

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA - CCMN**

**INSTITUTO DE QUÍMICA - IQ**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**Estudo metabólico da proteína Pdp3 de *Saccharomyces cerevisiae*, cujo domínio PWWP se assemelha ao do oncogene humano NSD3**

**Diego Seixas Gomes de Almeida**

**RIO DE JANEIRO**

**2015**

# **Estudo metabólico da proteína Pdp3 de *Saccharomyces cerevisiae*, cujo domínio PWWP se assemelha ao do oncogene humano NSD3**

**Diego Seixas Gomes de Almeida**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do diploma de Químico com Atribuições Tecnológicas.

Orientadora: Elis Cristina Araújo Eleutherio

Coorientadores: Germana Breves Rona

Anderson de Sá Pinheiro

Rio de Janeiro

Agosto/2015

ESTUDO METABÓLICO DA PROTEÍNA PDP3 DE *SACCHAROMYCES  
CEREVISIAE*, CUJO DOMÍNIO PWWP SE ASSEMELHA AO DO ONCOGENE  
HUMANO NSD3

Diego Seixas Gomes de Almeida

Orientadora: Elis Cristina Araújo Eleutherio.

Coorientadores: Germana Breves Rona e Anderson de Sá Pinheiro

Projeto final submetido ao corpo docente do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IQ/UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do diploma de Químico com Atribuições Tecnológicas.

Aprovado por:

Dr<sup>a</sup>. Elis Cristina Araújo Eleutherio (*Orientadora*)  
Instituto de Química – UFRJ

Dr. Anderson de Sá Pinheiro (*Coorientador*)  
Instituto de Química – UFRJ

Msc. Germana Breves Rona (*Coorientadora*)  
Instituto de Química – UFRJ

Dr<sup>a</sup> Bianca Cruz Neves (*Membro da Banca*)  
Instituto de Química - UFRJ

Msc. Mauro Braga França (*Membro da Banca*)  
Instituto de Química – UFRJ

Rio de Janeiro

Agosto/2015

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Cesar e Márcia, pelo amor e carinho essenciais em minha vida e por serem sempre minha maior fonte de inspiração e motivação, meus maiores críticos e, ao mesmo tempo, meus maiores apoiadores. Ao meu irmão Bruno, fonte constante de amizade e companheirismo, o maior tesouro da minha vida. A meus avós, Janete e Afonso, Generosa (em memória) e José, por sempre me incentivarem em sua humildade e simplicidade na escolha dos meus caminhos. Ao meu afilhado, Leonardo Dias Pereira, pela alegria que me proporciona, por ser meu amigo, por me lembrar a todo momento que ainda há uma criança dentro de mim e por me motivar a lutar para construir um futuro melhor. Minha maior inspiração para o essencial e simples da vida.

Aos meus orientadores Elis Cristina Araújo Eleutherio, Germana Breves Rona e Anderson de Sá Pinheiro pelos conselhos e discussões valiosas e essenciais para o desenvolvimento do meu projeto e para meu amadurecimento como pesquisador. Agradeço em especial a Germana pela paciência, atenção e carinho que tornaram o desenvolvimento deste trabalho prazeroso e proveitoso.

Aos meus amigos, colegas e companheiros de bancada do Laboratório de Investigação de Fatores de Estresse (LIFE) por todo o apoio, ajuda e por compartilharem sua experiência e conhecimento. É muito gratificante trabalhar ao lado de pessoas capazes de trazer alegria e personalidade ao ambiente de laboratório, tornando os dias menos cansativos e as horas mais prazerosas. Vocês são a alma deste laboratório. Agradeço em especial ao meu amigo Vinícius Simas Grilo pelas muitas discussões sobre projetos, sonhos e ideias, pelo seu apoio, torcida e por sua amizade sempre presente ao longo de toda minha graduação.

Aos meus amigos de longa data do Rio que estiveram sempre presentes em minhas conquistas e derrotas, fornecendo apoio nas horas mais difíceis e compartilhando momentos de alegria que para sempre ficarão recordados em meu coração. Aos meus amigos mais recentes de Valença, pessoas que pude conhecer há pouco tempo e ao lado das quais pude compartilhar bons momentos e que torcem por mim.

Aos meus amigos / irmãos de intercâmbio na McGill University, Cristian Tomazela Prado e Marina Jorge Amaral, por se fazerem presentes e me darem apoio em um momento essencial para traçar meus caminhos futuros.

Ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro e a todos os professores e mestres que passaram pela minha vida durante minha Graduação e meu curso técnico, fornecendo conhecimento e inspiração para que me dedicasse com afinco e paixão à área da Química. Somente conhecimento compartilhado é capaz de edificar pessoas melhores que, por sua vez, constroem um mundo melhor a cada dia. Agradeço em especial à professora Fernanda Arruda Nogueira Gomes da Silva, minha primeira orientadora científica, que me introduziu à pesquisa e me ensinou que quando nos dedicamos com afinco ao que amamos, com humildade e respeito ao que fazemos, colhemos bons frutos do nosso trabalho.

Durante minha jornada até aqui, tive mestres que me ensinaram que conhecimento sem propósito não vale de nada. Sou muito grato por ter feito parte deste projeto de pesquisa e muito me alegra saber que pude contribuir para trazer alguma luz sobre o assunto do câncer na esperança de que o conhecimento aqui edificado forneça esperança a tantas pessoas que sofrem direta ou indiretamente com a doença. Por fim, dedico este trabalho em memória a meu tio Robson Seixas Gomes, que faleceu de câncer e que não pode estar aqui para presenciar este projeto, mas que sempre esteve presente em meu coração e na minha memória durante seu desenvolvimento.

Encontrei o meu propósito e agradeço a todos que estiveram ao meu lado em mais essa etapa da minha caminhada, pois ninguém anda por essa vida sozinho.

*Diego Seixas Gomes de Almeida*

***Grandescunt Aucta Labore***  
*(Pelo trabalho, todas as coisas crescem)*

## RESUMO

### PROJETO DE CURSO

**TÍTULO:** ESTUDO METABÓLICO DA PROTEÍNA PDP3 DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, CUJO DOMÍNIO PWWP SE ASSEMELHA AO DO ONCOGENE HUMANO NSD3

**ALUNO:** Diego Seixas Gomes de Almeida

**ORIENTADORA:** Dr<sup>a</sup> Elis Cristina Araújo Eleutherio (DBQ - Instituto de Química - UFRJ)

**COORIENTADORES:** Dr. Anderson de Sá Pinheiro (DBQ - Instituto de Química - UFRJ) e Msc. Germana Breves Rona (DBQ - Instituto de Química - UFRJ)

O câncer de mama é um dos maiores causadores de mortes no mundo, sendo o mais incidente entre as mulheres. A amplificação da região cromossômica 8p11-12 está presente em 15% dos tumores de mama e desempenha um importante papel na patogênese desta doença. O gene WHSC1L1/NSD3 destaca-se como o principal candidato a oncogene líder dessa região. NSD3 sofre um splicing alternativo, resultando em uma isoforma curta (NSD3c), que possui apenas um domínio PWWP, e uma isoforma longa, que possui um domínio com atividade histona metil transferásica. A superexpressão de NSD3c é capaz de transformar células saudáveis em tumorais. O domínio PWWP está envolvido diretamente na interação com histonas e DNA, estando envolvido na regulação transcricional do DNA. Por identidade de sequência, foi identificada a proteína YLR455W/Pdp3 em *Saccharomyces cerevisiae*, cujo domínio PWWP é similar ao da NSD3c. A Pdp3 faz parte de um complexo de acetilação de histonas envolvido na regulação da transcrição gênica em levedura. O objetivo deste trabalho foi analisar a semelhança metabólica funcional entre a proteína Pdp3 de *S. cerevisiae*, produto da ORF YLR455W, e a proteína humana NSD3c através do estudo de características fenotípicas como velocidade de crescimento, perfil respiratório/fermentativo e sensibilidade a espécies reativas de oxigênio. A deleção da Pdp3 causou diminuição da taxa de crescimento acompanhada de um aumento do perfil respiratório e maior resistência a espécies reativas de oxigênio. A cepa de levedura deficiente em Pdp3 mas que superexpressa Pdp3 contendo o domínio PWWP mutado (mutação W21A), apresentou taxa de crescimento, níveis de peroxidação lipídica e consumo de glicose semelhantes aos da cepa deletada, sugerindo que tal domínio é essencial para a função metabólica desempenhada pela Pdp3. Por outro lado, a superexpressão da NSD3c aumentou a taxa de proliferação celular, levando a diminuição do metabolismo oxidativo e aumento da sensibilidade a espécies reativas de oxigênio. Um fenótipo similar foi observado para as mutantes que superexpressam Pdp3 selvagem ou a químera Pdp3 contendo o domínio PWWP da NSD3c humana. Os resultados indicam que as proteínas Pdp3 de levedura e NSD3c de humanos parecem desempenhar funções semelhantes no metabolismo celular. O resultado obtido com a químera de Pdp3 mostrou que o domínio PWWP de NSD3 humana substitui funcionalmente o domínio PWWP da proteína de levedura.

**Palavras-chave:** PWWP, NSD3, Pdp3

## Lista de Abreviações

<b>8p 11-12</b>	Região 11-12 do braço curto do cromossomo 8
<b><math>\alpha</math></b>	Coefficiente angular
<b><math>\Delta</math>Pdp3</b>	Equivalente à cepa $\Delta$ YLR455W
<b><math>\Delta</math>Pdp3:v</b>	Equivalente à cepa $\Delta$ YLR455WpECUh6
<b><math>\Delta</math>Pdp3:Pdp3++</b>	Equivalente à cepa $\Delta$ YLR455WpECUh6YLR455W
<b><math>\Delta</math>Pdp3:Quimera++</b>	Equivalente à cepa $\Delta$ YLR455WpECUh6YLR455W <sub>PWWPNSD3c</sub>
<b><math>\Delta</math>Pdp3:W21A++</b>	Equivalente à cepa $\Delta$ YLR455WpECUh6YLR455W <sub>W21A</sub>
<b><math>\mu</math></b>	Taxa específica de crescimento
<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>Abs<sub>570</sub></b>	Absorbância a 570 nm
<b>Abs<sub>532</sub></b>	Absorbância a 532 nm
<b>AdoMet</b>	S-adenosil metionina
<b>AdoHcy</b>	S- adenosil homocisteína
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>C5HCH</b>	Domínio rico em sequências de cisteína-histidina adjacente
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>C-terminal</b>	Carboxi-terminal
<b>CUP1</b>	Promotor Cobre
<b>DHAP</b>	Di-hidroxiacetona fosfato
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetra-acético
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>F</b>	Fator de conversão de peso seco
<b>Gdp</b>	Glicerol-3-fosfato desidrogenase
<b>GFP</b>	<i>Green fluorescent protein</i>
<b>Glut1</b>	Tansportador de glicose 1
<b>Glut3</b>	Tansportador de glicose 3
<b>GSH</b>	Glutathiona (forma reduzida)
<b>Gut1</b>	Glicerol quinase
<b>Gut2</b>	Glicerol3-fosfato desidrogenase
<b>H2A</b>	Histona 2A
<b>H2B</b>	Histona 2B
<b>H3</b>	Histona 3
<b>H4</b>	Histona 4
<b>HK</b>	Hexoquinase
<b>Hxk2</b>	Hexoquinase 2
<b>HMTase</b>	Histona metiltransferase

<b>HDMT</b>	Histona Desmetilase
<b>Kan</b>	Canamicina
<b>LLA</b>	Leucemia linfócita aguda
<b><i>ln</i></b>	Logaritmo neperiano
<b>LMA</b>	Leucemia mielóide aguda
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)
<b>NADH</b>	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
<b>NSD</b>	<i>Nuclear receptor binding set domain</i>
<b>NSD1</b>	<i>Nuclear receptor binding set domain 1</i>
<b>NSD2</b>	<i>Nuclear receptor binding set domain 2</i>
<b>NSD3</b>	<i>Nuclear receptor binding set domain 3</i>
<b>NSD3c</b>	Isoforma curta da NSD3
<b>NSD3l</b>	Isoforma longa da NSD3
<b>N-terminal</b>	Amino-terminal
<b>NuA3</b>	Complexo histona acetil transferase de levedura
<b>ORF</b>	<i>Open Reading frame</i>
<b>pb</b>	Pares de base
<b>Pdp3</b>	<i>PWWP Domain Protein NuA3 de S.cerevisiae</i>
<b>PDC</b>	Piruvato descarboxilase
<b>PDH</b>	Piruvato desidrogenase
<b>pECUh6</b>	Vetor plasmidial com promotor CUP1
<b>PFK</b>	Fosfofrutoquinase
<b>pH</b>	Potencial de hidrogênio
<b>PHD</b>	Domínio <i>Plant Homeodomain</i>
<b>PK</b>	Piruvato quinase
<b>PWWP</b>	Domínio prolina-triptofano-triptofano-prolina
<b>PWWPNSD3c</b>	Domínio PWWP da NSD3c
<b>RD</b>	Replicação dependente
<b>RI</b>	Replicação independente
<b><i>S. cerevisiae</i></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>SD 2%</b>	Meio mínimo
<b>SDH</b>	Succinato desidrogenase
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SET</b>	Domínio <i>Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax</i>
<b>SN<sub>2</sub></b>	Substituição nucleofílica de segunda ordem
<b>Sod</b>	Superóxido dismutase
<b>T</b>	Tempo de geração médio
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico
<b>TBARS</b>	<i>Tiobarbithuric Acid Reactive Substances</i>
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético

<b>ura</b>	Uracila
<b>W</b>	Triptofano
<b>W21A</b>	Mutação do triptofano 21 por uma alanina
<b>WHISTLE</b>	Isoforma da NSD3
<b>WHSC1</b>	<i>Wolf-hirschhorn syndrome candidate 1 protein</i>
<b>WHSC1L1</b>	<i>Wolf-hirschhorn syndrome candidate 1-like protein 1</i>
<b>WT</b>	<i>Wild type</i> (By4741) (controle)
<b>WT:v</b>	Equivalente à cepa WTPeCUh6
<b>WT:NSD3c++</b>	Equivalente à cepa WTPeCUh6NSD3c
<b>X</b>	Concentração celular final
<b>X<sub>0</sub></b>	Concentração celular inicial
<b>YLR455W</b>	Gene codificador da proteína Pdp3 de <i>S.cerevisiae</i>
<b>YPD 2%</b>	Meio de cultura rico ( <i>yeast extract peptone dextrose</i> )

## Índice de Figuras

<b>Figura 1. Alterações fisiológicas comuns às células cancerígenas</b> (adaptado de Hanahan e Weinberg, 2000) .....	14
<b>Figura 2. Estrutura de organização do DNA eucariótico</b> .....	16
<b>Figura 3. Modificações covalentes pós-taducionais em histonas</b> .....	18
<b>Figura 4. Família NSD (Nuclear Receptor SET Domain)</b> (adaptado de Li <i>et al.</i> , 2009) .....	20
<b>Figura 5. Metilação em histonas</b> (adaptado de Morishita e Di Luccio, 2011a) .....	21
<b>Figura 6. Esquema dos complexos NuA3</b> (adaptado de Gilbert <i>et al.</i> , 2014) .....	25
<b>Figura 7. Substituição de genes da levedura por ortólogos humanos</b> (adaptado de Kachroo <i>et al.</i> , 2015) .....	26
<b>Figura 8. Semelhança metabólica entre o efeito Warburg de células tumorais e o efeito Crabtree (repressão catabólica) de <i>S. cerevisiae</i></b> (adaptado de Diaz-Ruiz <i>et al.</i> , 2011) .....	30
<b>Figura 9. Mecanismo de repressão catabólica (efeito Crabtree) em levedura</b> (adaptado de Gancedo e Flores, 2008) .....	31
<b>Figura 10. Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a defesa antioxidante estimulada pelo estresse oxidativo</b> (adaptado de França <i>et al.</i> , 2007) .....	34
<b>Figura 11. Mapa do vetor plasmidial pECUh6</b> .....	37
<b>Figura 12. Determinação da velocidade específica de crescimento (<math>\mu</math>) e do tempo de geração médio (T) de células de levedura deficientes em Pdp3 e superexpressando a Pdp3 mutada em W21A e de seus controles em condições de metabolismo fermentativo sob repressão catabólica (efeito Crabtree)</b> .....	46
<b>Figura 13. Sensibilidade ao estresse oxidativo de células deficientes na Pdp3 e superexpressando a Pdp3 mutada em W21A e de seu controle em condições de metabolismo fermentativo sob repressão catabólica (efeito Crabtree)</b> .....	48
<b>Figura 14. Sensibilidade ao estresse oxidativo de células deficientes na Pdp3 e superexpressando a Pdp3 mutada em W21A e de seu controle em condições de metabolismo fermentativo sob repressão catabólica (efeito Crabtree)</b> .....	49

<b>Figura 15. Consumo de glicose em condições não proliferantes de células deficientes na Pdp3 e superexpressando a Pdp3 mutada em W21A em relação a WT coletadas em metabolismo fermentativo .....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 16. Determinação da velocidade específica de crescimento (<math>\mu</math>) e do tempo de geração médio (T) de células de levedura superexpressando a NSD3c humana, a Pdp3, a quimera da Pdp3 contendo o domínio PWWP da NSD3c humana e seus controles em condições de metabolismo respiratório .....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 17. Sensibilidade ao estresse oxidativo de células de levedura superexpressando a NSD3c humana e superexpressando a Pdp3 e seus controles em condições de metabolismo respiratório.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 18. Sensibilidade ao estresse oxidativo de células de levedura superexpressando a NSD3c humana, a Pdp3 e a quimera da Pdp3 contendo o domínio PWWP da NSD3c humana e seus controles em condições de metabolismo respiratório .....</b>	<b>54</b>

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	<b>13</b>
1.1. Câncer .....	13
1.2. Efeito Warburg .....	14
1.3. Epigenética .....	15
1.4. Amplicon 8p11-12 .....	18
1.5. Família NSD ( <i>Nuclear Receptor SET Domain</i> ) .....	19
1.6. NSD3 ( <i>Nuclear Receptor SET Domain-Containing 3</i> ) .....	22
1.7. Domínio PWWP .....	23
1.8. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	25
1.9. Estágios de Crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	27
1.10. Efeito Warburg X Efeito Crabtree .....	28
1.11. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) .....	33
1.12. Metabolismo do Glicerol .....	35
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>36</b>
<b>3. Material e Métodos</b> .....	<b>37</b>
3.1. Cepas e Condições de Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	37
3.2. Meios de Cultura e Condições de Crescimento de Bactérias <i>E. coli</i> .....	41
3.3. Manipulação do DNA Plasmidial ( <i>Miniprep</i> ) .....	41
3.4. Transformação de Levedura em Fase Estacionária .....	41
3.5. Curva de Crescimento, Determinação da Taxa Específica de Crescimento ( $\mu$ ) e Determinação do Tempo de Geração Médio (T) .....	41
3.6. Tolerância ao Estresse Oxidativo .....	42
3.6.1. Viabilidade Celular .....	42
3.6.2. Peroxidação Lipídica .....	43
3.7. Consumo de Glicose .....	43
3.8. Análise de Dados e Análise Estatística .....	44
<b>4. Resultados e Discussão</b> .....	<b>45</b>
4.1. Efeitos da Pdp3 e suas modificações em células de levedura sob condições de repressão catabólica (efeito Crabtree) .....	45
4.2. Efeitos da Pdp3 de levedura e da NSD3c humana e suas modificações em levedura sob condições de metabolismo respiratório .....	51
<b>5. Conclusão</b> .....	<b>56</b>
<b>6. Referências</b> .....	<b>57</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

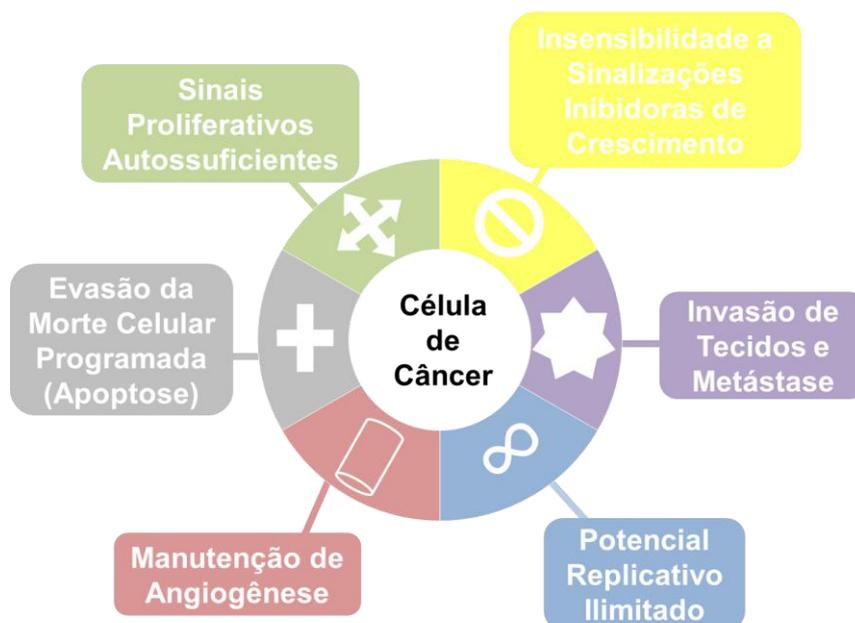
### **1.1. Câncer**

Câncer é o nome dado a um conjunto heterogêneo de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células (neoplasia) que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. A formação de neoplasia ocorre devido a um desequilíbrio entre a proliferação celular (ciclo celular) e a apoptose (morte celular programada). Esses eventos são regulados por uma grande quantidade de genes que, ao sofrerem mutações, podem ter seus produtos expressos de maneira alterada, ocasionando uma desregulação destes processos e culminando na formação de um tumor. Portanto, o câncer é uma doença de múltiplas etiologias. É causado essencialmente por uma anomalia no padrão de expressão gênica (Albert e Helin, 2010), cuja evolução ocorre devido a alterações genéticas e epigenéticas que levam à ativação de oncogenes e/ou à inativação de genes supressores de tumor (Albert e Helin, 2010; Lucio-Eterovic e Carpenter, 2011). Tais alterações provocam modificações na fisiologia celular que levam ao crescimento celular desordenado e à invasão de tecidos adjacentes e outros órgãos, causando a morbidade e mortalidade envolvendo a doença. O câncer pode se desenvolver em diversos tipos celulares, podendo ser mais ou menos agressivo e invasivo (Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA).

O câncer pode ser desencadeado por fatores intrínsecos ao próprio organismo, como são os casos de pré-disposição genética, ou por fatores externos ambientais. São raros os casos de cânceres que se devem exclusivamente a fatores hereditários, familiares e étnicos, apesar de o fator genético exercer um importante papel na oncogênese. A maioria dos casos de câncer está relacionada a fatores de risco externos (ambientais) tais como hábitos alimentares, exposição a agentes químicos carcinogênicos e mutagênicos, exposição à radiação solar, infecções por alguns tipos virais, entre outros (Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA).

Apesar de o câncer ser um grupo complexo e heterogêneo de doenças que pode afetar uma grande variedade de grupos celulares, existem algumas alterações essenciais que são comuns a todos os tipos de células cancerígenas, tais como: manutenção de sinais proliferativos autossuficientes, insensibilidade a sinalizações inibidoras de crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose),

potencial replicativo ilimitado, manutenção de vascularização (angiogênese), invasão de tecidos e metástase (Hanahan e Weinberg, 2000) (Figura 1).



**Figura 1. Alterações fisiológicas comuns às células cancerígenas** (adaptado de Hanahan e Weinberg, 2000).

## 1.2. Efeito Warburg

Em células saudáveis a fosforilação oxidativa mitocondrial é utilizada para a produção de energia (Santidrian *et al.*, 2013). Por outro lado, as células tumorais apresentam um aumento expressivo da glicólise e da expressão das enzimas desta via durante a proliferação, convertendo a maior parte da glicose em L-lactato mesmo em condições normais de oxigenação. Este fenômeno é conhecido como efeito Warburg ou glicólise aeróbica (ou ainda fermentação aeróbica, de maneira mais específica) e representa uma marca metabólica bastante específica das células tumorais, reafirmando a ideia de que o câncer é também uma doença de características metabólicas. As causas do efeito Warburg são controversas. Inicialmente foi proposto que o aumento da glicólise, mesmo em presença de oxigênio seria uma manifestação metabólica de um problema mais fundamental na fisiologia da célula tumoral: o comprometimento da respiração celular (Warburg, 1956), de modo que um aumento no fluxo da via glicolítica seria um mecanismo compensatório de produção de energia para manter a célula tumoral viável. Apesar de a glicólise aeróbica e glicólise anaeróbica serem similares na produção de lactato

(formado na redução do piruvato para regeneração do  $\text{NAD}^+$ ), a glicólise anaeróbica se origina da ausência de oxigênio enquanto a glicólise aeróbica (mais precisamente fermentação aeróbica) teria sua origem no comprometimento da respiração celular nas células cancerígenas. Foi verificado que células capazes de elevar as taxas da via glicolítica durante dano respiratório prolongado foram capazes de gerar câncer, enquanto que aquelas incapazes de elevar a glicólise quando submetida aos mesmos danos pereceram devido à falha energética (Warburg, 1956). Desta maneira, em termos metabólicos, células tumorais se desenvolveriam a partir de células saudáveis na ocorrência de danos graduais e irreversíveis na capacidade respiratória.

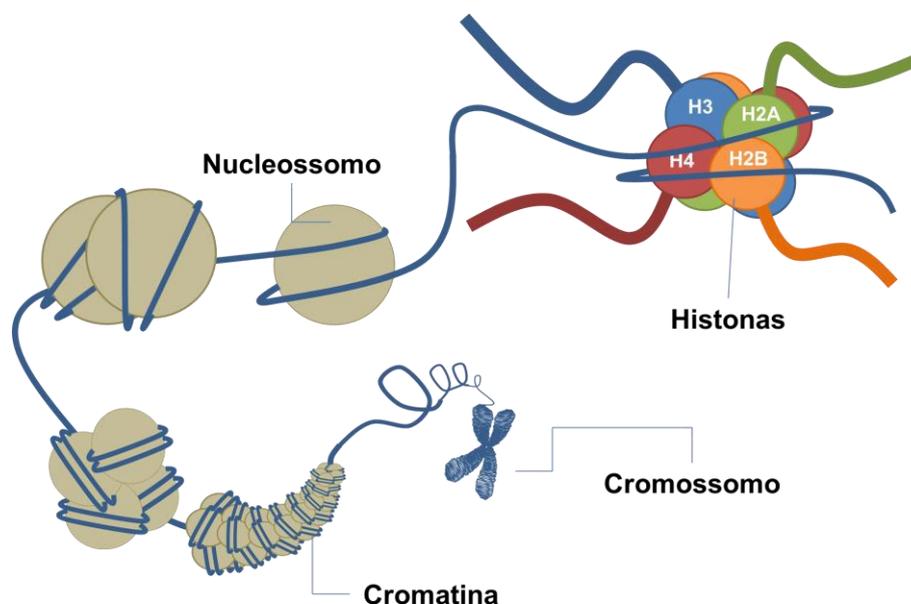
Entretanto, a teoria de Warburg não relaciona o descontrole dos mecanismos moleculares de crescimento celular ao comprometimento da respiração e não leva em consideração os aspectos mutacionais associados aos tumores. Além disso, há um considerável número de evidências que desafia o paradigma da célula cancerosa ser puramente "glicolítica". Foi evidenciado que algumas células cancerosas podem alternar de forma reversível entre fermentação e respiração, dependendo da ausência ou a presença de glicose e das condições ambientais. Esta propriedade representa uma vantagem das células cancerosas *in vivo*, uma vez que podem adaptar o seu metabolismo a microambientes heterogêneos em condições de crescimento acelerado em tumores sólidos malignos (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011). A reprogramação do metabolismo energético através do efeito Warburg e as alterações metabólicas expressas pelas células de câncer seriam apenas a manifestação de uma causa mais fundamental em nível de expressão gênica selecionada durante a progressão tumoral. A visão do câncer como doença metabólica foi sendo gradualmente incorporada à visão do câncer como doença genética. Desta forma torna-se crucial compreender os mecanismos metabólicos e genéticos pelos quais as células cancerosas podem regular de forma reversível o seu metabolismo energético.

### **1.3. Epigenética**

Após sofrer uma mutação gênica somática, como translocação, amplificação ou mutação pontual, um proto-oncogene pode tornar-se eventualmente um oncogene. Um mecanismo genético importante para a ativação de oncogenes no câncer humano é a amplificação de determinadas regiões cromossomais, o que leva

à existência de múltiplas cópias de um proto-oncogene, que codifica proteínas relacionadas ao crescimento e diferenciação celular e à transdução e execução de sinais mitóticos. A presença de um grande número de cópias de um gene potencializa a sua função e, quando de sua ativação, ocorre um aumento nos níveis de expressão e, conseqüentemente, da atividade das proteínas codificadas por este, levando ao desenvolvimento de um tumor (Yang *et al.*, 2010).

Anomalias presentes nos padrões da expressão gênica, relacionadas com diversos tipos de câncer e doenças ligadas ao desenvolvimento e diferenciação celulares, não estão envolvidas apenas com mutações no DNA, mas também estão relacionadas a mudanças epigenéticas (Albert e Helin, 2010; Morishita e Di Luccio, 2011b). O DNA eucariótico encontra-se empacotado dentro do núcleo através da sua associação com proteínas denominadas histonas, formando a unidade fundamental da cromatina, o nucleossomo (Figura 2). O nucleossomo é constituído por 146 pares de base (pb) de DNA envolvidos em torno de um octâmero de histonas composto por duas cópias de cada histona: H2A, H2B, H3 e H4 (Völkel e Angrand, 2007; Albert e Helin, 2010).

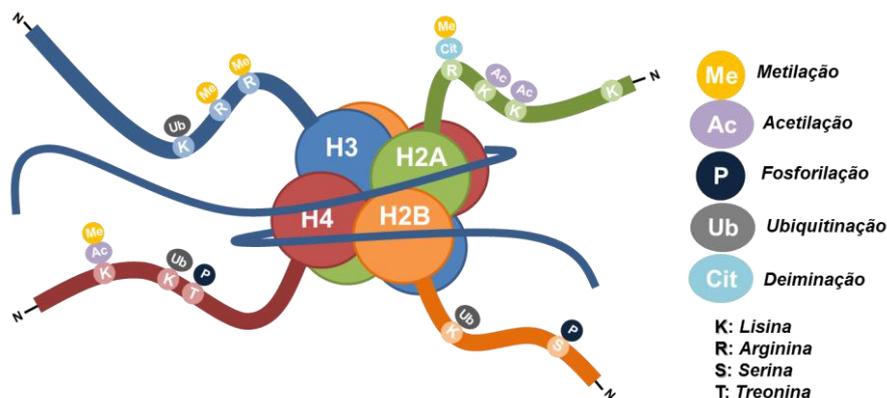


**Figura 2. Estrutura de organização do DNA eucariótico:** O DNA eucariótico está empacotado dentro do núcleo através da sua associação com proteínas denominadas histonas, formando a unidade fundamental da cromatina, o nucleossomo.

O enovelamento e a condensação dos nucleossomos resultam em uma mudança da cromatina dificultando as atividades que requerem acesso ao material

genético. Para alterar esse panorama as células desenvolveram mecanismos para marcar e modificar a estrutura da cromatina, incluindo a modificação química de histonas e o recrutamento de fatores responsáveis pelo remodelamento da cromatina que alteram o nível de acessibilidade ao material genético do nucleossomo (Huen *et al.*, 2010). A cromatina sofre mudanças estruturais que facilita os processos biológicos de replicação e reparo do DNA, recombinação, progressão do ciclo celular e transcrição, apresentando um papel importante neste último processo (Albert e Helin, 2010; Huen *et al.*, 2010; Slater, 2003). Desta forma, o nucleossomo tem um papel importante na regulação epigenética de muitos processos celulares como transcrição, reparo de DNA e apoptose (Vermeulen *et al.*, 2010).

As caudas N-terminais das histonas são submetidas a modificações covalentes pós-traducionais que regulam a transcrição gênica tais como metilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação, além disso, complexos multi-proteicos modulam as interações DNA-histona (Figura 3). Essas modificações tem como objetivo recrutar as proteínas reguladoras que exercem a sua função sobre a cromatina e alterar a interação das histonas com o DNA (Vermeulen *et al.*, 2010). A transcrição pode ser controlada (ativada/silenciada) através de processos como acetilação/desacetilação, metilação/desmetilação e ubiquitinação/desubiquinação, ocorridos nas caudas das histonas (H2A, H2B, H3 e H4) (Morishita e Di Luccio, 2011a). Esses mecanismos trabalham juntos para permitir a regulação espacial e temporal do acesso ao material genético, facilitando e controlando o processo de replicação do DNA e a expressão gênica (Huen *et al.*, 2010). Desta forma a acessibilidade do DNA para as proteínas que atuam nesses processos é afetada pela condensação da cromatina que é resultado das modificações químicas nas caudas das histonas (Völkel e Angrand, 2007).



**Figura 3. Modificações covalentes pós-traducionais em histonas:** Mudanças pós-traducionais que ocorrem nos resíduos de aminoácidos nas caudas N-terminal de histonas (metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação e deiminação).

As histonas podem ser divididas em duas classes: replicação-dependente (RD) e replicação- independente (RI). As histonas RD são altamente induzidas antes e durante a replicação do DNA; esse grupo é constituído pelo conjunto central das histonas que compõem o nucleossomo (H2A, H2B, H3 e H4). A classe RI é formada por um grupo de variantes das histonas expressas a baixos níveis em todas as etapas do ciclo celular. As variantes H2A.Z e H3.3 das histonas H2A e H3 atuam especificamente no processo de transcrição, já a variante H2A.X está diretamente envolvida na manutenção da estabilidade do genoma (Kurat *et al.*, 2014).

Durante a regulação gênica alguns genes são ativados enquanto outros são reprimidos, resultando em um padrão de expressão que caracteriza a identidade da célula. Na célula tumoral, esta modulação epigenética pode estar comprometida, o que leva à expressão de oncogenes e à inativação de genes supressores de tumor. Estas alterações genéticas e epigenéticas são responsáveis por ocasionar a iniciação e propagação do câncer.

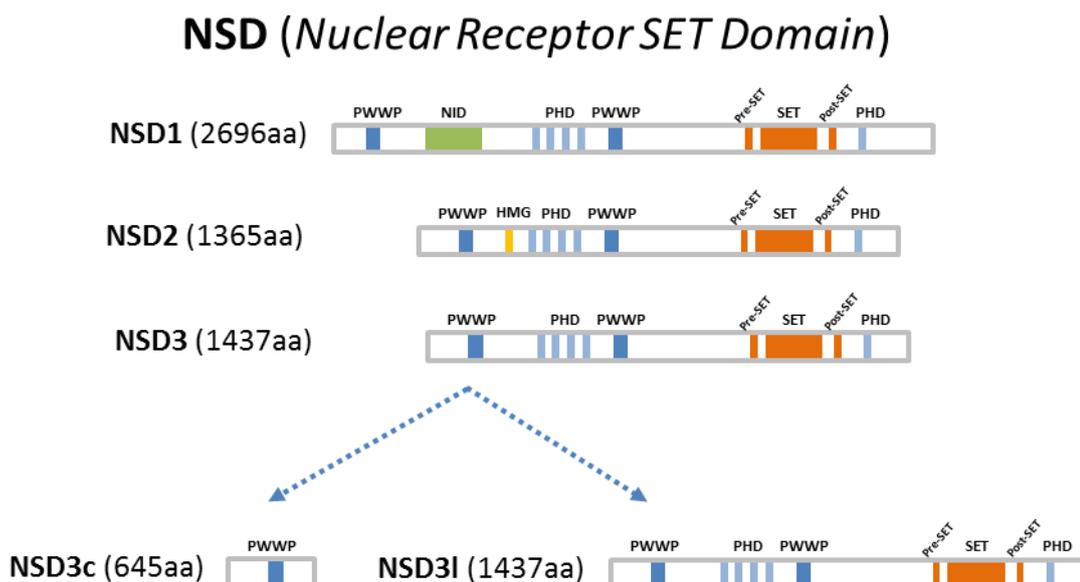
#### 1.4. Amplicon 8p11-12

A amplificação da região 11-12 do braço curto do cromossomo 8 (8p11-12) ocorre em aproximadamente 15% dos casos de câncer de mama humano (Lucio-Etereovic e Carpenter, 2011; Yang *et al.*, 2010). O amplicon 8p11-12 contém vários oncogenes que poderiam desempenhar um papel no desenvolvimento do câncer de mama. Nesta região foram identificados 23 genes relacionados à progressão tumoral (Yang *et al.*, 2010). Yang e colaboradores (2010) investigaram sistematicamente as

propriedades transformantes de 13 candidatos a oncogenes do amplicon 8p11-12 *in vitro*, descobrindo que os genes *WHSC1L1*, *DDHD2* e *ERLIN2* são os oncogenes mais expressivos, apresentando maior capacidade de transformar células humanas saudáveis em células com o fenótipo alterado. Entre esses candidatos, foi identificado o gene referente a síndrome de Wolf-Hirschhorn (*WHSC1L1*), também conhecido como NSD3, como um dos principais candidatos a oncogenes líder da região 8p11-12 amplificada no câncer de mama. A superexpressão de *WHSC1L1* (NSD3) em células MCF-10A ocasionou a maior eficiência de transformação de uma célula de mama saudável em tumoral dentre os genes testados (Yang *et al.*, 2010).

### 1.5. Família NSD (*Nuclear Receptor SET Domain*)

O gene *WHSC1L1* codifica uma proteína pertencente à família NSD (*Nuclear Receptor SET Domain*) composta por três proteínas que tem atividade histona metiltransferases (HMTases): NSD1 (*loci* 5q35), NSD2/MMSET/*WHSC1* (*loci* 4p16) e NSD3/*WHSC1L1* (*loci* 8p12) (Figura 4) (Morishita, 2011a, 2011b). Os mecanismos de ação de tais proteínas ainda permanecem desconhecidos (Morishita e Di Luccio, 2011b). As três proteínas dessa família estão envolvidas em muitas doenças, incluindo vários tipos de câncer, devido a alterações nos *loci* dos genes e à alteração do nível de expressão dessas proteínas, porém pouco se sabe sobre sua participação nestes processos. A NSD1 está associada à leucemia mielóide aguda, mieloma múltiplo e câncer de pulmão; a NSD2 com mieloma múltiplo e câncer de pulmão e a NSD3 com leucemia mielóide aguda, câncer de mama e pulmão. Sabe-se que desempenham um papel relacionado ao controle de metilação de caudas de histonas, apresentando um papel importante na integridade da cromatina (Morishita e Di Luccio, 2011a; Lucio-Etereovic e Carpenter, 2011). Suspeita-se que a diversidade funcional das três proteínas NSD se origina devido às especificidades de seus domínios catalíticos SET (*Su(var)3-9*, *Enhancer of Zeste*, *Trithorax*), que as levam a atuar sobre diferentes substratos. O domínio SET está presente em grande parte das proteínas que possuem a função de histona metiltransferase, sendo específico para metilação de resíduos de lisina (K).

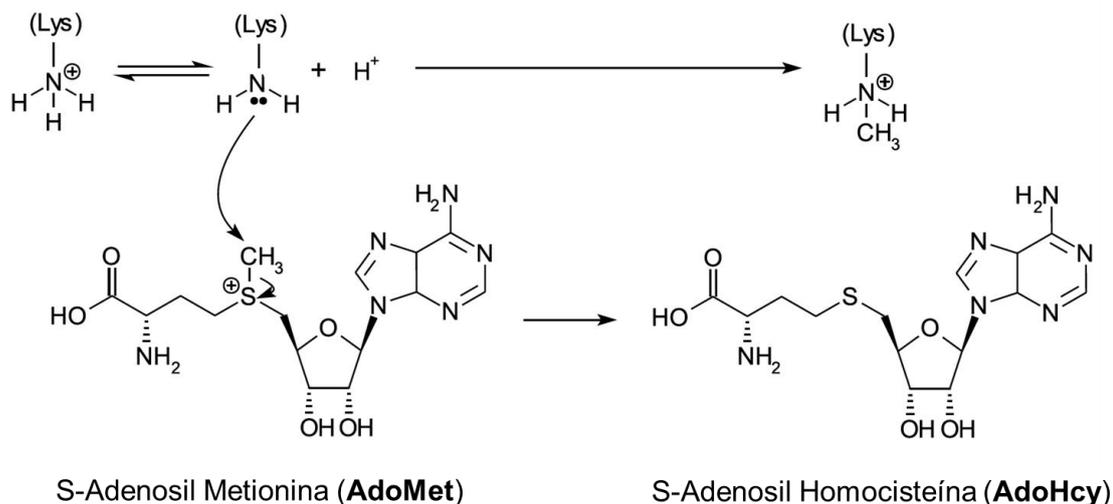


**Figura 4. Família NSD (Nuclear Receptor SET Domain):** A família NSD é composta por 3 proteínas: NSD1(2696 aa), NSD2 (1365 aa) e NSD3 (1437 aa). NSD1 e NSD2 são compostas pelos mesmos domínios: dois PWWP, cinco PHD e um SET. NSD3 sofre um splicing alternativo resultando em uma isoforma curta (645 aa), possuindo apenas o primeiro domínio PWWP; e uma isoforma longa (1437 aa) (adaptado de Li *et al.*, 2009).

A metilação de histonas ocorre em resíduos de arginina (R) e lisina (K) da cauda N-terminal (Albert e Helin, 2010). A lisina da histona se liga à cavidade formada pelo domínio SET e o domínio pós-SET das enzimas do tipo histona metiltransferase, responsáveis pela metilação das histonas. O cofator AdoMet (S-adenosil metionina) se liga à cavidade presente na outra extremidade do domínio SET, agindo como doador do grupo metil. A reação que ocorre entre o AdoMet e a amina da lisina é uma substituição nucleofílica de segunda ordem ( $SN_2$ ) (Figura 5) (Morishita e Di Luccio, 2011a).

Existem aproximadamente 55 proteínas humanas com a função única de metilar histonas, evidenciando a importância desta modificação covalente na manutenção da cromatina e na regulação da transcrição (Albert e Helin, 2010; Morishita e Di Luccio, 2011a). A presença de uma histona metiltransferase (HMTase) e uma histona desmetilase (HDMT) no mesmo complexo permite a troca dos estados transcricionais apagando modificações pré-existentes, seguida de uma nova marcação da cromatina. Logo, é necessário um controle e ajuste fino da expressão, atividade e recrutamento das HMTases e HDMTs; um erro nessa regulação é capaz

de alterar o balanço transcricional levando à expressão inapropriada de um gene podendo desencadear uma doença (Albert e Helin, 2010).



**Figura 5. Metilação em histonas:** Mecanismo de metilação em resíduos de lisina (adaptado de Morishita e Di Luccio, 2011a).

Erros na regulação de HMTases estão relacionadas ao desenvolvimento de cânceres; existem cerca de 50 argininas e lisinas em histonas que sofrem metilações, cerca de 22 delas estão envolvidas em casos de câncer e outras doenças humanas (Albert e Helin, 2010). A agressividade do câncer também está relacionada com a regulação deficiente de algumas HMTases e, apesar de ainda não terem sido completamente evidenciados os mecanismos deste processo, foram identificadas algumas regiões cromossômicas que são amplificadas ou deletadas em casos de câncer. Essas mudanças intragênicas foram descritas para os genes: MLL3, PRDM1, PRDM2, EHMT1, SMYD2, PRDM12 (Albert e Helin, 2010), NSD1, NSD3/WHSC1L1, (Albert e Helin, 2010; Morishita e Di Luccio, 2011b), NSD2/MMSET/WHSC1, Suv39h, EZH2, MLL, Riz (Morishita e Di Luccio, 2011b). Como as HMTases são importantes reguladoras do processo de diferenciação celular, supõe-se que um erro na regulação das HMTases leve ao bloqueio da diferenciação normal da célula, contribuindo para o desenvolvimento tumoral, uma vez que HMTases geralmente são encontrados superexpressas nesses tecidos (Albert e Helin, 2010; Morishita e Di Luccio, 2011b). A metilação de lisina ou arginina, ou qualquer outra modificação de histonas, pode atuar ativando ou reprimindo a transcrição. Todas as modificações covalentes das histonas contribuem

para regular as diversas atividades associadas à cromatina (Morishita e Di Luccio, 2011b).

Embora existam relatos conflitantes sobre as atividades catalíticas das proteínas NSD, tornou-se claro que os três membros são H3 mono e dimetilases, altamente específicas quando os nucleossomos são usados como seus substratos (He *et al.*, 2013). Estudos indicam que NSD1 (lisina-HMTase) atua especificamente na transferência de grupos metilas para lisina (K)-36 na histona H3 (H3K36) e para lisina-20 da histona H4 (H4K20). NSD1 é uma proteína de 2696 aminoácidos (aa), que contém quatro domínios de PHD (*Plant Homeodomain*), dois domínios PWWP (motivo de sequência prolina-triptofano-triptofano-prolina), e um domínio SET responsável pela atividade HMTase. NSD2 (lisina-HMTase H3K4 e H4K20) e NSD3 (lisina-HMTase H3K36) compartilham os mesmos domínios funcionais com NSD1, mas em uma sequência mais curta de 1365 aminoácidos no caso da NSD2 e 1437 aminoácidos no caso da NSD3 (Morishita e Di Luccio, 2011a, 2011b).

### **1.6. NSD3 (*Nuclear Receptor SET Domain-Containing 3*)**

A NSD3, também conhecida como WHSC1L1 (Síndrome de Wolf-Hirschhorn Candidato 1 do Tipo 1), é um membro da família de histona metiltransferase NSD. Algumas isoformas da NSD3 foram relatadas. A isoforma mais longa, NSD3l, codifica uma proteína de 1437 aminoácidos. NSD3l inclui dois domínios PWWP (motivo de sequência prolina-triptofano-triptofano-prolina), cinco domínios PHD (um domínio C5HCH rico em sequências de cisteína-histidina adjacentes) e um domínio SET que possui a atividade de histona metiltransferase. Em tecido humano, a NSD3l é expressa em elevados níveis no cérebro, coração, músculo esquelético e na placenta, e em níveis de expressão mais baixos no pâncreas, fígado, pulmão e rim (Zhou, 2010). O produto do *splicing* alternativo do exon 10 resulta em um transcrito que codifica a isoforma curta da NSD3 (NSD3c), uma proteína de 645 aminoácidos. Os 619 aminoácidos N-terminais que formam a NSD3c são idênticos aos da região N-terminal da NSD3l e apenas o primeiro domínio PWWP da NSD3l está incluído na isoforma NSD3c (Yang *et al.*, 2010). A terceira isoforma da NSD3, WHISTLE, é expressa em um nível baixo em comparação com as outras isoformas da NSD3, contém apenas o segundo domínio PWWP, o domínio SET e o domínio pós-SET (Zhou *et al.*, 2010).

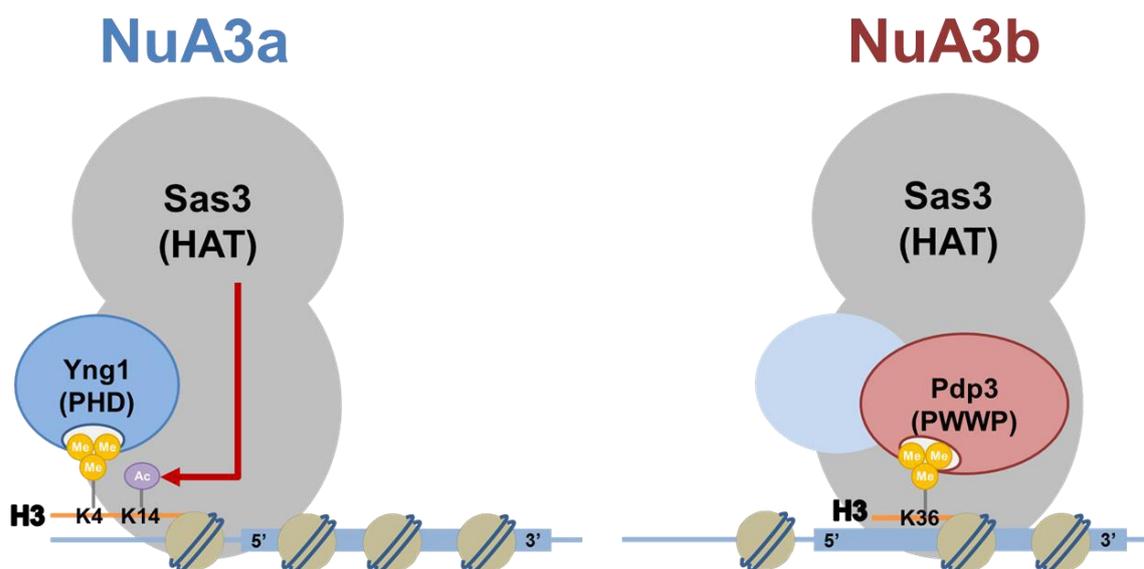
O gene humano *NSD3* tem sido implicado em câncer hematológico, de mama e de pulmão, sugerindo um papel importante para *NSD3* no controle do crescimento e diferenciação celular. Foi observada uma desregulação dos níveis de *NSD3* durante tratamento de leucemia, o nível de expressão de RNAm da *NSD3* em pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) e leucemia linfocitária aguda (LLA) foi maior do que nos controles normais (Zhou *et al.*, 2010). A *NSD3* é amplificada em alguns casos de câncer de mama, apresentando alto potencial transformante (Albert e Helin, 2010). Ainda não se sabe ao certo como a *NSD3* atua e pouco se conhece sobre seu alvo e mecanismo de ação (Albert e Helin, 2010; Lucio-Etereovic e Di Luccio, 2011). Devido a sua homologia com a *NSD1* e a *NSD2*, supõe-se que ela seja uma supressora da transcrição (Albert e Helin, 2010). O silenciamento do gene *WHSC1L1* (*NSD3*), do amplicon 8p11-12, em células de câncer de mama resulta numa perda profunda de crescimento e sobrevivência destas células (Yang *et al.*, 2010). A *NSD3l* e a *NSD3c* estão localizadas no núcleo, e podem atuar como oncoproteínas transformantes em células de câncer de mama. Foi observado ainda que a expressão da isoforma curta (*NSD3c*) é suficiente para transformar uma célula saudável em uma célula cancerosa (Yang *et al.*, 2010).

### 1.7. Domínio PWWP

O domínio PWWP descoberto no gene *WHSC1* é encontrado apenas em organismos eucarióticos e possui o motivo de sequência prolina-triptofano-triptofano-prolina (pro-trp-trp-pro) conservado (Alvarez-Venegas e Avramova, 2012; Wu *et al.*, 2011). O domínio PWWP contém aproximadamente 140 aminoácidos e está presente em proteínas nucleares relacionadas ao crescimento, divisão e diferenciação celular, sendo encontrado em mais 60 proteínas eucarióticas implicadas na regulação da transcrição e organização da cromatina (Alvarez-Venegas e Avramova, 2012). O domínio PWWP pertence à família chamada de *Royal Family*, a qual também pertencem os domínios Tudor, Chromo e MBT (Wang *et al.*, 2009; Alvarez-Venegas e Avramova, 2012; Wu *et al.*, 2011). Esse domínio contém uma cavidade hidrofóbica formada por resíduos aromáticos para reconhecimento de resíduos de lisina metilados em histonas, ligando-se simultaneamente à histona e ao DNA, contribuindo para manutenção da habilidade de reconhecimento do nucleossomo (Wang *et al.*, 2009; Qin, 2014). Desta forma, o domínio PWWP é um motivo de reconhecimento capaz de se ligar a resíduos

metilados de lisina em histonas (Wu *et al.*, 2011), desempenhando um papel importante na regulação epigenética (Yang *et al.*, 2010). O domínio PWWP é frequentemente associado com domínios SET, que metilam resíduos de lisina em histonas. Várias proteínas que contêm o domínio PWWP demonstraram estar envolvidas na regulação da transcrição bem como no reparo e metilação do DNA (Slater *et al.*, 2003).

Muitas proteínas possuem resíduos do domínio PWWP conservados. Entre essas, encontram-se a proteína humana NSD3 e o produto da ORF YLR455W de *Saccharomyces cerevisiae*, também conhecido como Pdp3 (**PWWP Domain Protein NuA3**), (Stec *et al.*, 2000). A proteína Pdp3 de *S. cerevisiae* é composta de 304 aminoácidos e possui um único domínio PWWP similar ao da NSD3c (30,65% de identidade de sequência) (Rona, 2014); ela se encontra localizada no núcleo, porém se desloca para o citoplasma em resposta a situações de estresse como hipóxia (Dastidar *et al.*, 2012). A Pdp3 é uma proteína que compõe o complexo NuA3, que possui a função de histona acetiltransferase e está envolvido no processo de transcrição de DNA. Grande parte dos genes controlados por este complexo estão envolvidos no processo de duplicação do DNA. O complexo NuA3 existe sob duas formas diferentes: NuA3a, que se liga especificamente a H3K4me3 (resíduo de lisina na posição 4 trimetilado da histona H3) através do domínio PHD da proteína Yng1 que em seguida acetila a H3K14 dando início ao processo de transcrição; e o complexo NuA3b no qual o domínio PWWP da proteína Pdp3 se liga a H3K36me3 atuando como um regulador positivo para o alongamento da transcrição (Gilbert *et al.*, 2014), conforme representado na Figura 6. A presença de um *cage* aromático no domínio PWWP da Pdp3 é necessário para interação com a histona trimetilada na posição lisina 36 H3K36me3. Os resíduos aromáticos são conservados no domínio PWWP da Pdp3 nas posições F18, W21 e F48 e mutações independentes nestes resíduos foram reportadas como capazes de abolir a interação da Pdp3 com o peptídeo H3K36me3, sugerindo que o Pdp3 requer um *cage* aromático conservado para ligar-se à cromatina (Gilbert *et al.*, 2014).



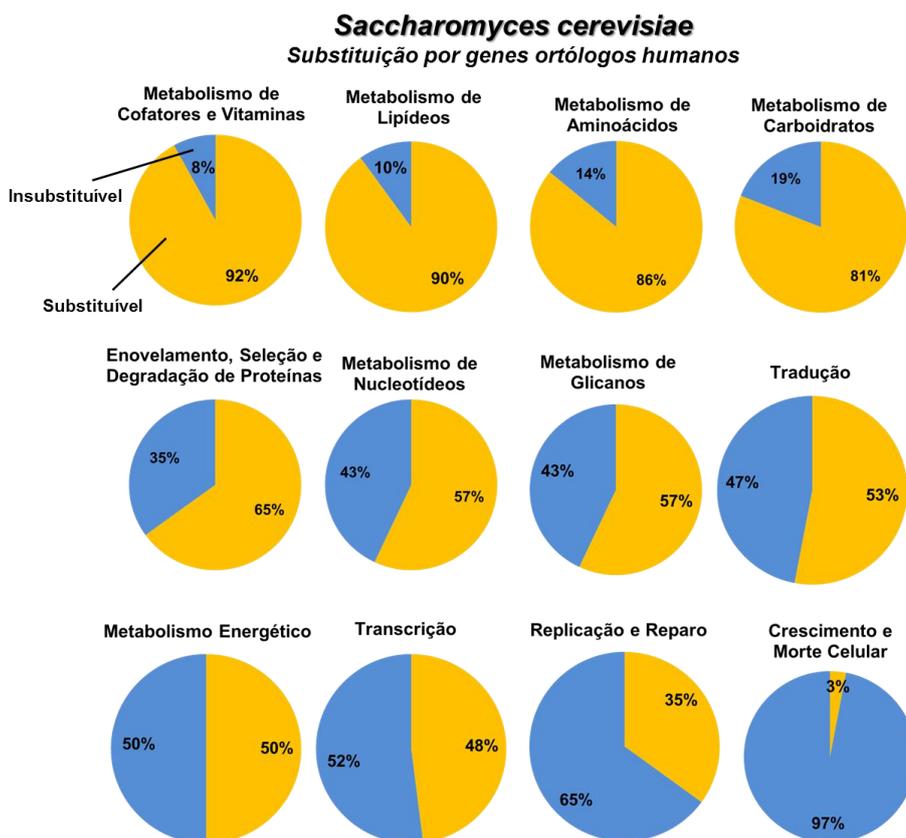
**Figura 6. Esquema dos complexos NuA3:** *NuA3a*. Yng1 se liga através de seu domínio PHD a H3K4me3 (resíduo de lisina trimetilado na posição 4 da histona H3), recrutando o complexo NuA3a para a região promotora de genes transcricionalmente ativos. Em seguida, Sas3 acetila a H3K14 (resíduo de lisina na posição 14 da histona H3), dando início ao processo de transcrição gênica. *NuA3b*. Pdp3 se liga através de seu domínio PWWP a H3K36me3 (resíduo de lisina trimetilado na posição 36 da histona H3), recrutando o complexo NuA3b para a região codificadora de genes transcricionalmente ativos (Gilbert *et al.*, 2014).

### 1.8. *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microorganismo utilizado como modelo de estudo para células eucarióticas. Devido à facilidade de manipulação genética, à semelhança bioquímica de células de levedura com célula animal e devido à disponibilidade de recursos em genômica funcional e análise ômicas para a levedura, este eucarioto unicelular foi estabelecido como uma ferramenta valiosa para a investigação bioquímica (Guaragnella *et al.*, 2013). Além disso, uma grande quantidade de proteínas de levedura pode ser substituída por proteínas ortólogas humanas (Mannarino *et al.*, 2011). Recentemente, Kachroo e colaboradores (2015) substituíram 414 genes da levedura por seus ortólogos humanos equivalentes, observando que aproximadamente 43% destes genes foram capazes de manter a sobrevivência da levedura e manutenção das vias metabólicas (Figura 7) (Kachroo *et al.*, 2015). Neste experimento, dentre os genes testados, aqueles que expressavam enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos, aminoácidos e carboidratos de modo geral puderam ser funcionalmente substituídos por seus ortólogos humanos, enquanto que as proteínas envolvidas na replicação e reparo do

DNA ou em processos de crescimento celular não apresentaram uma tendência de substituição tão elevada. Por exemplo, 90% das proteínas testadas envolvidas no metabolismo de lipídeos puderam ser funcionalmente substituídas por ortólogas humanas, 81% das envolvidas no metabolismo de carboidratos, 53% das envolvidas em tradução, 50% das envolvidas no metabolismo energético, 48% das envolvidas em transcrição, 35% das envolvidas em replicação e reparo do DNA e apenas 3% daquelas envolvidas nos processos de crescimento e morte celular. Estes resultados indicam que a levedura representa uma ferramenta biológica valiosa para o estudo de doenças humanas, compreendidas as devidas limitações do modelo.

Diversas instituições de pesquisa de câncer em todo o mundo fazem uso da genética de leveduras como parte de sua estratégia de pesquisa, simulando nesse modelo as alterações patológicas observadas nas células cancerígenas e, em seguida, manipulando-o para tentar reverter tais alterações. Leland H. Hartwell, Tim Hurt e Sir Paul M. Nurse foram agraciados com o Prêmio Nobel de 2001 em Fisiologia ou Medicina por seu trabalho sobre o ciclo celular em eucarioto utilizando a levedura como organismo modelo (Nobel Prize, 2001).



**Figura 7. Substituição de genes da levedura por ortólogos humanos:** Em média geral 43% dos genes humanos testados foram capazes de manter a sobrevivência e manutenção das vias metabólicas da levedura após substituição ortóloga e cerca de 47% dos genes de leveduras apresentam homologia estrutural ou funcional com o genoma humano (adaptada de Kachroo *et al.*, 2015).

A *S. cerevisiae* tem sido amplamente utilizada em pesquisa básica devido a uma série de vantagens frente a outros organismos eucarióticos, como pequeno ciclo celular, rápido crescimento celular, fácil manipulação e o fato de utilizar diversos mecanismos genéticos que são semelhantes aos de organismos multicelulares (Tosato *et al.*, 2012). De acordo com os dados mais recentes, cerca de 47% dos genes de leveduras apresentam homologia estrutural ou funcional com o genoma humano, incluindo genes relacionados à iniciação e progressão de tumores. Para genes que não possuem ortólogos, a levedura geralmente apresenta uma via de ação análoga à via de ação do gene humano, de modo que o gene pode ser expresso de forma heteróloga em *S. cerevisiae* e o fenótipo resultante pode ser estudado (Tosato *et al.*, 2012). Atualmente, bancos de dados contendo coleções completas de deleções de todas as ORFs (***Open Reading Frames***) de *S. cerevisiae* encontram-se disponíveis comercialmente. Além disso, bibliotecas de ORFs fusionadas a *tags* de expressão também estão disponíveis, o que facilita a realização de estudos de imunoprecipitação e interação proteica. Alguns dos exemplos mais importantes incluem ORFs fusionadas à proteína verde fluorescente (GFP- ***Green Fluorescent Protein***), o que permite a determinação da sua localização celular em diferentes condições (Botstein e Fink, 2011). Essa levedura ainda é o organismo eucariótico mais fácil de ser manipulado geneticamente para estudos de interação entre o genótipo e o fenótipo, sendo estabelecido como uma ferramenta valiosa para a investigação do câncer.

### **1.9. Estágios de Crescimento da *Saccharomyces cerevisiae***

A levedura *S. cerevisiae* apresenta três estágios de crescimento, que se inicia com uma fase de crescimento exponencial fermentativo quando a fonte de carbono disponível é a glicose. Nesta fase, conhecida como primeira fase exponencial do crescimento, as células apresentam metabolismo fermentativo devido à repressão catabólica exercida pela glicose sobre alguns genes necessários a respiração.

Quando a glicose é consumida, as células entram em fase adaptativa, chamada de diauxia, onde não há crescimento. Após a adaptação, as células voltam a se multiplicar utilizando metabolismo respiratório, onde a fonte de carbono utilizada é o etanol produzido na fermentação (Toledano, 2003). Quando esta fonte de carbono acaba, as células entram em fase estacionária.

A tolerância celular à toxidez das espécies reativas de oxigênio (EROs) é diferente entre os diferentes estágios de crescimento. Células em fase estacionária possuem uma maior resistência ao estresse oxidativo e térmico do que células em primeira fase de crescimento exponencial (Toledano, 2003). A respiração confere proteção contra o estresse oxidativo e duas hipóteses são postuladas quanto a isso. A primeira hipótese é a de que a produção de EROs pela mitocôndria induz uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo. A segunda pressupõe que os genes que respondem ao estresse oxidativo, como SOD1, SOD2 e GSH, também são reprimidos pela via de repressão catabólica (Toledano, 2003). De fato, quando há o aumento na produção de EROs, há a ativação da maquinaria de defesa antioxidante celular.

A troca para o metabolismo respiratório é um fator importante para a tolerância ao estresse oxidativo. Células cultivadas em meios onde não ocorre a repressão catabólica (não-fermentativos), como os meios onde a fonte de carbono é o etanol ou o glicerol, são forçadas a respirar, e se tornam mais resistentes ao  $H_2O_2$  e à menadiona do que células cultivadas em meio com glicose como fonte de carbono (Thevelein e De Winde, 1999).

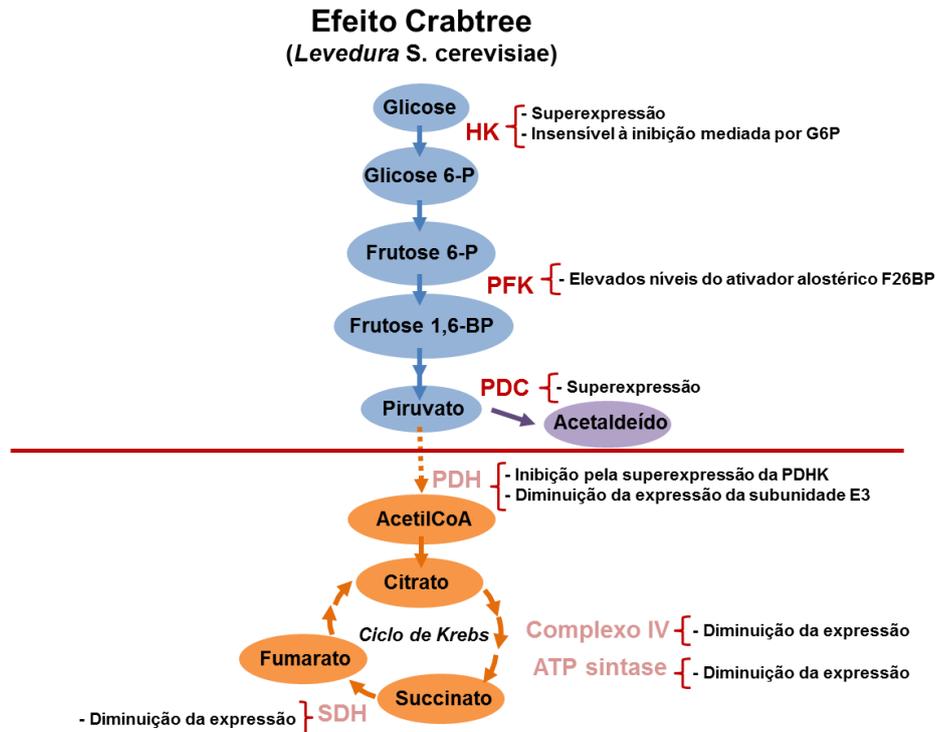
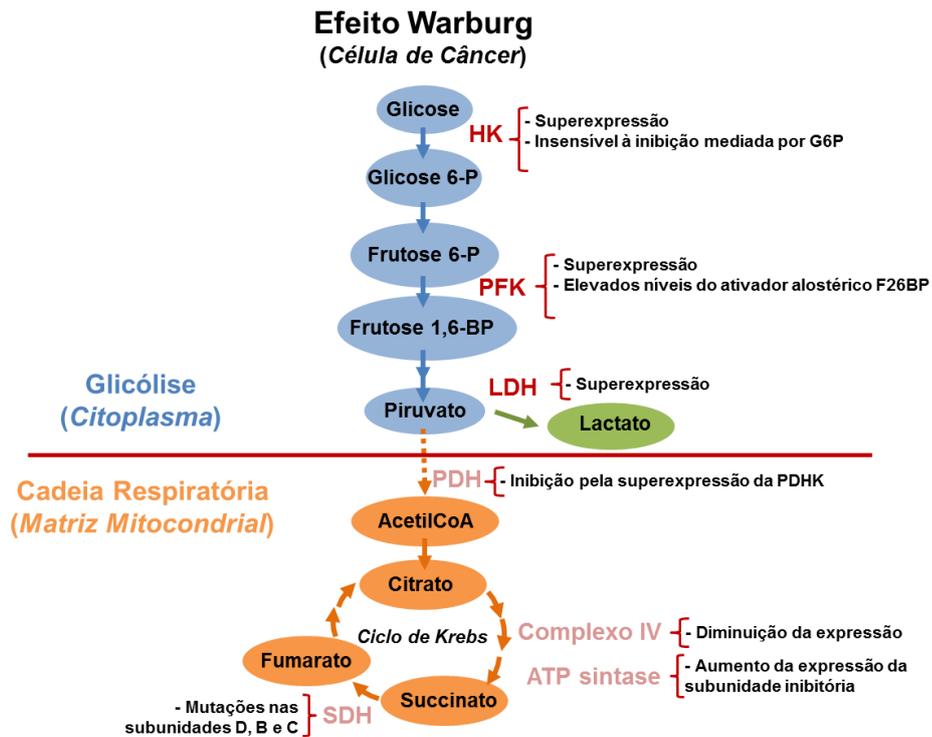
Estudos que avaliam marcadores de estresse oxidativo, como proteínas carboniladas e peroxidação lipídica (Brasil, 2013; Trevisol *et al.*, 2011), mostram que o nível basal desses marcadores em células em metabolismo respiratório é naturalmente maior por conta da produção de EROs inerente a esse processo e que fatores exógenos causadores de estresse oxidativo, como  $H_2O_2$  e menadiona, tem efeitos mais drásticos em células sob metabolismo fermentativo.

### **1.10. Efeito Warburg X Efeito Crabtree**

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microorganismo anaeróbico facultativo, ou seja, quando há disponibilidade de oxigênio no meio a levedura respira, na ausência deste, ela fermenta. Entretanto, a *S. cerevisiae* exibe uma característica metabólica que a torna um modelo interessante e único para estudo

de doenças que envolvem reprogramação do metabolismo energético, como é o caso do câncer. Quando há elevada quantidade de glicose no meio, a levedura fermenta mesmo em presença de oxigênio num processo denominado Efeito Crabtree (repressão catabólica). Há uma grande semelhança entre o efeito Crabtree da levedura e o efeito Warburg da célula tumoral. Em ambos os casos ocorre uma regulação negativa do metabolismo oxidativo respiratório associado a um aumento da fermentação, independente da presença de oxigênio. Desta forma, a levedura em fase de crescimento em meio contendo excesso de glicose apresenta um metabolismo energético semelhante a uma célula tumoral (Figura 8). Isso aponta a *S. cerevisiae* como modelo metabólico favorável para a triagem de drogas para terapias anti-tumorais cujo alvo é o metabolismo pois, assim como em células cancerosas, na fermentação de levedura em repressão catabólica ocorre a superexpressão das enzimas da glicólise (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011).

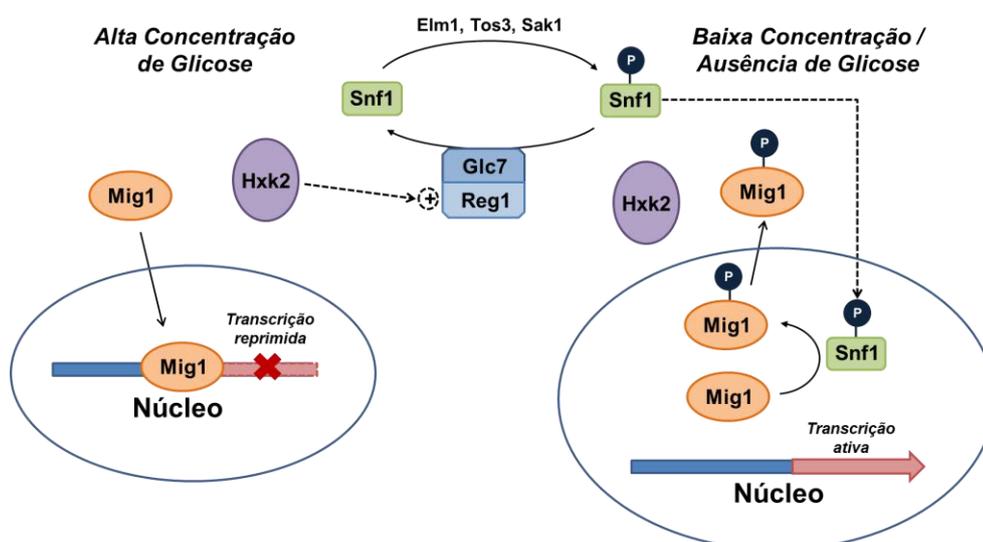
A glicose e a frutose são as fontes de energia primariamente consumidas pela *S. cerevisiae*, mas outras fontes de carbono também podem ser utilizadas (Carlson, 1999; Kim *et al.*, 2013). As células se adaptam a diferentes fontes de carbono por um mecanismo de controle transcricional. A análise da expressão genômica já demonstrou que a transcrição de genes é diferente de acordo com níveis variantes de glicose (Derisi *et al.*, 1997). Quando a concentração de glicose é alta no meio de crescimento, há a repressão da expressão dos genes envolvidos no ciclo de Krebs, na cadeia de transporte de elétrons e em muitos outros, como os envolvidos na gliconeogênese, no ciclo do glioxilato e no transporte e catabolismo de fontes alternativas de carbono, como galactose, maltose e sacarose (Kim *et al.*, 2013; Thevelein, 1994).



**Figura 8. Semelhança metabólica entre o efeito Warburg de células tumorais e o efeito Crabtree (repressão catabólica) de *S. cerevisiae*:** Em ambos os efeitos, ocorre superexpressão das enzimas que participam da via glicolítica e uma diminuição da atividade das enzimas que participam da via oxidativa (adaptado de Diaz-Ruiz *et al.*, 2011).

As principais proteínas envolvidas na via de repressão catabólica são a Hxk2, Snf1 e Mig1. Os genes envolvidos na via de repressão catabólica pela glicose são de dois tipos: genes requeridos para a repressão, como o *hxk2*, e genes necessários à desrepressão, como *cat1/snf1* (Thevelein, 1994). O gene *hxk2* codifica a hexoquinase 2 (Hxk2), uma enzima responsável por catalisar a fosforilação da glicose no citosol e por regular a repressão catabólica (Carlson, 1999; Thevelein, 1994). O alvo primário da Hxk2 é a proteína quinase Cat1/Snf1; o alvo secundário é o complexo transcricional Mig1-Ssn6/Cyc8-Tup1, que está envolvido com a repressão da respiração mitocondrial, gliconeogênese, ciclo do glioxilato e no uso de fontes de carbono alternativas. A inibição é mantida enquanto a concentração de glicose se mantém alta no meio (Thevelein, 1994).

De modo geral, na presença de glicose em concentrações elevadas, a Hxk2 impede a fosforilação do Mig1 pela Snf1, permitindo ao Mig1 exercer seu efeito repressor sobre os genes envolvidos no ciclo de Krebs e na cadeia transportadora de elétrons. A Hxk2 também interage com Reg1, facilitando a ação da fosfatase Glc7 sobre Snf1 para mantê-la em sua forma desfosforilada e inativa, contribuindo, desta forma, para o baixo nível de fosforilação de Mig1. Na ausência de glicose, Snf1 é fosforilado por qualquer uma das quinases Elm1, Tos3 e Sak1; sob esta forma, Snf1 fosforila Mig1, que migra para o citosol e lá se mantém junto à Hxk2, de modo que a expressão gênica pode finalmente ocorrer (Figura 9) (Gancedo e Flores, 2008).



**Figura 9. Mecanismo de repressão catabólica (efeito Crabtree) em levedura:** As principais proteínas envolvidas na via de repressão catabólica são a Hxk2, Snf1 e Mig1 (adaptado de Gancedo e Flores, 2008).

Apesar de as bases metabólicas e bioquímicas da repressão catabólica serem bem estabelecidas na levedura *S. cerevisiae*, as bases do efeito Warburg nas células cancerígenas ainda permanece controverso, apesar da semelhança metabólica com o efeito Crabtree. A expressão elevada de transportadores de glicose tem sido proposta como um dos principais fatores determinantes para o efeito Warburg. Os transportadores de glicose (GLUT1 e GLUT3) são superexpressos em várias linhagens celulares de câncer. A inibição dos transportadores Glut foi utilizada para limitar o crescimento de células tumorais *in vitro*. Além disso, foi demonstrado que o transporte de glicose pode ser um alvo apropriado para os agentes anti-tumorais farmacológicos, pois controlam a taxa de glicólise no carcinoma hepatocelular e nas linhagens de células HeLa (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011).

A intensa glicólise também pode ser explicada pelo aumento da atividade das enzimas que participam da via glicolítica. A este respeito, verificou-se que cada uma delas é superexpressa e/ou desregulada em várias linhagens tumorais. Embora a expressão aumentada não possa ser rigorosamente correlacionada com um aumento do fluxo metabólico, alguns estudos demonstraram que a atividade de cada uma das enzimas da via é várias vezes maior em comparação com os seus controles normais. Uma vez que a contribuição para o fluxo metabólico global é diferente para cada enzima, a estimulação de etapas que controlam o fluxo glicolítico teria um impacto importante para o aumento quantitativo da glicólise. Hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK) e piruvato-quinase (PK) são pontos de controle da via e os seus padrões de expressão e regulação são alterados em alguns tumores. A hexoquinase 2 (HK2) é a principal isoforma superexpressa em alguns tumores (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011) e tem sido relacionada à manutenção do efeito Warburg e da progressão tumoral (Wolf *et al.*, 2011). Uma vez que condições de hipóxia prevalecem no interior de tumores sólidos, a utilização da glicólise como via energética permitiria à célula tumoral manter sua proliferação acelerada na ausência de oxigênio no interior de tumores sólidos (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011).

Outra hipótese é que a desregulação do metabolismo oxidativo poderia ajudar as células tumorais a escapar do processo de apoptose (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011), uma vez que apresenta uma regulação dependente da mitocôndria. Uma última teoria supõe que células tumorais necessitam aumentar o nível energético para manter a sua alta taxa de proliferação mesmo em presença de oxigênio, ativando a glicólise

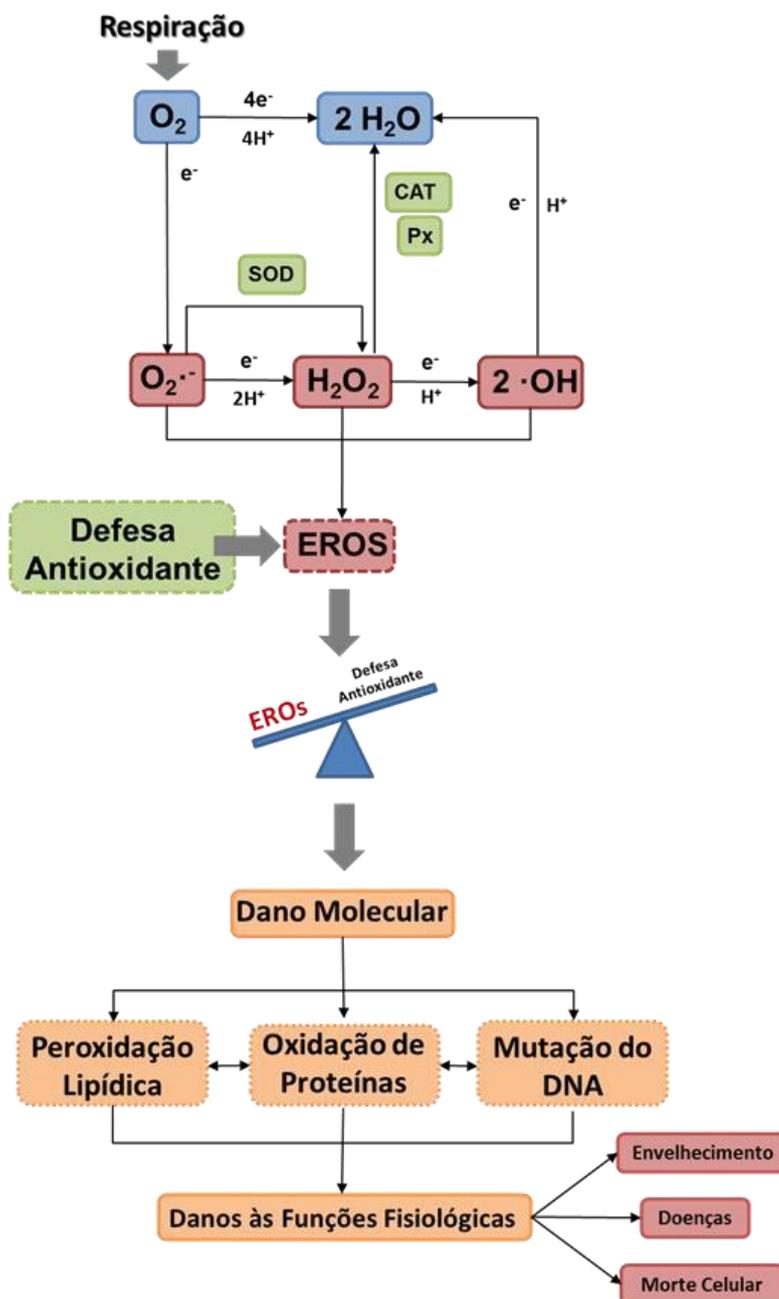
(Díaz-Ruiz *et al.*, 2011; López-Lázaro, 2008). Apesar de a respiração celular fornecer um alto rendimento de ATP por molécula de glicose, a glicólise é capaz de produzir ATP de forma mais rápida do que o processo oxidativo. Em um processo de replicação, a necessidade energética é grande, sendo assim a glicólise supriria melhor a demanda energética por ser uma via mais rápida (López-Lázaro, 2008). A glicólise é essencial para reações de biossíntese e, a partir dela, pode-se construir as moléculas necessárias para a replicação celular, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios. Deste modo, a glicólise torna-se essencial para a proliferação celular (López-Lázaro, 2008).

### 1.11. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Durante a respiração celular o aceptor final de elétrons é o oxigênio molecular, que é reduzido a H<sub>2</sub>O ao final da via respiratória. Durante a cadeia transportadora de elétrons são formados intermediários parcialmente reduzidos do oxigênio como o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e o ânion peróxido (O<sub>2</sub><sup>2-</sup>). O superóxido, o peróxido de hidrogênio e os compostos gerados a partir destes, como o radical hidroxila ( $\cdot$ OH), são coletivamente definidos como espécies reativas de oxigênio (EROs). Para mitigar as EROs, ocorre a expressão e atuação de enzimas responsáveis por neutralizar e regularizar os níveis destas espécies e manter a homeostase fisiológica durante o processo de respiração celular. Assim como outros organismos eucarióticos, a levedura *S. cerevisiae* possui mecanismos de defesa antioxidantes enzimáticos, como a catalase e a superóxido dismutase (Abbott *et al.*, 2009), e não enzimáticos, como a glutatona (GSH) (França *et al.*, 2007). A enzima superóxido dismutase (Sod) remove o radical superóxido, convertendo-o a oxigênio e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que, pela ação da enzima catalase e peroxidase, produz água e oxigênio (Mannarino *et al.*, 2008; Abbott *et al.*, 2009).

Na inibição da cadeia respiratória, a atuação das enzimas de defesa antioxidante é baixa e a célula acumula EROs, o que resulta em danos oxidativos, definindo o estresse oxidativo. A regulação negativa do metabolismo oxidativo ocorre tanto no efeito Warburg (células tumorais) quanto no efeito Crabtree (células de levedura), de modo que tais células não desenvolvem uma defesa antioxidante eficiente contra EROs, que são capazes de danificar todos os principais blocos de construção da célula, incluindo o DNA, lipídios e proteínas. Estes danos levam à morte celular, acelerando o processo de envelhecimento e induzem doenças

relacionadas à idade. Tanto a redução das defesas antioxidantes quanto o aumento da produção de EROs, ou ambos, levam ao aumento do estresse oxidativo que reduz a longevidade celular, conforme esquematizado na Figura 10 (Abbott *et al.*, 2009; Moskovitz *et al.*, 2001).



**Figura 10. Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a defesa antioxidante estimulada pelo estresse oxidativo:** Quando ocorre desbalanço entre a defesa antioxidante intracelular e a produção de EROs, ocorrem danos moleculares nas estruturas celulares, caracterizando a condição de estresse oxidativo (adaptado de França *et al.*, 2007).

### 1.12. Metabolismo do Glicerol

Ao substituir a glicose pelo glicerol como fonte de carbono, a levedura é forçada a retirar sua energia através da respiração, oposta à fermentação. Quando o metabolismo respiratório é adotado pela levedura, ela se torna metabolicamente mais próxima às células saudáveis dos organismos multicelulares (Kirchman e Botta, 2008).

O glicerol é fosforilado por uma glicerol quinase (Gut1), gerando glicerol-3-fosfato. A seguir, glicerol-3-fosfato é oxidado a di-hidroxiacetona fosfato (DHAP) pela enzima glicerol fosfato ubiquinona oxirredutase (Gut2), localizada na superfície da membrana mitocondrial interna. Os elétrons desta oxidação são transferidos para a ubiquinona, entrando na cadeia respiratória (Flores *et al.*, 2000; Nevoigt e Sahl, 1997). DHAP entra na via glicolítica, gerando NADH (no citoplasma) e piruvato, que segue para a via respiratória. Glicerol-3-fosfato desidrogenase (Gpd1/2) auxilia na re-oxidação do NADH citoplasmático (Herrero *et al.*, 2008). Logo, quando a fonte de carbono utilizada é o glicerol, a levedura apresenta uma elevação no nível de EROs, característica do metabolismo oxidativo e, portanto, ocorre um estímulo no desenvolvimento da defesa oxidante. Com um sistema de defesa antioxidante presente, a célula tem maior resistência a EROs, apesar de a produção de tais espécies ser maior durante o processo respiratório do que no processo fermentativo. Esse balanço entre a produção de EROs e recrutamento da defesa antioxidante durante o processo respiratório deve ser equilibrado para evitar danos moleculares demasiados à célula.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste projeto consiste em analisar a semelhança funcional entre a proteína Pdp3 (produto da ORF YLR455W) de *Saccharomyces cerevisiae* e a isoforma curta da proteína NSD3 humana (NSD3c), superexpressa em câncer de mama.

O projeto apresenta como objetivos específicos a avaliação da variação de parâmetros fenotípicos em diferentes cepas da levedura, especificados a seguir:

- Analisar o efeito da superexpressão da Pdp3 de *S. cerevisiae* ( $\Delta$ YLR455WpECUh6YLR455W ou  $\Delta$ Pdp3:Pdp3++) bem como da quimera Pdp3 contendo o domínio PWWP da proteína NSD3c de humano ao invés do domínio PWWP original ( $\Delta$ YLR455WpECUh6YLR455W<sub>PWWPNSD3c</sub> ou  $\Delta$ Pdp3:Quimera++) sobre a taxa de crescimento e tolerância ao estresse oxidativo;
- Analisar o efeito da mutação W21A na Pdp3 de *S. cerevisiae* ( $\Delta$ YLR455WpECUh6YLR455W<sub>W21A</sub> ou  $\Delta$ Pdp3:W21A++) sobre a taxa de crescimento, consumo de glicose e tolerância ao estresse oxidativo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Cepas e Condições de Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

A cepa BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae* (MATa; *his3*; *leu2*; *met15*; *ura3*) e sua mutante isogênica  $\Delta ylr455w$ , que contém a ORF YLR455W interrompida pelo gene *KanMX4*, que confere resistência à geneticina, foram adquiridas da Euroscarf, Frankfurt, Alemanha. Os estoques destas cepas foram mantidos em meio sólido YPD 2% (1% p/v extrato de lêvedo, 2% p/v glicose, 2% p/v peptona e 2% p/v ágar) em condições apropriadas para evitar a seleção de *petites* ou supressores. No caso da cepa mutante, este meio de cultivo também continha 0,02% de geneticina.

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* transformadas e seus controles foram construídas através da inserção do plasmídeo pECUh6 (Figura 11), adquirido da Enzimax (USA), na cepa apropriada. Trata-se de um plasmídeo de múltiplas cópias, com promotor forte *CUP1* (induzido pela presença de  $Cu^{2+}$ ), marcador de resistência a ampicilina e marcador nutricional de uracila.

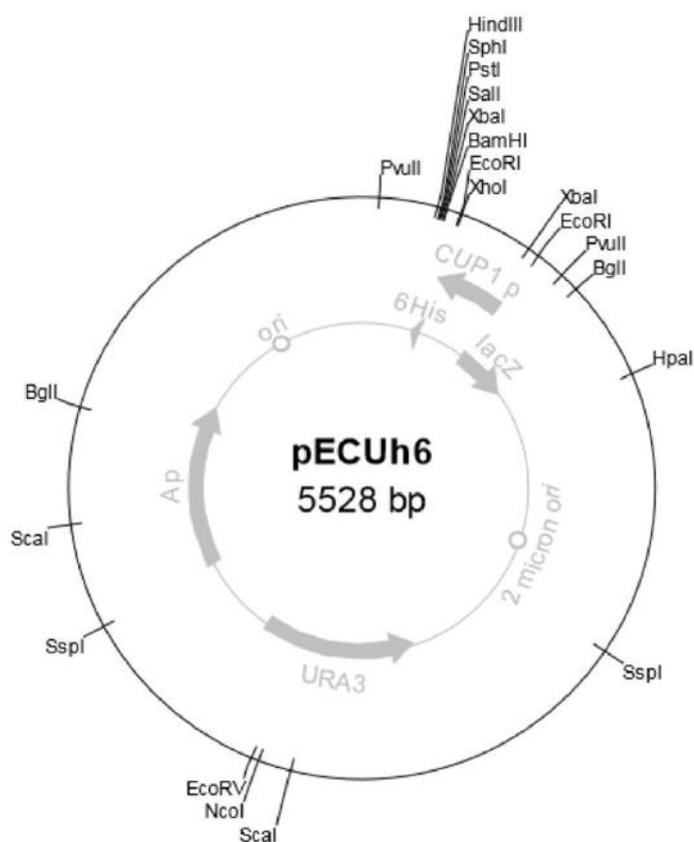


Figura 11. Mapa do vetor plasmidial pECUh6.

As sequências para expressão plasmidial foram inseridas utilizando as enzimas de restrição XhoI e HindIII conforme especificado:

**YLR455W:**

ATGACAAAAGATATTAGAACAGGCGATTTAGTGTTATGCAAAGTTGGCTCGTTTC  
CACCTTGGCCAGCTGTAGTATTTCCACAGCGTTTGCTGCGAAACGATGTATATA  
GAAAGAGAAAATCCAATTGTGTTGCTGTTTGTTTTTTCAACGATCCAACCTATTAT  
TGGGAACAACCCAGTAGATTAAGGAGCTAGATCAAGACAGCATTACAATTTTC  
ATATTAGAACATAGTAAAAATGCAAACCAAAGGGAATTGGTCAATGCTTATAAGG  
AAGCAAAAATTTTGTGATGATTTCAACGTATTTTTACAAGAAAAGTTTGAAGAAGAA  
AACAGGTTAAGTGATCTAAAAGCGTTTGAGAAAAGTGAAGGTTCTAAAATCGTTG  
CCGGAGAAGATCCCTTTGTAGGTGGAACAAAAGTAGTGAATAAAAGAAAAAAA  
ATTCAATATCCATCAAAGAAGATCCGGAAGATAACCAGAAATCAAATGAAGAAGA  
AAGCAAACCGAACATCAAACCGTCCAAAAAAAAGAGACCCACAGCTAATTCGGG  
AGGAAAATCAAACAGTGGCAATAAAAAGAAAGTTAAATTAGACTATTCCAGAAGA  
GTAGAAATTTACAGTTATTTGCGCCGAGGATTCAAAGAAATCTAATCCAGAGAG  
AAACACCTCCTACTGAGCATGAGATCAAGGAACTCATGAACTATTAATAGAAT  
ATATGAGAATTCTGACACCAAACGGCCCTTTTTTGTATTTGAAGGCCCTACGCGAA  
AGCAAATTACACAAGCTACTGAAAGCAATTGTTAATGATCCTGACTTAGGCGAAT  
TTCACCCACTTTGTAAAGAAATTTTACTGTCCTGGGCAGACCTAATCACAGAACT  
GAAGAAAGAAAAGTTGCAAGCGCTACCTACGCCTTGA

**YLR455W<sub>W21A</sub>:**

ATGACAAAAGATATTAGAACAGGCGATTTAGTGTTATGCAAAGTTGGCTCGTTTC  
CACCTGCTCCAGCTGTAGTATTTCCACAGCGTTTGCTGCGAAACGATGTATATA  
GAAAGAGAAAATCCAATTGTGTTGCTGTTTGTTTTTTCAACGATCCAACCTATTAT  
TGGGAACAACCCAGTAGATTAAGGAGCTAGATCAAGACAGCATTACAATTTTC  
ATATTAGAACATAGTAAAAATGCAAACCAAAGGGAATTGGTCAATGCTTATAAGG  
AAGCAAAAATTTTGTGATGATTTCAACGTATTTTTACAAGAAAAGTTTGAAGAAGAA  
AACAGGTTAAGTGATCTAAAAGCGTTTGAGAAAAGTGAAGGTTCTAAAATCGTTG  
CCGGAGAAGATCCCTTTGTAGGTGGAACAAAAGTAGTGAATAAAAGAAAAAAA  
ATTCAATATCCATCAAAGAAGATCCGGAAGATAACCAGAAATCAAATGAAGAAGA  
AAGCAAACCGAACATCAAACCGTCCAAAAAAAAGAGACCCACAGCTAATTCGGG  
AGGAAAATCAAACAGTGGCAATAAAAAGAAAGTTAAATTAGACTATTCCAGAAGA

GTAGAAATTTACAGTTATTTTCGCCGCAGGATTCAAAGAAATCTAATCCAGAGAG  
 AAACACCTCCTACTGAGCATGAGATCAAGGAAACTCATGAACTATTAATAGAAT  
 ATATGAGAATTCTGACACCAAACGGCCCTTTTTTTGATTTGAAGGCCCTACGCGAA  
 AGCAAATTACACAAGCTACTGAAAGCAATTGTTAATGATCCTGACTTAGGCGAAT  
 TTCACCCACTTTGTAAAGAAATTTTACTGTCCTGGGCAGACCTAATCACAGAACT  
 GAAGAAAGAAAAGTTGCAAGCGCTACCTACGCCTTGA

**YLR455W<sub>PWWPNSD3c</sub>**:

ATGACAACGGAAGTGTCCACTGGTGTAAAGTTTCAGGTTGGCGATCTTGTGTGG  
 TCCAAGGTGGGAACCTATCCTTGGTGGCCTTGTATGGTTTCAAGTGATCCCCAG  
 CTTGAGGTTCATACTAAAATTAACACAAGAGGTGCCCGAGAATATCATGTCCAGT  
 TTTTAGCAACCAGCCAGAGAGGGCGTGGGTTTCATGAAAACGGGTACGAGAG  
 TATAAAGGTCATAAACAGTATGAAGAATTACTGGCTGAGGCAACCAAACAAGCC  
 AGCAATCACTCTGAGAAACAAAAGATTCGGAAACCCCGACCTCAGAGAGAACGT  
 GCTCAGTGGGATATTGGCATTGCCCATGCAGAGAAAGCATTGAAAATGACTAGA  
 GAAGAAAGAATAGAACAGTATACTTTTTATTACATTGATAAACAGCCTGAAGAGG  
 CTTTATCCCAAGCAAAAAAGAGTGTTGCCTCCAAAACCGAAGTTAAAAAACCCG  
 ACGACCAAGATCTGTGCTGATCAAAGAAGATCCGGAAGATAACCAGAAATCAAA  
 TGAAGAAGAAAGCAAACCGAACATCAAACCGTCCAAAAAAAAGAGACCCACAGC  
 TAATTCGGGAGGAAAATCAAACAGTGGCAATAAAAAGAAAGTTAAATTAGACTAT  
 TCCAGAAGAGTAGAAATTTACAGTTATTTTCGCCGCAGGATTCAAAGAAATCTAA  
 TCCAGAGAGAAACACCTCCTACTGAGCATGAGATCAAGGAAACTCATGAACTAT  
 TAAATAGAATATATGAGAATTCTGACACCAAACGGCCCTTTTTTTGATTTGAAGGC  
 CCTACGCGAAAGCAAATTACACAAGCTACTGAAAGCAATTGTTAATGATCCTGAC  
 TTAGGCGAATTTACCCACTTTGTAAAGAAATTTTACTGTCCTGGGCAGACCTAA  
 TCACAGAACTGAAGAAAGAAAAGTTGCAAGCGCTACCTACGCCTTGA

As cepas utilizadas e discutidas neste trabalho estão especificadas como segue:

- **WTpECUh6 (ou WT:v)**: Cepa By4741 de *S. cerevisiae* (controle);
- **WTpECUh6NSD3c (ou WT:NSD3c++)**: Cepa By4741 de *S. cerevisiae* superexpressando em vetor pECUh6 a proteína NSD3c;

- **$\Delta$ YLR455W (ou  $\Delta$ Pdp3)**: Cepa By4741 de *S. cerevisiae* deletada em ylr455w no genoma (controle);
- **$\Delta$ YLR455WpECUh6 (ou  $\Delta$ Pdp3:v)**: Cepa By4741 de *S. cerevisiae* deletada em ylr455w no genoma contendo o vetor pECUh6 vazio (controle);
- **$\Delta$ YLR455WpECUh6YLR455W ( $\Delta$ Pdp3:Pdp3++)**: Cepa By4741 de *S. cerevisiae* deletada em ylr455w no genoma superexpressando em vetor pECUh6 a proteína Pdp3;
- **$\Delta$ YLR455WpECUh6YLR455W<sub>PWWPNSD3c</sub> (ou  $\Delta$ Pdp3:Quimera++)**: Cepa By4741 de *S. cerevisiae* deletada em ylr455w no genoma superexpressando em vetor pECUh6 a quimera da proteína Pdp3 contendo o domínio PWWP da proteína NSD3c humana;
- **$\Delta$ YLR455WpECUh6YLR455W<sub>W21A</sub> (ou  $\Delta$ Pdp3:W21A++)**: Cepa By4741 de *S. cerevisiae* deletada em ylr455w no genoma superexpressando em vetor pECUh6 a proteína Pdp3 contendo a mutação W21A;

Os estoques das cepas foram mantidos em meio SD 2% (2% p/v glicose; 0,67% p/v base nitrogenada sem aminoácido; 0,001% p/v requerimentos nutricionais) sólido (2% p/v ágar) sem uracila. Todos os experimentos foram conduzidos em meio *dropout* líquido sem uracila (marcador nutricional) contendo 2% em peso de glicose, para metabolismo fermentativo, ou 4% em peso de glicerol, para metabolismo respiratório, ambos suplementados com sulfato de cobre a uma concentração final de 50  $\mu$ M para indução da expressão do vetor plasmidial. Os cultivos foram realizados a 28°C, 160 rpm, em *erlenmeyers* preenchidos com 1/5 do seu volume com o meio.

A composição do meio de cultivo *dropout* é a seguinte: 0,67% p/v base nitrogenada sem aminoácidos, 2% p/v glicose (fonte de carbono para fermentação) ou 4% p/v glicerol (fonte de carbono para respiração), 0,2% p/v mistura *dropout* (obs: para o meio sólido acrescentou-se 2% p/v ágar). A mistura *dropout* é composta de: 0,5 g adenina, 10,0 g leucina, 2,0 glicina, 2,0 g arginina, 2,0 g metionina, 2,0 g asparagina, 2,0 g ácido aspártico, 2,0 g fenilalanina, 2,0 g glutamina, 2,0 g serina, 2,0 g ácido glutâmico, 2,0 g treonina, 2,0 g triptofano, 2,0 g histidina, 2,0 g tirosina, 2,0 g inositol, 2,0 g uracila, 2,0 g isoleucina e 2,0 g valina.

### **3.2. Meios de Cultura e Condições de Crescimento de Bactérias *E. coli***

As bactérias de *E. coli* utilizadas para multiplicação do vetor plasmidial foram crescidas em meio de cultura líquido *Luria-Bertani* (LB) a 37°C com agitação de 300 rpm no caso de meios líquidos. Com a finalidade de selecionar as cepas transformadas com resistência à ampicilina (marcador de resistência dos vetores plasmidiais) utilizou-se o meio LB contendo ampicilina (LB-*amp*). Para crescimento em meio sólido foi adicionado aos meios 2,0% p/v de ágar. O meio LB é composto de: 1% p/v triptona meio LB, 0,5% p/v extrato de levedura, 1% p/v NaCl, ajustando-se o pH a 7,5 com NaOH 1 M. No caso do meio LB-*amp* adicionou-se 100 µg/mL de ampicilina.

### **3.3. Manipulação do DNA Plasmidial (Miniprep)**

Para o isolamento rápido e em pequena escala de DNA plasmidial da *E. coli* foi utilizado o kit QIAprep Spin Miniprep, da Qiagen. A extração de DNA plasmidial através do kit foi efetuada de acordo com as recomendações do fabricante descritas no respectivo protocolo. A solução de DNA plasmidial foi armazenada em água ultrapura estéril a -20°C. O DNA plasmidial foi utilizado em etapas posteriores para a transformação de células de levedura.

### **3.4. Transformação de Levedura em Fase Estacionária**

As cepas de levedura foram cultivadas a 28°C em meio rico YPD2%, *overnight* e sob agitação de 160 rpm até atingir a fase estacionária. Coletou-se um volume de 200 µL do meio de crescimento com as células em tubo *ependorf*, centrifugando-se por 5 s a 13000 rpm. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em tampão *One Step* que consistia de 0,2 N acetato de lítio, 40% p/v PEG4000 e 100 mM ditioneitol (DTT). Posteriormente foi adicionado 50-1000 ng do plasmídeo em um volume final de 100 µL. Após esta etapa as células foram incubadas a 45°C por 1 h e plaqueadas em meio mínimo SD 2% na ausência de uracila com a finalidade de selecionar as transformantes.

### **3.5. Curva de Crescimento, Determinação da Taxa Específica de Crescimento ( $\mu$ ) e Determinação do Tempo de Geração Médio (T)**

A curva de crescimento celular foi determinada por espectrofotometria através de medida de absorvância a 570 nm da suspensão celular ao longo do tempo em

intervalos regulares até que o crescimento celular atingisse fase estacionária. A absorvância lida foi convertida em concentração de células (mg de peso seco de células/mL) utilizando-se o fator de conversão de peso seco ( $F$ ), determinado pela construção de uma curva de peso seco que relaciona a absorvância lida a 570 nm à concentração celular. A curva de peso seco foi determinada a partir da filtração de um volume adequado da suspensão celular em filtro Millipore (45  $\mu$ m) que posteriormente foi colocado sob luz de infravermelho até peso constante para determinação da massa celular seca. Tal massa foi relacionada à concentração celular na suspensão inicial a partir da qual foram feitas diluições adequadas de concentrações conhecidas para leitura da absorvância a 570 nm. O coeficiente angular ( $\alpha$ ) da curva de peso seco ( $Abs_{570} = f([células] \text{ mg/mL})$ ) corresponde ao inverso do fator de peso seco ( $F = 1/\alpha$ ).

Para determinação da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) as medidas da absorvância a 570 nm das cepas foram realizadas em intervalos regulares até as células atingirem a fase estacionária. O  $\mu$  destas células foi determinado na fase de crescimento exponencial pela expressão  $\ln(X/X_0) = \mu t$ , na qual  $X_0$  corresponde à concentração celular inicial (mg de peso seco/mL) e  $X$  à concentração celular (mg de peso seco/mL) após um tempo de crescimento  $t$ . O tempo de geração médio ( $T$ ), tempo médio necessário para a duplicação da massa celular, foi determinado pela expressão  $T = \ln 2/\mu$ .

### 3.6. Tolerância ao Estresse Oxidativo

Para indução do estresse oxidativo, as células em fase exponencial em seus respectivos meios foram tratadas com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) durante uma hora a 28°C e 160 rpm. Após este tempo de estresse, as células foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 min e lavadas com água destilada gelada estéril com objetivo de interromper o estresse e utilizadas nos experimentos de viabilidade e peroxidação lipídica para avaliação da resistência ao estresse oxidativo. As concentrações de peróxido de hidrogênio utilizadas foram de 3 mM para os experimentos em que a fonte de carbono foi a glicose e de 20 mM quando a fonte de carbono foi o glicerol.

#### 3.6.1. Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi analisada por plaqueamento em meio sólido YPD 2% antes e após o estresse com peróxido de hidrogênio. Tomou-se uma alíquota

correspondente a 40 µg de células dos cultivos em *dropout* que foram avolumadas a 1 mL em água estéril. A partir desta solução foram realizadas diluições sucessivas até uma solução com diluição final de mil vezes, a partir da qual foram plaqueados 100 µL em meio sólido YPD 2% para a contagem das colônias em triplicata. As placas foram incubadas a 28°C por 72 h e o número de colônias contado. A taxa de sobrevivência foi calculada a partir da relação entre o número de colônias obtido após e antes do estresse em termos percentuais.

### 3.6.2. Peroxidação Lipídica

Cerca de 50 mg de célula em seu respectivo meio de cultivo foram centrifugados e lavados duas vezes com água gelada. Após as lavagens o centrifugado foi ressuspensionado em 500 µL de ácido tricloroacético 10% (TCA), adicionando-se em seguida 1,5 g de pérolas de vidro. As células foram rompidas pela realização de seis ciclos de agitação violenta em vórtex por 20 s, intercalados com 20 s no gelo. O sobrenadante foi obtido após a centrifugação a 13000 rpm por 5 min. O nível de peroxidação lipídica foi determinado pelo método TBARS – *Tiobarbituric Acid Reactive Substances* (Steels, 1994). O ensaio se baseia na reação do malondialdeído (MDA), um dos produtos finais formados a partir da oxidação dos lipídios da membrana plasmática, com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando uma base de Schiff colorida cuja concentração pode ser determinada por espectrofotometria. O ensaio foi feito com 150 µL de extrato, 150 µL de água destilada, 100 µL de EDTA 0,1 M e 600 µL de ácido tiobarbitúrico 1% em NaOH 0,05 M. A mistura reacional foi incubada em tubos de microcentrífuga a 100°C por 15 minutos. Os tubos foram resfriados e a absorbância determinada por espectrofotometria a 532 nm. Cada amostra foi feita em duplicata e os resultados expressos em pmoles de malondialdeído, um dos produtos da peroxidação lipídica, por miligrama de célula (pmoles MDA/mg cél). O resultado final foi calculado através da razão entre o nível de peroxidação após o estresse e o controle (antes do estresse), sendo expresso em vezes de aumento.

### 3.7. Consumo de Glicose

As células foram cultivadas em meio *dropout* 2% glicose e coletadas no meio da primeira fase exponencial (metabolismo fermentativo), sendo centrifugadas a 5000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi resuspensionado em

tampão fosfato 50 mM pH 6 contendo glicose até um volume final de 10 mL de maneira que fosse obtida uma concentração celular final de 3 mg/mL (peso seco/mL) e 20 mM de glicose, em um erlenmeyer de 50 mL. Foi retirada uma alíquota imediatamente após a adição do tampão contendo glicose (ponto zero, 0 min) em condições não-proliferantes, que foi centrifugada imediatamente a 3000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi devidamente filtrado para condições cromatográficas e armazenado para posterior análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O meio foi incubado a 28° C e 160 rpm e alíquotas de 1 mL foram retiradas ao longo do tempo nos pontos referentes a 20 min, 40 min e 60 min, procedendo-se da mesma maneira que no ponto zero para o tratamento da amostra, centrifugando-se o meio e armazenando o sobrenadante após filtração apropriada para posterior análise por CLAE. A glicose foi analisada utilizando um sistema de CLAE equipado com um detector de índice de refração RI- 2031 Plus, JASCO, Japão. A glicose foi quantificada em uma coluna Aminex HPX-87H (7.8 mm I.D. x 30 cm, BioRad, EUA), com a temperatura de 60°C utilizando 0,004 mM de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) como eluente a um fluxo igual a 0,6 mL por minuto.

### **3.8. Análise de Dados e Análise Estatística**

Os resultados de todos os experimentos representam a média ± desvio padrão de no mínimo 3 experimentos independentes para cada condição e cepa testada. Para a análise dos resultados foi feito primeiramente o teste F para a análise das variâncias e posteriormente os resultados foram analisados utilizando o teste t de Student. As barras marcadas com asteriscos representam resultados estatisticamente iguais para um p abaixo de 0,05 dentro de cada condição ou cepa estudada.

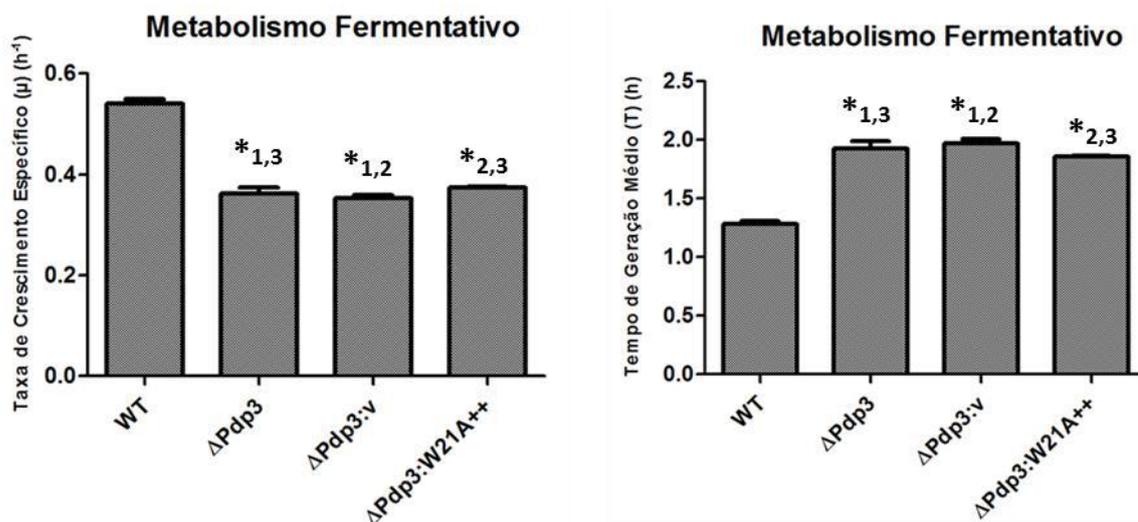
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Efeitos da Pdp3 e suas modificações em células de levedura sob condições de repressão catabólica (efeito Crabtree)

Em meio fermentativo, isto é, no qual as células de levedura encontram-se sob efeito da repressão catabólica (efeito Crabtree) e, portanto, fermentam mesmo em presença de oxigênio, há simulação de uma condição metabólica de uma célula cancerígena (efeito Warburg), com manutenção de uma maior taxa glicolítica concomitante à repressão respiratória. Nestas condições, a cepa deletada para a proteína Pdp3 ( $\Delta$ Pdp3) apresentou uma taxa de crescimento específico inferior à cepa selvagem (WT), ou seja, a ausência da proteína Pdp3 modifica o fenótipo da célula diminuindo a sua velocidade de crescimento (Rona, 2014).

A superexpressão da Pdp3 mutante W21A ( $\Delta$ Pdp3:W21A++) ocasionou uma taxa de proliferação celular semelhante à da cepa deletada nesta mesma proteína, evidenciando que a presença do resíduo de triptofano é essencial à manutenção da função da Pdp3. A substituição do triptofano 21 (W21), aminoácido de cadeia lateral aromática indólica, pela alanina (A), cuja cadeia lateral é uma metila, no cage aromático da proteína Pdp3 impediria a ligação a histonas metiladas pelo domínio PWWP, uma vez que este triptofano é essencial para reconhecimento do padrão de metilação em genes ativos transcricionalmente, ocasionando a perda da função (Gilbert, 2014).

Uma cepa deletada contendo um plasmídeo vazio pECUh6 ( $\Delta$ Pdp3:v) foi utilizada como controle para validação de tais observações, apresentando comportamento semelhante à cepa deletada sem o plasmídeo vazio, indicando que a inserção de um vetor plasmidial não interfere de maneira significativa nos padrões de expressão basais da levedura e que os resultados observados são influenciados unicamente pela expressão da proteína recombinante, e não pela presença física do plasmídeo ou pela adição de  $\text{Cu}^{2+}$ . Os resultados obtidos para a taxa de crescimento específico ( $\mu$ ) e tempo de geração médio (T) em condições de fermentação sob repressão catabólica estão representados na Figura 12.



**Figura 12.** Determinação da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e do tempo de geração médio (T) de células de levedura deficientes em Pdp3 e superexpressando a Pdp3 mutada em W21A e de seus controles em condições de metabolismo fermentativo sob repressão catabólica (efeito Crabtree). Para a determinação de  $\mu$  e de T, as cepas foram cultivadas em *dropout* suplementado com glicose 2%, as medidas da absorvância a 570 nm foram realizadas em intervalos regulares até as células atingirem a fase estacionária. O  $\mu$  destas células foi determinado na fase de crescimento exponencial pela expressão  $\ln X/X_0 = \mu t$  e o T pela expressão  $T = \ln 2/\mu$ . Os resultados representam a média e desvio padrão de no mínimo 3 experimentos independentes. \* representa valores de média estatisticamente iguais para um nível de significância  $p < 0,05$ .

Os avanços na compreensão dos mecanismos de danos oxidativos em biomoléculas permitiram identificar uma diversidade de biomarcadores deste processo, como carbonilação de proteínas, oxidação de lipídios e DNA. Esses biomarcadores são utilizados para associar a ocorrência de estresse oxidativo em diversas doenças (Brasil, 2011). Durante o estresse oxidativo, um dos alvos das espécies reativas de oxigênio (EROs) são os ácidos graxos que compõem a membrana celular formada por uma bicamada lipídica. Como consequência tem-se uma grande alteração da estrutura da membrana, comprometendo algumas de suas funções, como o transporte de nutrientes e a manutenção do equilíbrio osmótico. Uma das formas de verificar a sensibilidade ao estresse oxidativo é analisar os danos causados à membrana (Brasil, 2011).

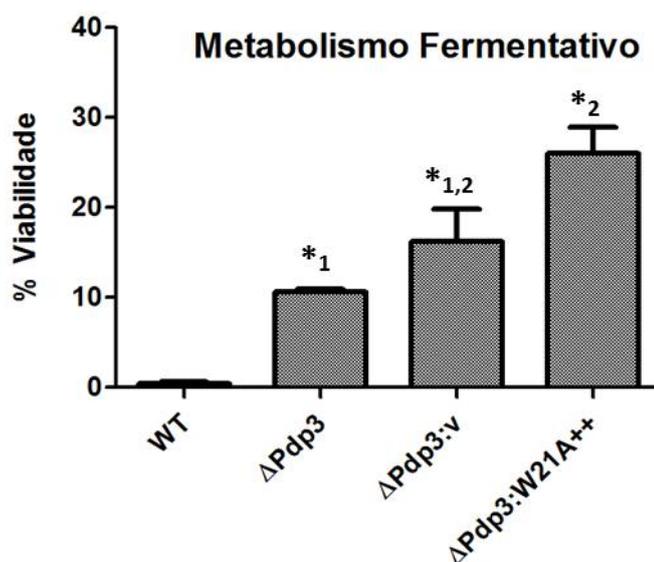
Em condições de metabolismo fermentativo sob repressão catabólica ocorre inibição da respiração celular e, portanto, não ocorre a estruturação efetiva das defesas antioxidantes necessárias para mitigação de EROs, tornando as células mais susceptíveis a danos moleculares oxidativos decorrentes da formação destas

espécies. Esta condição simula o efeito Warburg das células cancerígenas que, além de aumentar a taxa de proliferação celular, diminui a atividade mitocondrial e aumenta a taxa glicolítica. Como há uma diminuição da via oxidativa, a célula tumoral não desenvolve a defesa antioxidante no processo de resposta ao estresse oxidativo, o que ocasiona um aumento da sensibilidade das células tumorais a EROs (Ruckenstuhl *et al.*, 2009).

Como o peróxido de hidrogênio é uma espécie reativa de oxigênio, as células de levedura foram tratadas com este reagente durante uma hora, a 28°C e 160 rpm, para simular uma situação de estresse oxidativo. Em caso de células sob metabolismo fermentativo, ou seja, cujas defesas antioxidantes intracelulares não se encontram bem desenvolvidas, foi dado um estresse de 3 mM, verificado em estudos anteriores (Rona, 2014) como suficiente para verificação de variações fenotípicas entre as diferentes cepas sem morte celular total em todas elas. A sensibilidade foi determinada através da viabilidade celular e peroxidação lipídica, comparando a situação controle, antes do estresse, à situação após o estresse.

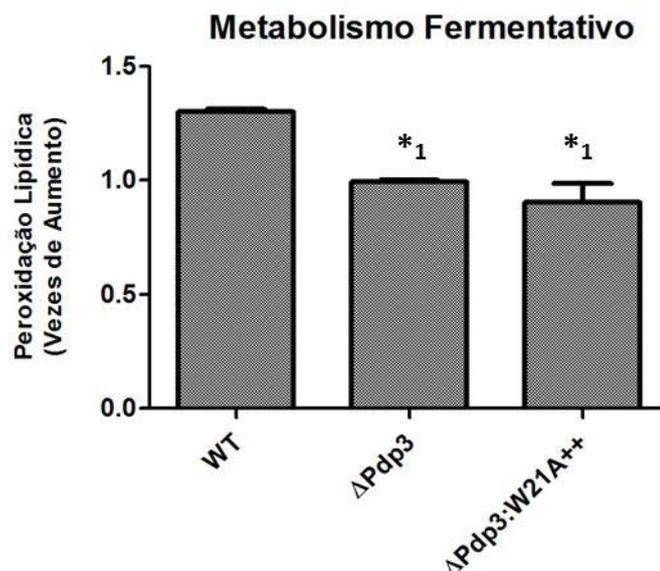
A deleção da Pdp3 ( $\Delta$ Pdp3) ocasionou um aumento de viabilidade celular em relação à cepa que expressa níveis basais de Pdp3 (WT), indicando que a deleção é benéfica em termos de resistência ao estresse oxidativo. A superexpressão da Pdp3 mutada em W21A ( $\Delta$ Pdp3:W21A<sup>++</sup>) ocasionou da mesma maneira um aumento de viabilidade celular em relação à cepa WT, confirmando a importância do resíduo de triptofano 21 na manutenção da funcionalidade da proteína e corroborando que sua perda de funcionalidade é benéfica em termos de estresse oxidativo. Os resultados encontram-se resumidos na Figura 13.

Novamente a inserção de um plasmídeo vazio na cepa deletada em Pdp3 ( $\Delta$ Pdp3:v) ocasionou resultado estatisticamente igual ao da cepa deletada sem o plasmídeo vazio ( $\Delta$ Pdp3), indicando que os resultados observados são função apenas da deleção desta proteína, sem influência da inserção do vetor plasmidial.



**Figura 13. Sensibilidade ao estresse oxidativo de células deficientes na Pdp3 e superexpressando a Pdp3 mutada em W21A e de seu controle em condições de metabolismo fermentativo sob repressão catabólica (efeito Crabtree).** Células cresceram em meio *dropout* contendo glicose 2% até metade da fase exponencial e foram submetidas ao estresse com peróxido de hidrogênio na concentração de 3 mM por 1 h a 28°C/160 rpm. A viabilidade celular foi medida através de plaqueamento das células em meio rico YPD2% sólido. Os resultados representam a média e desvio padrão de no mínimo 3 experimentos independentes. \* representa valores de média estatisticamente iguais para um nível de significância  $p < 0,05$ .

Foi observado que ausência ou perda funcional da Pdp3 protegeu a célula contra a peroxidação lipídica, uma vez que os níveis de dano oxidativo à membrana na cepa que não expressa a Pdp3 ( $\Delta Pdp3$ ) e na cepa que expressa esta proteína com a mutação W21A ( $\Delta Pdp3:W21A^{++}$ ) foram inferiores aos da WT. Os níveis de peroxidação lipídica para estas duas cepas foram semelhantes, confirmando os resultados obtidos nos experimentos anteriores de que a perda do triptofano do *cage* aromático é capaz de inativar funcionalmente a Pdp3, que passa a apresentar comportamento semelhante à da cepa deletada nesta mesma proteína, evidenciando a importância deste resíduo na manutenção da atividade da proteína, conforme resultados explicitados na Figura 14.

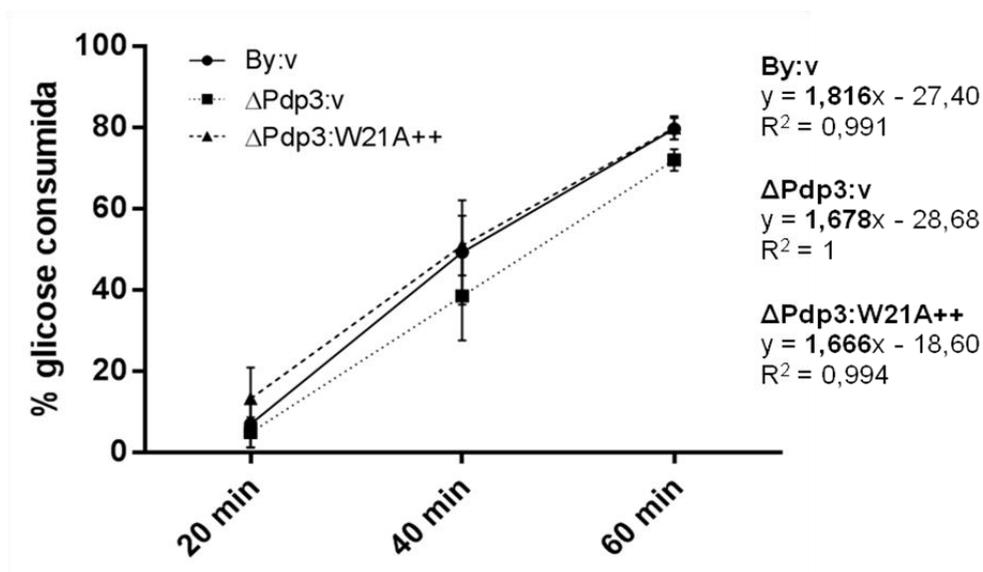


**Figura 14. Sensibilidade ao estresse oxidativo de células deficientes na Pdp3 e superexpressando a Pdp3 mutada em W21A e de seu controle em condições de metabolismo fermentativo sob repressão catabólica (efeito Crabtree).** Células cresceram em meio *dropout* contendo glicose 2% até metade da fase exponencial e foram submetidas ao estresse com peróxido de hidrogênio na concentração de 3 mM por 1 h a 28°C/160 rpm. Os níveis de peroxidação lipídica foram determinados pelo método de TBARS e os resultados foram expressos como uma razão entre o nível de peroxidação lipídica após e antes do estresse. Os resultados representam a média e desvio padrão de no mínimo 3 experimentos independentes. \* representa valores de média estatisticamente iguais para um nível de significância  $p < 0,05$ .

Em metabolismo fermentativo a velocidade de consumo de glicose é alta quando comparada ao metabolismo oxidativo, uma vez que o rendimento energético por molécula de glicose em condições fermentativas (2 ATP/glicose) é baixo em comparação ao rendimento energético em condições respiratórias (30-32 ATP/glicose).

Os resultados obtidos para o consumo de glicose (Figura 15) indicam que a deleção da Pdp3 ( $\Delta Pdp3:v$ ) ou a superexpressão desta proteína com a mutação W21A ( $\Delta Pdp3:W21A^{++}$ ) ocasiona uma redução no consumo de glicose em relação à cepa WT controle (By:v), corroborando com os resultados anteriores que indicam que a deleção ou perda de funcionalidade da Pdp3 diminui a taxa de proliferação e o perfil fermentativo. Além disso, observa-se que a taxa de consumo de glicose da cepa que superexpressa a Pdp3 mutada em W21A ( $\Delta Pdp3:W21A^{++}$ ) é semelhante ao da cepa deletada controle ( $\Delta Pdp3:v$ ), indicando junto aos resultados obtidos anteriormente que a deleção ou perda de funcionalidade da Pdp3 pela mutação

W21A ocasionam efeitos metabólicos semelhantes podendo indicar que a Pdp3 exerce uma função relacionada ao *shift* metabólico de respiração para fermentação em levedura dentro do contexto de metabolismo energético.



**Figura 15. Consumo de glicose em condições não proliferantes de células deficientes na Pdp3 e superexpressando a Pdp3 mutada em W21A em relação a WT coletadas em metabolismo fermentativo:** As cepas foram cultivadas em meio *dropout* contendo glicose 2% até metade da fase exponencial, coletadas por centrifugação e transferidas para solução de glicose contendo tampão (condições não proliferantes). A taxa do consumo de glicose foi determinada por CLAE. Os resultados representam a média e desvio padrão de no mínimo 3 experimentos independentes.

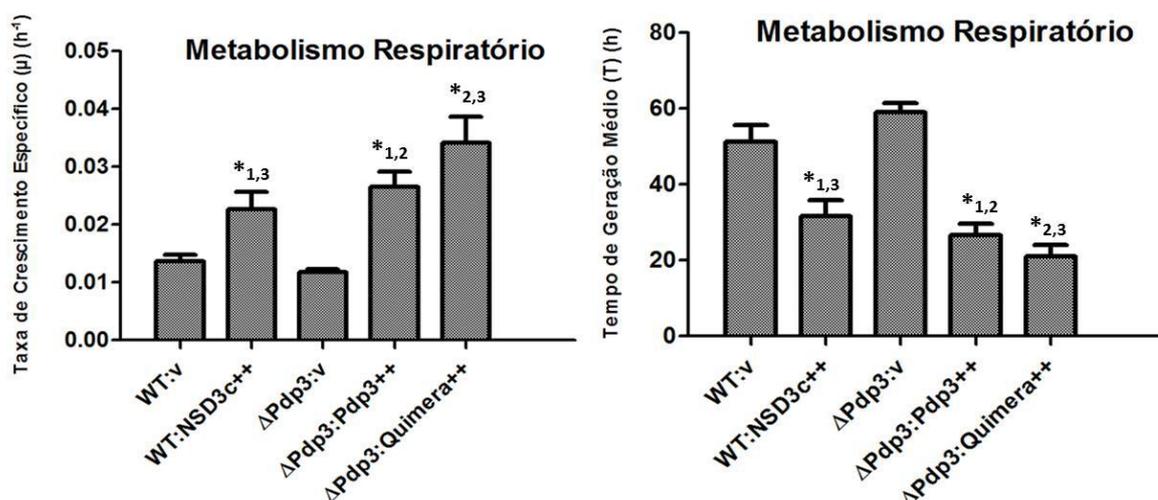
O conjunto de resultados obtidos indica que a superexpressão da proteína mutada Pdp3 substituída no resíduo de triptofano 21 por uma alanina (mutação W21A) em metabolismo fermentativo ocasiona um fenótipo semelhante ao da deleção de Pdp3, com uma diminuição da taxa de proliferação celular e maior resistência ao estresse oxidativo, evidenciando a importância deste resíduo para a manutenção da funcionalidade da Pdp3 e que a deleção ou perda de funcionalidade desta proteína é benéfica para a célula em termos de resistência ao estresse oxidativo, afetando negativamente a taxa de crescimento e proliferação celular.

#### **4.2. Efeitos da Pdp3 de levedura e da NSD3c humana e suas modificações em levedura sob condições de metabolismo respiratório**

Em meio contendo glicerol as células de levedura adotam o metabolismo respiratório, ou seja, condições metabólicas de uma célula humana saudável que recebe aporte normal de oxigênio. Esta condição de crescimento da levedura permite avaliar como uma célula saudável, que cresce e se desenvolve em condições aeróbicas, sofre influência das proteínas Pdp3 e NSD3c em relação ao metabolismo. A taxa de proliferação observada em condições respiratórias foi bem menor do que em condições fermentativas.

A superexpressão da isoforma curta da NSD3 (WT:NSD3c++) aumentou a taxa de crescimento específico quando comparado ao controle, indicando que a proteína humana NSD3c, superexpressa em casos de câncer de mama, ocasionaria um aumento da taxa de proliferação celular. Ou seja, a superexpressão da isoforma curta da NSD3c é capaz de transformar o fenótipo de *S. cerevisiae* da mesma maneira que na transformação fenotípica de uma célula saudável em tumoral quando tal proteína é superexpressa nos casos de câncer (Rona, 2014).

A deleção da proteína Pdp3 ( $\Delta$ Pdp3) ocasionou uma pequena redução na taxa de proliferação em relação à cepa WT, corroborando com os resultados obtidos de que a Pdp3 influencia positivamente a proliferação celular, visto que sua deleção modifica o fenótipo da célula diminuindo sua velocidade de crescimento. Por outro lado, a superexpressão da Pdp3 ( $\Delta$ Pdp3:Pdp3++) em condições de metabolismo respiratório ocasionou um aumento bastante pronunciado da taxa de crescimento em relação ao controle, atingindo níveis semelhantes aos da superexpressão da NSD3c humana em levedura. A superexpressão da quimera da proteína Pdp3 contendo o domínio PWWP da NSD3c humana no lugar do PWWP original ( $\Delta$ Pdp3:Quimera++) também ocasionou um aumento bastante pronunciado em relação ao controle, indicando que o domínio PWWP da NSD3c humana é capaz de substituir funcionalmente o domínio da Pdp3. Tais resultados estão representados na Figura 16.



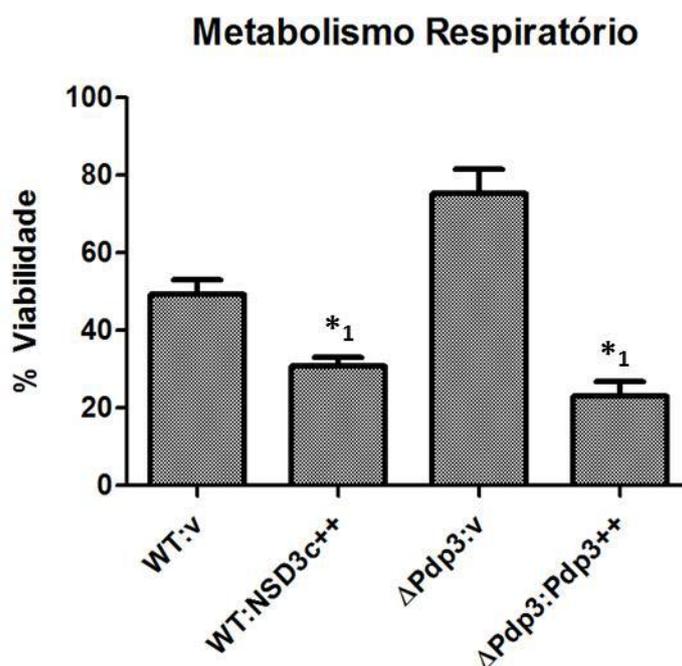
**Figura 16.** Determinação da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e do tempo de geração médio (T) de células de levedura superexpressando a NSD3c humana, a Pdp3, a quimera da Pdp3 contendo o domínio PWWP da NSD3c humana e seus controles em condições de metabolismo respiratório. Para a determinação de  $\mu$  e de T, as cepas foram cultivadas em *dropout* suplementado com glicerol 4%, as medidas da absorvância a 570 nm foram realizadas em intervalos regulares até as células atingirem a fase estacionária. O  $\mu$  destas células foi determinado na fase de crescimento exponencial pela expressão  $\ln X/X_0 = \mu t$  e o T pela expressão  $T = \ln 2/\mu$ . Os resultados representam a média e desvio padrão de no mínimo 3 experimentos independentes. \* representa valores de média estatisticamente iguais para um nível de significância  $p < 0,05$ .

Em condições de metabolismo respiratório, a célula apresenta as defesas antioxidantes bem desenvolvidas e pode lidar com o estresse oxidativo de modo mais eficiente. Desta forma, o estresse com peróxido nos experimentos de resistência ao estresse oxidativo foi feito a uma concentração de 20 mM, por uma hora a 28°C e 160 rpm, concentração anteriormente verificada (Rona, 2014) capaz de permitir um crescimento celular que tornasse possível a observação de diferenças entre as cepas em relação à resistência ao estresse oxidativo sem total morte celular. Os resultados para a sensibilidade ao estresse oxidativo em condições respiratórias estão indicados nas Figuras 17 e 18.

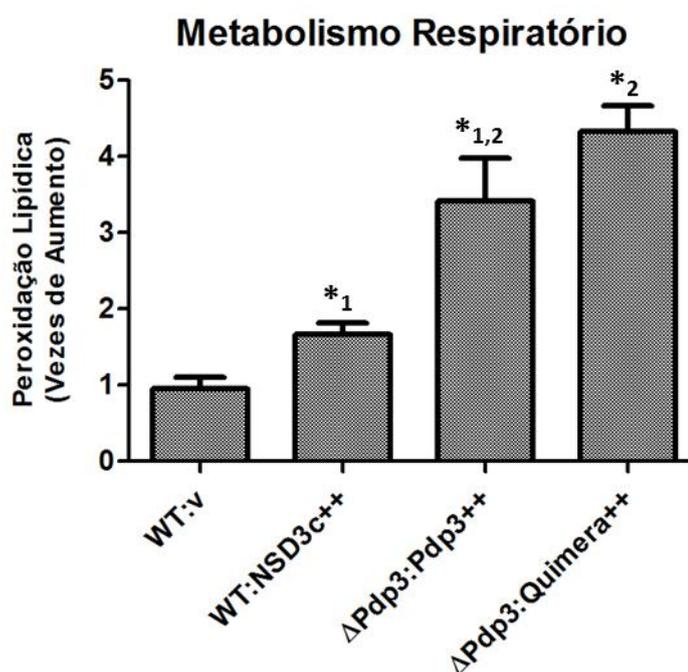
A superexpressão da NSD3c (WT:NSD3c++) (Rona, 2014) ou da Pdp3 ( $\Delta$ Pdp3:Pdp3++) ocasionou um maior nível de peroxidação lipídica em relação aos seus respectivos controles, associado a uma queda na viabilidade após o estresse com peróxido de hidrogênio, ou seja, a célula que superexpressa a NSD3c ou a Pdp3 apresenta uma menor resistência às espécies reativas de oxigênio (EROs). Por outro lado, a deleção da proteína Pdp3 ( $\Delta$ Pdp3:v) ocasionou uma maior resistência a EROs, verificado pela manutenção de uma viabilidade superior a do

controle que expressa níveis basais da Pdp3 (WT:v). Estes resultados mostram que a célula se torna mais resistente a EROs quando há deficiência na proteína Pdp3. Esse fenômeno ocorre provavelmente devido à diminuição do metabolismo oxidativo, anteriormente verificada na superexpressão da NSD3c (Rona, 2014) e proposta como hipótese para a Pdp3, o que diminuiria as defesas antioxidantes estimuladas durante a respiração celular. Além disso, a superexpressão da quimera da Pdp3 contendo o domínio PWWP da NSD3c ( $\Delta$ Pdp3:Quimera++) ocasionou um aumento bastante pronunciado dos níveis de peroxidação lipídica em relação à cepa WT, semelhante à cepa superexpressando da Pdp3 ( $\Delta$ Pdp3:Pdp3++), indicando novamente que o domínio PWWP da NSD3c humana é capaz de substituir funcionalmente o da Pdp3 em termos metabólicos.

Tais resultados associados aos obtidos em experimentos anteriores (Rona, 2014) evidenciam a influência da NSD3c humana no *shift* metabólico energético (Rona, 2014) e as consequências em termos de estresse oxidativo que ocorre devido à repressão do metabolismo respiratório e ao estímulo da via glicolítica sob tais condições. Propõe-se que um mecanismo de alteração metabólica semelhante ocorre no caso da Pdp3 de levedura. Além disso, observa-se que o domínio PWWP da proteína humana NSD3c substitui funcionalmente o mesmo domínio na proteína Pdp3 de levedura, corroborando com resultados obtidos anteriormente (Rona, 2014) e confirmando a conservação funcional deste domínio entre a levedura e a célula humana.



**Figura 17. Sensibilidade ao estresse oxidativo de células de levedura superexpressando a NSD3c humana e superexpressando a Pdp3 e seus controles em condições de metabolismo respiratório.** Células cresceram em meio *dropout* contendo glicerol 4% até metade da fase exponencial e foram submetidas ao estresse com peróxido de hidrogênio na concentração de 20 mM por 1 h a 28°C/160rpm. A viabilidade celular foi medida através de plaqueamento das células em meio rico YPD 2% sólido. Os resultados representam a média e desvio padrão de no mínimo 3 experimentos independentes. \* representa valores de média estatisticamente iguais para um nível de significância  $p < 0,05$ .



**Figura 18. Sensibilidade ao estresse oxidativo de células de levedura superexpressando a NSD3c humana, a Pdp3 e a quimera da Pdp3 contendo o domínio PWWP da NSD3c humana e seus controles em condições de metabolismo respiratório.** Células cresceram em meio *dropout* contendo glicerol 4% até metade da fase exponencial e foram submetidas ao estresse com peróxido de hidrogênio na concentração de 20mM por 1 h a 28°C/160 rpm. Os níveis de peroxidação lipídica foram determinados pelo método de TBARS e os resultados foram expressos como uma razão entre o nível de peroxidação lipídica após e antes do estresse. Os resultados representam a média e desvio padrão de no mínimo 3 experimentos independentes. \* representa valores de média estatisticamente iguais para um nível de significância  $p < 0,05$ .

A taxa de consumo de glicose foi determinada apenas para as células que foram cultivadas em glicose, visto que as células cultivadas em glicerol (metabolismo respiratório) apresentam um consumo muito lento de glicose, não sendo possível verificar diferenças pronunciadas entre as mutantes e seus controles.

De acordo com o conjunto de resultados obtidos, observa-se que a superexpressão da proteína Pdp3 em *Saccharomyces cerevisiae* sob condições de metabolismo respiratório é capaz de alterar o fenótipo da célula de levedura aumentando a taxa de proliferação celular e elevando a sensibilidade ao estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio, em uma manifestação fenotípica semelhante à superexpressão da NSD3c humana, reportada como capaz de transformar o metabolismo de uma célula saudável em tumoral (efeito Warburg) quando superexpressa. Além disso, a superexpressão da proteína Pdp3 quimera contendo o domínio PWWP do oncogene de câncer de mama NSD3c humano em condições respiratórias altera o fenótipo da levedura de maneira semelhante à superexpressão da Pdp3, aumentando a taxa de proliferação celular e elevando a sensibilidade ao estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio, indicando que o domínio PWWP do oncogene humano NSD3c é capaz de substituir funcionalmente este mesmo domínio na Pdp3, evidenciando a semelhança funcional em termos de efeito metabólico gerado por estas proteínas, bem como confirma a conservação da funcionalidade do domínio PWWP entre as espécies.

## 5. CONCLUSÃO

A proteína Pdp3 de *Saccharomyces cerevisiae*, parte integrante do complexo NuA3 com função de histona acetiltransferase, e a proteína NSD3c humana, superexpressa em casos de câncer de mama e com função de histona metiltransferase, parecem apresentar semelhança funcional dentro do contexto do metabolismo energético.

## 6. REFERÊNCIAS

Abbott, Derek A.; Suir, Erwin; Duong, Giang-Huong; Hulster, Erik de; Pronk, Jack T.; van Maris, Antonius J A (2009): **Catalase overexpression reduces lactic acid-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae***. In *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (8), p. 2320–2325. DOI: 10.1128/AEM.00009-09

Albert, Mareike; Helin, Kristian (2010): **Histone methyltransferases in cancer**. In *Semin. Cell Dev. Biol.* 21 (2), p. 209–220. DOI: 10.1016/j.semcd.2009.10.007

Alvarez-Venegas, Raúl; Avramova, Zoya (2012): **Evolution of the PWWP-domain encoding genes in the plant and animal lineages**. In *BMC Evol. Biol.* 12, p. 101. DOI: 10.1186/1471-2148-12-101

Botstein, David; Fink, Gerald R. (2011): **Yeast: an experimental organism for 21st Century biology**. In *Genetics* 189 (3), p. 695–704. DOI: 10.1534/genetics.111.130765

Brasil, Aline de Araújo et al. (2013): **The involvement of GSH in the activation of human Sod1 linked to FALS in chronologically aged yeast cells**. In *FEMS Yeast Research* 13, p. 433–440

Brasil, Aline de Araújo (2011): **Esclerose Lateral Amiotrófica e Estresse Oxidativo: envolvimento do antioxidante glutatona (GSH)**. Dissertação. Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro. Instituto de Química.

Carlson, M. (1999): **Glucose repression in yeast**. In *Current Opinion in Microbiology* 2, p. 202–207

Dastidar, Ranita Ghosh; Hooda, Jagmohan; Shah, Ajit; Cao, Thai M.; Henke, Robert Michael; Zhang, Li (2012): **The nuclear localization of SWI/SNF proteins is subjected to oxygen regulation**. In *Cell Biosci* 2 (1), p. 30. DOI: 10.1186/2045-3701-2-30

Derisi, J. L.; Iyer, V. R.; Brown, P. O. (1997): **Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale**. In *Science* 278 (5338), p. 680–686

Diaz-Ruiz, Rodrigo; Rigoulet, Michel; Devin, Anne (2011): **The Warburg and Crabtree effects: on the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression.** In *Biochim.Biophys. Acta* 1807 (6), p. 568–576. DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.08.010

Flores, C.L. et al. (2000): **Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts.** In *FEMS Microbiology Reviews* 24, p. 507–529

França, M. B.; Panek, A. D.; Eleutherio, E. C. A. (2007): **Oxidative stress and its effects during dehydration.** In *Comp. Biochem.Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 146 (4), p. 621–631. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.02.030.

Gancedo, Carlos; Flores, Carmen-Lisset. (2008): **Moonlighting proteins in yeasts.** In *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72 (1), p. 197-210. DOI: 10.1128/MMBR.00036-07

Guaragnella, Nicoletta; Palermo, Vanessa; Galli, Alvaro; Moro, Loredana; Mazzoni, Cristina; Giannattasio, Sergio (2013): **The expanding role of yeast in cancer research and diagnosis: insights into the function of the oncosuppressors p53 and BRCA1/2.** In *FEMS Yeast Res.* 14 (1), p.2-16. DOI: 10.1111/1567-1364.12094

Gilbert, Tonya M.; McDaniel, Stephen L.; Byrum, Stephanie D.; Cades, Jessica A.; Dancy, Blair C. R.; Wade, Herschel et al. (2014): **A PWWP Domain-Containing Protein targets the NuA3 acetyltransferase complex via histone H3 lysine 36 trimethylation to coordinate transcriptional elongation at coding regions.** In *Mol. Cell Proteomics* 13 (11), p. 2883-95. DOI: 10.1074/mcp.M114.038224

Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. (2000): **The hallmarks of cancer.** In *Cell*, 100, p. 57-70

He, Chao; Li, Fudong; Zhang, Jiahai; Wu, Jihui; Shi, Yunyu (2013): **The methyltransferase nsd3 has chromatin-binding motifs, phd5-c5hch, that are distinct from other nsd (nuclear receptor set domain) family members in their histone h3 recognition.** In *J. Biol. Chem.* 288 (7), p. 4692–4703. DOI: 10.1074/jbc.M112.426148

Herrero, E. et al. (2008): **Redox control and oxidative stress in yeast cells.** *Biochimica et biophysica acta* 1780, p. 1217–1235

Huen, Michael S. Y. et al. (2010): **Regulation of chromatin architecture by the PWWP domain-containing DNA damage-responsive factor EXPAND1/MUM1**. In *Mol. Cell* 37 (6), p. 854–864. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.12.040

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA. **Informações sobre o Câncer**. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)>. Acesso em: 13 de Junho de 2015.

Kachroo, Aashiq H.; Laurent, Jon M.; Yellman, Christopher M.; Meyer, Austin G.; Wilke, Claus O.; Marcotte, Edward M. (2015): **Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity**. In *Science*.348 (6237) p. 921-925. DOI: 10.1126/science.aaa0769

Kim, J. H. et al. (2013): **The glucose signaling network in yeast**. In *Biochimica et biophysica acta* 1830 (11), p. 5204–5210

Kirchman, P. A.; Botta, G. (2008): **Conditions Requiring Respiratory Metabolism**. In *Vitro* 128 (2), p. 187–195

Kurat, Christoph F.; Recht, Judith; Radovani, Ernest; Durbic, Tanja; Andrews, Brenda; Fillingham, Jeffrey (2014): **Regulation of histone gene transcription in yeast**. In *Cell. Mol. Life Sci.* 71 (4), p. 599–613. DOI: 10.1007/s00018-013-1443-9

Li, Yan; Trojer, Patrick; Xu, Chong-Feng; Cheung, Peggie; Kuo, Alex; Drury, William J. et al. (2009): **The target of the NSD family of histone lysine methyltransferases depends on the nature of the substrate**. In *J. Biol. Chem.* 284 (49), p. 34283–34295. DOI: 10.1074/jbc.M109.034462

López-Lázaro, Miguel (2008): **The Warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen?** In *Anticancer Agents Med Chem* 8 (3), pp. 305–312

Lucio-Eterovic, Agda Karina; Carpenter, Phillip B. (2011): **An open and shut case for the role of NSD proteins as oncogenes**. In *Transcription* 2 (4), p. 158–161. DOI: 10.4161/trns.2.4.16217

Mannarino, Sérgio C.; Amorim, Maria A.; Pereira, Marcos D.; Moradas-Ferreira, Pedro; Panek, Anita D.; Costa, Vítor; Eleutherio, Elis C A (2008): **Glutathione is necessary to ensure benefits of calorie restriction during ageing in *Saccharomyces cerevisiae***. In *Mech. Ageing Dev.* 129 (12), p. 700–705. DOI: 10.1016/j.mad.2008.09.001

Morishita, Masayo; Di Luccio, Eric (2011a): **Cancers and the NSD family of histone lysine methyltransferases**. In *Biochim.Biophys. Acta* 1816 (2), p. 158–163. DOI: 10.1016/j.bbcan.2011.05.004

Morishita, Masayo; Di Luccio, Eric (2011b): **Structural insights into the regulation and the recognition of histone marks by the SET domain of NSD1**. In *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 412 (2), p. 214–219. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.07.061

Moskovitz, J.; Bar-Noy, S.; Williams, W. M.; Requena, J.; Berlett, B. S.; Stadtman, E. R. (2001): **Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals**. In *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (23), p. 12920–12925. DOI: 10.1073/pnas.231472998

Nobel Prize. **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2001**: Disponível em: <[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2001/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2001/)>. Acesso em: 04 de Julho de 2015.

Nevoigt, E.; Sahl, U. (1997): **Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae***. In *FEMS Microbiology Reviews* 21, p. 231–241

Qin, Su; Min, Jirong (2014): Structure and function of the nucleosome-binding PWWP domain. In *Trends in Biochemical Sciences* 39 (11), p. 536-547. DOI:10.1016/j.tibs.2014.09.001

Rona, Germana Breves (2014): **Uma nova visão sobre a função da ORF YLR455W de *S. cerevisiae*, similar ao pró-oncogene humano WHSC1L1/NSD3**. Dissertação. Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro. Instituto de Química.

Ruckenstuhl, Christoph; Büttner, Sabrina; Carmona-Gutierrez, Didac; Eisenberg, Tobias; Kroemer, Guido; Sigrist, Stephan J. et al. (2009): **The Warburg effect**

**suppresses oxidative stress induced apoptosis in a yeast model for cancer.** In *PLoS ONE* 4 (2), p. e4592. DOI: 10.1371/journal.pone.0004592

Santidrian, Antonio F.; Matsuno-Yagi, Akemi; Ritland, Melissa; Seo, Byoung B.; LeBoeuf, Sarah E.; Gay, Laurie J. et al. (2013): **Mitochondrial complex I activity and NAD<sup>+</sup>/NADH balance regulate breast cancer progression.** In *J. Clin. Invest.* 123 (3), p. 1068–1081. DOI: 10.1172/JCI64264

Slater, Leanne M.; Allen, Mark D.; Bycroft, Mark (2003): **Structural variation in PWWP domains.** In *J. Mol. Biol.* 330 (3), p. 571–576

Stec, I.; Nagl, S. B.; van Ommen, G J; den Dunnen, J. T. (2000): **The PWWP domain: a potential protein-protein interaction domain in nuclear proteins influencing differentiation?**In *FEBS Lett.* 473 (1), p. 1–5

Steels, E. L.; Learmonth, R. P.; Watson, K. (1994): **Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically.** In *Microbiology (Reading, Engl.)* 140 (Pt 3), p. 569–576

Thevelein, J. M. (1994): **Signal transduction in yeast.** In *Yeast* 10, p. 1753–1790

Thevelein, J. M.; De Winde, J. H. (1999): **Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** In *Molecular Microbiology* 33 (5), p. 904–18

Toledano, M. B. (2003): **Yeast stress responses.** [s.l.]In Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

Tosato, Valentina; Grüning, Nana-Maria; Breitenbach, Michael; Arnak, Remigiusz; Ralser, Markus; Bruschi, Carlo V. (2012): **Warburg effect and translocation-induced genomic instability: two yeast models for cancer cells.** In *Front Oncol* 2, p. 212. DOI: 10.3389/fonc.2012.00212

Trevisol, E. T. V. et al. (2011): **The effect of trehalose on the fermentation performance of aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*.** In *Applied Microbiology and Biotechnology* 90, p. 697–704

Vermeulen, Michiel; Eberl, H. Christian; Matarese, Filomena; Marks, Hendrik; Denissov, Sergei; Butter, Falk et al. (2010): **Quantitative interaction proteomics**

**and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers.** In *Cell* 142 (6), p. 967–980. DOI: 10.1016/j.cell.2010.08.020

Völkel, Pamela; Angrand, Pierre-Olivier (2007): **The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation.** In *Biochimie* 89 (1), p. 1–20. DOI: 10.1016/j.biochi.2006.07.009

Yang, Zeng-Quan; Liu, Gang; Bollig-Fischer, Aliccia; Giroux, Craig N.; Ethier, Stephen P. (2010): **Transforming properties of 8p11-12 amplified genes in human breast cancer.** In *Cancer Res.* 70 (21), p. 8487–8497. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1013

Wang, Yu; Reddy, Bharat; Thompson, James; Wang, Hengbin; Noma, Ken-ichi; Yates, John R.; Jia, Songtao (2009): **Regulation of Set9-mediated H4K20 methylation by a PWWP domain protein.** In *Mol. Cell* 33 (4), p. 428–437. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.02.002

Warburg O. (1956): **On the origin of cancer cells.** In *Science*, 123 (3191), p. 309-314

Wolf, Amparo; Agnihotri, Sameer; Micallef, Johann; Mukherjee, Joydeep; Sabha, Nesrin; Cairns, Rob; Hawkins, Cynthia; Guha, Abhijit (211): **Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme.** In *Exp Med.* 208 (2), p. 313-26. doi: 10.1084/jem.20101470. Epub 2011 Jan 17

Wu, Hong; Zeng, Hong; Lam, Robert; Tempel, Wolfram; Amaya, Maria F.; Xu, Chao et al. (2011): **Structural and histone binding ability characterizations of human PWWP domains.** In *PLoS ONE* 6 (6), p. e18919. DOI: 10.1371/journal.pone.0018919

Zhou, Zhangle; Thomsen, Rune; Kahns, Søren; Nielsen, Anders Lade (2010): **The NSD3L histone methyltransferase regulates cell cycle and cell invasion in breast cancer cells.** In *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 398 (3), p. 565–570. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.06.119

