

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**VALIDAÇÃO FUNCIONAL DE QUIMERAS LEXA_{DBD}GIM EM
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Ana Fátima Gouveia Teixeira de Amorim

MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E BIOTECNOLOGIA

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**VALIDAÇÃO FUNCIONAL DE QUIMERAS LEXA_{DBD}GIM EM
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Ana Fátima Gouveia Teixeira de Amorim

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

Orientador interno: Prof. Doutor Júlio Duarte³

¹ Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras.

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

³ Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E BIOTECNOLOGIA

2011



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

AGRADECIMENTOS

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

À Professora Doutora Lisete Fernandes por me ter dado a oportunidade de realizar o trabalho experimental no seu grupo de investigação, pelos conhecimentos transmitidos e pela dedicação e disponibilidade ao longo de todo o percurso do trabalho.

À minha colega Dora Pinto por toda a paciência, apoio, conversas/discussões e pelo bom ambiente de trabalho.

Um especial agradecimento à minha mãe e ao meu irmão André pelo carinho e apoio incondicional.

Ao Fábio Claro, à Marisa Jacinto, ao Bruno Rebelo, à Sónia Godinho, ao João Gonçalves, à Sara Cruz, ao Rivaly Miranda e ao Manuel Silva pelo companheirismo, boa disposição e amizade.

À minha família por estar sempre comigo.

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Símbolos

:: - na descrição do genótipo das estirpes, indica uma substituição/inserção de gene

Δ - na descrição do genótipo das estirpes, indica uma deleção do gene

Abreviaturas

AAA+ - do inglês *A*TPases *a*ssociated with various cellular *a*ctivities

Abs - *a*bsorvância

AD - do inglês *a*ctivation *d*omain

ADH1 - gene que codifica para a álcool desidrogenase

Af9 - do inglês *A*LL1-*f*used gene from chromosome *9* protein

Arp1 - do inglês *a*ctin-*r*elated *p*rotein *1*

ATP - do inglês *a*denosine *t*riphosphate

BIN2 e BIN3 - genes que codificam para subunidades da TriC

BNE - *b*anda *n*ão *e*specífica

BSA - do inglês *b*ovine *s*erum *a*lbumin

CCT/TriC - do inglês *c*haperonin *c*ontaining *T*CP-1/*T*CP-1 *r*ing *c*omplex

CEN - do inglês *c*entromere

c-myc - do inglês *c*hicken-*m*yelocytomatosis oncogene

Cpy - carboxipeptidase Y

CTT1 - gene que codifica para a catalase

CYC1 - gene que codifica para a citocromo c isoforma 1

DBD - do inglês *D*NA *b*inding *d*omain

DO - *d*ensidade *ó*ptica

eIF1A - do inglês *e*ukaryotic translation *i*nitiation *f*actor *1A*

ENL - do inglês *e*leven-*n*ineteen-*l*eukemia

FtsA - proteína de ligação à membrana que interage com FtsZ e que é homóloga à actina

FtsZ - gene procariota que codifica uma proteína homóloga à tubulina

GAL1 - gene que codifica para uma galactocinase

GAL4 - gene que codifica para um ativador transcricional dos genes GAL

GAL10 - gene que codifica para UDP-glucose-4-epimerase

Gcn4 - do inglês *g*eneral *c*ontrol *n*onderepressible protein *4*

GFP - do inglês *g*reen *f*luorescent *p*rotein

GimC - do inglês *g*enes *i*nvolved in *m*icrotubule *b*iogenesis *c*omplex

GLN3 - gene que codifica para um ativador transcricional de genes que codificam proteínas envolvidas no catabolismo de fontes pobres em de azoto

GLR1 - gene que codifica para a glutationa redutase
GSH1 - gene que codifica para a glutamilsteína sintetase
GTF's - do inglês *general transcription factors*
Msn2/4 - do inglês *multicopy suppressor of SNF1 mutation*
HA - *human influenza hemagglutinin epitope tag*
HIF - do inglês *hypoxia inducible factor*
HIS3 - gene que codifica para imidazoglicerol-fosfato desidratase
HSP - do inglês *heat shock protein*
LEU2 - gene que codifica para β -isopropil-malato desidrogenase
LexA - repressor do sistema SOS em *Escherichia coli*
LexA_{DBD}Gim - quimera constituída pelo domínio de ligação ao DNA da proteína LexA em fusão com a ORF de uma das Gim, neste trabalho foi utilizada a designação Lexgim
MAT - do inglês *mating type*
Mig2 - do inglês *multicopy inhibitor of GAL gene expression*
MM - marcador de massa molecular
MM-1 - do inglês *myc modulator 1*
mol/cel - moléculas por célula
nd - não detectado
NLS - do inglês *nuclear localization signal*
ONPG - do inglês *ortho-nitrophenyl- β -galactopyranoside*
ORF - do inglês *open reading frame*
PCR - do inglês *polymerase chain reaction*
PEG - do inglês *polyethylene glycol*
Pfd - Prefoldina
PVDF - do inglês *polyvinylidene fluoride*
RBL2 - gene que codifica para o co-factor A, proteína de ligação à β - tubulina
RPB5 - gene que codifica para a subunidade ABC27 comum às RNA polimerases I, II, III
Sas5 - do inglês *something about silencing subunit 5*
SC - do inglês *synthetic complete*
SGD - do inglês *Saccharomyces genome database*
SDS - do inglês *sodium dodecyl sulfate*
SDS-PAGE - do inglês *sodium dodecyl sulfate - polyacrilamide gel electrophoresis*
SPC98 e *SPC97* - genes que codificam para componentes do complexo da γ -tubulina
SPB - do inglês *spindle pole bodies*
Ssn6/Cyc8 - co-repressor geral da transcrição
SWI/SNF - do inglês *switch/sucrose nonfermentable*
Taf14 - do inglês *TATA binding protein-associated factor*

TAP - do inglês *tandem affinity purification tag*

TBP - do inglês *TATA binding protein*

TE - *Iris-EDTA*

TIF11 - gene que codifica para a proteína eIF1A

TRP1 - gene que codifica para fosforibosil-antranilato isomerase

TRR1 - gene que codifica para a tioredoxina redutase

TRX2 - gene que codifica para a tioredoxina I

TUB1 e *TUB2* - genes que codificam para a α - e β - tubulina, respectivamente

UAS - do inglês *upstream activating sequences*

URA3 - gene que codifica para a orotidina 5-fosfato descarboxilase

Uri1/Bud27 - do inglês *unconventional prefoldin Rpb5 interactor*

URS - do inglês *upstream regulator sequences*

VBP1 - do inglês *VHL binding protein 1*

VHL - *von Hippel-Lindau*

Yaf9 - do inglês *yeast homolog of the human leukemogenic protein AF9*

Yap1 - do inglês *yeast AP-1*

YEATS - domínio conservado comum às proteínas *Yaf9*, *ENL*, *AF9*, *Taf14*, *Sas5*

YP - do inglês *yeast extract-peptone*

YPD - do inglês *yeast extract-peptone-dextrose*

YNB - do inglês *yeast nitrogen base*

RESUMO

O complexo GimC/Prefoldina é um complexo hetero-oligomérico envolvido na biogénese do citoesqueleto. Este complexo é constituído por seis subunidades distintas que se classificam em classe α (Gim2/Pfd3 e Gim5/Pfd5) e β (Gim1/Pfd6, Gim3/Pfd4, Gim4/Pfd2 e Gim6/Pfd1). GimC/Prefoldina interage com polipéptidos nascentes de actina e tubulina ainda ligados ao ribossoma e entrega-os à chaperonina CCT/TriC. Sabe-se que as diferentes subunidades Gim não são redundantes. A ausência de cada uma das subunidades leva a fenótipos distintos, nomeadamente, em condições de stresse oxidativo e osmótico em *Saccharomyces cerevisiae*. De acordo com o trabalho desenvolvido anteriormente no laboratório não foi possível correlacionar os fenótipos de stresse com defeitos a nível do citoesqueleto tendo-se equacionado se as diferenças fenotípicas poderiam estar relacionadas com a expressão genética de diferentes genes que actuam conforme as condições do meio. Atendendo ainda a dados da literatura, perspectiva-se o envolvimento das Gim, por exemplo, na regulação da transcrição.

Tendo como finalidade a identificação de alvos moleculares de interacção directa com as Gim e subjacentes aos fenótipos de stresse, pretendeu-se com o presente trabalho a validação funcional das proteínas Gim em *Saccharomyces cerevisiae*, para utilização em sistemas *two-hybrid*. Para tal, foram realizados ensaios *one-hybrid* com quimeras LexA_{DBD}Gim (Lexgim) e diferentes repórteres. Paralelamente foi averiguado o potencial de cada Gim na regulação da transcrição mediada pela RNA polimerase II.

Os resultados obtidos conduziram à identificação de promotores específicos nos quais as quimeras Lexgim não desempenham funções como activadores nem como repressores transcricionais, por si só, em condições de crescimento óptimas. Deste modo, as Lexgim poderão ser utilizadas para identificação de novos alvos de interacção, em ensaios *two-hybrid* nas condições testadas, ou seja na ausência de stresse. Porém, dado que a interacção Gim/alvo poderá existir apenas em condições de stresse, a capacidade das Lexgim afectarem a transcrição deverá ser estudada em condições de stresse oxidativo e osmótico, através de ensaios *one-hybrid*.

Palavras-chave: Gim, transcrição, *two-hybrid*, stresse

ABSTRACT

GimC/Prefoldin is a hetero-oligomeric complex involved in cytoskeleton biogenesis. It is composed by six different subunits belonging to α (Gim2/Pfd3 and Gim5/Pfd5) and β (Gim1/Pfd6, Gim3/Pfd4, Gim4/Pfd2 and Gim6/Pfd1) classes. This complex interacts with actin and tubulin nascent polypeptides while associated with ribosome and deliver them to chaperonin CCT/TriC. The Gim subunits are not redundant. In *Saccharomyces cerevisiae*, the absence of each subunit leads to different phenotypes, for instance, in the presence of osmotic and oxidative stress agents. Taking into account previous work developed in our laboratory, it was not possible to correlate the stress phenotypes with cytoskeleton defects so, it was hypothesized that the phenotypic differences could be due to differential expression of specific stress genes. In addition, literature data does not exclude the involvement of the Gim, for example, in transcriptional regulation.

In order to identify targets that directly interact with Gim and support the stress phenotypes, this work aimed the functional validation of Gim in *Saccharomyces cerevisiae*, in the context of two-hybrid systems. In this way, one-hybrid assays with each LexA_{DBD}Gim (Lexgim) chimeras and different reporters were performed. At the same time it was determined the potential of each Gim to regulate transcription mediated by RNA polymerase II.

The obtained results led to the identification of specific promoters in which Lexgim chimeras do not operate as transcriptional activators neither repressors *per se* under optimal growth conditions. In this way Lexgim can be used for two-hybrid assays within the tested conditions. Since the Gim/target interactions may occur only in stress conditions, the Lexgim capacity to affect transcription should be evaluated in osmotic and oxidative stress conditions through one-hybrid assays.

Key words: Gim, transcription, *two-hybrid*, stress

ÍNDICE

1. Introdução	
1.1 Chaperones moleculares	1
1.2 Complexo GimC/Prefoldina	3
1.3 Fenótipos associados às Gim em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
1.4 Expressão genética em mutantes gim em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
1.5 Possíveis funções das Gim na expressão genética	7
1.6 Objectivo	10
2. Material e Métodos	
2.1 Material biológico	11
2.2 Transformação e extracção de DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	11
2.3 Confirmação das sequências codificantes Lexgim	12
2.4 Extracção de DNA genómico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
2.5 Preparação do fragmento genómico <i>GIM6</i> e sequenciação	13
2.6 Transformação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
2.7 Ensaio de actividade da β -galactosidase	14
2.8 Preparação de extractos proteicos pós-mitocondriais e totais	15
2.9 Método de Bradford	15
2.10 Determinação dos níveis de proteínas em condições desnaturantes	16
3. Resultados e Discussão	
3.1 Confirmação das sequências nucleotídicas das <i>ORF's GIM2, GIM5 e GIM6</i>	17
3.2 Determinação da actividade das quimeras Lexgim nos repórteres L9LEU, L9URA e JK103	17
3.2.1 Ensaio <i>one-hybrid</i>	17
3.2.2 Repórter L9LEU	19
3.2.3 Repórter L9URA	20
3.2.4 Análise comparativa dos repórteres L9LEU e L9URA	20
3.2.5 Repórter JK103	21
3.3 Determinação da actividade das quimeras Lexgim nos repórteres JK1621 e PLG Δ 312S	23
3.3.1 Ensaio <i>one-hybrid</i>	23
3.3.2 Repórter JK1621	24
3.3.3 Repórter PLG Δ 312S	24
3.3.4 Razão entre os repórteres PLG Δ 312S e JK1621	25
3.4 Análise da abundância das quimeras Lexgim	26
4. Considerações Finais	

4.1 Avaliação do potencial papel das quimeras Lexgim na activação da transcrição	29
4.2 Avaliação do potencial papel das quimeras Lexgim na repressão da transcrição	30
4.3 Utilização das Gim para ensaios <i>two-hybrid</i>	30
5. Referências Bibliográficas	32
6. Anexos	
I Meios de cultura	34
II Solução de transferência	36
III Resultados suplementares	37

1. INTRODUÇÃO

1.1 Chaperones moleculares

As chaperones moleculares constituem um grupo de proteínas que desempenham um papel crucial em vários processos tais como, a modulação da conformação de proteínas e a associação/dissociação de complexos proteicos (Gong *et al.*, 2009). Embora as proteínas contenham na sua estrutura primária toda a informação para a aquisição da sua conformação nativa, são as chaperones moleculares que estabilizam as cadeias nascentes ainda ligadas ao ribossoma e as protegem, permitindo a aquisição de uma conformação nativa funcional, ou seja o *folding* das proteínas (Gomes-Puertas *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 1999). As chaperones moleculares afectam processos como a translocação de proteínas através de membranas, processamento de RNA e degradação de proteínas associadas ao retículo endoplasmático (Gong *et al.*, 2009). As chaperones moleculares existem em eucariotas (não só no citosol mas também nos compartimentos celulares) e procariontes formando famílias de proteínas conservadas (Deuerling e Bukau, 2004).

Diversas situações de stress levam a alterações nas proteínas como *misfolding* e/ou agregação. Neste contexto, o papel das chaperones é permitir a manutenção de um ambiente protegido para que os processos de *folding* ou *refolding* das proteínas ocorram sem erros (Gómez-Puertas *et al.*, 2004). Em organismos eucarióticos, são conhecidas como chaperones moleculares as proteínas HSP's (*heat-shock proteins*), AAA+ (*ATPases associated with various cellular activities*), a CCT/TriC (*chaperonin containing TCP-1/TCP-1 ring complex*) e o complexo GimC (*genes involved in microtubule biogenesis*)/Prefoldina (Gong *et al.*, 2009).

Uma das famílias de chaperones moleculares mais estudada é a das chaperoninas que pode ser dividida em dois grupos, I e II, conforme se encontram em eubactérias (GroEL), organelos endossimbóticos ou arqueas (termossoma) e citosol de eucariotas (CCT/TriC), respectivamente (Gómez-Puertas *et al.*, 2004). Embora todas as chaperoninas partilhem a mesma estrutura (complexos compostos por proteínas com cerca de 60 kDa, sob um forma de toróide geralmente composto por dois anéis), existem algumas diferenças importantes dentro dos grupos (Gómez-Puertas *et al.*, 2004). Enquanto, o grupo I apresenta 7 subunidades idênticas, o grupo II pode possuir anéis octaméricos compostos por uma ou duas subunidades diferentes, anéis nonaméricos compostos por três subunidades diferentes e anéis octaméricos com oito subunidades diferentes, como a chaperonina citosólica CCT/TriC (Gómez-Puertas *et al.*, 2004). O grupo I também é caracterizado pela presença de um pequeno oligómero denominado co-chaperonina (GroES) que actua em conjunto com a chaperonina (GroEL) no *folding* de proteínas cobrindo a cavidade da chaperonina (Gómez-Puertas *et al.*, 2004; Vabulas *et al.*, 2010). Apesar da ausência desta co-chaperonina no

grupo II, a sua função é mimetizada por uma sequência localizada na extremidade do domínio apical, denominada por protusão helicoidal (Gómes-Puertas *et al.*, 2004).

Em *Escherichia coli*, a GroEL interactua com cerca de 250 proteínas citosólicas diferentes e o *fold*ing é regulado pela encapsulação total do substrato no anel da chaperonina com a ajuda de GroES, cuja actividade é dependente de ATP (Vabulas *et al.*, 2010). Por seu turno, nos eucariotas existe o sistema CCT/TriC semelhante a GroEL, o qual interage com cerca de 10% das proteínas citosólicas recém-sintetizadas, incluindo a actina e a tubulina (Vabulas *et al.*, 2010) e a subunidade G α -transducina, a ciclina E, e a proteína supressora de tumor *von Hippel-Lindau* (VHL) (Young *et al.*, 2004).

Todas as células eucarióticas possuem microtúbulos os quais possuem funções essenciais à manutenção das células por exemplo a migração nuclear e orientação do fuso mitótico. Asseguram processos como a segregação dos cromossomas na mitose e na meiose, uma vez que constituem o fuso mitótico (Janke e Kneussel, 2010; Raynaud-Messina e Merdes, 2007). Os microtúbulos são polímeros dinâmicos de heterodímeros de α - e β - tubulina, com estrutura cilíndrica de 25nm de diâmetro (Meurer-Grob *et al.*, 2001). Cada um dos cilindros é composto, geralmente, por 13 protofilamentos, em que cada um é constituído por fios de α - e β - tubulina e apresentam extremidades polares bioquimicamente diferentes (Meurer-Grob *et al.*, 2001). A formação dos polímeros de heterodímeros de α - e β -tubulina resulta de um primeiro passo pós-traducional dos monómeros de α - e β - tubulina (Geissler *et al.*, 1998). Este processo denomina-se nucleação dos microtúbulos e necessita de γ -tubulina que é um componente do centro organizador dos microtúbulos (denominado em levedura por *spindle pole bodies* (SPB)) (Geissler *et al.*, 1998; Raynaud-Messina e Merdes, 2007). Sabe-se que é necessário, para a viabilidade celular, a manutenção de um nível mínimo de β -tubulina na célula. Contudo, o nível de β -tubulina deve estar em proporção com a α -tubulina (Lacefield e Solomon, 2003) pelo que, um excesso de β -tubulina relativamente à α -tubulina ou principalmente a presença de β -tubulina livre na célula, torna-se altamente tóxica em levedura (Geissler *et al.*, 1998). Diversas proteínas intervêm na formação dos heterodímeros, nomeadamente a chaperonina citosólica CCT/TriC importante no *fold*ing, bem como o complexo GimC/Prefoldina que actua em conjunto com a CCT/TriC na biogénese da α - e β - tubulina (Geissler *et al.*, 1998; Leroux *et al.*, 1999).

A actina assegura funções importantes na célula, nomeadamente na polarização, divisão celular e esporulação (Zheng *et al.*, 2009). Pode ser encontrada na célula na forma monómerica (G-actina) ou em forma de filamentos (F-actina) constituindo o citoesqueleto de actina (Zheng *et al.*, 2009). Tal como para a α - e β - tubulina, também o complexo GimC/Prefoldina está envolvido na biogénese da actina (Hansen *et al.*, 1999). Além disso, sabe-se que este complexo GimC/Prefoldina interage com proteínas relacionadas com actina,

como a Arp1 (*Actin-related protein 1*) (Rommealaere *et al.*, 2001) a qual é importante para a orientação do fuso mitótico e migração nuclear (Clark e Meyer, 1994).

1.2 Complexo GimC/Prefoldina

O complexo GimC/Prefoldina é conservado entre seres eucariotas nomeadamente mamíferos, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* (Geissler *et al.*, 1998). Embora arqueas não possuam citoesqueleto, a existência de GimC/Prefoldina encontra-se descrita em *Methanococcus jannaschii* e pensa-se que poderá estar relacionado com o *folding* de outros substratos. Em arqueas, o GimC/Prefoldina impede a agregação de proteínas e estabiliza proteínas em estado não nativo (Gutsche *et al.*, 1999; Leroux *et al.*, 1999).

O complexo GimC/Prefoldina é hetero-oligomérico, constituído por 6 subunidades diferentes entre si, denominadas Gim1/Pfd6, Gim2/Pfd3, Gim3/Pfd4, Gim4/Pfd2, Gim5/Pfd5 e Gim6/Pfd1, em *Saccharomyces cerevisiae*/mamíferos. É constituído por duas subunidades α (Gim2/Pfd3 e Gim5/Pfd5) e quatro subunidades β (Gim1/Pfd6, Gim3/Pfd4, Gim4/Pfd2 e Gim6/Pfd1) (Figura 1.1). Pode ser considerado funcionalmente conservado, na escala evolutiva, uma vez que *in vitro* as subunidades α e β de arqueas substituem funcionalmente a ausência de Gim5 e Gim1, respectivamente, de levedura (Leroux *et al.*, 1999). Assim, num contexto evolutivo pensa-se que o aparecimento destas proteínas poderá estar relacionado com possíveis proteínas ancestrais da actina e tubulina, isto é, FtsA e FtsZ, respectivamente (Leroux e Hartl, 2000). Não foram encontrados em bactérias, homólogos de GimC/Prefoldina (Leroux e Hartl, 2000), o que vem demonstrar que o seu papel como um cofactor do grupo II de chaperoninas está estritamente correlacionado com o facto de se ter mantido conservado nos eucariotas e arqueas (Gutsche *et al.*, 1999).

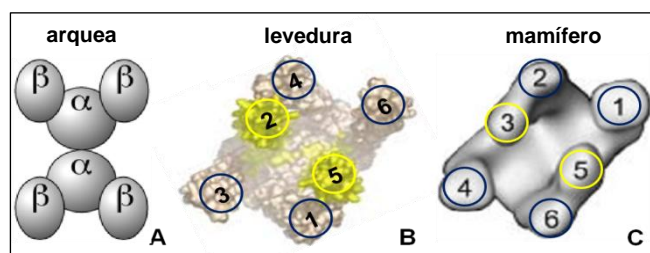


Figura 1.1 - Modelo da estrutura do complexo GimC/Prefoldina em: (A) *Methanococcus jannaschii* adaptado de Leroux *et al.* (1999); (B) *Saccharomyces cerevisiae* adaptado de Stirling *et al.* (2003) e (C) adaptado Simons *et al.* (2004). Em B e C os círculos a amarelo representam as subunidades α e os círculos a azul as subunidades β .

O GimC/Prefoldina nas arqueas, apenas recruta e estabiliza proteínas que ainda não possuem a sua conformação final, transferindo-as para o termosoma (Martín-Benito *et al.*, 2007). Por seu turno, nos seres eucarióticos, há um reconhecimento de um determinado

conjunto de proteínas as quais são protegidas no interior da sua cavidade até que sejam transferidas para a CCT/TriC (Simons *et al.*, 2004). Contudo, a deleção dos genes *GIM* em *Saccharomyces cerevisiae* não compromete a viabilidade celular, excepto em determinadas situações como temperaturas subóptimas ou na presença de drogas que afectam o citoesqueleto (Geissler *et al.*, 1998). Há que salientar que as diferentes subunidades não são redundantes, pois a ausência de cada uma das subunidades não é assegurada pelas restantes, existindo fenótipos diferentes, o que leva a equacionar que algumas proteínas Gim possam ter um papel mais preponderante que outras conforme as condições do meio (Geissler *et al.*, 1998; Gutsche *et al.*, 1999).

Cada subunidade Gim α contém duas ansas centrais β , flanqueadas por extremidades N- e C-terminais, enquanto as subunidades Gim β contém apenas uma ansa central (Figura 1.2) (Martin *et al.*, 2004; Simons *et al.*, 2004). As ansas centrais reúnem-se em forma de barris β formando uma plataforma e as hélices unem-se antiparalelamente com as extremidades N-terminal das cadeias na cavidade (Martin *et al.*, 2004; Simons *et al.*, 2004) (Figura 1.2). Quando todas as subunidades se encontram reunidas assumem uma conformação semelhante aos tentáculos de um polvo (Figura 1.1), o que lhe permite a interacção com a CCT/TriC para que esta execute o *folding* dos seus substratos (Whitehead *et al.*, 2007; Leroux *et al.*, 1999).

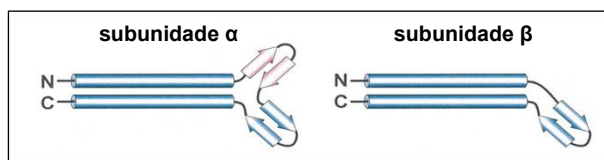


Figura 1.2 - Estrutura das subunidades α e β do complexo GimC/Prefoldina. Os cilindros a azul representam as hélices α e as setas representam as ansas β . N e C significam extremidades N-terminal e C-terminal, respectivamente (adaptado de Siegert *et al.*, 2000).

Estudos acerca do mecanismo de acção do complexo GimC/Prefoldina sugerem que este se liga co-traducionalmente à actina e tubulina entregando-as posteriormente à CCT/TriC, interagindo com esta, através das extremidades das hélices (Simons *et al.*, 2004). Em mamíferos, a GimC/Prefoldina interage com o polipéptido nascente de actina quando este contém 145 resíduos de aminoácidos (Figura 1.3). Esta união mantém-se até terminar a síntese de actina, que depois é encaminhada para a CCT/TriC (Hansen *et al.*, 1999). Ao ligar-se aos substratos que se encontram em estado *unfolded*, a GimC/Prefoldina evita o *misfolding* ou agregação durante a síntese e após a libertação do ribossoma, assegura uma maior eficiência na transferência da actina recém-sintetizada entre o ribossoma e a CCT/TriC (Hansen *et al.*, 1999). Existe também, a possibilidade da GimC/Prefoldina se voltar a ligar à actina após a libertação desta da CCT/TriC, no estado não nativo, deste

modo a actina entra num novo ciclo de *folding* entre a GimC/Prefoldina e CCT/TriC (Hansen *et al.*, 1999). Para a α - e β -tubulina o processo poderá ser semelhante. Por exemplo, a interacção entre a β -tubulina e a GimC/Prefoldina ocorre após a síntese de um polipéptido nascente com 250 resíduos de aminoácidos (Hansen *et al.*, 1999).

O complexo GimC/Prefoldina poderá intervir em diferentes fases da biogénese de proteínas como ligação a cadeias nascentes, interacção com proteínas não nativas libertadas pela CCT/TriC ou no resgate de proteínas que tenham sido desnaturadas, através de calor ou outros stresses (Hansen *et al.*, 1999).

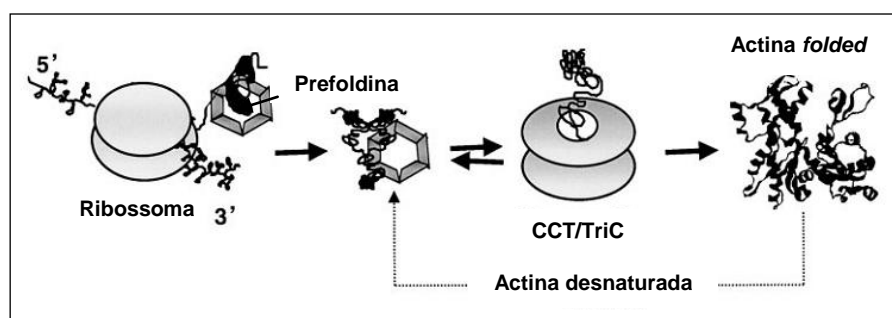


Figura 1.3 - Modelo do papel da GimC/Prefoldina no *folding* da actina (adaptado de Hansen *et al.*, 1999).

1.3 Fenótipos associados às Gim em *Saccharomyces cerevisiae*

O complexo GimC/Prefoldina não é essencial para a viabilidade celular, tornando-se necessário em condições ambientais subóptimas ou na ausência de outros genes (Leroux *et al.*, 1999).

Geissler *et al.* (1998) observaram que os mutantes *gim1*, *gim2*, *gim3*, *gim4* e *gim5* (o *gim6* não foi estudado) apresentaram sensibilidade a temperaturas subóptimas (23° e 14°C), além de exibirem uma proliferação lenta a 30°C e consequentemente um elevado tempo de duplicação. Na presença de drogas que provocam a despolimerização dos microtúbulos, como o benomil, os mutantes acima mencionados demonstraram elevada sensibilidade (Geissler *et al.*, 1998). Foi observado que mutantes *gim1*, *gim2*, *gim3*, *gim4* e *gim5* apresentaram maior sensibilidade que a estirpe selvagem à latrunculina-A, droga que se liga à actina, levando à despolimerização de F-actina e por isso gera stresse osmótico. Foi ainda descrita, a importância dos genes *GIM4* e *GIM5* (Voorst *et al.*, 2006) e *GIM2* (Fujita *et al.*, 2006) na tolerância ao etanol o qual induz genes de resposta ao stresse osmótico (Voorst *et al.*, 2006). A ausência de qualquer uma das subunidades Gim, também levou à redução da proliferação das células na presença de baixas concentrações de arsénio (Thorsen *et al.*, 2009). Este actua ao nível do citoesqueleto de actina e tubulina, disrompendo-o e também inibe a actuação do complexo GimC/Prefoldina (Thorsen *et al.*, 2009).

Os genes *GIM* asseguram uma vasta gama de interações genéticas especialmente com genes envolvidos na biogénese da tubulina. Os genes *GIM1*, *GIM2* e *GIM4* exibem interação genética com os genes *SPC98* e *SPC97* (codificam para componentes do complexo da γ -tubulina), *TUB1* e *TUB2* (codificam para a α - e β - tubulina, respectivamente), *BIN2* e *BIN3* (codificam para subunidades da TriC) e *RBL2* (codifica para uma proteína de ligação à β - tubulina) (Geissler *et al.*, 1998). Além disso, o complexo GimC/Prefoldina tornou-se essencial quando *TUB1* é sobre expresso ou mutado (Leroux *et al.*, 1999).

Estudos de Coelho (2007) realizados com estirpes mutadas para os diferentes genes *GIM*, em condições de stresse oxidativo e osmótico, permitiram verificar que a resposta ao stresse é diferente em cada mutante *gim*. As diferenças observadas não estão relacionadas com a composição estrutural do complexo GimC/Prefoldina, ou seja a ausência das subunidades α (Gim2 e Gim5) ou β (Gim1, Gim3, Gim4 e Gim6) não apresentam fenótipo semelhante entre si. Em stresse oxidativo, gerado pela presença de H₂O₂, os mutantes *gim2*, *gim3* e *gim6* exibiram maior sensibilidade que *gim1*, *gim4* e *gim5*. Na presença de menadiona, que também induz stresse oxidativo, os mutantes *gim2* e *gim5* foram menos afectados. Em condições de stresse osmótico, gerado através de NaCl, *gim1* e *gim5* foram mais afectados que *gim2*.

Foi observado o citoesqueleto (nosso laboratório, dados não publicados), de modo a perceber se os fenótipos de stresse estavam relacionados com defeitos a nível da estrutura do citoesqueleto de actina. As diferenças encontradas para o citoesqueleto de actina não se relacionaram com os diferentes fenótipos de stresse dos mutantes. Não se observaram diferenças no citoesqueleto de actina entre os mutantes *gim* que cresceram na ausência de stresse e os que foram submetidos a stresse gerado por NaCl ou por H₂O₂, excepto para os mutantes *gim4* e *gim6*. Os mutantes *gim1* e *gim5* apresentaram algumas diferenças no citoesqueleto isto é, a integridade do citoesqueleto de *gim5* pareceu mais afectada que a do *gim1*. Contudo, ambos apresentaram sensibilidade semelhante ao stresse osmótico gerado por NaCl.

1.4 Expressão genética em mutantes *gim* em *Saccharomyces cerevisiae*

A expressão de *TRX2* e *CTT1* é induzida em condições de stresse oxidativo e osmótico, respectivamente. O *TRX2* codifica para a proteína tioredoxina I, podendo ser observada a sua expressão na presença de H₂O₂ (Kuge e Jones, 1994). O *CTT1* codifica para a catalase citosólica, cuja expressão pode ser aumentada através do tratamento com NaCl (Schuller *et al.*, 1994).

Na presença de H₂O₂, dados do laboratório permitiram relacionar o fenótipo de stresse para os diferentes mutantes *gim* com a abundância de mRNA de *TRX2*. Os mutantes com maior resistência ao stresse oxidativo apresentaram menor produção de

mRNA, enquanto os mutantes mais sensíveis mostraram elevada expressão de *TRX2*. Na presença de NaCl, a expressão de *CTT1*, não se relacionou com os fenótipos de stresse de todos os mutantes gim. Há que salientar os mutantes gim2 e gim6, cuja sensibilidade na presença de NaCl é baixa, apresentaram expressão de mRNA significativamente inferior à da estirpe selvagem. As diferenças encontradas poderão dever-se ao facto da transcrição de *TRX2* e *CTT1* ser regulada através de mecanismos diferentes. A expressão de *TRX2* é induzida pelo factor de transcrição Yap1 (*yeast AP-1*) (Kuge e Jones, 1994). Sabe-se que em condições de stresse oxidativo este factor de transcrição acumula-se no núcleo induzindo a transcrição em promotores de genes transcritos pela RNA polimerase II, nomeadamente *TRX2* (tioredoxina I), *TRR1* (tioredoxina redutase), *GLR1* (glutathiona redutase), *GSH1* (glutamilcisteína sintetase) (Ikner e Shiozaki, 2005). Além disso, a ausência de Yap1 em *Saccharomyces cerevisiae* resulta numa reduzida resistência ao stresse oxidativo (Wu e Moye-Rowley, 1994). A expressão de *CTT1* é regulada por Msn2/Msn4 (*multicopy suppressor of SNF1 mutation*) que induz a transcrição mediada pela RNA polimerase II (Görner *et al.*, 1998). A deleção de *MSN2/MSN4* tem como consequência uma diminuição da expressão de *CTT1* (Görner *et al.*, 1998).

1.5 Possíveis funções das Gim na expressão genética

As alterações ambientais como deficiência de nutrientes, presença de etanol, stresse oxidativo, osmótico e térmico a que os seres vivos estão expostos provocam não só modificações na proliferação mas também em processos celulares como a transcrição (Chowdhury *et al.*, 1992; Ding *et al.*, 2009; Natarajan *et al.*, 2001). Quando as condições do meio se tornam adversas promovendo a alteração da homeostasia ocorre uma rápida reprogramação transcricional. A regulação da actividade da RNA polimerase II também é importante para a manutenção das condições de homeostasia das células, bem como para o seu desenvolvimento (Fuda *et al.*, 2009).

A iniciação da síntese de RNA é um dos passos mais importantes para a regulação da expressão de um gene (Casamassimi e Napoli, 2007). Esta envolve uma elevada diversidade de factores proteicos, cuja actividade é regulada por estímulos de stresse (Chowdhury *et al.*, 1992; Natarajan *et al.*, 2001). Exemplos de factores proteicos são: os transactivadores Yap1 e Msn2/Msn4 e factores gerais como TFIIS (factor de transcrição que actua na alongação da transcrição) (Estruch, 2000; Wu *et al.*, 2008). Neste processo, a RNA polimerase II actua juntamente com a maquinaria de transcrição basal que engloba os factores gerais de transcrição (GTF's - *general transcription factors*): TFIIA, -B, -D, -E, -F, e -H. Estes factores de transcrição podem actuar em diversos níveis, podendo interagir entre si, como também com sequências específicas de um gene, activando ou inibindo a transcrição de um gene (Fuda *et al.*, 2009). Há ainda o complexo Mediador que actua como

um adaptador entre os factores de transcrição ligados a elementos reguladores, a RNA polimerase II e os GTF's (Casamassimi e Napoli, 2007). A constituição do Mediador varia em função dos factores de transcrição, como o Yap1 e Msn2, os quais são recrutados em resposta a alterações do ambiente celular. O complexo Mediador é composto por 21 subunidades diferentes (Casamassimi e Napoli, 2007). Apesar de um conjunto de proteínas base sempre presentes, pode reunir componentes diferentes, ou seja o complexo Mediador poderá não ser sempre igual (Casamassini e Napoli, 2007). Este sofre modificações conformacionais possivelmente para integrar informações reguladoras através da ligação a activadores e repressores (Casamassini e Napoli, 2007). A formação de cada Mediador ocorre em resposta a factores de transcrição que são recrutados devido a mudanças do ambiente celular (Casamassini e Napoli, 2007). Tendo em conta a variabilidade que pode existir a nível do Mediador, as Gim não desempenhando um papel directo na transcrição, poderão interagir com componentes do Mediador.

Considerando os dados da bibliografia é possível equacionar o papel de algumas subunidades Gim na transcrição ou a sua interacção com proteínas que intervêm neste processo.

A Gim1 foi identificada num *screening* para factores que actuam ao nível do processo de gemulação (Ni e Snyder, 2001). Neste mesmo estudo, foi identificada a proteína Uri1/Bud27 (*unconventional prefoldin Rpb5 interactor*). Foi observado através de um ensaio *yeast two-hybrid* que a proteína Uri, prefoldina não convencional, possui domínios de ligação para a Prefoldina e para a subunidade Rpb5, comum às RNA polimerases I, II e III (Deplazes *et al.*, 2009; Gstaiger *et al.*, 2003).

A Gim2 foi detectada em extractos nucleares, o que pode ser devido a um papel na regulação da transcrição ou funções relacionadas (Geissler *et al.*, 1998). Por exemplo, a expressão de *CTT1* e *TRX2* parece ser afectada na ausência da Gim2 sob stresse gerado por NaCl e H₂O₂, respectivamente (nosso laboratório, dados não publicados). Além disso, a Pfd3 (Gim2) foi identificada como proteína VBP1 (*VHL binding protein 1*) em mamífero (Vainberg *et al.*, 1998), que se trata de uma proteína de ligação a VHL, a qual tem vindo a ser sugerida como elemento interveniente na transcrição. Em condições de hipoxia, leva à activação transcricional de genes alvo e estabilização dos factores HIF-1 α e HIF-2 α (factores indutíveis por hipoxia) (Carrol e Ashcroft, 2006).

Foi observado por Malagon *et al.* (2004) que a ausência de Gim5 aumenta a necessidade de TFIIIS. Além disso, a Gim5 foi identificada como homóloga da proteína MM-1 (*myc modulator 1*) em mamífero, cuja função é actuar como regulador negativo de *c-myc* (Fujioka *et al.*, 2001).

Foi identificado um conjunto de proteínas associadas à RNA polimerase II que formam um complexo do tipo prefoldina. Neste complexo, foram identificadas a Rpb5, a Pfd2

(Gim4) e Pfd6 (Gim1). Foi observada uma proteína semelhante à Pfd4 (Gim3), cuja expressão é inibida pelo factor p53, podendo ser importante na apoptose (Cloutier e Coulombe, 2010).

Existe uma gama de domínios conservados em diversas proteínas encontradas em diferentes sistemas envolvidos na remodelação da cromatina e que promovem diversas reacções como acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação (Schulze *et al.*, 2009). Um destes domínios denomina-se por YEATS devido às primeiras proteínas nas quais foi identificado (Yaf9, ENL, AF9, Taf14, Sas5) (Schulze *et al.*, 2009). As proteínas Yaf9 (*yeast homolog of the human leukemogenic protein AF9*), Taf14 (*TATA binding protein-associated factor*) e Sas5 (*something about silencing subunit 5*) são de *Saccharomyces cerevisiae* e estão envolvidas na remodelação da cromatina, modificação de histonas e regulação da transcrição (Schulze *et al.*, 2009). Ao estudar interacções genéticas foi observado que as três proteínas interagem com a proteína Gim1 (Schulze *et al.*, 2009). A proteína Yaf9 e a Sas5 interagem ambas com a Gim5 e as proteínas Taf14 e Yaf9 interagem com a Gim2 (Schulze *et al.*, 2009).

O papel das Gim na biogénese da actina e tubulina também poderá afectar a transcrição. A ausência de uma das Gim poderá resultar numa deficiência ao nível da biogénese dos componentes do citoesqueleto, influenciando a mobilização de factores de transcrição. Por exemplo, o Gln3 é um activador transcricional de genes envolvidos no transporte e catabolismo de fontes pobres em azoto, cuja acumulação no núcleo é dependente da estabilidade do citoesqueleto de actina (Cox *et al.*, 2004).

É conhecida a presença de actina no núcleo, na forma de monómero ou filamentos curtos, como estando envolvida na transcrição e outros eventos (Bettinger *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2009). Sabe-se que a actina é necessária para as três RNA polimerases, também se associa a ribonucleoproteínas nucleares importantes no processamento do mRNA e está envolvida no transporte de RNA e proteínas celulares (Zheng *et al.*, 2009). Como referido anteriormente, o complexo GimC/Prefoldina interage com a actina e a Gim2 foi localizada no núcleo. A presença da Gim2 no núcleo poderá estar relacionada com a presença de actina. Por outro lado, a actina e proteínas relacionadas com esta foram identificadas em associação com complexos de remodelação de cromatina e complexos histona-acetiltransferase (Bettinger *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2009). O complexo SWI/SNF (*switch sucrose nonfermentable*), o qual induz alterações na cromatina de modo a que a maquinaria de transcrição aceda ao DNA (Ryan *et al.*, 1998), interage com a actina (Zheng *et al.*, 2009).

Não obstante as evidências sobre o papel na transcrição, as Gim também podem afectar outros níveis de expressão genética. O factor de iniciação da tradução eIF1A (codificado por *TIF11*) interage com a proteína Uri. A proteína Uri parece desempenhar

funções a nível da tradução e no controlo de qualidade das proteínas (Deplazes *et al.*, 2009). Tendo em conta que a Uri interage com Pfd6 (Gim1), esta também poderá exercer algum papel a nível da tradução.

1.6 Objectivo

Tendo como finalidade a identificação de alvos moleculares de interacção directa com as Gim subjacentes aos fenótipos de stresse, pretendeu-se com o presente trabalho a validação funcional das proteínas Gim em *Saccharomyces cerevisiae*, para utilização em sistemas *two-hybrid*. Para tal, foram avaliadas as proteínas quiméricas resultantes de fusão do domínio de ligação ao DNA do repressor LexA de *Escherichia coli* com cada uma das regiões codificantes das *GIM* (LexA_{DBD}Gim), em sistemas *one-hybrid*. Paralelamente foi averiguado o potencial de cada Gim na regulação da transcrição.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Notas prévias

1. A água utilizada nos procedimentos experimentais comuns é bidestilada e quando mencionado, estéril (água bidestilada, autoclavada durante 20 minutos, a 121°C).
2. Os procedimentos, salvo referência em contrário, foram realizados à temperatura ambiente.
3. Os reagentes utilizados são ultra-puros ou pró-análise.
4. O equipamento utilizado foi o comum para laboratório de Biologia Molecular e Microbiologia salientando-se:
 - a. Termociclador - MyCycler Thermal Cycler, Eppendorf;
 - b. Nanodrop 1000, versão 3.1.1;
 - c. Espectrofotômetros - Heλios β, Spectronic Unicam (para densidades ópticas (DO) a 600nm e absorvância (abs) a 595nm) e Heλios α, Thermo Scientific (para absorvância a 420nm).

2.1 Material biológico

As estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas encontram-se descritas na tabela 2.1. Todas as culturas, em meio YPD (líquido ou sólido) (Anexo I), foram incubadas a 28°-30°C. A densidade celular da cultura líquida de levedura foi relacionada com a densidade óptica a 600nm (DO₆₀₀), na seguinte proporção: 1DO₆₀₀ = 2x10⁷ células.mL⁻¹.

Tabela 2.1 - Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas.

Estirpe #clone	Genótipo Relevante	Isogenia	Referência
yMC10#1	MATa; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>Δtrp1</i>	BY4741	Cavaleiro e Fernandes
yMC10#2	MATa; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>Δtrp1</i>	BY4741	Cavaleiro e Fernandes
Y02059	MATa; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YNL153c::kanMX4	BY4741	Euroscarf
Y06491	MATa; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YML094w::kanMX4	BY4741	Euroscarf
Y00000	MATa; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i>	BY4741	Euroscarf
10B2	MATa; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ::YAP1-GFP	ATCC201388	Invitrogen

MAT- mating type

Os plasmídeos utilizados neste trabalho encontram-se listados na tabela 2.2. As estirpes, yMC10#1 e yMC10#2 (Tabela 2.1), após transformação com os plasmídeos, foram incubadas a 28°-30°C em meio SC selectivo (líquido ou sólido) (Anexo I).

2.2 Transformação e extracção de DNA plasmídico de *Escherichia coli*

Os plasmídeos utilizados são do tipo *shuttle* o que permite a sua amplificação em bactéria, para posterior transformação em levedura. Células de *Escherichia coli* DH5α, foram

transformadas com os plasmídeos mencionados na tabela 2.2, através do método descrito por Chung *et al.* (1989). As culturas foram incubadas durante 16-18 horas (*overnight*), a 37°C, com agitação orbital. Posteriormente, iniciou-se o processo de extracção de DNA, através do método de lise alcalina descrito por Birnboim e Doly (1979). O DNA extraído foi quantificado no Nanodrop e a integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose.

Tabela 2.2 - Plasmídeos utilizados para transformação de *Saccharomyces cerevisiae*.

Plasmídeo #clone	Descrição	Referência
L9LEU	2LexUAS; promotor <i>HIS3.LacZ</i> ; 2 μ m; <i>LEU2</i>	Chatterjee e Struhl, 1995
L9URA	2LexUAS; promotor <i>HIS3.LacZ</i> ; 2 μ m; <i>URA3</i>	Chatterjee e Struhl, 1995
JK103	4LexUAS; promotor <i>GAL1/10.LacZ</i> ; 2 μ m; <i>URA3</i> ;	Kamens <i>et al.</i> , 1990
JK1621	4LexURS; promotor <i>CYC1.LacZ</i> ; 2 μ m; <i>URA3</i>	Keleher <i>et al.</i> , 1992
PLG Δ 312S	Sem regiões LexURS; promotor de JK1621; 2 μ m; <i>URA3</i>	Guarente e Mason, 1983
Lex Δ I	promotor <i>ADH1</i> ; Lex _{DBD} .NLS.HA; <i>CEN</i> ; <i>TRP1</i>	Fernandes <i>et al.</i> , 1997
Lexgim1	promotor <i>ADH1</i> ; Lex _{DBD} .NLS.HA. <i>GIM1</i> _{ORF} ; <i>CEN</i> ; <i>TRP1</i>	Pinto e Fernandes
Lexgim2#8	promotor <i>ADH1</i> ; Lex _{DBD} .NLS.HA. <i>GIM2</i> _{ORF} ; <i>CEN</i> ; <i>TRP1</i>	Coelho, Amorim e Fernandes
Lexgim2#12	promotor <i>ADH1</i> ; Lex _{DBD} .NLS.HA. <i>GIM2</i> _{ORF} ; <i>CEN</i> ; <i>TRP1</i>	Coelho, Amorim e Fernandes
Lexgim3#4	promotor <i>ADH1</i> ; Lex _{DBD} .NLS.HA. <i>GIM3</i> _{ORF} ; <i>CEN</i> ; <i>TRP1</i>	Pinto e Fernandes
Lexgim3#5	promotor <i>ADH1</i> ; Lex _{DBD} .NLS.HA. <i>GIM3</i> _{ORF} ; <i>CEN</i> ; <i>TRP1</i>	Pinto e Fernandes
Lexgim4#1	promotor <i>ADH1</i> ; Lex _{DBD} .NLS.HA. <i>GIM4</i> _{ORF} ; <i>CEN</i> ; <i>TRP1</i>	Pinto e Fernandes
Lexgim4#2	promotor <i>ADH1</i> ; Lex _{DBD} .NLS.HA. <i>GIM4</i> _{ORF} ; <i>CEN</i> ; <i>TRP1</i>	Pinto e Fernandes
Lexgim5#3	promotor <i>ADH1</i> ; Lex _{DBD} .NLS.HA. <i>GIM5</i> _{ORF} ; <i>CEN</i> ; <i>TRP1</i>	Coelho, Amorim e Fernandes
Lexgim5#9	promotor <i>ADH1</i> ; Lex _{DBD} .NLS.HA. <i>GIM5</i> _{ORF} ; <i>CEN</i> ; <i>TRP1</i>	Coelho, Amorim e Fernandes
Lexgim6#5	promotor <i>ADH1</i> ; Lex _{DBD} .NLS.HA. <i>GIM6</i> _{ORF} ; <i>CEN</i> ; <i>TRP1</i>	Coelho, Amorim e Fernandes

ADH1 - promotor constitutivo em *Saccharomyces cerevisiae*; *CEN* - origem de replicação (plasmídeo centromérico em *Saccharomyces cerevisiae*); 2 μ m - origem de replicação (plasmídeo *high-copy-number* em *Saccharomyces cerevisiae*); DBD - *DNA binding domain*; HA - hemaglutinina; *LEU2*, *TRP1*, *URA3* - marcadores selecção; NLS - *nuclear localization signal* em *Saccharomyces cerevisiae*; UAS - *upstream activating sequences*; URS - *upstream regulator sequences*; Lexgim - LexA_{DBD}Gim.

2.3 Confirmação das sequências codificantes Lexgim

As sequências dos plasmídeos que expressam a Lexgim2, Lexgim5 e Lexgim6 foram confirmadas através de sequenciação. Para tal, foram utilizados *primers* (Tabela 2.3) específicos para cada sequência codificante de cada *GIM*.

Os procedimentos de sequenciação foram realizados de acordo com as instruções do kit *ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*. O procedimento de manuseamento do *software* para a aquisição das sequências finais ficou a cargo do serviço de sequenciação do Instituto Gulbenkian de Ciência.

As sequências foram analisadas no programa *Jalview* (versão 2.4.0.b2), o qual permitiu alinhar as sequências obtidas com as da base de dados SGD (*Saccharomyces*

genome database (www.yeastgenome.org). Os códigos de identificação para as ORF's da *GIM2*, *GIM5*, e *GIM6* são: YGR078C, YML09W e YJL179W, respectivamente. O programa *Chromas Lite* (versão 2.01) foi utilizado para verificar se a leitura das sequências nucleotídicas foi a correcta.

Tabela 2.3 - *Primers* utilizados para sequenciação.

Plasmídeo#clone	Primer	Sequência do primer
Lexgim2#8	NLS (→)	5'-AAGAAGAAGCGGAAGGTC-3'
Lexgim2#8	GIM2-JC4 (←)	5'-CGGGGTACCATTTACAGACACATTATATCTTGAGG-3'
Lexgim2#8	GIM2-JC5 (←)	5'-CTCTATGGCCTCGTCGATGGG-3'
Lexgim2#12	NLS (→)	5'-AAGAAGAAGCGGAAGGTC-3'
Lexgim2#12	GIM2-JC4 (←)	5'-CGGGGTACCATTTACAGACACATTATATCTTGAGG-3'
Lexgim2#12	GIM2-JC5 (←)	5'-CTCTATGGCCTCGTCGATGGG-3'
Lexgim5#3	GIM5-JC4 (←)	5'-CGGGGTACCGCAAAGAGTTACCTAGGCTGTAG-3'
Lexgim5#3	GIM5-JC5 (←)	5'-GCGATTGCTGCTTCAGCGCTC-3'
Lexgim5#9	NLS (→)	5'-AAGAAGAAGCGGAAGGTC-3'
Lexgim5#9	GIM5-JC4 (←)	5'-CGGGGTACCGCAAAGAGTTACCTAGGCTGTAG-3'
Lexgim5#9	GIM5-JC5 (←)	5'-GCGATTGCTGCTTCAGCGCTC-3'
Lexgim6#5	NLS (→)	5'-AAGAAGAAGCGGAAGGTC-3'
Lexgim6#5	GIM6-JC5 (←)	5'-CGGGGTACCGCTATTGCCGCTTTCTTTTAATTC-3'
Lexgim6#5	GIM6-JC3 (←)	5'-CTTTAGATTGTCTATTGTTTTTTCAAC-3'
Lexgim6#5	GIM6-JC7 (←)	5'-GAGGCGGTTATAGCGCCG-3'

Os primers *forward* estão assinalados com a seta → e os primers *reverse* estão assinalados com a seta ←.

2.4 Extracção de DNA genómico de *Saccharomyces cerevisiae*

A extracção de DNA genómico foi realizada como descrito por Ausubel *et al.* (2003). Células de uma cultura *overnight* em meio YPD (fase estacionária) foram resuspendidas em solução de sorbitol e a parede celular foi fragilizada com liticase (Sigma), SDS e KAc. A remoção de proteínas foi obtida com extracções fenol/CHCl₃ (saturada com TE pH8 (1:1)) e CHCl₃. O RNA foi hidrolisado com *DNase-free RNase* e o DNA foi precipitado com isopropanol. O DNA foi quantificado no Nanodrop e a integridade do DNA foi avaliada por eletroforese, em gel de agarose.

2.5 Preparação do fragmento genómico *GIM6* e sequenciação

DNA genómico das estirpes Euroscarf e Invitrogen (obtido pelo método descrito em 2.4) foi hidrolisado com a enzima de restrição EcoRI (NEBioLabs) de acordo com as instruções do fabricante. Após análise por eletroforese em gel de agarose, as bandas correspondentes ao fragmento de interesse (fragmento de 831pb que continha a sequência

codificante de *GIM6*) foram excisadas do gel de acordo com Ausubel *et al.* (2003) e o DNA foi quantificado no Nanodrop.

O fragmento de DNA genómico correspondente à *GIM6* foi amplificado por PCR com os *primers* GIM6-JC1 e GIM6-JC2 (Tabela 2.3) e Taq DNA polimerase (Fermentas) conforme as instruções fornecidas pelo fabricante. Os produtos de PCR foram purificados com o KIT NucleoSpin[®] Extract II (Macherey-Nagel), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas, através do Nanodrop e sequenciadas nas condições referidas no ponto 2.3 com os *primers* GIM6-JC4 e GIM6-JC5 (Tabela 2.3).

2.6 Transformação de *Saccharomyces cerevisiae*

Para a transformação de células *Saccharomyces cerevisiae*, foi utilizado o método de sais de lítio/PEG (Ito *et al.*, 1983). Os sais de lítio permitem a permeabilização das barreiras celulares e o PEG promove a concentração do DNA na superfície da célula. Também foi utilizado *carrier* de cadeia simples e realizados choques térmicos de modo a aumentar a eficiência de transformação. Dois clones da estirpe yMC10 (#1 e #2) (Tabela 2.1) foram transformados com dois plasmídeos combinando-se um plasmídeo repórter (L9LEU, L9URA, JK103, JK1621 ou PLGΔ312S) e um plasmídeo com a quimera Lex (Tabela 2.2). De modo a seleccionar as colónias transformantes foi utilizado meio SC sólido selectivo para dois marcadores auxotróficos, conforme os plasmídeos inseridos nas células. Ao fim de 4 dias de incubação foram obtidas colónias, das quais 16 foram repicadas individualmente, para meio SC sólido selectivo. No total, uma vez que foram utilizados dois clones independentes das quimeras Lexgim2, Lexgim3, Lexgim4 e Lexgim5 para cada estirpe, foram seleccionadas pelo menos 40 colónias. Para as quimeras Lexgim1 e Lexgim6 foram seleccionadas, pelo menos 24 colónias, para o ensaio de actividade da β-galactosidase descrito no ponto 2.7. Deste modo, foi assegurada maior independência dos resultados e consequentemente maior significado biológico.

2.7 Ensaio de actividade da β-galactosidase

A partir das colónias isoladas no ponto anterior foi determinada a actividade da β-galactosidase de acordo com o método descrito por Ausubel *et al.* (2003). Foram inoculadas pré-culturas e culturas em meio selectivo SC líquido e incubadas a 28°-30°C, com agitação orbital. Das pré-culturas crescidas *overnight*, foram inoculadas culturas com DO₆₀₀ 0,2 e após 6 horas de incubação, ou seja quando a DO₆₀₀ atingiu 0,6 a 0,8 (fase exponencial) foi recolhido 1,5mL de cultura que foi centrifugado à velocidade máxima, durante 5 minutos. O sobrenadante foi rapidamente retirado e o *pellet* foi congelado em gelo seco. Posteriormente, as células foram resuspendidas em tampão LacZ pH7 (PO₄⁻³ 100mM, KCl

10mM, MgSO₄ 1mM) com β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), permeabilizadas com SDS e CHCl₃. Foi adicionada solução de ONPG e as amostras foram colocadas no bloco térmico a 30°C, iniciando-se a contagem de tempo até se desenvolver cor amarela. A formação da cor amarela deve-se à hidrólise do ONPG pela β-galactosidase. Esta reacção origina a orto-nitrofenol, que em meio alcalino se encontra na forma de ião orto-nitrofenolato. Após a formação de cor amarela, foi adicionado Na₂CO₃, de modo a parar a reacção. As amostras foram centrifugadas, durante 5 minutos, a 4°C, à velocidade máxima. A absorvância do sobrenadante foi lida a 420nm. A actividade enzimática (número de unidades de β-galactosidase produzidas) foi calculada através da fórmula seguinte:

$$U = \frac{(\text{Abs}_{420} \times 1000)}{(\text{DO}_{600} \times V \times t)}$$

Em que U = nº de unidades de β-galactosidase produzidas

V = volume de cultura utilizado (1,5mL)

t = tempo de reacção (minutos)

DO₆₀₀ = densidade óptica da cultura (6horas)

Abs₄₂₀ = absorvância após reacção

2.8 Preparação de extractos proteicos pós-mitocondriais e totais

Das várias colónias, para a mesma transformação, foram escolhidas duas que melhor representassem os resultados.

A preparação de extractos proteicos pós-mitocondriais foi realizada conforme o previamente descrito em Fernandes *et al.* (1997). A lise celular foi realizada com esferas de vidro (Sigma) com um programa de 5 ciclos de 20 segundos à velocidade de 4m/s, no aparelho *Fastprep* 24 (Mp). Entre cada ciclo foram realizados intervalos de 1 minuto, durante o qual as amostras foram colocadas em gelo.

Foram também preparados extractos proteicos totais, através de um protocolo de extracção rápida (Horvath e Riezman, 1994). As células foram resuspendidas em *loading buffer* e a suspensão foi fervida a 95°C, durante 5 minutos para aplicação directa em SDS-PAGE.

2.9 Método de Bradford

O método de Bradford é um método colorimétrico que permite quantificar proteínas solúveis. Para tal, foi utilizado Reagente de Bradford (Biorad Protein Assay, Biorad) e 2µL de amostra do extracto proteico pós-mitocondrial, de acordo com as instruções do fabricante.

Em paralelo, foram preparadas diferentes concentrações de BSA (NEBioLabs) (10mg.mL⁻¹), nomeadamente 0; 1; 1,5; 3; 4; 5; 7,5; 10 (mg.mL⁻¹), para determinar a recta de calibração.

2.10 Determinação dos níveis de proteínas em condições desnaturantes

Os extractos proteicos pós-mitocondriais, com *loading buffer* (Tris 0,32M pH6,8, glicerol 4%, SDS 4% e β-mercaptoetanol 4%) foram analisados em SDS-PAGE a 10% (Faria e Fernandes, 2006), a 30mA (15mA por gel), com uma solução tamponada com Tris-Glicina pH8 e SDS. De seguida, procedeu-se à transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose 0,45µm (Whatman Potran[®]). A transferência foi realizada durante 3 horas, a 200mA, com solução de transferência composta por Tris-Glicina pH8 e Metanol (Anexo II). No final, a membrana foi corada com Ponceau e o gel com azul de Coomassie (Ausubel *et al.*, 2003). Os extractos pós-mitocondriais também foram analisados utilizando a solução de transferência a pH9,2 (Anexo II), a 350mA, durante 2 horas.

Para a análise dos extractos totais foram realizadas alterações ao procedimento de análise de proteínas acima descrito. Os extractos foram preparados numa solução de *loading buffer* diferente da anterior (Tris 0,06M pH6,8, glicerol 10%, SDS 2% e β-mercaptoetanol 5%). A transferência foi realizada a 350mA, durante 2 horas com a solução de transferência a pH9,2. Foram utilizadas membranas PVDF 0,2µm (Immun-Blot[™], Biorad). Também foram realizados géis a 12,5% e 15%.

As Lexgim foram detectadas com o anticorpo primário *anti-Lex* (ab50953, Abcam) numa diluição de 1:4000 e o anticorpo secundário *anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated* (Jackson Lab) foi utilizado numa diluição de 1:1000. O anticorpo primário *anti-Cpy* (Ab34636-10, Abcam) na diluição de 5:10000; o anticorpo secundário utilizado foi o *anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated* (Jackson Lab) na diluição acima referida. Para a detecção das peroxidase foi utilizado um substrato quimio-luminescente (Super Signal[®] West Pico, Thermo Scientific). As películas (Amersham Hyperfilm[™], ECL) foram digitalizadas no *scanner* (Scan Maker 9800 XL, Microtek), através do *software* de aquisição de imagem *Scan Wizard Pro* (versão 7.6.2) e o sinal foi quantificado, através do programa *ImageJ* (versão 1.44).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Confirmação das sequências nucleotídicas das ORF's GIM2, GIM5 e GIM6

A análise dos resultados de sequenciação das ORF's das GIM2 e GIM5, permitiu observar a inexistência de mutações nas quimeras Lexgim2 e Lexgim5, tendo como referência a sequência disponível na base de dados SGD (ver secção 2.3). Contudo, foi identificada uma alteração no nucleótido 220 da ORF da GIM6 da quimera Lexgim6. Segundo a base de dados (SGD), a GIM6 continha na posição 220 uma base de citosina e a sequência da Lexgim6, continha na mesma posição, uma base de adenina. Esta alteração na sequência da ORF levou à mudança do resíduo do aminoácido alanina para ácido aspártico. Em sequenciações anteriores, já havia sido detectada a alteração na Lexgim6, o que levou a equacionar se seria uma mutação na molécula ou se a diferença provinha da estirpe a partir da qual foi obtido fragmento GIM6.

As estirpes Euroscarf (web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf) e Invitrogen (ATCC: *global biosource center*, www.atcc.org), utilizadas para obtenção do fragmento da GIM6, derivaram ambas da estirpe S288C (Brachmann *et al.*, 1998). A ORF da GIM6 contida na Lexgim6 foi obtida a partir da estirpe Euroscarf. A estirpe a partir da qual foi sequenciada a GIM6, cuja sequência se encontra na base de dados, resulta de uma estirpe diplóide FY1679, a qual deriva de um cruzamento entre as estirpes FY23 e FY73 e estas derivam de uma estirpe S288C (Galiber *et al.*, 1996). Embora a estirpe inicial possa ter sido a mesma, é possível que, devido às manipulações genéticas que ocorreram entre estirpes até à obtenção das estirpes utilizadas neste trabalho, tenham ocorrido alterações no genoma. Possivelmente, por este motivo foi reportado na base de dados (SGD) recentemente que a estirpe S288C contém a mesma alteração nucleotídica que foi encontrada para as estirpes Euroscarf e Invitrogen. Assim sendo, a Lexgim6 clonada foi utilizada neste trabalho, considerando que o alelo clonado é o selvagem no contexto das estirpes estudadas.

3.2 Determinação da actividade das quimeras Lexgim nos repórteres L9LEU, L9URA e JK103

3.2.1 Ensaio *one-hybrid*

Foram realizados ensaios *one-hybrid* com plasmídeos que expressam as quimeras Lexgim e repórteres com o gene LacZ (Figura 3.1). Os ensaios foram realizados de modo independente com três genes repórter (Tabela 2.2: L9URA, L9LEU e JK103) e dois clones da estirpe yMC10 (#1 e #2), salvo indicação em contrário.

Os repórteres L9LEU e L9URA contêm parte do promotor *HIS3* do qual foi excisada a região que permite a sua regulação pelo Gcn4. Os repórteres, L9LEU e L9URA, diferem

apenas no marcador auxotrófico, leucina e uracilo, respectivamente. O repórter JK103 contém o promotor *GAL1/10* que não possui a região UAS, à qual se liga a proteína Gal4 que induz o promotor na presença de galactose. Os três plasmídeos contêm, em substituição das sequências reguladoras endógenas, regiões LexUAS que são reconhecidas pela proteína LexA. O facto dos promotores dos repórteres serem diferentes permitiu uma maior consistência dos resultados e inferir se a existência de activação transcricional é um processo que é específico em determinadas condições, de acordo com a maquinaria transcricional que é recrutada por cada promotor ou se a activação ocorre independentemente do promotor e da maquinaria de transcrição por este recrutada.

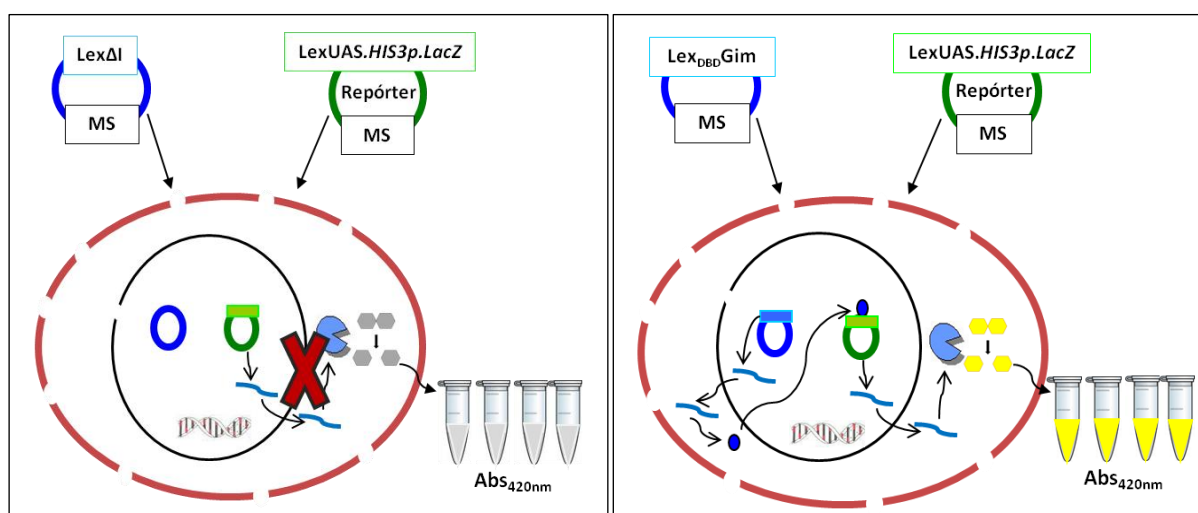


Figura 3.1 - Esquema de um ensaio *one-hybrid* para testar a actividade das quimeras Lexgim nos repórteres, L9LEU, L9URA e JK103. A *ORF LacZ*, que codifica para a β -galactosidase, está em fusão com um promotor do repórter. Quando é produzida uma proteína de fusão Lexgim (LexA_{DBD}Gim), esta acumula-se no núcleo. Ao interagir com a região LexUAS do promotor do repórter, pode induzir a transcrição do gene *LacZ* e a actividade da β -galactosidase é determinada pela formação de cor devido à hidrólise do substrato, ONPG. Como controlo é utilizado o plasmídeo Lex Δ I, o qual não possui nenhuma *ORF GIM* mas contém LexA_{DBD}, e neste caso espera-se que a actividade da β -galactosidase seja inferior à das quimeras. A verde está representado o plasmídeo repórter com os respectivos locais LexUAS. A linha oval a vermelho representa uma célula de levedura e a circunferência a preto o núcleo. O círculo a azul representa a quimera Lex. MS representa genes que permitem a selecção das células em meio selectivo.

Para cada repórter a actividade da enzima β -galactosidase, na presença de cada Lexgim, foi monitorizada, tendo como referência a actividade da enzima β -galactosidase produzida na presença de Lex Δ I. Assim, no caso de existir activação transcricional a actividade de β -galactosidase esperada nas células que contêm as diferentes quimeras Lexgim, deveria ser superior à do Lex Δ I (Figura 3.1). Considerando que actividades de β -galactosidase diferentes podem corresponder a níveis de proteínas com o mesmo potencial mas presentes nos extractos em abundâncias diferentes, os valores das unidades de β -

galactosidase foram referenciados à proporção de proteína quimérica/extracto (*fold induction*).

A quantificação dos níveis de proteínas Lexgim nos extractos pós-mitocondriais foi testada por diferentes métodos. Inicialmente, foi utilizado o anticorpo *anti-Cpy* como controlo interno. No entanto, a resolução das bandas não permitiu uma quantificação consistente, dado que nalgumas situações a banda correspondente à detecção de Cpy (59,8 kDa), não se distinguia do *background* e noutros casos não era visível (Anexo III). Paralelamente, foi observada a presença de uma banda inespecífica (BNE) na mesma posição para todos os extractos analisados com *anti-Lex*, com cerca de 23 kDa. Optou-se por utilizar esta banda como referência (controlo interno).

Observou-se que as bandas das proteínas Lexgim4 e Lexgim6 nem sempre eram detectadas. As proteínas Gim4 e Gim6 possuem um ponto isoeléctrico básico (8,39 e 9,41, respectivamente) e a transferência foi realizada, inicialmente, a pH8. Dado que as proteínas poderiam não ter sido transferidas para a membrana, foram testados extractos totais e a solução de transferência com o pH9,2. Paralelamente observou-se que as Lexgim4 e Lexgim6 não se separavam de uma banda inespecífica de aproximadamente 35 kDa. Para contornar este problema, também foram utilizadas membranas de PVDF de modo a diminuir o *background*, bem como SDS-PAGE a 12,5% e 15%. Contudo não foi conseguida a separação da Lexgim4 e Lexgim6 da banda inespecífica.

Por não ter sido possível separar a Lexgim4 e a Lexgim6 da banda inespecífica, optou-se por perceber se a banda inespecífica influenciava significativamente a quantificação da Lexgim4 e Lexgim6. Para este efeito, foi igualmente utilizada a solução de transferência a pH9,2 nas mesmas condições previamente referidas mas com membranas de nitrocelulose. Confirmou-se que a banda inespecífica não influenciava significativamente a quantificação da Lexgim4 e Lexgim6 a partir da comparação da quantificação da Lexgim, com e sem esta banda, com a quantificação do extracto do Lex Δ I. Assim, para todas as Lexgim foi determinada a razão entre Lexgim e BNE (Lexgim/BNE) em extractos pós-mitocondriais.

3.2.2 Repórter L9LEU

Com o repórter L9LEU (Figura 3.2) as moléculas Lexgim1, Lexgim3 e Lexgim6 apresentaram os valores mais elevados, cerca de 137, 149 e 135 unidades de β -galactosidase, respectivamente. A Lexgim2 e Lexgim5 apresentaram, em média, 109 unidades de β -galactosidase, enquanto a Lexgim4 apresentou valores duas a três vezes inferiores, ou seja cerca de 42 unidades. O Lex Δ I apresentou em média 23 unidades de β -galactosidase. Os resultados foram normalizados em relação ao Lex Δ I (Figura 3.2).

A determinação dos níveis de proteína Lexgim permitiu observar que a abundância relativa das Lexgim é variável pelo que a maior actividade da β -galactosidase das Lexgim1, Lexgim3 e Lexgim6 poderia ser resultado de maior abundância de proteína. A Lexgim4 e Lexgim6 foram as quimeras menos abundantes, 0,60 e 0,68, respectivamente. A Lexgim3 e Lexgim5 mostraram os níveis mais elevados, 1,98 e 1,70, respectivamente (Figura 3.2).

Foi determinado o *fold induction* (razão entre a actividade da enzima β -galactosidase (unidades normalizadas) e a quantidade de proteína Lexgim), observando-se que a quimera Lexgim6 (11,56) (Figura 3.3) se destacou das restantes moléculas, registando mais do dobro de indução transcricional. As quimeras Lexgim1, Lexgim2, Lexgim3, Lexgim4 e Lexgim5 apresentaram valores semelhantes entre si, embora a Lexgim5 tenha registado o valor mais baixo (3,73). Os resultados apresentados para este repórter foram obtidos a partir da estirpe yMC10#1. Para a estirpe yMC10#2 não foi possível tratar os resultados obtidos, porque os valores do Lex Δ I foram muito variáveis não permitindo a normalização das unidades do ensaio de β -galactosidase, embora a actividade não normalizada das Lexgim não tenha variado muito da obtida com a estirpe yMC10#1.

3.2.3 Repórter L9URA

Do estudo do comportamento das mesmas quimeras Lexgim com o repórter L9URA (Figura 3.2), cujo promotor é igual ao do repórter L9LEU, observou-se actividade da β -galactosidase semelhante, salientando-se a actividade da β -galactosidase para o Lex Δ I de 13 unidades. Relativamente às unidades normalizadas, observou-se que a actividade da β -galactosidase foi mais elevada para a Lexgim1 (10,31 \pm 2,19), Lexgim3 (11,34 \pm 2,86) e Lexgim6 (10,62 \pm 3,10) (Figura 3.2).

Relativamente aos níveis de proteínas Lexgim nos extractos, foi observado que a Lexgim3 e Lexgim5 apresentaram maior abundância, seguidas da Lexgim1 e Lexgim6. A Lexgim2 e Lexgim4 registaram menor abundância, isto é cerca de três vezes menos que as restantes (Figura 3.2).

Foi determinada a razão entre a actividade da β -galactosidase (unidades normalizadas) e a quantidade de proteína Lexgim produzida, sendo observada uma elevada indução transcricional para a quimera Lexgim2 (11,27), em detrimento da Lexgim5 que apresentou o resultado mais baixo (3,50) (Figura 3.3).

3.2.4 Análise comparativa dos repórteres L9LEU e L9URA

Os repórteres L9LEU e L9URA não mostraram diferenças de actividade significativas entre as moléculas Lexgim1, Lexgim3, Lexgim4 e Lexgim5. No entanto, o mesmo não se aplica às quimeras Lexgim2 e Lexgim6. Com o repórter L9URA, a quimera Lexgim2 apresentou *fold induction* aproximadamente três vezes superior do que o que foi obtido para

o repórter L9LEU (Figura 3.3). A quimera Lexgim6 apresentou metade do *fold induction* registado para o repórter L9LEU (Figura 3.3). Esta diferença não seria de esperar, dado que os repórteres apenas diferem no marcador auxotrófico. No entanto, estes marcadores (leucina e uracilo) possuem importâncias diferentes no crescimento das células e estão envolvidos em metabolismos regulados por factores diferentes, podendo ser este o motivo pelo qual foi observada uma diferença acentuada entre os dois repórteres para a Lexgim2 e Lexgim6. Sabe-se que o factor de transcrição Gcn4 é induzido em condições de deficiência de aminoácidos. De entre os vários aminoácidos que induzem a sua activação, pode-se referir a leucina e o triptofano (Hinnebusch, 1988). Um aspecto importante, é que as estirpes BY4741 (leu2 Δ 0), Σ L5527LH (leu2) e WB03 (leu2-3) foram classificadas como sensíveis em meio SC completo, pois não cresceram ou proliferaram lentamente, algo que não aconteceu em outros meios sintéticos completos (Cohen e Engelberg, 2007). Foi observado que o problema poderia estar relacionado com problemas no transporte de leucina e não com a expressão do gene *LEU2* (Cohen e Engelberg, 2007). O ensaio com o repórter L9URA pode ter condicionado as células transformadas com Lexgim2, dado que poderiam não conseguir transportar leucina para a célula. Assim sendo, gerou-se stresse nutricional que pode ter despoletado uma resposta mediada pelo Gcn4, o que induziu factores proteicos específicos necessários para a transcrição nestas condições.

Neste contexto, as Lexgim1, Lexgim3, Lexgim4 e Lexgim5 podem ser consideradas activadores fracos, o mesmo não é concluído para a Lexgim2 e Lexgim6 devido às variações supramencionadas.

3.2.5 Repórter JK103

Para o repórter JK103, cujo promotor é diferente do dos repórteres L9LEU e L9URA, observou-se que a actividade da β -galactosidase foi quase residual (Figura 3.2). Os valores de actividade da β -galactosidase da Lexgim1, Lexgim2, Lexgim3 e Lexgim6 foram cerca de 1, bem como o valor do Lex Δ I, enquanto para as restantes moléculas foram aproximadamente o dobro. Não se observaram diferenças significativas entre as Lexgim e o Lex Δ I. Assim sendo, a quimera com níveis superiores de actividade da β -galactosidase foi a Lexgim5 ($2,14 \pm 0,96$) e a que obteve resultados inferiores foi a Lexgim6 ($0,96 \pm 0,19$) (Figura 3.2).

Não foi possível quantificar a abundância das proteínas Lexgim4 e Lexgim6, embora tenham sido preparados extractos mais do que uma vez. Inicialmente foi assumido que as amostras podiam estar degradadas, no entanto com extractos preparados de fresco não foi possível detectar as bandas de interesse. Para esclarecer se a dificuldade de detecção das proteínas é devido a abundância baixa, à data estão a ser analisados SDS-PAGE com maior quantidade de extractos.

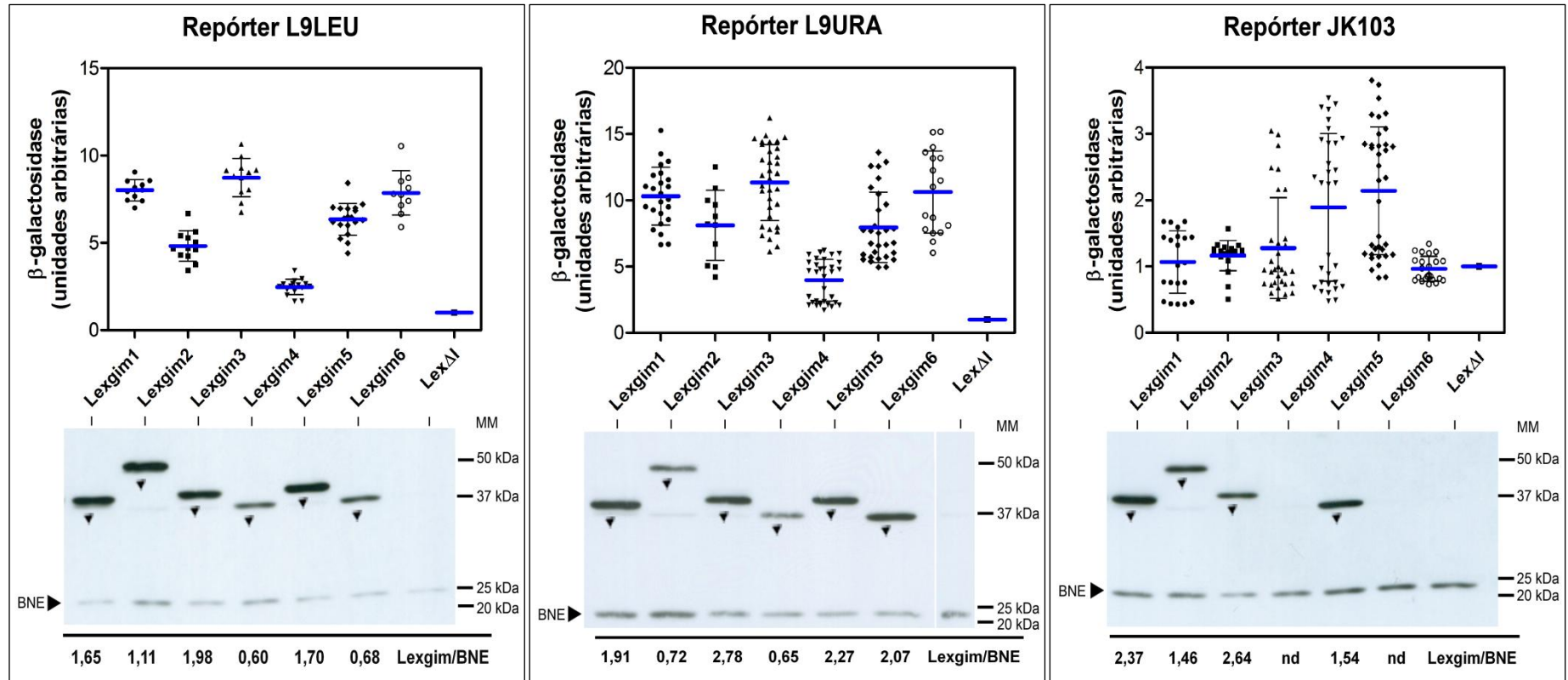


Figura 3.2 - Avaliação da capacidade de activação das quimeras Lexgim nos repórteres L9LEU, L9URA e JK103. Os resultados apresentados no gráfico foram normalizados (unidades de β-galactosidase de cada quimera Lexgim/média do valor de unidades de β-galactosidase do LexΔI). Os dados apresentados, para as moléculas Lexgim com o repórter L9LEU e para a molécula a Lexgim2 com os repórteres L9URA e JK103, foram obtidos apenas com a estirpe yMC10#1. A barra a azul representa a média dos valores obtidos e a preto está representado o desvio padrão entre as amostras. Os símbolos representam os valores de actividade da β-galactosidase obtidos por cada colónia transformada. Western blot dos extractos com anticorpo *anti-Lex*. Marcador de massa molecular (MM) (*Precision plus protein standart, dual color, Biorad*). Lexgim/BNE indica a razão entre o valor da quantificação de cada proteína Lexgim o respectivo valor da quantificação de BNE. BNE significa banda não específica. nd significa não detectado.

As restantes proteínas, foram todas detectadas, sendo que a Lexgim1 (2,37) e Lexgim3 (2,64), são as mais abundantes, em detrimento da Lexgim2 (1,46) e Lexgim5 (1,54). Os resultados da actividade da enzima β -galactosidase (unidades normalizadas) foram referenciados aos níveis de proteína Lexgim (Figura 3.3). Foi observado, que a proteína Lexgim5 apresentou o maior valor de *fold induction* (1,39), seguida da proteína Lexgim2 (0,80), enquanto as proteínas Lexgim1 e Lexgim3 apresentaram valores muito próximos de *fold induction*, 0,45 e 0,48, respectivamente (Figura 3.3). Em suma, as diferenças observadas entre as Lexgim não foram consideradas biologicamente significativas, uma vez que os valores são semelhantes ao de Lex Δ I. Estes resultados mostram ainda que no caso de repórter JK103 a transcrição foi basal o que indica que nem sempre na presença das quimeras Lexgim ocorreu indução transcricional.

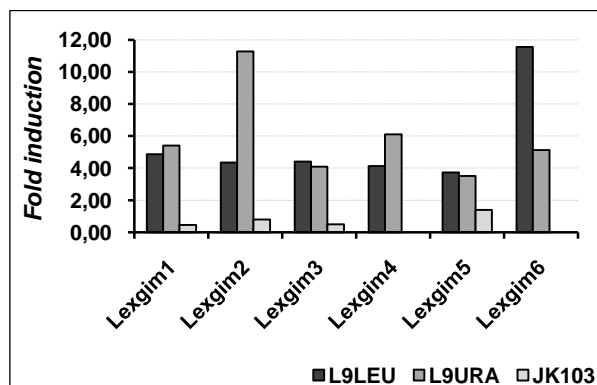


Figura 3.3 - *Fold induction* das quimeras Lexgim para os repórteres L9LEU, L9URA e JK103. Estes valores foram obtidos a partir da razão entre a média de unidades normalizadas de β -galactosidase referenciadas aos níveis de proteína Lexgim.

3.3 Determinação da actividade das quimeras Lexgim nos repórteres JK1621 e PLG Δ 312S

3.3.1 Ensaio one-hybrid

Foram realizados ensaios *one-hybrid* para estudar o possível papel das quimeras Lexgim na repressão da transcrição (Figura 3.4). Nesta situação, a actividade da β -galactosidase esperada para as células contendo as quimeras Lexgim seria menor do que o de Lex Δ I.

Os repórteres utilizados, JK1621 e PLG Δ 312S, possuem ambos o promotor do gene *CYC1* o qual é regulado pela presença de glucose no meio. O repórter JK1621 contém 4 regiões LexURS antes do promotor que permitem a interacção da molécula Lexgim com o DNA de modo a regular a transcrição, nomeadamente reprimindo. O repórter PLG Δ 312S não possui sequências LexURS, funcionando como um controlo negativo em relação ao repórter JK1621.

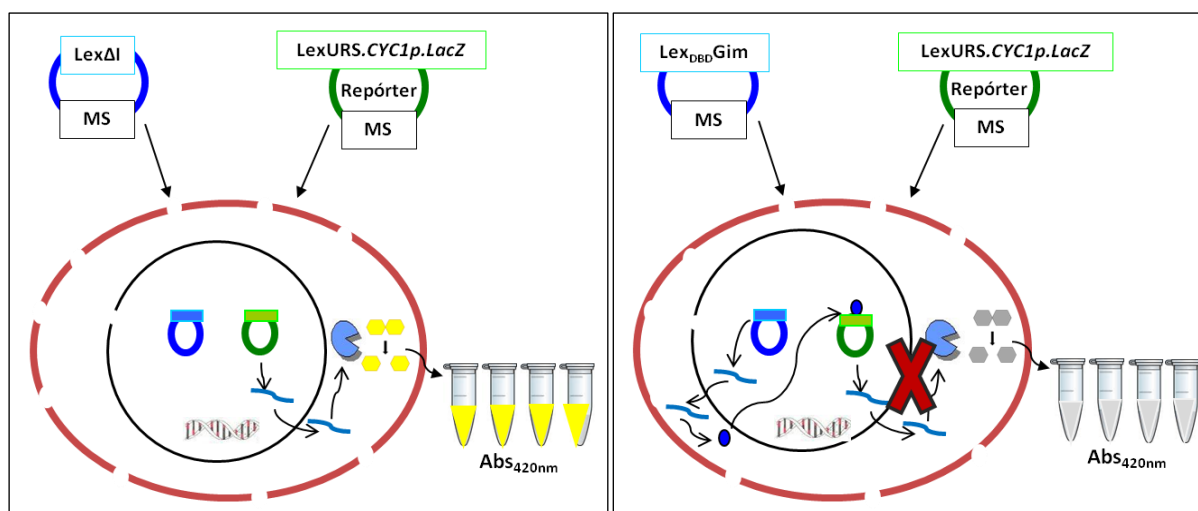


Figura 3.4 - Esquema de um ensaio *one-hybrid* para testar a actividade das quimeras Lexgim nos repórteres JK1621 e PLGΔ312S. A *ORF LacZ*, que codifica para a β-galactosidase, está em fusão com um promotor do repórter. Quando é produzida uma proteína de fusão Lexgim (LexA_{DBD}Gim), esta acumula-se no núcleo. Ao interagir com a região LexURS do promotor do repórter, pode impedir a transcrição do gene *LacZ* e a actividade da β-galactosidase é determinada pela formação de cor devido à hidrólise do substrato, ONPG. Como controlo é utilizado o plasmídeo LexΔI, o qual não possui nenhuma *ORF GIM* mas contém LexA_{DBD} e neste caso espera-se que a actividade da β-galactosidase seja superior à das quimeras. A verde está representado o plasmídeo repórter com os respectivos locais LexURS. A linha oval a vermelho representa uma célula de levedura e a circunferência a preto o núcleo. O círculo a azul representa o plasmídeo que contém a quimera Lexgim. MS representa genes que permitem a selecção das células em meio selectivo.

3.3.2 Repórter JK1621

Para o repórter JK1621 os resultados da actividade da enzima β-galactosidase (Figura 3.5) foram da mesma ordem de grandeza para todas as Lexgim, ou seja cerca de 25 a 30 unidades, incluindo o LexΔI. A quimera que apresentou o valor da actividade da β-galactosidase mais elevado foi a Lexgim3 ($1,32 \pm 0,22$) e a Lexgim6 ($1,05 \pm 0,14$) registou o valor menor. A Lexgim2 (1,82) e Lexgim5 (1,78) registaram maior abundância de proteínas relativamente à Lexgim3, Lexgim4 e Lexgim6, que apresentaram quase metade da abundância relativamente às restantes. Os valores de actividade da β-galactosidase referenciados à abundância de proteínas mostram que as moléculas com maior *fold induction* foram a Lexgim3 (1,37) e a Lexgim4 (1,37), enquanto as quimeras Lexgim2 (0,67) e a Lexgim5 (0,67) apresentaram os valores inferiores (Figura 3.6.A).

3.3.3 Repórter PLGΔ312S

Não foram observadas diferenças significativas entre as Lexgim com o repórter PLGΔ312S (Figura 3.5). A actividade da enzima β-galactosidase foi sempre da mesma ordem de grandeza variando, em média, 40 a 50 unidades para todas as Lexgim e para o LexΔI, em média, foram determinadas 35 a 40 unidades de β-galactosidase.

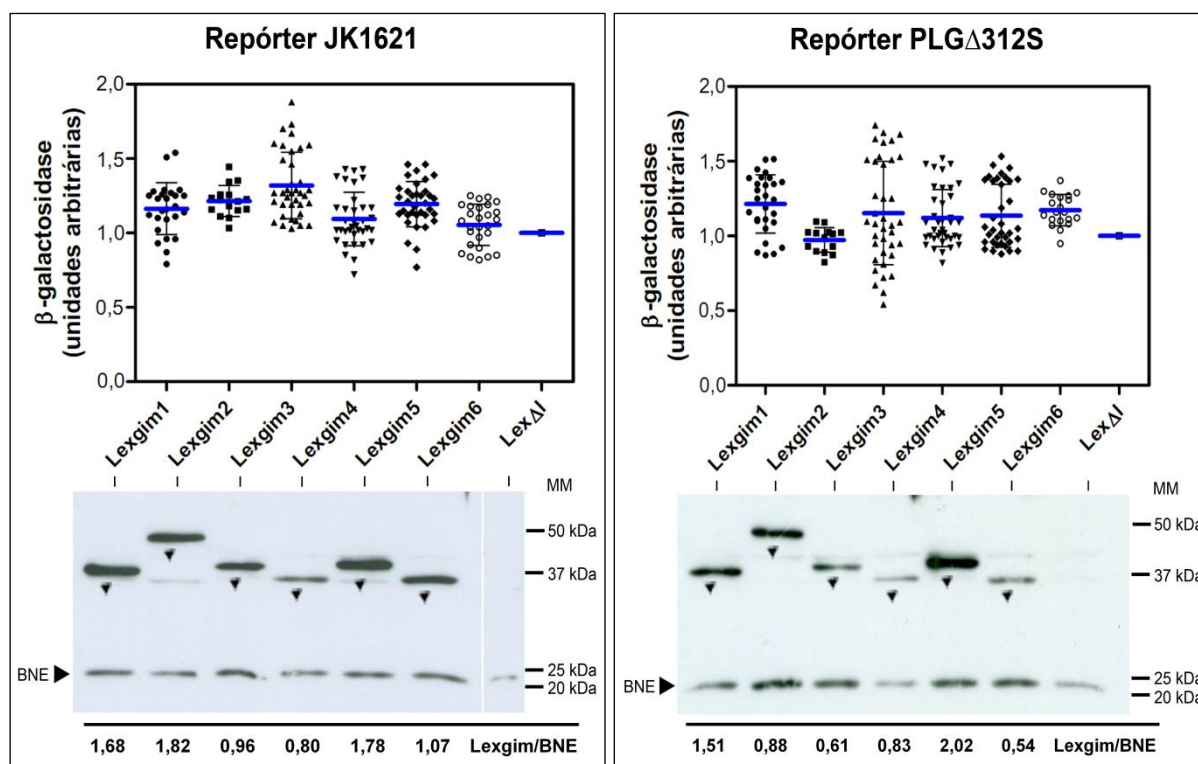


Figura 3.5 - Avaliação da capacidade de repressão das quimeras Lexgim nos repórteres JK1621 e PLG Δ 312S. Os resultados apresentados no gráfico foram normalizados (unidades de β -galactosidase de cada quimera Lexgim/média do valor de unidades de β -galactosidase do Lex Δ I). Os dados apresentados para as moléculas Lexgim2 foram obtidos apenas com a estirpe yMC10#1. A barra a azul representa a média dos valores obtidos e a preto está representado o desvio padrão entre as amostras. Os símbolos representam os valores de actividade da β -galactosidase obtidos por cada colónia transformada. Western blot dos extractos com anticorpo *anti-Lex*. Marcador de massa molecular (MM) (*Precision plus protein standart*, dual color, Biorad). Lexgim/BNE indica a razão entre o valor da quantificação de cada proteína Lexgim e o respectivo valor de BNE. BNE significa banda não específica.

Da quantificação da abundância das quimeras, observou-se que foi a Lexgim5 (2,02) que apresentou o valor mais elevado, seguida da Lexgim1 (1,51). Por seu turno, a Lexgim3 (0,61) e Lexgim6 (0,54) apresentaram os valores mais baixos (Figura 3.5). Quando os valores de actividade da β -galactosidase foram referenciados à abundância de proteína Lexgim observou-se que as moléculas Lexgim1 (0,80) e Lexgim5 (0,56) apresentaram os valores menores em detrimento da Lexgim6 e Lexgim3 que apresentaram os valores superiores, 2,17 e 1,89, respectivamente (Figura 3.6.A).

3.3.4 Razão entre os repórteres PLG Δ 312S e JK1621

Para ambos os repórteres não foram observadas diferenças biologicamente relevantes entre as diferentes Lexgim, nem em relação ao Lex Δ I (Figura 3.6.A). Foi determinada a razão do *fold induction* do repórter PLG Δ 312S *versus* o repórter JK1621 (Figura 3.6.B). A quimera Lexgim6 apresentou o valor mais elevado (2,21), seguida da quimera Lexgim2 (1,66) (Figura 3.6.B). A quimera que apresentou o valor mais baixo foi a

Lexgim5 (0,84) (Figura 3.6.B). As quimeras Lexgim não parecem ter afectado directamente a repressão transcricional. A actividade dos repórteres não variou significativamente quando as Lexgim estão presentes nas células.

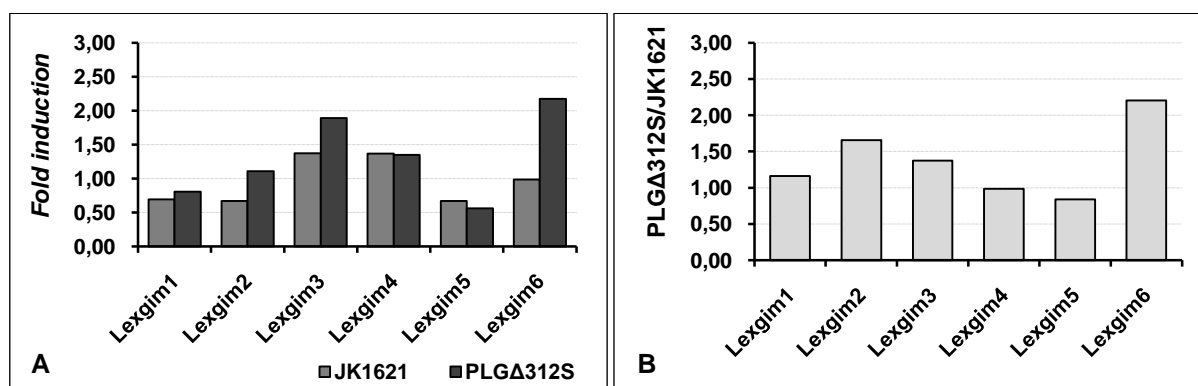


Figura 3.6 - *Fold induction* das quimeras Lexgim para os repórteres JK1621 e PLGΔ312S (A). Razão do *fold induction* entre os repórteres PLGΔ312S e JK1621 (B).

De forma a ser possível a comparação dos resultados obtidos com os da bibliografia, foi determinada a razão de actividades normalizadas de β-galactosidase entre os repórteres PLGΔ312S e JK1621. A razão entre as unidades de β-galactosidase dos dois repórteres foi inferior a 1,25 (Figura 3.7), não sendo observadas diferenças significativas entre as moléculas.

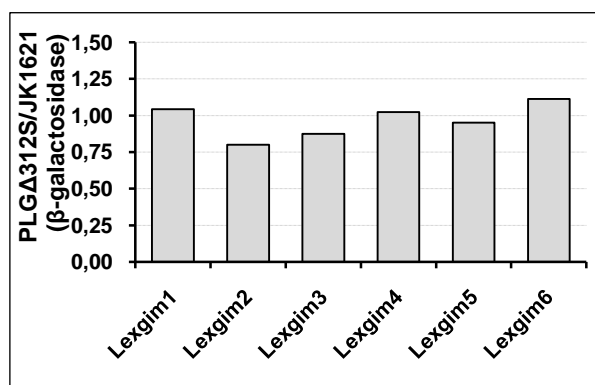


Figura 3.7 - Razão da actividade da β-galactosidase entre os repórteres PLGΔ312S e JK1621.

3.4 Análise da abundância das quimeras Lexgim

Ao analisar a abundância das proteínas Lexgim nos diferentes extractos referenciadas à Lexgim1, observou-se que não há diferenças significativas entre os repórteres para a mesma Lexgim (Tabela 3.1).

De acordo com os dados da literatura a Gim1 (784mol/cel) é das menos abundantes, tal como a Gim6 (721mol/cel) (Ghaemmaghami *et al.*, 2003; Tabela 3.1). No presente trabalho a Lexgim1 existe em maior abundância, juntamente com a Lexgim3 e a Lexgim5 nos diferentes extractos. Por seu turno, a Lexgim6 apresentou abundância semelhante à

Lexgim4, excepto para o repórter L9URA em que foi observado aproximadamente o triplo de Lexgim6 relativamente à Lexgim4.

A Lexgim4 quando sobre expressa apresentou para todos os repórteres, excepto o PLGΔ312S, os níveis de proteína mais baixos (Ghaemmaghami *et al.*, 2003; Tabela 3.1). Os níveis de Gim4 (1660mol/cel) são cerca do dobro dos níveis de Gim1 (Tabela 3.1). Neste trabalho, observou-se a proporção inversa entre a Lexgim4 e a Lexgim1, excepto para o repórter JK103, pois não foram detectados os níveis da Lexgim4.

De acordo com Ghaemmaghami *et al.* (2003), a Gim2 (6550mol/cel) é aproximadamente duas vezes superior aos níveis de Gim5 (2900mol/cel) mas esta proporção não se manteve quando a Lexgim2 e Lexgim5 foram sobre expressas. Para os repórteres L9LEU, L9URA e PLGΔ312S, os níveis de Lexgim5 foram cerca do dobro dos níveis de Lexgim2.

Tabela 3.1 - Abundância das proteínas Gim nas células referenciadas à Gim1.

Abundância das TAP.Gim referenciadas à TAP.Gim1 (Ghaemmaghami <i>et al.</i> , 2003)		Abundância das Lexgim referenciadas à Lexgim1, nos extractos				
		L9LEU	L9URA	JK103	JK1621	PLGΔ312S
Gim1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Gim2	8,35	0,67	0,38	0,62	1,08	0,58
Gim3	9,53	1,20	1,46	1,11	0,57	0,40
Gim4	2,12	0,36	0,34	nd	0,48	0,55
Gim5	3,70	1,03	1,19	0,65	1,06	1,34
Gim6	0,92	0,41	1,08	nd	0,64	0,36

nd - não detectado

A Gim3 (7475mol/cel) está descrita como sendo a proteína mais abundante (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Há cerca de 10 vezes mais Gim3 na célula do que Gim1 (Tabela 3.1). Esta proporção não foi mantida quando as Gim foram sobre expressas. Observou-se que a Lexgim3 é a mais abundante para os repórteres L9LEU, L9URA e JK103 mas foi das proteínas menos abundantes para os restantes repórteres.

As Lexgim não apresentaram grandes variações de abundância entre si mas os dados da literatura mostram abundâncias diferentes entre as Gim. A abundância das Lexgim foi diferente dos resultados de Ghaemmaghami *et al.* (2003), porque alguns genes *GIM* poderão possuir promotores endógenos mais fracos que outros e por isso ter sido observado menos abundância de algumas Gim face a outras. Neste trabalho, as Lexgim foram expressas a partir de promotores idênticos, o que resultou em abundâncias semelhantes. Além disso o processo de degradação poderá ter ocorrido à mesma velocidade levando a uma estabilidade idêntica das proteínas na célula. As Lexgim contêm

uma sequência NLS que as direcciona para o núcleo, enquanto na literatura a abundância das proteínas foi obtida com base em quimeras abundantes no citoplasma, o que poderá expor a proteínas a controlos de degradação diferentes.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

4.1 Avaliação do potencial papel das quimeras Lexgim na activação da transcrição

Os activadores transcricionais, são geralmente constituídos por um domínio de ligação ao DNA (DBD) e um domínio de activação (AD) (Titz *et al.*, 2006). A região DBD direcciona o activador para a sequência alvo e o AD induz a iniciação da transcrição (Titz *et al.*, 2006). Em muitos casos, os activadores, após um sinal sofrem modificações pós-traducionais e acumulam-se núcleo onde os activadores localizam as sequências de ligação ao DNA (Lee e Mapp, 2010). Desta forma, podem actuar de diferentes modos: recrutam enzimas de remodelação da cromatina, modificam histonas ou modificam o mediador que actua directamente na maquinaria geral de transcrição e na RNA polimerase II (Chen e Roeder, 2011; Lee e Mapp, 2010). Além disso, promovem diversas interacções de modo a estimular a reunião do complexo de pré-iniciação (holoenzima RNA polimerase II e cofactores associados a esta) (Lee e Mapp, 2010). Os activadores transcricionais podem estimular a transcrição promovendo a ligação de um determinado componente da maquinaria basal ou alterando a conformação de um elemento que já se encontra ligado à maquinaria basal, estimulando a actividade e/ou a estabilidade do complexo (Latchman, 1994). Um activador transcricional, não induz a transcrição de todos os genes e nem sempre o faz para o mesmo gene, pois determinadas proteínas só são necessárias em determinadas condições impostas pelo meio (Latchman, 1994). Desta forma, há uma coordenação das necessidades da célula de acordo com os seus recursos, ou seja determinadas proteínas de resposta a um stresse são produzidas apenas quando necessário.

Neste trabalho, foi estudada a possibilidade das quimeras Lexgim desempenharem um papel como activadores transcricionais de genes mediada pela RNA polimerase II. Dados da literatura utilizando os mesmos repórteres (L9URA e JK103) e proteínas em fusão com o LexA_{DBD} mostram por exemplo, que a proteína LexTBP (*IATA binding protein*) com o repórter JK103 resulta em 190 unidades de actividade da β -galactosidase (Keaveney e Struhl, 1998). O potencial de activação da proteína LexTBP com o repórter L9URA resulta em 350 unidades (Chaterjee e Struhl, 1995). A proteína LexGcn4, em que o Gcn4 é conhecido como transactivador transcricional, apresenta 290 unidades de β -galactosidade com o repórter L9URA (Chaterjee e Struhl, 1995). Estes dados são pelo menos duas vezes superiores aos obtidos para as quimeras Lexgim, por este motivo apenas foram consideradas activadores fracos com os repórteres L9LEU e L9URA. As quimeras Lexgim apresentaram valores inferiores a 2,90 unidades com o repórter JK103, o que demonstra que neste contexto, não funcionam como activadores transcricionais.

4.2 Avaliação do potencial papel das quimeras Lexgim na repressão da transcrição

Da mesma forma que os activadores são importantes para a regulação da transcrição também os repressores desempenham um papel importante neste processo, pelo que se torna essencial saber se as Lexgim afectariam os repórteres induzindo a repressão da transcrição. O repressor pode impedir a transcrição de genes dependente da RNA polimerase II de modos diferentes. Há repressores que impedem a transcrição, interagindo com o promotor de modo a que este não responda a indutores da transcrição (Courey e Jia, 2001). Os repressores também podem interagir directamente com activadores transcripcionais impedindo que estes se liguem ao DNA (Courey e Jia, 2001).

Lutfiyya e Johnston (1996) estudaram da proteína Mig2 em fusão com LexA_{DBD} como possível repressor transcricional com os mesmos repórteres utilizados neste trabalho. Num meio com glucose a 4%, para o repórter JK1621, LexMig2 apresenta 13 unidades de β -galactosidase (Lex Δ I, 106 unidades de β -galactosidase), enquanto para o repórter PLG Δ 312S, a proteína LexMig2 induz a expressão de 168 unidades (a actividade da β -galactosidase do Lex Δ I foi de 155 unidades). A razão da actividade da β -galactosidase entre PLG Δ 312S e JK1621 mostra que a LexMig2 induz a repressão 13 vezes comparativamente ao Lex Δ I que induziu a repressão 1,5 vezes. Com os mesmos repórteres, foi estudado o papel do complexo *TUP1-SSN6* (repressores gerais da transcrição) actuar como repressor da transcrição. Os ensaios foram realizados em meio com glucose a 2%, sendo observado que a LexSsn6 promove a repressão 34 vezes (Keleher *et al.*, 1992). Nesta situação, a actividade da β -galactosidase é de 200 unidades para o repórter PLG Δ 312S e de 5,9 unidades para o repórter JK1621. A actividade da β -galactosidase para o Lex Δ I é 250 e 240 unidades, respectivamente (Keleher *et al.*, 1992). Os resultados obtidos para as quimeras Lexgim são muito inferiores aos obtidos nos estudos referidos anteriormente (Figura 3.5 e 3.6). A razão de unidades de β -galactosidase entre os dois repórteres varia entre aproximadamente 1 e 2 (Figura 3.7). As Lexgim não actuam como repressores transcripcionais, dado que os resultados obtidos são considerados *background*.

Apesar destes repórteres terem sido utilizados para o estudo do papel das Lexgim como repressores transcripcionais, os resultados do repórter JK1621 também podem ser utilizados para estudo da activação transcricional. Os resultados obtidos com o repórter JK1621 foram semelhantes aos obtidos com o repórter JK103, embora os promotores sejam diferentes (Figura 3.2 e 3.5).

4.3 Utilização das Gim para ensaios *two-hybrid*

Os ensaios *two-hybrid* permitem o estudo de interacções proteicas, proteínas de ligação ao DNA, activadores e repressores transcripcionais nas células (Brückner *et al.*, 2009). Este tipo de abordagem pode ser realizado em larga escala e permite detectar

interacções *in vivo* (Brückner *et al.*, 2009). Em termos gerais, este sistema consiste na fusão de uma proteína de interesse com um domínio de ligação ao DNA e uma proteína que interacciona com a proteína de interesse em fusão com um domínio de activação. A proteína de interesse liga-se a sequências UAS de um promotor (Brückner *et al.*, 2009). A interacção da proteína de interesse com a proteína que contém o domínio de activação leva ao recrutamento deste domínio de modo a reconstituir um factor de transcrição. Desta forma a RNA polimerase II será recrutada para que ocorra a transcrição (Brückner *et al.*, 2009). A proteína de interesse não deverá possuir actividade transcricional isto é, deverá ser inerte não interferindo no resultado do ensaio (Toby e Golemis, 2001). Muitas vezes tem-se tornando difícil resolver este problema, pois há um número razoável de proteínas (5 a 10%) que induzem a actividade transcricional, principalmente quando são ricas em resíduos acídicos (Toby e Golemis, 2001). Neste sentido, as proteínas Lexgim poderão ser utilizadas para ensaios *two-hybrid*, dado que os resultados mostram que não induzem a actividade transcricional preferencialmente em promotores dos repórteres JK103 e JK1621.

Em condições fisiológicas de crescimento em meio fermentativo foi observado que as Gim não funcionam como activadores e/ou repressores transcricionais em promotores específicos. Desta forma, as quimeras Lexgim poderão ser utilizadas em ensaios *two-hybrid* de modo a identificar novos alvos de interacção, em condições óptimas, ou seja, na ausência de stresse. Os alvos a identificar poderão ser proteínas envolvidas na transcrição ou noutros processos celulares. Atendendo a que as interacções Gim/alvo poderão ocorrer apenas em determinadas situações, deveriam ser repetidos os ensaios *one-hybrid* com drogas que geram stresse, nomeadamente stresse osmótico e oxidativo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (2003) Current Protocols in Molecular Biology, *John Wiley & Sons, Inc.* pp. 1934-2038
- Bettinger, B.T., Gilbert, D.M., Amberg, D.C. (2004) *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**:410-415
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979) *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., Boeke, J.D. (1998) *Yeast* **14**:115-132
- Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., Schlattner, U. (2009) *Int. J. Mol. Sci.* **10**(6):2763-2788
- Carroll, V.A., Ashcroft, M. (2006) *Cancer Res.* **66**:6264-6270
- Casamassimi, A., Napoli, C. (2007) *Biochimie* **89**:1439-1446
- Chatterjee, S., Struhl, K. (1995) *Nature* **374**(6525):820-822
- Chen, W., Roeder, R. (2011) *Seminars in Cell & Developmental Biology* 1-10
- Chowdhury, S., Smith, K.W., Gustin, M.C. (1992) *The Journal of Cell Biology*, **118**:561-571
- Chung, C.T., Niemela, S. L., Miller, R.H. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**:2172-2175
- Clark, S.W., Meyer, D.I. (1994) *The Journal of Cell Biology* **127**:129-138
- Cloutier, P., Coulombe, B. (2010) *Biochem. Cell Biol.* **88**:211-221
- Coelho, João Nuno Santos, (2007) Caracterização de mutantes gim em condições de stresse, Tese de mestrado, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
- Cohen, R., Engelberg, D. (2007) *FEMS Microbiol. Letters* **273**:239-243
- Courey, A.J., Jia, S. (2001) *Genes Dev.* **15**:2786-2796
- Cox, K.H., Tate, J.J., Cooper, T.G. (2004) *The Journal of Biological Chemistry* **279**(18):19294-19301
- Deplazes, A., Möckli, N., Luke, B., Auerbach, D. Peter, M. (2009) *The EMBO Journal* **28**:1429-1441
- Deuerling, E., Bukau, B. (2004) *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**:261-277
- Ding, J., Huang, X., Zhang, L., Zhao, N., Yang, D., Zhang, K. (2009) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**:253-263
- Estruch, F. (2000) *FEMS Microbiology Reviews* **24**:469-486
- Faria, J.P. Fernandes L. (2006) *Free Radical Biology & Medicine* **41**:1684-1693
- Fernandes, F., Rodrigues-Pousada, C., Struhl, K. (1997) *Molecular and Cellular Biology* **6**:982-6993.
- Fuda, N.J., Ardehali, M.B., Lis, J.T. (2009) *Nature* **461**:86-192
- Fujioka, Y., Taira, T., Maeda, Y., Tanaka, S., Nishihara, H., Sanae M. M. Iguchi-Ariga, S.M.M., Nagashima, K. Ariga, H. (2001) *The Journal of Biological Chemistry* **276**(48):45137-45144
- Fujita, K., Matsuyama, A., Kobayashi, Y., Iwahashi, H. (2006) *FEMS Yeast Res.* **6**:744-750
- Galibert, F., Alexandraki, D., Baur, A., Boles, E., Chalwatzis, N., Chuat, J.C., Coster, F., Cziepluch, C., Haan, M.D., Domdey, H., Durand, P., Entian, K.D., Gatus, M., Goffeau, A., Grivell, L.A., Hennemann, A., Herbert, C.J., Heumann, K., Hilger, F., Hollenberg, C.P., Huang, M.E., Jacq, C., Jauniaux, J.C., Katsoulou, C., Kirchrath, L., Kleine, K., Kordes, E., Kötter, P., Liebl, S., Louis, E.J., Manus, V., Mewes, W.M., Miosga, T., Obermaier, B., Perea, J., Pohl, T., Portetelle, D., Pujol, A., Purnelle, B., Rad, M.R., Rasmussen, S.W., Rose, M., Rossau, R., Schaaff-Gerstenschlager I., Smits, P.H.M., Scarcez, T., Soriano, N., Tovan, D., Tzermia, M., Broekhoven, A.V., Vandenbol, M., Wedler, H., Wettstein, D.V., Wambutt, R., Zagulski M., Zöllner, A., Karpfinger-Hartl, L. (1996) *The EMBO Journal* **15**(9):2031-2049
- Geissler, S., Siegers, K., Schiebe, E. (1998) *The EMBO Journal* **17**:952-966
- Ghaemmaghami S, Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., Weissman, J.S. (2003) *Nature* **425**(6959):737-741
- Gómez-Puertas, P., Martín-Benito, J., Carrascosa, J.L., Willison, K.R., Valpuesta, J.M. (2004) *Journal of Molecular Recognition* **17**:85-94
- Gong, Y., Kakiyama, Y., Krogan, N., Greenblatt, J., Emili, A., Zhang, Z., Houry, W.A. (2009) *Molecular Systems Biology* **5**(275):1-14
- Görner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M.T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H., Schüller, C. (1998) *Genes Dev.* **12**:586-597
- Gstaiger, M., Luke, B., Hess, D., Oakeley, E.J., Wirbelauer, C., Blondel, M., Vigneron, M., Peter, M., Krek, W. (2003) *Science* **302**:1208-1212
- Guarente, L., Mason, T. (1983) *Cell* **32**:1279-1286
- Gutsche, I., Essen, L.O., Baumeister, W. (1999) *J. Mol. Biol.* **293**:295-312
- Hansen, W.J., Cowan, N.J., Welch, W.J. (1999) *The Journal of Cell Biology* **145**(2):265-277.
- Hinnebusch, A.G. (1988) *Microbiological Reviews* **52**(2):248-273
- Ikner, A., Shiozaki, K. (2005) *Mutat. Res.* **569**:13-27
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A. (1983) *J. Bacteriology* **153**(1):163-168

- Janke, C., Kneussel, M. (2010) *Cell Trends in Neurosciences* **33**:362-372
- Kamens, J., Richardson, P., Mosialos, G., Brent, R., Gilmore, T. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**:2840-2847
- Keaveney, M., Struhl, K. (1998) *Molecular Cell* **1**:917-924
- Keleher, C.A., Redd, M.J., Schultz, J., Carlson, M., Johnson, A.D. (1992) *Cell* **68**:709-719
- Kuge, S., Jones, N. (1994) *The EMBO Journal* **13**(3):655-664
- Lacefield, S., Solomon, F. (2003) *Genetics* **165**:531-541
- Latchman, D. (1994) *Gene Regulation a Eukaryotic Perspective*, Springer pp. 202-226
- Lee, L.W., Mapp, A.K. (2010) *The Journal of Biological Chemistry* **285**(15):11033-11038
- Leroux, M.R., Fändrich, M., Klunker, D., Siegers, K., Lupas, A.N., Brown, J.R., Schiebel, E., Dobson, C.M., Hartl, F. (1999) *The EMBO Journal* **18**:6730-6743
- Leroux, M.R., Hartl, F.U. (2000) *Current Biology* **10**:R260-R264
- Lutfiyya, L.L., Johnston, M. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**(9):4790-4797
- Malagon, F., Tong, A.H., Shafer, B.K., Strathern, J.N. (2004) *Genetics* **166**:1215-1227
- Martin, J., Gruber, M., Lupas, A.N. (2004) *TRENDS in Biochemical Sciences* **29**(9):455-458
- Martín-Benito, J., Gómez-Reino, J., Stirling, P.C., Lundin, V.F., Gómez-Puertas, P., Boskovic, J., Chacón, P., Fernández, J.J., Berenguer, J., Leroux, M.R., Valpuesta, J.M. (2007) *Cell Structure* **15**:101-110
- Meurer-Grob, P., Kasparian, J., Wade, R.H. (2001) *Biochemistry* **40**:8000-8008
- Natarajan, K., Meyer, M.R., Jackson, B.M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A.G., Marton, M.J. (2001) *Molecular and Cellular Biology* **21**(1):4347-4368
- Ni, L., Snyder, M. (2001) *Molecular Biology of the Cell* **12**:2147-2170
- Raynaud-Messina, B., Merdes, A. (2007) *Current Opinion in Cell Biology* **19**: 24-30
- Rommelaere, H., De Neve, M., Neiryck, K., Peelaers, D., Waterschoot, D., Goethals, M., Fraeyman, N.B., Vandekerckhove, J., Ampe, C. (2001) *The Journal of Biological Chemistry* **276**(44):41023-41028
- Ryan, M.P., Jones, R., Morse, R.H. (1998) *Molecular and Cellular Biology* **18**(4):1774-1782
- Schuller, C., Brewster, J.L., Alexander, M.R., Gustin, M.C., Ruis, H. (1994) *The EMBO Journal* **13**:4382-4389
- Schulze, J.M., Wang, A.Y., Kobor, M.S. (2009) *Biochem. Cell Biology* **87**:65-75
- Siegert, R., Leroux, M.R., Scheufler, C., Hartl, F.U., Moarefi, I. (2000) *Cell* **103**:621-632
- Simons, C.T., Staes, A., Rommelaere, H., Ampe, C., Lewis, S.A., Cowan, N.J. (2004) *The Journal of Biological Chemistry* **279** (6):4196-4203
- Strirling, P.C., Bakhoun, S.F., Feigl, A.B., Leroux, M.R. (2006) *Nature Structural & Molecular Biology* **13**(10):865-870
- Titz, B., Thomas, S., Rajagopala, S.V., Chiba, T., Ito, T., Uetz, P. (2006) *Nucleic Acids Research* **34**(3):955-967
- Thorsen, M., Perrone, G.G., Kristiansson, E., Traini, M., Ye, T., Dawes, I.W., Nerman, O., Tamás, M.J. (2009) *BMC Genomics* **10**:105
- Toby, G.G., Golemis, E.A. (2001) *Methods* **24**:201-217
- Vabulas, R.M., Raychaudhuri, S., Hayer-Hartl, M., Hartl, F.U. (2010) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**:1-18
- Vainberg, I.E., Lewis, S.A., Rommelaere, H., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Klein, H.L., Cowan, N.J. (1998) *Cell* **93**:863-873.
- Voorst, F.V., Houghton-Larsen, J., Jønson, L., Kielland-Brandt, M.C., Brandt, A. (2006) *Yeast* **23**:351-359
- Whitehead, T.A., Boonyaratanakornkit, B.B., Höllrigl, V., Clark, D.S. (2007) *Protein Science* **16**:626-634
- Wu, W.S., Li, W.H., Chen B.S. (2008) *Gene Regulation and Systems Biology* **2**:53-62
- Wu, A.L., Moye-Rowley W.S. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**:5832-5839
- Young, J.C., Agashe, V.R., Siegers, K., Hartl, F.U. (2004) *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**:781-791
- Zheng, B., Han, M., Bernier, M., Wen, J. (2009) *FEBS Journal* **276**:2669-2685

6. ANEXOS

I Meios de cultura

Meio 2xTY líquido (meio rico para *Escherichia coli*)

Triptona 1,6% (BD[®]), Extracto de Levedura 1% (BD[®]), NaCl 5% (Merck[®]). Autoclavado a 121°C, durante 20 minutos.

Meio YPD líquido (meio rico para *Saccharomyces cerevisiae*)

Extracto de Levedura 1% (BD[®]) e Peptona 2% (BD[®]). Autoclavado a 121°C durante 20 minutos. No momento de utilização, adicionou-se glucose para concentração final a 2%, a partir de uma solução previamente autoclavada separadamente.

Meio YPD sólido (meio rico para *Saccharomyces cerevisiae*)

Extracto de Levedura 1% (BD[®]) e Peptona 2% (BD[®]) e Bactoagar 2% (BD[®]). Autoclavado a 121°C durante 20 minutos. No momento de utilização, adicionou-se glucose para concentração final a 2%, a partir de uma solução previamente autoclavada separadamente.

Meio SC líquido (meio sintético completo/selectivo para *Saccharomyces cerevisiae*)

Glucose 2% (Merck[®])

YNB (*yeast nitrogen base without amino acids*) 6,85% (BD[®])

SC mix: L- α -Arginina 0,05% (Sigma[®]); L- α -Metionina 0,05% (Sigma[®]); L- α -Tirosina 0,075% (Sigma[®]); L- α -Isoleucina 0,075% (Sigma[®]); L- α -Lisina 0,075% (Sigma[®]); L- α -Fenilalanina 0,125% (Sigma[®]); L- α -valina 0,375% (Sigma[®]); L- α -Ácido Aspártico 0,25% (Sigma[®]); L- α -Ácido Glutâmico 0,025% (Sigma[®]).

L- α -Triptofano 0,05% (Sigma[®])

L- α -Histidina 0,1% (Sigma[®])

L- α -Leucina 0,1% (Sigma[®])

Adenina 0,025% em NaOH 10mM (Sigma[®])

Uracilo 0,025% em NaOH 10mM (Sigma[®])

L- α -Treonina 0,2% (Sigma[®])

L- α -Serina 0,4% (Sigma[®])

Meio SC sólido (meio sintético completo/selectivo para *Saccharomyces cerevisiae*)

BactoAgar para concentração final a 2% (BD[®]) autoclavado a 121°C, durante 20 minutos. Os componentes foram adicionados ao BactoAgar no momento de utilização nas mesmas quantidades que para o meio SC líquido.

Em geral as soluções de aminoácidos, bases, SC *mix* e glucose 2% foram autoclavados a 110°C, durante 20 minutos. A autoclavagem não se procede sempre a 121°C uma vez que alguns componentes das soluções podem precipitar ou oxidar rapidamente quando expostos a esta temperatura.

II Solução de transferência

A solução de transferência a pH8 foi preparada com a solução tamponada Tris-Glicina (Tris-base 0,025M (Calbiochem®) e Glicina 0,192M (Merck®)) e Metanol 20% (Merck®). Para preparar a solução de transferência a pH9,2, antes da adição do Metanol, o pH da solução Tris-Glicina foi acertado com NaOH 5M.

III Resultados suplementares

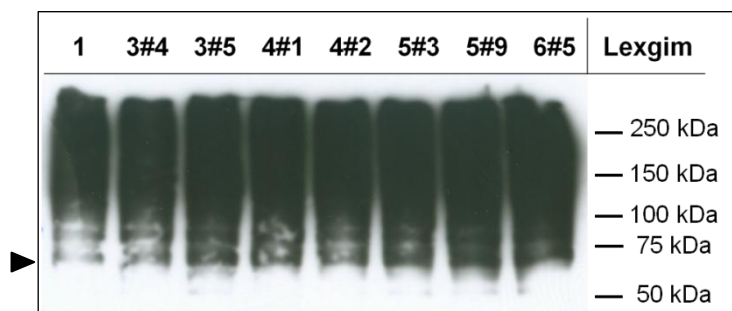


Figura 6.1 - Western blot com *anti-Cpy* para os extractos da Lexgim1, Lexgim3, Lexgim4, Lexgim5 e Lexgim6 com o repórter L9LEU. A transferência foi realizada a pH8 e os extractos utilizados foram os pós-mitocondriais. A seta indica as bandas com pouca definição, o que não permitiu a quantificação do sinal.