



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Mecanismos moleculares de desintoxicação de cádmio
usando o modelo biológico *Saccharomyces cerevisiae* –
papel de Yap2**

Daiane Mazzola

Rio de Janeiro
2015

DAIANE MAZZOLA

MECANISMOS MOLECULARES DE
DESINTOXICAÇÃO DE CÁDMIO USANDO O
MODELO BIOLÓGICO *Saccharomyces cerevisiae* –
PAPEL DE YAP2

Tese de doutorado submetida ao
Programa de Pós-graduação em
Bioquímica, do Instituto de Química
da Universidade Federal do Rio de
Janeiro – UFRJ, como parte dos
requisitos necessários para a obtenção
do título de Doutor em Ciências

Orientadores: Prof.^a Dr.^a. Elis Cristina Araújo Eleutherio

Prof. Dr. Marcos Dias Pereira

Rio de Janeiro
2015

CIP - Catalogação na Publicação

M477m Mazzola, Daiane
Mecanismos moleculares de desintoxicação de cádmio usando o modelo biológico *Saccharomyces cerevisiae* - papel de Yap2 / Daiane Mazzola. -- Rio de Janeiro, 2015.
186 f.

Orientadora: Elis Cristina Araújo Eleutherio.
Coorientador: Marcos Dias Pereira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, 2015.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Cádmio. 3. Yap1. 4. Yap2. 5. Rck1. I. Eleutherio, Elis Cristina Araújo, orient. II. Pereira, Marcos Dias, coorient. III. Título.

MECANISMOS MOLECULARES DE DESINTOXICAÇÃO DE CÁDMIO USANDO O MODELO
BIOLÓGICO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* – PAPEL DE YAP2

Daiane Mazzola

Orientadora: Elis Cristina Araújo Eleutherio

Co-orientador: Marcos Dias Pereira

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica,
Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio
de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Aprovado por:



Dr^a Elis Cristina Araújo Eleutherio
Instituto de Química – UFRJ



Dr. Francisco Meirelles Bastos Oliveira
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ



Bianca Cruz Neves
Instituto de Química – UFRJ



Claudio Akio Masuda
Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

Rio de Janeiro
Setembro/2015

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação de Fatores de Estresse no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro e no laboratório Genomics and Stress do Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa em Portugal, sob orientação da Prof. Dr^a Elis Cristina Araújo Eleutherio, do Prof. Dr Marcos Dias Pereira e da Prof. Dr^a Claudina Rodrigues-Pousada, com o apoio das seguintes instituições:

- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
- FAPERJ – Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro
- FCT – Fundação para Ciência e tecnologia.
- IUBMB – International Union of Biochemistry and Molecular Biology.

AGRADECIMENTOS

À Professora Elis pela orientação, pelo ensinamento, por ter confiado a mim um projeto tão desafiador e por ter me dado uma incrível e inesquecível oportunidade de crescimento.

Ao Professor Marcos, meu co-orientador, pelo ensinamento, pela amizade e confiança.

À Professora Claudina, pela orientação, pela maravilhosa recepção em seu laboratório, por acreditar no meu potencial, estimular o meu crescimento e, acima de tudo, por ter me transformado na Profissional que hoje sou.

À Catarina Pimentel, pela luta constante e incessante por mim e para que esta Tese acontecesse de uma forma linda; pelas cobranças que me tornaram forte e me fizeram crescer; por me incentivar a trabalhar com garra e dedicação; por se doar por inteiro; pelo carinho e pela amizade verdadeira que eu nunca esquecerei;

À Soraia, por ter me ensinado e trabalhado tanto para a realização dessa Tese; pela paciência em todos os momentos; pela amizade linda e verdadeira que construímos em pouco tempo, que durará para sempre; pelo carinho e amor; pela companhia que fez com que horas de bancada fossem minutos;

À Catarina Amaral, pelos ensinamentos; pela paciência; pelo carinho e dedicação a este trabalho e à minha pessoa; por ter me recebido tão bem e por ter me ajudado tanto com o trabalho e com as coisas do dia-a-dia; pela companhia e amizade;

Aos companheiros de luta do nosso Laboratório de Investigação de Fatores de Estresse: Claudinha, Léo, Dudu, Thales, Fred, Germana, Renata, Luciana, Dani, Raquel, Mariana, Rayne, Mauro, Aline e Vinícius; meus colegas e alunos: Alex, Daniel e Maria Fernanda; pelo crescimento; pela ajuda no trabalho; pelos ensinamentos; pela amizade e pelo carinho;

A todos do Laboratório *Genomics and Stress* e ITQB: Professora Claudina, Pi, Regina, Catu, Sofia, Fábio, So, Rita, Cátia, Sara, Joana, Mariana, Carol, Dani, Merci, Filipa, Sônia, Ana Fox, Andréia; Seu João; Seu Domingos; pela recepção maravilhosa em Portugal; pela ajuda em todos os momentos; pelo carinho, amizade e

companheirismo; pelos momentos inesquecíveis; pela força que me foi dada para que eu chegasse até aqui;

A todos do Rio de Janeiro, pela ajuda; pelo carinho e amizade; pelos momentos de descontração, em especial: Seu Zé, Tati, Thaís, Vitória, Iuri, Carlinhos, Maranhão; Fernanda; Renan; Célia; Jimena e Gabi.

À minha família, pelo amor, pela compreensão e apoio que me fizeram prosseguir na caminhada; em especial meus tios Odilon e Iara pela ajuda nos momentos mais difíceis, pela acolhida, companhia e pelo carinho; minha prima Tassi por tudo isso, pela amizade e companheirismo;

Aos amigos, pelo amor e carinho que, mesmo à distância, acalentaram o coração e deram a certeza de uma amizade segura e verdadeira.

Ao Ighor, meu grande amor, pela sua força que me fortaleceu; pela confiança e pela segurança que me impulsionou; pelo amor e dedicação que superou distâncias. Você foi o responsável por tornar essa jornada mais leve e por me tornar uma pessoa/profissional mais corajosa e mais forte. Muito obrigada por acreditar tanto no meu potencial e sempre incentivar meu crescimento.

Aos meus pais, Dejanira e Jovino, pelo amor incondicional, pelo apoio, pela base que sempre me sustentou, pelo incentivo e motivação para que eu saísse para o mundo, que sempre me deu forças para seguir. Vocês são o meu exemplo de coragem, dedicação, amor pelo trabalho e pela vida. O exemplo de vocês me fez chegar até aqui com vontade de continuar. Muito obrigada.

Ao CNPq, CAPES, FAPERJ, FCT, IUBMB pelo suporte financeiro durante a realização deste trabalho.

Dedico este trabalho aos meus pais.

“Imaginação é mais importante que conhecimento. Enquanto o conhecimento é limitado, a imaginação abraça o mundo inteiro, estimulando o progresso, dando vida à evolução. Isto é, estritamente falando, um fator real na pesquisa científica.”

Albert Einstein

RESUMO

Cádmio é um metal pesado ainda muito utilizado nos processos industriais e encontra-se em grande quantidade na natureza. Tornou-se uma preocupação ambiental, uma vez que possui alta toxicidade e dispõe de um longo tempo de meia-vida. Sendo assim, ao entrar em contato com este metal, muitas espécies o acumulam cronicamente no organismo, podendo sofrer danos celulares irreversíveis.

Saccharomyces cerevisiae tem sido extremamente utilizada como modelo para estudar mecanismos moleculares envolvidos no processo de toxicidade/desintoxicação do cádmio. Dois importantes fatores de transcrição nesta levedura, Yap1 e Yap2, são os principais responsáveis pela regulação da defesa contra o cádmio. Yap1 possui um mecanismo de defesa contra este metal bem definido e sua principal função é a indução de genes de defesa contra o estresse oxidativo. Apesar de Yap2 possuir grande homologia com Yap1, o papel dessa proteína na resposta ao cádmio ainda não foi totalmente esclarecido.

Nesse sentido, o presente estudo objetivou analisar o papel do fator de transcrição Yap2 na resposta ao estresse por cádmio em *S. cerevisiae*. Inicialmente, o Capítulo 1 abordará a discussão sobre ensaios de tolerância ao cádmio, expressão gênica e proteica empregados para compreender melhor se Yap2 é requerido na defesa contra o cádmio. Os dados mostram que, além de Yap1, Yap2 é altamente induzido pelo cádmio estimulando a expressão do seu conhecido gene-alvo *FRM2* em resposta ao metal. Segundo a literatura, a ativação da expressão gênica mediada por Yap1 e Yap2 depende do transporte destes dois fatores de transcrição do citoplasma para o núcleo, o que

parece ser dependente da formação de pontes dissulfeto intramoleculares. Portanto, no Capítulo 2, avaliou-se o papel da proteína cinase Rck1 na via de sinalização induzida pelo cádmio. Rck1 mostrou um papel inibitório sobre Yap2 no estresse por cádmio, reduzindo o tempo de permanência de Yap2 no núcleo, diminuindo o tempo de meia-vida desta proteína. Esses fatores levaram a uma mudança na célula, fazendo com que a proteína Yap1 fosse mais expressa e se tornasse mais estável. As alterações que Rck1 provoca nos dois fatores de transcrição prejudicam a regulação de genes de defesa antioxidante que atuam na resposta ao estresse por cádmio.

O Capítulo 3 mostra uma nova função regulatória para Yap2 em resposta ao cádmio, o qual regula positiva e parcialmente os genes *SLT2*, *RLM1* e *CHS1* que codificam proteínas da via de integridade da parede celular (CWI, *Cell Wall Integrity*).

A partir do presente trabalho, desvendou-se uma via de sinalização celular em resposta ao cádmio sob controle de Rck1 e regulada por Yap1 e Yap2, além disso pôde-se verificar que Yap2 é altamente requerido para a atenuação do estresse oxidativo e manutenção da integridade da parede celular.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*; cádmio; Yap1; Yap2; Rck1; CWI; defesa antioxidante.

ABSTRACT

Cadmium is a heavy metal still used in the industry and it is found in large amounts in the nature. It has become an environment concern since it has high toxicity and a long half-life. Therefore, when in contact with this metal, many species accumulate it chronically in the organism with irreversible damages.

Saccharomyces cerevisiae has been extensively used as an experimental model to study the molecular mechanisms involved in the process of toxicity/detoxification of cadmium. Two important transcription factors in this yeast, Yap1 and Yap2, are the primarily responsible by regulation of defense against cadmium. Yap1 has a mechanism of defense against this metal well defined and its major function is the induction of defense genes against oxidative stress. Even though Yap2 has wide homology with Yap1, the role of this protein in the response to cadmium stress has not been totally clarified.

In this context, the present study aimed to analyze the role of the transcription factor Yap2 in the response to cadmium stress in *S. cerevisiae*. Firstly, the Chapter 1 will address the discussion about sensitivity to cadmium, gene and protein levels analysis were applied to understand better if Yap2 is required in the defense against cadmium. The data showed in addition Yap1, Yap2 is highly induced by cadmium stimulating the expression of its well-known target gene *FRM2* in response to this metal. According to the literature, the activation of gene expression mediated by Yap1 and Yap2 depend on their transports of the cytoplasm to the nucleus and appear to depend of intramolecular disulfide bounds. Therefore, in Chapter 2, it was evaluated the

role of the protein kinase Rck1 in the signaling pathway induced by cadmium. Rck1 showed an inhibitory function under Yap2 in the cadmium stress, reducing its residence time in the nucleus, decreasing the half-life time and the protein stability. These factors have led to a change in the cell, causing Yap1 was more expressed and become more stable. The changes caused by Rck1 on these two transcription factors impair the regulation of antioxidant defense genes that act in the cadmium stress response.

Lastly, with assays of gene expression, the Chapter 3 shows a novel regulatory function to Yap2 in response to cadmium, this transcription factor regulated positively and partially the genes *SLT2*, *RLM1* and *CHS1* that codify proteins of the Cell Wall Integrity pathway (CWI).

From this work, it was uncovered a pathway of cellular signaling in response to cadmium under Rck1 control and regulated by Yap1 and Yap2, also could be verified Yap2 is highly required to the attenuation of oxidative stress and maintenance of the cell wall integrity.

Key-words: *Saccharomyces cerevisiae*; cadmium; Yap1; Yap2; Rck1; CWI; antioxidant defense.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C = graus centígrados

AMPc = Monofosfato de Adenosina cíclico

Amp^R = Ampicilina resistente

ARE = *AP-1 Recognition Element* (elemento de reconhecimento de sítio AP-1)

ATP = trifosfato de adenosina

BER = *Base Excision Repair* (reparo por excisão de base)

b-ZIP = *Basic Leucine Zipper domain*

cDNA = DNA complementar

CF = Contraste de Fase

CIP = *Calf Intestinal Phosphatase* (fosfatase alcalina intestinal)

CCD = *Charge Coupled Device*

c-CRD = *carboxyl-terminal cysteine-rich domains* (domínio rico em cisteína localizado na região carboxi-terminal)

Cd = cádmio

CDF = *Cation Diffusion Facilitator*

Cd(GS)₂ ou GS-Cd-GS = bis-glutationato de cádmio

CHX = cicloheximida

cm = centímetros

CWI = *Cell Wall Integrity*

Cys = cisteína

DABCO = 1,4-diazadicyclo[2.2.2]octane

DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole

DEPC = dicarbonato de dietila

DMSO = dimetil sulfóxido

DNA = ácido desoxirribonucleico

DNase = desoxirribonuclease

DNP = *dinitrophenol*

dNTP = deoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA = ácido etilenodiaminotetracético

ERO = espécies reativas de oxigênio

Fw ou Fwd = *primer forward*

g = grama

GFP = *Green Fluorescent Protein* (proteína verde fluorescente)

GPx = glutationa peroxidase

GRAS = *Generally Recognized as Safe* (geralmente reconhecido como seguro)

GSH = glutationa

HA = *human influenza hemagglutinin*

HEPES = *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

HIS = histidina

HOG = *high osmolarity glycerol*

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

ICP-MS = *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente)

ITQB = Instituto de Tecnologia Química e Biológica

IPTG = isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

Kan = canamicina

kb = quilobases = 1.000 pares de bases

kDa = quilo Dalton = 1.000 Dalton

LB = Luria-Bertani (meio)

LEU = leucina

M = molar

MAP = *Mitogen Activated Protein Kinase* (proteína cinase ativada por mitógeno)

mg = miligrama

min = minutos

mL = mililitro

MDA = *malondialdehyde* (dialdeído malônico)

mM = milimolar

MMR = *Mismatch Repair*

MSC = múltiplo sítio de clonagem

μ g = micrograma

μ L = microlitro

μ m = micrometro

μ M = micromolar

NADPH = *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* (Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina)

NCBI = *National Center for Biotechnology Information*

NER = *Nucleotide Excision Repair*

NES = *Nuclear Exportation Signal* (sinal de exportação nuclear)

Ni-Cd = níquel-cádmio

ng = nanograma

nm = nanômetros

n-CRD = *amino-terminal cysteine-rich domains* (domínio rico em cisteína localizado na região amino-terminal)

O₂^{•-} = radical superóxido

OD = densidade óptica

O.N = *over night*

ORF = *Open Reading Frame* (fase aberta de leitura)

pb = pares de base

PBS = *Phosphate Buffered Saline* (tampão fosfato salino)

PCR = *polymerase chain reaction* (reação de polimerização em cadeia)

PEG = polietilenoglicol

pH = potencial hidrogeniônico

PHMG = polihexametileno guanidina

PIPES = *piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)*

PKA = proteína cinase dependente de AMPc

pmol = picomol

PMSF = *phenylmethylsulfonyl fluoride*

PVC = policloreto de polivinila

qRT-PCR = PCR em tempo real

RNA = ácido ribonucleico

RNA_m = ácido ribonucleico mensageiro

RNA_r = ácido ribonucleico ribossomal

RNAse = ribonuclease

rpm = rotações por minuto

RT = *Reverse Transcriptase* (transcriptase reversa)

R_v ou Rev = *primer reverse*

S = sulfeto

SC = *Synthetic Complete* (meio sintético completo)

SD = *Synthetic Dextrose* (meio sintético mínimo)

SDS = *Sodium Dodecyl Sulfate* (dodecil sulfato de sódio)

SGD = *Saccharomyces Genome Database*

SOB = *Super Optimal Broth* (meio)

SOC = *Super Optimal Broth with Catabolic repressor* (meio)

SOD = superóxido dismutase

TB = *Terrific Broth* (tampão)

TBARS = *Spectrophotometric Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)

t-BOOH = terc-butil hidroperóxido

TEMED = *tetramethylethylenediamine*

TCA = ácido tri-cloro acético

Tris = tris(hidroximetil)aminometano

TRP = triptofano

U = unidade

UNL = Universidade Nova de Lisboa

URA = uracila

UV = ultravioleta

V = voltagem

WT = cepa selvagem

X-Gal = 5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactosídeo

Yap = *Yeast activator protein*

YNB = *Yeast Nitrogen Base* (base nitrogenada de levedura)

YPD = *Yeast Extract Peptone Dextrose* (meio)

YRE = *Yap Response Element* (elemento de resposta à Yap)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos carcinógenos do cádmio.....	38
Figura 2 – Transportadores responsáveis pela entrada e saída de cádmio em <i>S. cerevisiae</i>	40
Figura 3 – Complexo formado entre cádmio e glutathione, bis-glutathionato de cádmio – Cd(GS) ₂	44
Figura 4 – Mecanismo de desintoxicação do cádmio mediado pela glutathione e Ycf1 ..	45
Figura 5 – Características estruturais da Família Yap	48
Figura 6 – Mecanismo de resposta ao H ₂ O ₂ regulado por Yap1 em <i>S. cerevisiae</i>	52
Figura 7 – Dois mecanismos de regulação realizados por Yap1 em <i>S. cerevisiae</i>	54
Figura 8 – Visão esquemática da homologia entre o c-CRD de Yap1 e Yap2 e a representação da substituição da região inteira de Yap1 pela de Yap2	56
Figura 9 – Potencial efeito combinado entre membros da Família Yap	60
Figura 10 – Produtos finais utilizados na construção dos plasmídeos pRS416YAP1-HA, pRS416YAP2-HA e pRS416RCK1-HA.....	78
Figura 11 – Produtos finais utilizados na construção do plasmídeo pMet-RCK1-HA...	79
Figura 12 – Análise da tolerância ao cádmio das cepas mutantes nos genes <i>YAP1</i> e <i>YAP2</i> de <i>S. cerevisiae</i>	101
Figura 13 – Efeito do cádmio na expressão de RNAm de <i>YAP1</i> e no nível da proteína Yap1	104

Figura 14 – Efeito do cádmio na expressão de RNAm de <i>YAP2</i> e no nível da proteína Yap2.....	105
Figura 15 – Análise do efeito do cádmio e do envolvimento de Yap1 na expressão de RNAm de <i>YAP2</i>	107
Figura 16 – Efeito do cádmio na atividade de Yap2 e expressão de RNAm de <i>FRM2</i>	109
Figura 17 – Busca pelo interatoma ligado a Yap2 através da ferramenta de bioinformática STRING.....	112
Figura 18 – Efeito do cádmio no crescimento celular da cepa mutante no gene <i>RCK1</i> de <i>S. cerevisiae</i>	114
Figura 19 – Análise da tolerância do cádmio das cepas mutantes no gene <i>RCK1</i> de <i>S. cerevisiae</i>	116
Figura 20 – Efeito do cádmio no nível da proteína Rck1.....	119
Figura 21 – Análise da tolerância ao cádmio das duplas e tripla mutantes construídas neste estudo.....	122
Figura 22 – Análise do efeito do cádmio e do envolvimento de Rck1 na atividade de Yap2 e expressão de RNAm de <i>FRM2</i>	124
Figura 23 – Análise do efeito do cádmio e do envolvimento de Rck1 na fosforilação de Yap2.....	126
Figura 24 – Análise do efeito do cádmio e do envolvimento de Rck1 na expressão de RNAm de <i>YAP2</i>	128
Figura 25 – Análise do efeito do cádmio e do envolvimento de Rck1 na estabilidade e no tempo de meia-vida da proteína Yap2.....	130

Figura 26 – Análise do efeito do cádmio e do envolvimento de Rck1 na localização celular de Yap2	132
Figura 27 – Análise do efeito do cádmio e do envolvimento de Rck1 na localização celular de Yap1	134
Figura 28 – Análise do efeito do cádmio e do envolvimento de Rck1 na fosforilação, no nível da proteína e na estabilidade da proteína Yap1	136
Figura 29 – Análise do efeito do cádmio e do envolvimento de Rck1 na expressão de RNAm de <i>TRX2</i> e <i>GPX2</i>	140
Figura 30 – Análise do estado de carbonilação de proteínas	143
Figura 31 – Análise do conteúdo de peróxidos lipídicos	144
Figura 32 - Representação esquemática da parede celular de levedura	146
Figura 33 – Análise do efeito do cádmio e do envolvimento de Yap1 e Yap2 na expressão de RNAm dos genes da via CWI	149
Figura 34 – Análise da tolerância ao cádmio das cepas mutantes nos genes da via CWI de <i>S. cerevisiae</i>	150
Figura 35 – Representação do mecanismo de sinalização celular regido por Yap1, Yap2 e dependente de Rck1 em <i>S. cerevisiae</i> em resposta ao estresse oxidativo gerado pelo cádmio	153
Figura 36 – Representação do mecanismo de sinalização celular regido por Yap2 em <i>S. cerevisiae</i> em resposta aos danos causados à parede celular gerados pelo cádmio.....	154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – <i>S. cerevisiae</i>	65
Tabela 2 – <i>E. coli</i>	66
Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados nas construções	68
Tabela 4 – Oligonucleotídeos utilizados para qRT-PCR	70
Tabela 5 – Vetores utilizados neste trabalho	71
Tabela 6 – Ferramentas de Bioinformática e seus <i>sites</i>	72
Tabela 7 – Soluções utilizadas para preparo do gel de poliacrilamida	90
Tabela 8 – Conteúdo intracelular de cádmio (ICP-MS)	120

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1. CÁDMIO	29
2.1.1. Toxicidade do cádmio	31
2.1.1.1. A similaridade com zinco	31
2.1.1.2. Envolvimento com o estresse oxidativo	32
2.1.1.3. Potencial mutagênico e carcinogênico	34
2.2. <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> COMO MODELO EXPERIMENTAL.....	38
2.2.1. Transporte de cádmio em <i>S. cerevisiae</i>: mecanismos de entrada X mecanismos de saída e desintoxicação	39
2.2.2. Papel da Glutathione na defesa contra o cádmio	42
2.2.3. Papel da Família Yap na resposta ao estresse em <i>S. cerevisiae</i>	46
2.2.3.1. Yap1, o maior regulador da resposta ao estresse oxidativo	49
2.2.3.2. Yap2	55
2.2.3.3. Outros fatores de transcrição da Família Yap	58
3. OBJETIVOS	62
3.1. OBJETIVO GERAL.....	62
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
4. MATERIAL E MÉTODOS	64
4.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	64
4.2. MICRORGANISMOS UTILIZADOS	64
4.3. MEIOS DE CULTURA	64
4.4. ESTOQUE E CONDIÇÕES DE CULTIVO	66
4.5. OLIGONUCLEOTÍDEOS (<i>PRIMERS</i>)	66
4.6. VETORES	67
4.7. FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA	72
4.8. CÉLULAS COMPETENTES DE BACTÉRIA	72
4.9. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.....	73
4.10. CÉLULA COMPETENTE DE LEVEDURA	73

4.11. TRANSFORMAÇÃO EM LEVEDURA COM PLASMÍDEO NÃO-RECOMBINANTE	74
4.12. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	74
4.13. CONSTRUÇÃO DO VETOR CONTENDO OS GENES <i>YAP1</i> , <i>YAP2</i> E <i>RCK1</i> LIGADOS AO EPÍTOPO HA	75
4.14. CONSTRUÇÃO DAS MUTANTES PELA TÉCNICA DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA.....	80
4.14.1. Construção das cassetes de interrupção	80
4.14.2. Transformação em levedura com plasmídeo recombinante	81
4.15. PCR DE COLÔNIA	82
4.16. CURVA DE CRESCIMENTO E ENSAIO DE SENSIBILIDADE	83
4.17. TOLERÂNCIA AO ESTRESSE	84
4.18. CONTEÚDO INTRACELULAR DE CÁDMIO	84
4.19. EXPRESSÃO DE RNAM.....	85
4.19.1. Extração de RNA total	86
4.19.2. Verificação da integridade do RNA por eletroforese.....	86
4.19.3. Digestão com DNase e purificação do RNA	87
4.19.4. Obtenção do cDNA	87
4.19.5. Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) – SYBR Green	88
4.20. EXPRESSÃO PROTEICA.....	88
4.20.1. Extrato proteico	89
4.20.2. Quantificação de proteínas	89
4.20.3. Western blot	90
4.21. ESTABILIDADE DA PROTEÍNA	92
4.22. ENSAIO DE FOSFORILAÇÃO	93
4.23. LOCALIZAÇÃO CELULAR	94
4.24. PROTEÍNA CARBONILADA	95
4.25. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	96
4.26. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	97
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
5.1. CAPÍTULO 1: <i>YAP2</i> ATIVO NA RESPOSTA AO CÁDMIO	99
5.1.1. Yap1 e Yap2 na tolerância ao cádmio.....	100
5.1.2. Cádmio induz a expressão gênica de <i>YAP1</i> e <i>YAP2</i>	102

5.1.3. Yap2 está ativo na resposta ao cádmio	108
5.2. CAPÍTULO 2: RCK1 REGULA OS FATORES DE TRANSCRIÇÃO YAP1 E YAP2 EM RESPOSTA AO CÁDMIO	111
5.2.1. Proteína Rck1 envolvida na resposta ao cádmio	113
5.2.2. Yap1 e Yap2 medeiam a resistência da mutante <i>rck1Δ</i> ao cádmio	121
5.2.3. Rck1 parece não afetar a fosforilação e a expressão de <i>YAP2/Yap2</i>	125
5.2.4. Rck1 diminui a estabilidade e o tempo de meia-vida de Yap2	129
5.2.5. A exportação nuclear de Yap2 é afetada por Rck1	131
5.2.6. Rck1 interfere na expressão e estabilidade Yap1	135
5.2.7. Yap1 e Yap2 medeiam a indução de genes de defesa antioxidante observados na mutante <i>rck1Δ</i>	137
5.3. CAPÍTULO 3: YAP2 REGULA GENES DA VIA DE INTEGRIDADE DA PAREDE CELULAR	146
6. CONCLUSÕES	158
7. PERSPECTIVAS	160
8. REFERÊNCIAS	162
9. ANEXOS	186

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As condições adversas que causam alterações fisiológicas como resposta nos organismos são conhecidas como situações de estresse, as quais são agressões diretas ou indiretas com origens diversas que causam um desequilíbrio interno. Muitas situações ambientais como alterações osmóticas, de temperatura, exposição a oxidação e presença de metais pesados, podem causar a perturbação da ordem biológica e prejudicar o funcionamento celular normal.

Um pré-requisito para a sobrevivência e evolução de um organismo é a capacidade deste se adaptar às mudanças ambientais. O conjunto de mecanismos moleculares que tornam o organismo apto às novas condições ambientais é conhecido como resposta ao estresse (Rodrigues-Pousada et al. 2010).

Dentre os diferentes tipos de causadores de estresse, os metais pesados ainda hoje são uma grande preocupação a nível ambiental, uma vez que a grande utilização de metais pela indústria e a mineração em grande escala acarretam o aumento de rejeitos altamente contaminados, os quais acumulam nas águas, solos e plantas (Nagajyoti et al. 2010; Ali et al. 2013). Diversas pesquisas com enfoque em metais e seus efeitos tóxicos tem surgido nos últimos anos, uma vez que metais pesados têm uma alta permanência no ambiente e possuem alta toxicidade a uma grande variedade de organismos (Emamverdian et al. 2015; Tchounwou et al. 2012; Chang e Leu 2011; Ayres 1992).

O cádmio é um metal pesado que ainda é bastante utilizado na indústria na fabricação de baterias, pigmentos e na galvanoplastia (Joseph 2009). Com a sua alta produção e utilização, este metal acaba por ser emitido no ambiente, representando um importante contaminante, já que não pode ser destruído na natureza (Jarup e Akesson 2009; Thevenod e Lee 2013).

Quando acumula no ambiente, o cádmio entra em contato com o organismo de diversas formas e causa danos aos tecidos pelos seus diferentes mecanismos de toxicidade, levando ao aparecimento de doenças, muitas vezes, fatais (Marettová et al. 2015).

O entendimento dos mecanismos regulatórios celulares em resposta a agentes tóxicos como o cádmio, é essencial para esclarecer os processos fisiológicos e patológicos nos organismos.

A levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) tem sido utilizada como modelo experimental para estudar as vias de sinalização celulares em resposta a metais pesados por conservar muitos processos celulares e moleculares de organismos eucariotos mais complexos (Rodrigues-Pousada et al. 2010; Adamis et al. 2007; Yang e Pon 2003). Além disso, atua como biorremediador de metais e é um micro-organismo acessível a todas as técnicas de biologia molecular (Khurana e Lindquist 2010).

Esta levedura possui um complexo e flexível programa de expressão de genes que respondem a diversos estímulos ambientais e atuam em vias de sinalização e regulação com importante função na defesa celular. A Família Yap corresponde a uma família de fatores de transcrição com domínio b-ZIP de ligação ao DNA que são de grande relevância para a defesa contra o estresse em *S. cerevisiae*. Yap1 é o principal regulador de resposta ao estresse oxidativo, seu mecanismo de ativação por H₂O₂ e por agentes reativos a tióis está bem esclarecido na literatura. Além disso, muitos genes importantes no processo de desintoxicação celular do cádmio são regulados por Yap1 (Rodrigues-Pousada et al. 2010). Por outro lado, Yap2, um homólogo de Yap1 (Bossier et al. 1993; Wu et al. 1993), confere resistência ao cádmio quando superexpresso, mas o fato de um mutante *yap2Δ* não apresentar sensibilidade ao metal (Wu et al. 1993; Bossier et al. 1993; Hirata et al. 1994; Lesuisse e Labbe 1995; Azevedo et al. 2007), deixou dúvidas sobre a real função desse fator de transcrição na defesa contra o cádmio.

A existência de possíveis genes que estejam relacionados com Yap2 poderia esclarecer e responder algumas questões permanentes sobre o papel desse fator de transcrição na defesa contra o estresse causado pelo cádmio. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo analisar o papel do fator de transcrição Yap2 na resposta ao estresse por cádmio em *S. cerevisiae*.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CÁDMIO

O cádmio (Cd) é um metal pesado que foi descoberto em 1817 na Alemanha por Friedrich Strohmeyer, que observou que a calamina (carbonato de zinco) com presença de impurezas mudavam de cor durante o aquecimento e isso não ocorria com a calamina pura. Estudos mais aprofundados mostraram que o elemento responsável pela mudança para uma cor amarelada em vez de branca era conhecido como cádmio. Assim, a Alemanha se tornou o único produtor importante de cádmio durante 100 anos (USGS 2015).

O sulfeto de cádmio (CdS), conhecido como Greenockita, é o único mineral específico de cádmio e possui a composição de 77,81 % de Cd e 22,19 % de S. No entanto, a grande maioria do cádmio é resultado do subproduto do processamento de minérios de zinco, cobre e chumbo. Ainda, cádmio é um metal de transição que pertence ao grupo IIB da Tabela Periódica e é encontrado na crosta terrestre em uma faixa de concentração entre 0,1 a 1 ppm (IARC 1993). Também está classificado em 67º lugar em quantidade entre outros 90 elementos encontrados naturalmente na Terra. Sendo assim, cádmio é introduzido no ambiente tanto de forma natural, quanto por atividades antropogênicas, visto que esta última contribui até dez vezes mais para o acúmulo de cádmio no ambiente. As principais formas de inserção do cádmio no ambiente se dão através da atividade vulcânica, incêndios florestais, queima de combustíveis fósseis e transporte de partículas contaminadas do solo através do vento (Joseph 2009).

Nos dias atuais a maior produção de cádmio se dá na Ásia, mas este metal tem sido utilizado mundialmente em muitos processos industriais, fazendo com que a produção seja da ordem de 22.200 toneladas segundo dados de 2015 (USGS 2015). A principal forma de aplicação é na fabricação de baterias de Ni-Cd, a qual representa mais de 80 % do consumo global do metal (USGS 2015). As demais formas de utilização na indústria, em ordem decrescente, são na produção de pigmentos de tintas, cerâmica, esmalte, vidros e plásticos, uma vez que o sulfato de cádmio possui coloração

amarela e o seleneto de cádmio coloração vermelha; na galvanoplastia, revestindo metais como alumínio, ferro, aço, com o objetivo de aumentar a proteção por evitar a corrosão (Joseph 2009) e aumentar a condutividade elétrica (Marder et al. 2004); e como estabilizador para PVC, uma vez que previne a sua degradação quando o material é exposto à luz UV (ultravioleta) ou ao aquecimento (Joseph 2009).

Desta forma, os humanos podem entrar em contato com o cádmio através da ingestão de água e alimentos, uma vez que plantas e peixes podem absorver o metal da água e do solo e possuem alta capacidade de acumulá-lo. A inalação é outra forma importante de contaminação e pode ocorrer nas áreas de mineração, na indústria ou pela fumaça do cigarro. Obviamente o cádmio não é adicionado de forma proposital ao cigarro, nem o tabaco que é utilizado para a produção de cigarro contém cádmio na sua constituição natural. Não obstante, o tabaco é obtido a partir das folhas da espécie vegetal *Nicotiana tabacum* (Musk e De Klerk 2003) que possui grande facilidade em concentrar cádmio. O teor deste metal no tabaco está em uma faixa de 1-2 µg/g de peso seco, proporcional a 0,5 - 1 µg por cigarro (Satarug e Moore 2004).

Com um tempo de meia-vida em torno de 20 anos nas células do fígado e rins, considerado extremamente longo (Brzówska e Moniuszko-Jakoniuk 2001; Martelli et al. 2006) e com um caráter cumulativo na cadeia alimentar da qual o homem faz parte, o cádmio torna-se um fator cada vez mais agressivo ao ambiente e a saúde humana, uma vez que, mesmo em quantidade subtóxicas, o fenômeno de bioacumulação leva a níveis de risco nos elos finais da cadeia trófica (Moore 2004).

Em contato com o organismo, a absorção do cádmio ocorre pela similaridade com metais essenciais, como cálcio, ferro, cobre e zinco. Cerca de 3 a 10 % é absorvido pelo sistema gastrointestinal e até 50 % pode ser absorvido após inalação, mas muito pouco é absorvido através da pele (Sahmound et al. 2005). Por fim, o cádmio é armazenado nos rins, fígado, pulmões, cérebro, sistema nervoso central, coração, testículos e ossos, podendo facilitar o aparecimento de certas doenças como enfisema pulmonar não hipertrófico, alergia, dano tubular renal irreversível, osteoporose, distúrbio no metabolismo do cálcio, câncer de próstata, entre outras (Valko et al. 2005; Il'yasova e Schwartz 2005; Giaginis et al. 2006).

2.1.1. Toxicidade do cádmio

Metais pesados e metalóides são frequentemente citados na literatura por seu alto nível de toxidez, mesmo em baixas concentrações, merecendo destaque o cádmio (Fulekar e Sharma 2008). Cádmio é mutagênico, sendo classificado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como um agente carcinogênico (IARC 1993). Segundo pesquisas realizadas em 2005 pelas agências americanas *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR) e *Environmental Protection Agency* (EPA), o cádmio ocupa o sétimo lugar na lista de substâncias tóxicas com maior risco de causar danos ao homem.

A toxicidade de uma substância está intimamente relacionada com seu potencial para provocar efeito adverso à saúde. No caso do cádmio, muitos efeitos indesejados são conhecidos, tanto nos homens como em plantas e animais, confirmando assim a sua propriedade tóxica. O efeito tóxico de um metal é dependente da dose, do tempo de exposição, da forma física / química do elemento e da via de administração / absorção. Assim, esse caráter tóxico depende do tipo de interação que este tem com o organismo, e ocorre em três estágios: a) absorção; b) transporte, distribuição, acumulação e biotransformação; c) efeito e eliminação pelo organismo (Hodgson, 2004).

2.1.1.1. A similaridade com zinco

A toxicidade causada por cádmio pode estar associada a diversas vias e muitos desses efeitos tóxicos estão intimamente relacionados com a similaridade que o cádmio possui com o zinco. Apesar de o zinco ser um metal essencial ao funcionamento celular, o cádmio não possui função biológica específica no homem e na grande maioria dos organismos. Mas a semelhança apresentada pelos dois metais mostra-se principalmente nas suas propriedades químicas, uma vez que pertencem ao mesmo grupo da Tabela Periódica (IIB), apresentam os sub-níveis 3d e 4d completos, ambos têm valência II, são estáveis como cátions divalentes Cd^{2+} e Zn^{2+} e não sofrem mudanças no número de oxidação (Brzóska e Moniuszko-Jakoniuk 2001; Martelli et al. 2006).

Assim, sendo tão similares, o cádmio pode substituir o zinco nas estruturas enzimáticas, levando a redução ou perda de sua atividade (Martelli et al. 2006). Enzimas reguladoras responsáveis pela síntese de DNA, RNA e envolvidas com o reparo, que necessitam do zinco como cofator, também podem ser prejudicadas por essa substituição (Giaginis et al. 2006; Waisberg et al. 2003). Então, cádmio e zinco competem entre si na absorção no organismo, na distribuição pelos tecidos e na absorção na célula, prejudicando processos metabólicos importantes para o bom funcionamento celular (Brzóška e Moniuszko-Jakoniuk 2001).

No contexto intracelular, os dois metais interagem com macromoléculas através dos elementos enxofre, oxigênio e nitrogênio, se ligando às proteínas albumina na corrente sanguínea e à metalotioneínas, as quais são proteínas ligantes de metais e amplamente difundidas em muitos organismos. Também possuem compatibilidade por estruturas biológicas com grupamento sulfidríla (SH), porém, o cádmio possui maior afinidade que o zinco (Brzóška e Moniuszko-Jakoniuk 2001).

Alguns estudos demonstraram que o efeito tóxico do cádmio pela exposição ao cigarro se deve a substituição do zinco por este metal em enzimas que controlam a produção de espermatozoides, ocasionando a falta de fertilidade (Mortada et al. 2004). Além disso, o cádmio pode substituir o zinco em enzimas que atuam no processo de calcificação óssea, levando a osteoporose e osteomalácia (Satarug et al. 2003).

2.1.1.2. Envolvimento com o estresse oxidativo

Os organismos vivos possuem um sistema de regulação que ajuda a manter baixos os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), deixando sua produção e eliminação equilibradas para ter como resultado níveis de ERO em estado estacionário. No entanto, em determinadas situações, este equilíbrio pode ser perturbado por diversos motivos, como o aumento dos níveis de compostos oxidantes ligado ao aumento de ERO; diminuição das reservas antioxidantes de baixo peso molecular; inativação de enzimas antioxidantes; diminuição da produção de enzimas antioxidantes e de antioxidantes de baixo peso molecular ou a combinação de duas ou mais situações (Lushchak 2014).

Sendo assim, qualquer desses desequilíbrios que afetam muitos processos vitais para a célula, geram o que se chama de Estresse Oxidativo. As consequências, graves ou não, irão depender dos níveis de geração de ERO, do sistema antioxidante ser eficiente, da plasticidade, recursos energéticos e dos alvos celulares que interagem (Lushchak 2014).

Os metais, de forma geral, podem ser produtores de danos oxidativos nas células de diferentes organismos (Collinson et al. 2002) e metais como mercúrio, chumbo, níquel, cádmio e cobre auxiliam na produção de radicais livres (Garcia-Fernandez et al. 2002).

Diferentemente de metais com potencial redox, certos metais não podem gerar ERO de forma direta, mecanismo comum nas reações redox biológicas como nas reações de Haber Weiss e de Fenton. Entretanto, esses metais induzem a geração de ERO de forma indireta, com a estimulação de NADPH oxidases, substituindo cátions essenciais dos seus sítios específicos de ligação em enzimas e através da inibição enzimática, uma vez que tem afinidade por grupos sulfidrilas das enzimas (Shahid et al. 2014).

A absorção de cádmio conduz a um estresse oxidativo indireto. O metal cádmio se liga aos sistemas de defesa antioxidante, como glutatona, prejudicando a proteção celular contra o estresse oxidativo (Adamis e col., 2003).

O cádmio aumenta a produção de ERO uma vez que inibe o funcionamento da Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE) na mitocôndria. A atividade da transferência de elétrons no complexo III é inibida, gerando um acúmulo de ubiquinona parcialmente reduzida no sítio Q_0 deste complexo. A ubiquinona parcialmente reduzida é instável e doa um elétron ao oxigênio molecular, formando o radical $O_2^{\cdot-}$ (Wang et al. 2004).

Este metal ainda pode causar danos à membrana celular, causando o aumento da peroxidação lipídica, já que o primeiro ponto de ação dos metais em organismos celulares é a membrana plasmática, além da facilidade em que ácidos graxos insaturados que compõe a estrutura molecular das membranas tem de serem atacados por metais (Howlett e Avery 1997).

Liu e colaboradores (2005), mostraram que 250 μ M de $CdCl_2$ foram capazes de aumentar em até 3,5 vezes a peroxidação lipídica em *S. cerevisiae* e, conseqüentemente, induzir a ativação das defesas por superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase

(GPx) em 2,8 e 5,2 vezes, respectivamente. Ainda, uma publicação recente mostrou os efeitos negativos do cádmio em ratos, que tiveram os níveis de peroxidação lipídica cerebral aumentados mesmo com uma administração de cádmio por um curto período de tempo (Haider et al. 2015).

Esses dados mostram que o cádmio, mesmo em baixas concentrações ou durante um curto período de tempo, pode acarretar deterioração da membrana plasmática, o que compromete a viabilidade da célula.

2.1.1.3. Potencial mutagênico e carcinogênico

O cádmio é um composto inorgânico que foi classificado pela IARC e pela *German MAK Commission* como um agente carcinógeno do Grupo I para humanos (Hartwig 2013). Ele está relacionado com diversos tipos de câncer, como: de próstata, renal, leucemia, pulmão, nos testículos, no pâncreas, entre outros (Il'yasova e Schwartz 2005; Satarug et al. 2003). Nesse sentido, cádmio contribui para o aparecimento de câncer não só por aumentar os níveis de ERO que se relacionam com o aparecimento de danos e mutações, mas também por inibir os sistemas de reparo do DNA e pelo potencial de indução de proto-oncogenes (c-myc e c-jun), fatores relevantes na indução de hipermutabilidade (Giaginis et al. 2006; Jin et al. 2003).

Os sistemas de reparo são os principais mecanismos de defesa contra danos ao DNA, cuja função é manter a sequência genética íntegra, minimizando mutações e erros de replicação. Existem dados na literatura que demonstram a interferência do cádmio nos sistemas de reparo como: (1) *Mismatch Repair* (MMR) – uma via biológica altamente conservada que mantém a estabilidade genômica através da correção de incompatibilidade entre bases, que pode ocorrer durante a replicação do DNA ou em decorrência de modificações químicas nas bases, como O⁶- metilguanina e 8-oxoguanina; (2) Sistemas de reparo por excisão – onde as bases incompatíveis ou danificadas em uma das duas fitas são cortadas e substituídas por bases corretas, usando a outra fita como molde. É composta por duas categorias: (a) *Base Excision Repair* (BER) - a base danificada é retirada através da quebra da ligação glicosídica entre a base e a ribose, gerando um sítio abásico e, através da DNA polimerase, ocorre o

emparelhamento com uma base não danificada e a ligação pela DNA ligase (Memisoglu e Samson 2000; Nilsen e Krokan 2001); (b) *Nucleotide Excision Repair* (NER) – não se restringe apenas a uma base afetada, mas pode atuar em outras áreas danificadas do DNA como volumes maiores que não estejam relacionados estruturalmente (Giaginis et al. 2006).

Em uma revisão de literatura atual, muitas publicações mostram os efeitos deletérios do cádmio nos sistemas de reparo ao DNA (Bishak et al. 2015). O cádmio afeta o MMR uma vez que tem o potencial de inativar enzimas que atuam neste sistema de reparo, resultando na redução das suas atividades de ligação ao DNA e suas habilidades de reconhecer os desalinhamentos entre bases (Lutzen et al. 2004; Giaginis et al. 2006; Wieland et al. 2009). Como consequência, ocorre a redução da capacidade de reparar pequenos desalinhamentos e incompatibilidades base-base (Jin et al. 2003), alterando a capacidade de controlar o ciclo celular G2 de *checkpoint* e levando ao acúmulo de células mutadas (Bertin e Averbeck 2006).

Outro sistema de reparo, BER, também pode ser afetado pelo cádmio. Baixas concentrações do metal prejudicaram o reparo dos danos oxidativos de bases de DNA em células de mamíferos (Fatur et al. 2003). Algumas proteínas com função importante no BER como a formamidopirimidina-DNA-glicosilase são diretamente afetadas por este metal (Bertin e Averbeck 2006), assim como as interações do zinco com fatores de transcrição relacionados ao reparo do DNA (Vercesi et al. 1997). Ademais, algumas etapas do BER são suprimidas, como a polimerização e ligação da fita de DNA, inativando proteínas como a DNA Pol β , PARP e Ligase I (Giaginis et al. 2006).

Quanto ao sistema de reparo NER, os efeitos deletérios do cádmio afetam uma proteína desse sistema de defesa, conhecida como Xeroderma Pigmentosum A (XPA), a qual é responsável pelo reconhecimento de alterações no DNA (Hartwig et al. 2002).

Outra forma importante de acúmulo de mutações causadas pelo efeito tóxico deste metal é através dos efeitos deletérios do cádmio sobre a apoptose (Joseph 2009).

O mecanismo de apoptose é uma forma de morte celular programada, geneticamente regulada e com um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da homeostase do tecido de diversos organismos, além de participar da eliminação de células que possuem mutações (Joseph 2009). O gene *TP53* codifica a proteína p53, um fator de transcrição envolvido no controle do ciclo celular e na supressão de tumor por

apoptose, é um dos mediadores do ciclo celular, considerado um dos mais importantes na indução à apoptose em resposta a genotoxicidade (Anetor 2012). Obviamente, a inativação da p53 é considerada um fator determinante para o desenvolvimento tumoral, podendo levar a uma instabilidade no genoma e ao aparecimento de câncer (Spike e Wahl 2011).

Uma série de estudos mostram o mecanismo mutagênico do cádmio envolvido com a apoptose. Este metal pode se ligar a grupos tiol bem como substituir o zinco na estrutura da proteína p53 (Anetor 2012) e, desta forma, pode afetar a estrutura e função desta proteína (Urani et al. 2014). No estudo de Riger e colaboradores (2011) foi observado que, mesmo em uma concentração dez vezes menor que outros metais (Cu^{2+} , Ni^{2+} e Cr^{3+}), o cádmio mostrou-se mais tóxico, reduzindo de forma considerável a sobrevivência celular e, principalmente, evidenciando maior porcentagem de células contendo p53 não funcional. Além disso, Aimola e colaboradores (2012) observaram que a alteração funcional da p53 causada pelo cádmio contribui para a aquisição da resistência apoptótica no câncer de próstata. Em uma publicação mais antiga, Achanzar e colaboradores (2000) comprovaram que a expressão do gene *TP53* foi significativamente menor nas células submetidas a 48 horas de cádmio comparadas com o controle sem o metal, sendo que cerca de 65 % das células morreram após a exposição.

O mecanismo apoptótico também envolve a ativação das caspases em todos os mecanismos multicelulares. As caspases são proteases que catalisam a clivagem de proteínas depois do resíduo de ácido aspártico, assim, uma caspase consegue clivar outras caspases, ativando-as. Com a ativação, uma caspase iniciadora cliva outra, gerando sempre uma caspase executora, a qual destrói proteínas vitais à célula, ativa proteínas tóxicas e prejudica proteínas essenciais para a proteção contra a apoptose. Todos esses fatores são causadores de morte celular (Hengartner 2000). O Citocromo C, presente no espaço intermembrana da mitocôndria, ativa a Caspase-9, capaz de iniciar o processo apoptótico (Pulido e Parrish 2003). Assim, para que a integridade celular seja mantida, é necessário que o Citocromo C não seja liberado para o citoplasma. No entanto, o cádmio pode causar danos à membrana da mitocôndria, através do seu efeito na formação de ERO, aumento da osmolaridade, aumento do

cálcio intramitocondrial, entre outros fatores, e que auxiliam na liberação desses componentes pró-apoptóticos (Oh et al. 2004).

Esses dados mostram os mecanismos pelos quais o cádmio é indutor de mutagênese.

Entretanto, muitos outros estudos apresentam o cádmio e seu efeito no aparecimento de câncer, com dados que apontam que, após a exposição crônica com cádmio, há indução de tumores malignos em múltiplos órgãos, como testículos, próstata, rins, adrenal (Waalkes et al. 1999a, 1999b, 2000). Também tem sido relacionado ao câncer de próstata em diversos estudos (van Wijngaarden et al. 2008; Julin et al. 2012; Lin et al. 2013), sendo que Cheung e colaboradores (2014), através de um levantamento de dados da *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES III), mostraram que a concentração de cádmio na urina é um importante indicador de mortalidade por câncer de próstata. Pacientes com câncer de bexiga apresentaram altas concentrações de cádmio no sangue comparados com controles sem câncer (Kellen et al. 2006). Concordando com esses estudos, Kazi e colaboradores (2008) apresentaram em seus resultados que os níveis de cádmio no sangue e na amostra de escalpo do cabelo de indivíduos homens com câncer de pulmão foram significativamente mais altos que os controles.

A metilação aberrante do DNA é considerada outro mecanismo carcinógeno do cádmio (Huang et al. 2008). A metilação é uma modificação que acontece naturalmente no DNA e esse processo envolve a adição de um grupo metil ao carbono da posição 5 do anel de citosina, formando 5-metilcitosina (Robertson e Jones 2000). A hipermetilação na região promotora de supressores tumorais, juntamente com o silenciamento desses genes, atuam como mecanismos protetores contra proliferação tumoral (Esteller et al. 2001). No entanto, tecidos tumorais possuem como característica a redução do padrão de metilação global e, desta forma, a hipometilação pode gerar uma redução na integridade genômica (Laird 1997). Huang e colaboradores (2008), mostraram que o cádmio, além de estimular a proliferação celular, aumentar ERO e causar danos ao DNA, também leva à hipometilação global do DNA.

O esquema a seguir resume os mecanismos carcinógenos do cádmio (Figura 1).

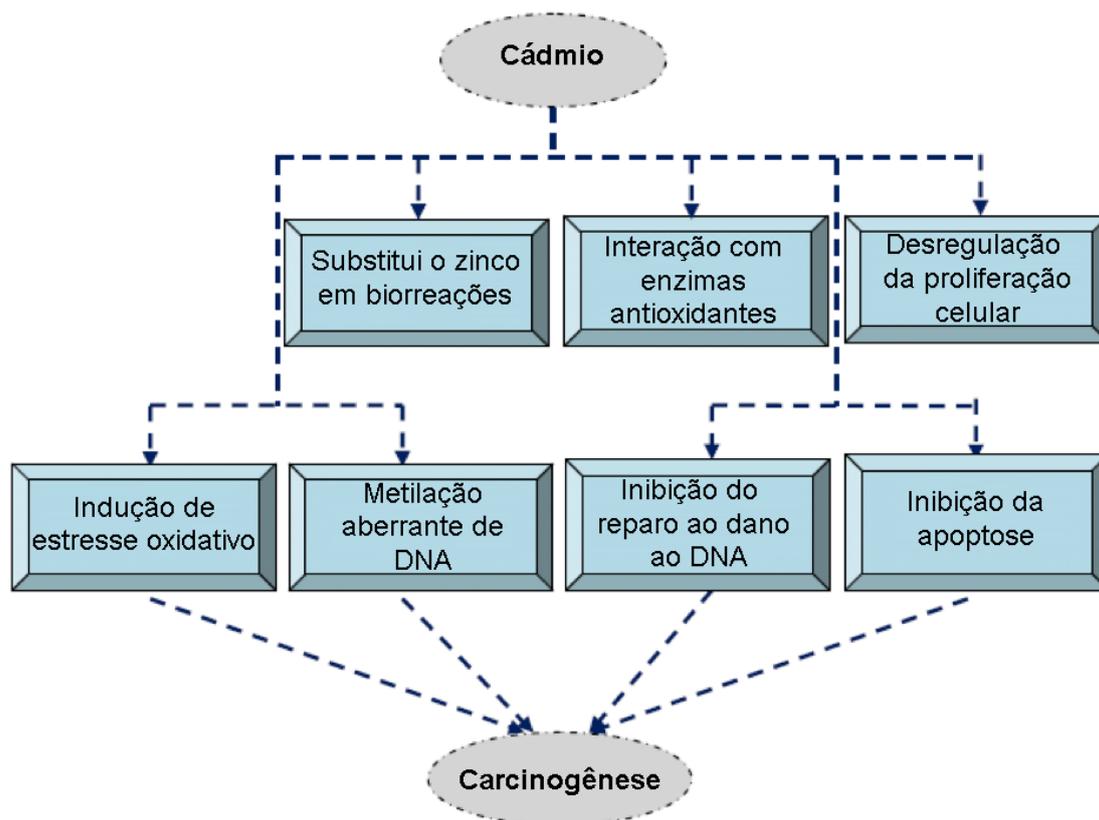


Fig. 1. Mecanismos carcinogênicos do cádmio. Estão apresentados os mecanismos pelos quais o cádmio pode causar carcinogênese. Maiores detalhes são descritos no tópico 2.1.1.3 (Adaptado de Bishak et al. 2015).

2.2. *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* COMO MODELO EXPERIMENTAL

A levedura de panificação *S. cerevisiae*, é utilizada como modelo experimental por conservar muitos processos celulares e moleculares de organismos eucariotos mais complexos, o que permite responder a diversas questões relacionadas a divisão celular, diferenciação, transdução de sinal e metabolismo (Khurana e Lindquist 2010).

As principais vantagens da sua utilização como micro-organismo modelo estão na sua fácil manipulação genética, seja através de modernas técnicas de biologia molecular ou pela genética clássica; apresenta um genoma completamente sequenciado; possui um curto tempo de geração, o que facilita a obtenção de resultados mais rápidos que em organismos mais complexos e é um microrganismo *Generally Regarded As Safe*

(G.R.A.S), ou seja, não patogênico a humanos. Além disso, células desta levedura apresentam notáveis semelhanças com a bioquímica de células animais. Esta similaridade pode ser constatada pelo fato de que proteínas deste micro-organismo têm se mostrado funcionalmente capazes de substituir proteínas ortólogas humanas e vice-versa (Khurana e Lindquist, 2010; Kachroo et al. 2015). Desse modo, os conhecimentos gerados a partir dos estudos com esse modelo serão relevantes para esclarecimento dos mecanismos moleculares e celulares em humanos.

S. cerevisiae é utilizada em diferentes áreas de pesquisa da biologia dos seres vivos, incluindo áreas de “genômica funcional” e “biologia de sistemas”, domínios estes relevantes por não focarem apenas no estudo de genes e proteínas específicas, mas na forma em que interagem formando uma rede atuante dentro da célula (Botstein e Fink, 2011).

É necessário entender as alterações que acontecem nas células em decorrência do estresse por cádmio, uma vez que as rotas bioquímicas e os mecanismos de proteção celulares que auxiliam na tolerância e resistência aos tóxicos são pouco conhecidos. Assim, *S. cerevisiae* tem mostrado ser um potente organismo para desvendar os detalhes moleculares de ação dos metais e estratégias de desintoxicação (Wysocki e Tamás 2010). Nesta levedura, bem como em outros organismos, as células usam de uma variedade de mecanismos de tolerância e homeostase que conduzem a disponibilidade de metais essenciais e limitam os efeitos prejudiciais de metais tóxicos (Wysocki e Tamás 2010).

2.2.1. Transporte do cádmio em *S. cerevisiae*: mecanismos de entrada X mecanismos de saída e desintoxicação

A captação de cádmio pela célula de *S. cerevisiae* necessita do metabolismo celular e do transporte ativo (Adamis et al. 2003). Assim sendo, a entrada do metal não essencial Cd^{2+} ocorre baseada no mimetismo molecular através de proteínas de membrana envolvidas na captação de metais essenciais como Fe^{3+} (Fet4), Mn^{2+} (Smf1 e Smf2), Zn^{2+} (Zrt1), Ca^{2+} (Mid1) (Wysocki e Tamás 2010) e Mg^{2+} (Alr1) (Kern et al. 2005), como pode ser visto na Figura 2.

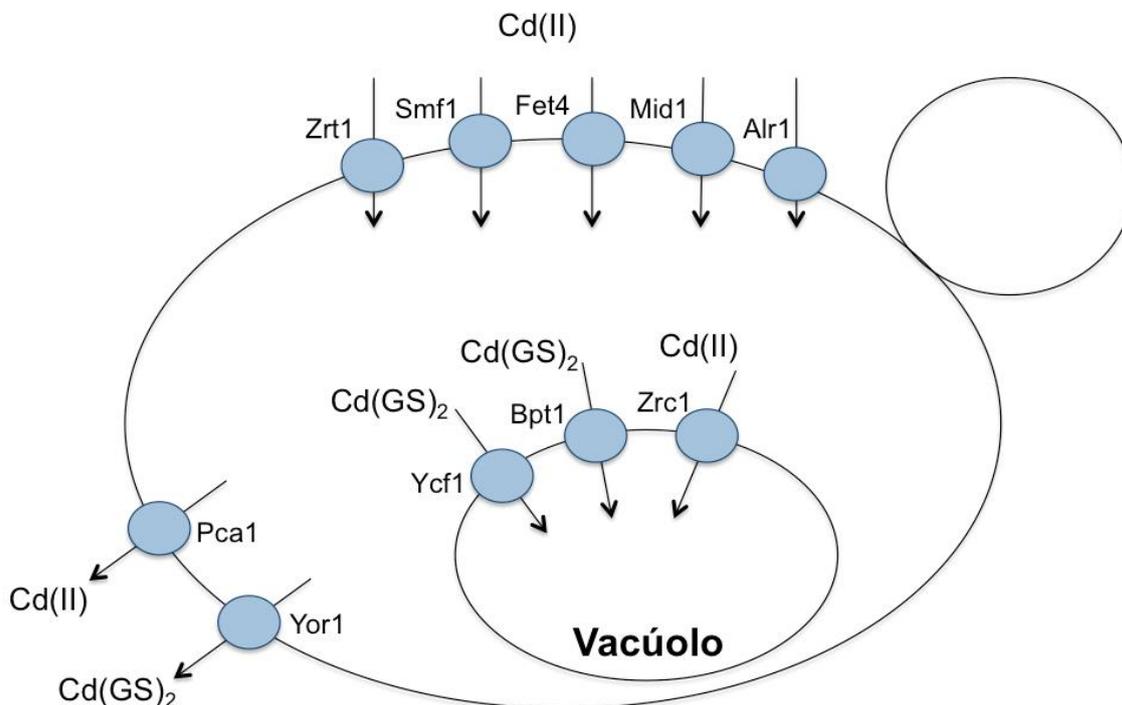


Fig. 2. Transportadores responsáveis pela entrada e saída de cádmio em *S. cerevisiae*. A entrada de cádmio na célula da levedura: proteínas de transporte localizadas na membrana plasmática que transportam Cd^{2+} de fora da célula para o citoplasma pelo seu mimetismo molecular com outros metais. Mecanismo de desintoxicação do cádmio: proteínas de membrana plasmática e vacuolar que transportam Cd^{2+} e $\text{Cd}(\text{GS})_2$ do citoplasma para fora da célula e para dentro do vacúolo, respectivamente (Adaptado de Wysocki e Tamás 2010).

A proteína Zrt1 é um transportador de alta afinidade de zinco e pertence à Família ZIP de proteínas como Zrt e Irt (Eng et al. 1998). No entanto, além de transportar zinco, Zrt1 é uma das mais importantes vias de transporte de cádmio e este dado é comprovado por diversos estudos que demonstraram que a falta de Zrt1 levou a uma menor absorção de cádmio do meio, enquanto que a captação de zinco fica inibida pelo cádmio. Além disso, células que são expostas à um meio pobre em zinco, aumentam a expressão de Zrt1, o que torna a célula mais sensível ao cádmio. Em

contrapartida, sob altas concentrações de zinco e cádmio, Zrt1 é inativada a fim de prevenir a captação tóxica do cádmio e do excesso de zinco (Gomes et al. 2002; Gitan et al. 2003).

A segunda via mais importante de transporte de cádmio é regulada pelas proteínas Smf1 e Smf2 transportadoras de manganês, as quais são pertencentes à *Natural resistance-associated macrophage protein Family* (Família Nramp). No entanto, além de transportar Cd^{2+} e Mn^{2+} , Smf1 ainda transporta Co^{2+} , Cu^{3+} , Fe^{3+} e Zn^{2+} . Quando *SMF1* e *SMF2* são superexpressos, as células de levedura mostram um aumento de sensibilidade ao cádmio (Ruotolo et al. 2008).

Fet4, uma proteína de baixa afinidade responsável pela entrada de ferro, pode mediar a entrada de cobre, zinco e cádmio. A expressão desta proteína é regulada positivamente pelos fatores de transcrição Aft1 e Zap1 em resposta a baixos níveis de Fe^{3+} e Zn^{2+} , e negativamente regulada por Rox1 em condições aeróbicas. Assim, a falta de Rox1 levou ao aumento da expressão de *FET4* e, conseqüentemente, maior sensibilidade da célula ao cádmio (Jensen e Culotta 2002).

Também se sugere que proteínas transportadoras de cálcio seriam potenciais transportadores de cádmio. Um estudo mostrou que a expressão da proteína heteróloga transportadora de cálcio Lct1, capaz de substituir a função do transportador de cálcio na levedura Mid1, foi responsável pelo grande acúmulo de cádmio na célula e o conseqüente aumento da sua sensibilidade (Clemens et al. 1998).

Além de compreender as diferentes formas de entrada de cádmio na levedura que explica o efeito tóxico na célula, também é bastante relevante entender os mecanismos de remoção dos metais tóxicos do citoplasma, que ocorre através de vias de exportação que tornam as células mais tolerantes ao estresse (Figura 2).

Uma proteína localizada na membrana plasmática, chamada de Pca1, é considerada a principal rota de exportação de cádmio do citoplasma em *S. cerevisiae*. Foi demonstrado que a expressão de Pca1 confere maior tolerância a célula uma vez que reduz os níveis intracelulares de cádmio. Ainda que a expressão desta proteína seja constitutiva, ela não é detectada em condições normais, uma vez que possui um rápido *turnover*. Por outro lado, Pca1 é estabilizada na membrana em resposta ao cádmio, aumentando seu efluxo e a tolerância da célula a este metal (Adele et al. 2007).

Outros transportadores da membrana plasmática são conhecidos por exportar cádmio do citoplasma. Yor1 pertence à Família de transportadores *ATP-binding cassette* (ABC), que estão relacionados a proteínas responsáveis pela resistência a multidrogas em humanos (Mrp1) e em levedura (Ycf1). A deleção de *YORI* acarreta sensibilidade moderada ao cádmio e parece ser responsável pela retirada do cádmio na sua forma conjugada a glutathiona ($\text{Cd}(\text{GS})_2$) (Nagy et al. 2006). Alr1, uma proteína responsável pela entrada de Mg^{2+} para o citoplasma, parece contribuir para o controle dos níveis intracelulares de cádmio, dado que a mutação em *ALRI* levou ao aumento do conteúdo de cádmio na célula, tornando-a mais sensível (Kern et al. 2005).

Mesmo sabendo que todos esses mecanismos de exportação do cádmio para fora da célula são importantes para a desintoxicação do metal, o transporte de cádmio para dentro do vacúolo é o meio mais relevante conhecido.

A proteína Ycf1 representa a principal via de transporte vacuolar de metais conjugados a GSH e xenobióticos e foi identificada em um *screen* de genes que, quando superexpressos, aumentam a tolerância ao cádmio. Ainda, células com *YCF1* deletada são altamente sensíveis a este metal (Szczyepka et al. 1994).

Mais estudos mostram outros transportadores vacuolares com potencial de transportar cádmio para o vacúolo. Parálogos de Ycf1, Bpt1 e Vmr1 possuem um papel menos especial no transporte vacuolar de cádmio, pois atuam somente na ausência de Ycf1. Além desses, Zrc1 - uma proteína da Família *cation diffusion facilitator* (CDF) – tem a função de transportar zinco para o vacúolo quando em excesso no citoplasma. No entanto, Zrc1 é também um transportador de cádmio para o vacúolo. O primeiro dado que comprovou o envolvimento de Zrc1 na defesa contra o cádmio foi em 1989, onde os autores mostraram que a superexpressão de *ZRC1* confere resistência ao cádmio (Kamizono et al. 1989).

2.2.2. Papel da Glutathiona na defesa contra o cádmio

O antioxidante glutathiona (GSH, γ -Glutamil-Cisteinil-Glicina) é formado por glutamato (Glu), cisteína (Cys) e glicina (Gly), contendo uma γ -ligação peptídica entre o glutamato e a cisteína (Anderson 1998). Esta ligação dá estabilidade ao tripeptídeo,

pois evita que ele seja facilmente degradado. A sua síntese ocorre no citoplasma e sua degradação nos espaços periplasmáticos e no vacúolo (Rebbeer et al. 1998)

A glutatona mostrou-se de grande relevância no mecanismo de defesa contra o cádmio no estudo de Vido e colaboradores (2001). Os autores analisaram o proteoma de células de *S. cerevisiae* após exposição a 1 mM de CdSO₄ e verificaram que a biossíntese de glutatona foi altamente induzida nessas condições, juntamente com outras proteínas envolvidas no sistema de defesa antioxidante. Nesse contexto, Lafaye e colaboradores (2005) investigaram o metaboloma de células desta levedura e verificaram uma alta produção de GSH após indução com 50 µM de cádmio. Pouco antes, em 2002, Fauchon e colaboradores analisaram o proteoma das células expostas ao cádmio e observaram o aumento da expressão do gene *GSH1* envolvido na síntese de glutatona. Desta forma, a glutatona é considerada o principal metabólito na proteção contra o cádmio em *S. cerevisiae*.

A formação de complexos entre GSH e metais ocorre *in vivo* e *in vitro*, sendo que esses conjugados podem ser estocados dentro do vacúolo como meio de proteção intracelular. O complexo glutatona-cádmio é chamado de bis-glutationato de cádmio – Cd(GS)₂ (Figura 3), e sua síntese ocorre no citoplasma da célula de *S. cerevisiae* (Li et al. 1997).

O processo de formação de conjugados de cádmio com glutatona envolve a participação da isoforma 2 da glutatona S-transferase, Gtt2 (Adamis et al. 2007). As glutatonas S-transferases, conhecidas como Gtt em leveduras, catalisam o ataque nucleofílico do átomo de enxofre da glutatona nos grupos eletrofílicos de substratos tóxicos, com potencial de melhorar a sua solubilidade e facilitar o seu transporte para o vacúolo como conjugado (Shin et al. 2002). Em *S. cerevisiae* existem duas variações dessa enzima, Gtt1 e Gtt2, mas apenas Gtt2 é importante para a formação de bis-glutationato de cádmio (Adamis et al. 2007; Adamis et al. 2009).

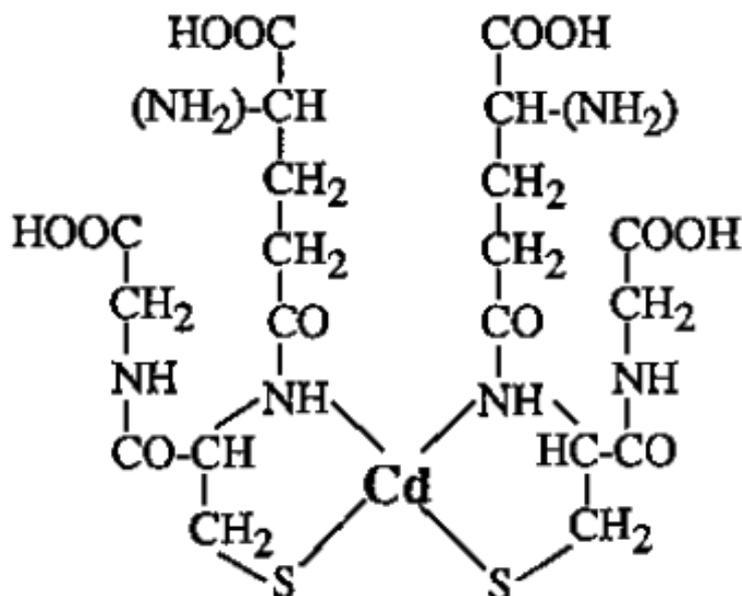


Fig. 3. Complexo formado entre cádmio e glutationa, bis-glutatonato de cádmio - $\text{Cd}(\text{GS})_2$ (Li et al. 1997).

No estudo de Fauchon e colaboradores (2002), foi verificado que a quantidade de proteína Gtt2 aumentou cerca de 27 vezes após a exposição da levedura com cádmio, uma das comprovações da relação de Gtt2 no processo de desintoxicação do metal.

Todo o conjunto de que participa da regulação e transporte de cádmio para o vacúolo é de grande importância para a defesa contra o cádmio, pois torna a célula mais tolerante, uma vez que altos níveis do complexo $\text{Cd}(\text{GS})_2$ no citoplasma ocasionam grandes prejuízos à célula (Adamis et al. 2007).

Assim, a Figura 4 exemplifica esse mecanismo de transporte do cádmio para o vacúolo regulado pela glutathione e Ycf1. A ausência de *YCF1* (*yef1Δ*) faz com que a cepa seja incapaz de transportar o complexo $\text{Cd}(\text{GS})_2$ para o vacúolo e apresente alta sensibilidade ao cádmio. Portanto, a compartimentalização desse complexo é de extrema importância para a sobrevivência celular. Além disso, GSH é um sistema de defesa antioxidante extremamente relevante e a fonte de recuperação de GSH para a proteção celular contra o cádmio acontece na dependência do vacúolo, pois é a forma que a célula possui de reciclar o GSH, imobilizado na forma de $\text{Cd}(\text{GS})_2$ vacuolar. Para tal, as proteínas que participam da formação do complexo (Gtt2), transporte para o

vacúolo (Ycf1) e degradação do GSH estocado neste compartimento (Gama-Glutamil Transferase, γ GT e a Peptidase, Lap4) devem ser correguladas de forma a retirar $\text{Cd}(\text{GS})_2$ do citoplasma sem exaurir todo o GSH intracelular (Adamis et al. 2007; Adamis et al. 2009). Uma vez no vacúolo, o complexo se dissocia devido ao baixo pH deste compartimento e, com a ação das γ GT e Lap4 sobre o GSH vacuolar, os aminoácidos Glu, Cys e Gly se tornam novamente disponíveis no citoplasma para a ressíntese de GSH pelas enzimas Gsh1 e Gsh2 (Adamis et al. 2007; Adamis et al. 2008). Ainda, a enzima glutathione redutase (Glr) tem um papel fundamental no mecanismo antioxidante, uma vez que reduz a forma oxidada da glutathione (GSSG) (Adamis et al. 2007).

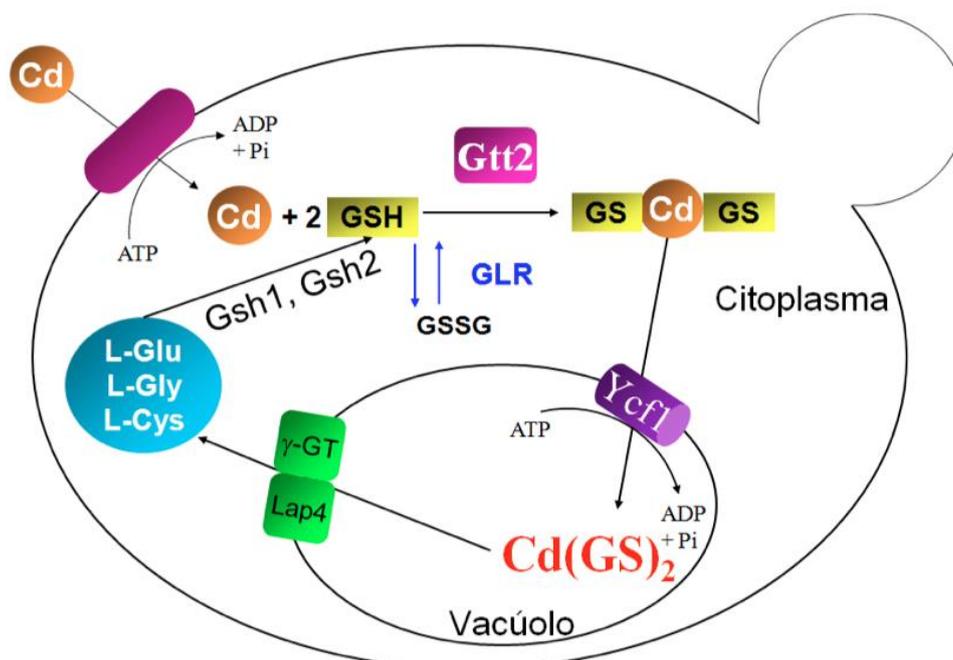


Fig. 4. Mecanismo de desintoxicação do cádmio mediado pela glutathione e Ycf1.

Nesta figura: Cd, cádmio; L-Glu, L-Gly e L-Cys, L-aminoácidos glutamato, glicina e cisteína, respectivamente; GSH e GSSG, forma da glutathione reduzida e oxidada, respectivamente; Gtt2, glutathione transferase 2; Ycf1, transportador vacuolar; Gsh1 e Gsh2, enzimas responsáveis pela síntese de GSH; GLR, glutathione redutase; GS-Cd-GS e $\text{Cd}(\text{GS})_2$, complexo formado entre cádmio e glutathione; γ GT, gama-glutamil transferase; Lap4, aminopeptidase vacuolar (Adaptado de Adamis et al. 2009).

2.2.3. Papel da Família Yap na resposta ao estresse em *S. cerevisiae*

Quando a levedura *S. cerevisiae*, assim como outros organismos, é exposta a uma grande quantidade de estímulos provenientes do ambiente, responde com um amplo e complexo programa de expressão de genes de resposta a estímulos específicos. Assim, para atingir a homeostase celular, esta levedura utiliza de meios altamente coordenados para a regulação transcricional, necessitando de diversos fatores de transcrição que atuem individualmente ou em combinação com outros fatores de transcrição a fim de realizar funções específicas (Rodrigues-Pousada et al. 2010).

As mudanças celulares iniciam no momento em que ocorre a primeira percepção e transdução de sinais de estresse, fazendo com que a levedura mude todo o processo fisiológico na célula e aumente a expressão de genes que codificam proteínas de resposta ao estresse. Nesse sentido, muitas proteínas possuem um papel central nos mecanismos de respostas celulares, como fatores de transcrição que têm a função de modular a expressão genética, chaperonas responsáveis por manter o enovelamento de proteínas, além de proteínas implicadas com os processos de reparo, degradação e desintoxicação celulares (Rodrigues-Pousada et al. 2010).

Organismos eucariotos, desde a levedura até humanos, possuem fatores de transcrição conhecidos como AP-1, os quais são responsáveis pela ativação de uma ampla variedade de genes que respondem a diversos estímulos (Angel e Karin 1991; Karin 1995; Ransone e Verma 1990). As proteínas AP-1 se caracterizam por possuírem um domínio de ligação ao DNA conservado (Landschulz et al. 1988), chamado de b-ZIP. Esse domínio baseia-se em um zíper de leucina responsável pela dimerização (O'Shea et al. 1991) e por uma região básica adjacente com função de interagir com sequências de DNA, os sítios AP-1 (Ellenberger et al. 1992).

O principal e mais bem caracterizado fator AP-1 em *S. cerevisiae* é Gcn4, que coordena a expressão de pelo menos 40 genes de resposta a depleção de aminoácidos e alterações ambientais (Ellenberger et al. 1992; Hinnebusch 1988; Hope e Struhl 1985). Gcn4 é consideravelmente similar às oncoproteínas Jun e Fos em termos funcionais, têm a mesma especificidade de ligação ao DNA (Bohmann et al. 1987; Distel et al.

1987; Struhl 1987) e podem funcionalmente permutar para ativar a transcrição de um sítio AP em células de leveduras e de mamíferos (Oliviero et al. 1992; Oliviero e Struhl 1991; Struhl 1988).

A Família *yeast activator protein* (Yap) de proteínas b-ZIP em *S. cerevisiae* é composta por oito membros (Yap1, Yap2, Yap3, Yap4, Yap5, Yap6, Yap7 e Yap8) que possuem uma significativa similaridade nas suas sequências com a proteína Gcn4 (Figura 5). Por outro lado, diferem nos aminoácidos que fazem contato com o DNA (Rodrigues-Pousada et al. 2010).

A maioria dos fatores de transcrição da Família Yap, contém nos seus N-terminal e C-terminal uma região rica em cisteínas, as quais são determinantes para o mecanismo de defesa regido por estas proteínas. Cada fator de transcrição possui suas cisteínas específicas que participam do processo de sinalização celular, estas são oxidadas pelo agente indutor e formam pontes dissulfeto intramoleculares, de forma direta ou indireta, mudando o estado conformacional da proteína, sua localização e atividade celular. Além disso, quase todas as proteínas dessa família possuem em sua região C-terminal um sinal de exportação nuclear (NES, *nuclear export signal*), o qual é reconhecido pela proteína nuclear Crm1. Através do reconhecimento do NES, esta proteína tem como função exportar esses fatores de transcrição do núcleo para o citoplasma (Rodrigues-Pousada et al. 2010).

Nesse sentido, quando ocorre a indução por um agente estressor como H₂O₂, menadiona, cádmio, arsênio, entre outros, ocorre a formação de pontes dissulfeto intramoleculares devido a oxidação das cisteínas de certas proteínas da Família Yap, alterando a sua conformação. Esta nova forma, faz com que o NES seja mascarado e, então, não reconhecido por Crm1, levando ao acúmulo dos fatores de transcrição no núcleo, os quais ativam os seus respectivos genes-alvo que atuam na defesa contra o estresse (Rodrigues-Pousada et al. 2010).

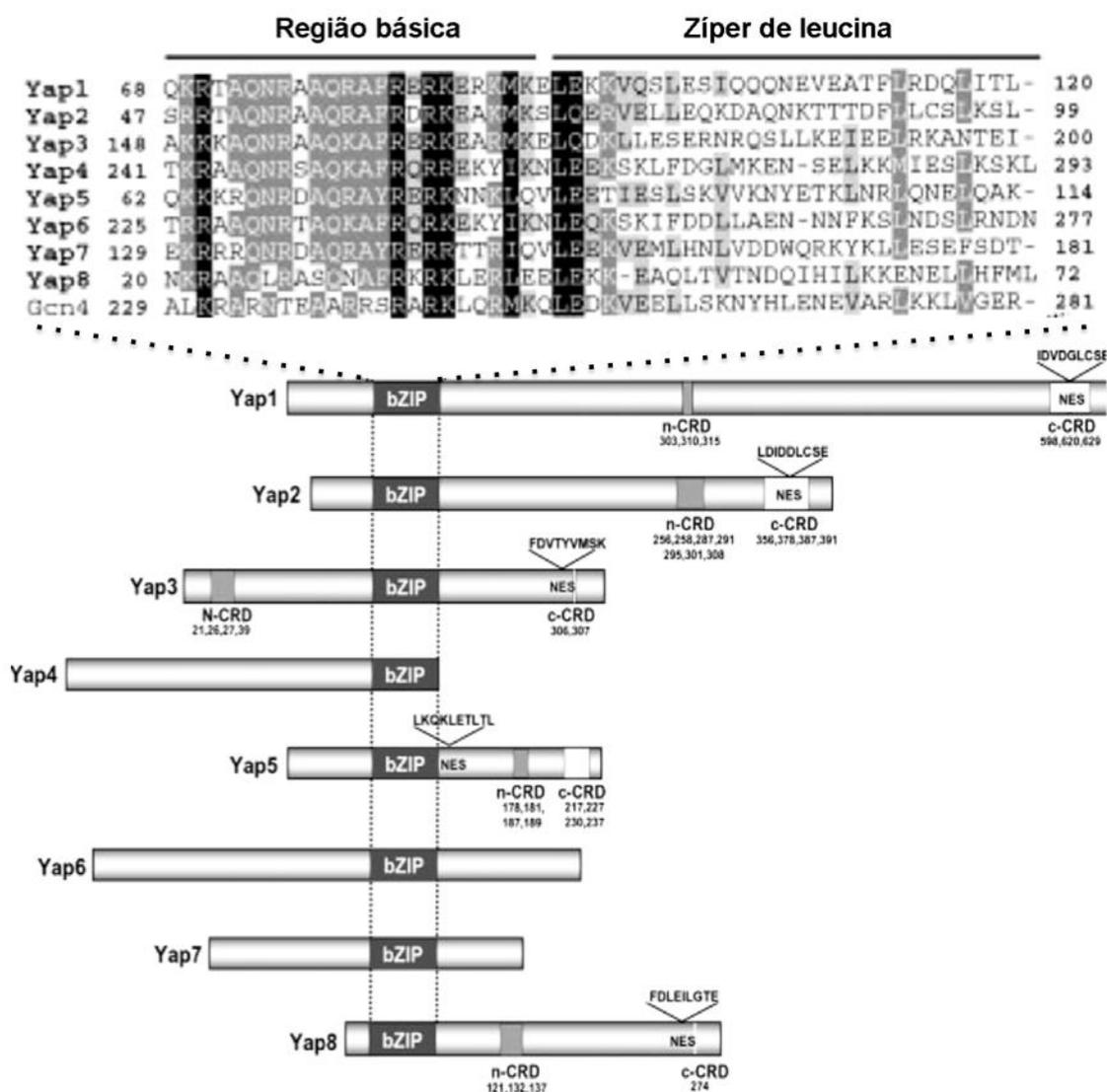


Fig. 5. Características estruturais da Família Yap. A parte superior da figura mostra a sequência de oito domínios b-ZIP que são comparados com a região equivalente a Gcn4, o clássico fator AP-1 de levedura. O lado esquerdo é correspondente a região básica responsável pela ligação ao DNA e o lado direito é correspondente ao zíper de leucina, responsável pela dimerização. A parte inferior da figura apresenta a posição dos domínios estruturais importantes, domínios ricos em cisteína (n-CRD e c-CRD) e o sinal de exportação nuclear (NES). Os números dos resíduos de cisteína são indicados abaixo de cada domínio (Adaptado de Rodrigues-Pousada et al. 2010).

Dentro dessa família de fatores de transcrição, duas proteínas, Yap1 e Yap2, possuem alta similaridade com relação a estrutura e compartilham de alta homologia. O sequenciamento dos genes *YAP1* e *YAP2* revelou a presença de um domínio b-ZIP no N-terminal homólogo ao fator Gcn4 de levedura e ao seu homólogo de mamíferos c-Jun. Também compartilharam de uma região de similaridade no C-terminal e outra na região interna próxima ao domínio b-ZIP (Ellenberger et al. 1992).

2.2.3.1. Yap1, o maior regulador da resposta ao estresse oxidativo

O fator de transcrição Yap1 foi o primeiro membro da família a ser caracterizado e foi identificado pela sua capacidade de se ligar e ativar o *AP-1 recognition element* SV-40 (ARE: TGACTAA) (Moye-Rowley et al. 1989). Baseado na capacidade de se ligar ao ARE, Yap1 foi purificado como uma proteína de 90 kDa e o gene foi clonado pelo *screening* de uma biblioteca λ gt11 com um anticorpo monoclonal contra Yap1. A partir destes achados, Yap1 foi encontrado em transformantes multicopy resistentes a quelantes de ferro (1,10-fenantrolina e 1-nitroso-2-naphthol), além de outras drogas, como 4-nitroquinolina-*N*-óxido, *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina, triaziquone, sulfometuron metil e cicloheximida (Toda et al. 1991; Billard et al. 1997; Bussereau et al. 2006).

Poucos anos depois da descoberta desta proteína, Yap1 foi considerado o mais importante regulador da resposta ao estresse oxidativo em *S. cerevisiae*.

Como se sabe, para manter a homeostase celular com baixos níveis de ERO e uma eficiente atividade antioxidante, a célula necessita de mecanismos de regulação finos e aprimorados. Desta forma, o perfeito controle desses mecanismos torna a célula apta a enfrentar a produção de ERO endógena, resultante da respiração aeróbica ou proveniente do ambiente. *S. cerevisiae* possui uma ampla rede de sensores que detectam mesmo baixos níveis de H₂O₂ e ativam os antioxidantes que previnem ou atuam no dano causado pelo estresse oxidativo (Rodrigues-Pousada et al. 2010).

A caracterização de Yap1 foi mostrada através da observação de que a mutante *yap1* Δ é hipersensível a oxidantes como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e terc-butil hidroperóxido (tBOOH), bem como substâncias geradoras de radical superóxido (O₂⁻).

Outros estudos também mostraram que esta mutante apresentou alta sensibilidade a metilglioxal e ao cádmio (Rodrigues-Pousada et al. 2004; Wu e Moye-Rowley 1994).

Kuge e colaboradores (1997) foram pioneiros em verificar o papel fundamental de Yap1 na defesa contra o estresse oxidativo. Os autores identificaram *TRX2* como um alvo de Yap1, que foi induzido quando a célula foi exposta a H_2O_2 , tBOOH, diamida e dietilmaleato (DEM). A indução deste gene foi dependente de Yap1 e foi mediada por dois *Yap Response Element* (YRE) na sua região promotora. Os YRE são sítios de ligação (TTAC/GTAA) localizados nos genes-alvo das proteínas da Família Yap e podem também ser chamados de *Yap sites*. Um pouco antes, Wu e Moye-Rowley (1994) apresentaram *GSH1* como alvo de Yap1 em uma via de desintoxicação de cádmio.

Além desses genes, muitos outros têm sido identificados e relacionados com Yap1 em muitas vias de defesa encontradas na célula. Vários estudos apresentados ao longo dos últimos anos puderam esclarecer o mecanismo de defesa contra diferentes tipos de estressores orquestrado por Yap1 em *S. cerevisiae*.

Um dos principais mecanismos que regulam a resposta ao estresse por Yap1 está baseado na localização nuclear desta proteína. Em condições fisiológicas Yap1 permeia entre o citoplasma e o núcleo, no entanto, quando a célula é submetida ao estresse, Yap1 se direciona para o núcleo para ativar genes-alvo responsáveis pela defesa (Kuge et al. 1997).

Na Figura 6 é mostrado um esquema do mecanismo de defesa contra H_2O_2 mediado por Yap1, descrito a seguir.

A resposta de Yap1 ao estresse por H_2O_2 está bem estabelecida na literatura. Quando a célula é exposta ao H_2O_2 , Yap1 é direcionada ao núcleo e sua permanência nesse compartimento depende principalmente do seu domínio rico em cisteína localizado no C-terminal (c-CRD). Existem três resíduos de cisteína conservados em Yap1 – Cys598, Cys620 e Cys629 – relevantes na resposta ao H_2O_2 e na sinalização do estado redox da célula (Kuge et al. 1997). No núcleo, Crm1, uma proteína de exportação nuclear, tem o potencial de reconhecer e se ligar ao sinal de exportação nuclear (NES) localizado na região C-terminal de Yap1, transportando Yap1 novamente para o citoplasma. Entretanto, a exposição ao H_2O_2 muda o estado redox de dois resíduos de cisteína em Yap1 - Cys598 e Cys303 – formando uma ponte dissulfeto intramolecular

que mascara o NES e inibe a exportação de Yap1 do núcleo por Crm1. Este mecanismo mantém Yap1 no núcleo o tempo necessário para ativar as defesas contra o H_2O_2 , enquanto o estresse estiver ativo na célula (Kuge et al. 2001).

A presença de H_2O_2 é inicialmente detectada quando este metabólito entra na célula e é importante ressaltar que Yap1 não é oxidada diretamente pelo H_2O_2 . Ou seja, a peroxidase receptora de oxidantes Gpx3, atua como um sensor para o H_2O_2 e sua atividade peroxidase depende de dois resíduos de cisteína (Cys36 e Cys82) que são parte do seu sítio catalítico e estão envolvidos com a formação de pontes dissulfeto. Nesse contexto, o peróxido oxida a sulfidril da Cys36 da Gpx3 transformando esta sulfidril em ácido sulfênico. Esta reação é seguida pela formação transiente de uma ponte dissulfeto intermolecular entre a Cys36 da Gpx3 com a Cys598 da Yap1. A seguir, forma-se uma ponte dissulfeto intramolecular entre Cys598 e Cys303 da Yap1, liberando Gpx3. Assim, Yap1 é transportada do citoplasma para o núcleo através da proteína Pse1 e, com essa nova conformação, permanece no núcleo (Temple et al. 2005).

Quando o estresse cessa, Yap1 que estava oxidado, é então reciclado de uma forma dependente de tiorredoxinas (Trx1 e Trx2) que reduzem as pontes dissulfeto de Yap1, tornando-o inativo novamente. Interessante observar que Yap1 controla a expressão de *TRX2*, mas Trx2 também pode regular *YAP1* (Temple et al. 2005).

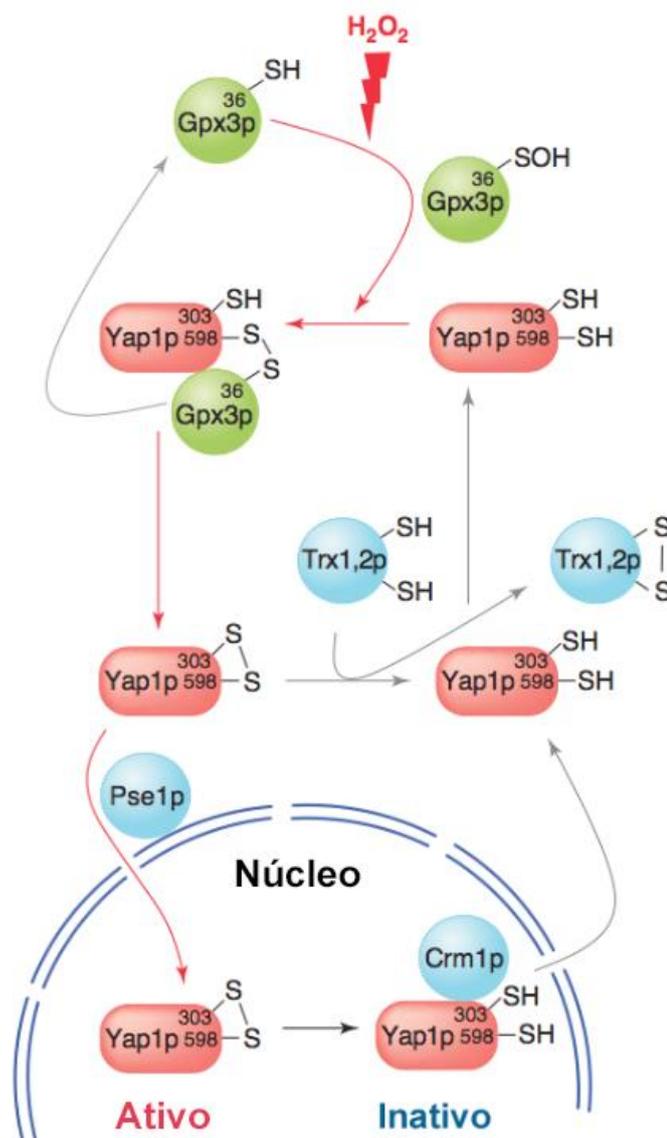


Fig. 6. Mecanismo de resposta ao H₂O₂ regulado por Yap1 em *S. cerevisiae*. A figura mostra o envolvimento de Gpx3 e Yap1 na sinalização e transdução do dano induzido por H₂O₂ para ativar a transcrição de defesa antioxidante. Os resíduos de cisteína em Yap1 e Gpx3 são indicadas pelos números dos resíduos. Trx1 e Trx2 são tiorredoxinas; Gpx3 é uma peroxirredoxina; Pse1 e Crm1 são proteínas envolvidas na importação e exportação de Yap1 para/do núcleo, respectivamente. Setas vermelhas sinalizam o mecanismo de localização nuclear de Yap1 induzida por H₂O₂ e a ativação da transcrição de genes de defesa antioxidante, enquanto as setas cinzas representam os mecanismos para a restauração do estado inativo de Yap1. (Adaptado de Temple et al. 2005).

Por outro lado, a ativação de Yap1 e sua localização nuclear podem ocorrer de forma independente de Gpx3 quando Yap1 é ativado em resposta a outros agentes reativos à tióis, como é o caso do estresse causado por diamida, quinona, menadiona e cádmio. Além disso, essa resposta a agentes reativos à tióis também difere da resposta ao peróxido por não envolver o n-CRD. Nesse caso, as cisteínas do c-CRD de Yap1 - Cys598, Cys620 e Cys629 – são modificadas devido à interação direta com o agente de estresse (Azevedo et al. 2003). A Figura 7 representa os diferentes mecanismos de regulação realizados por Yap1 na resposta ao estresse por H₂O₂ e agentes reativos à tióis.

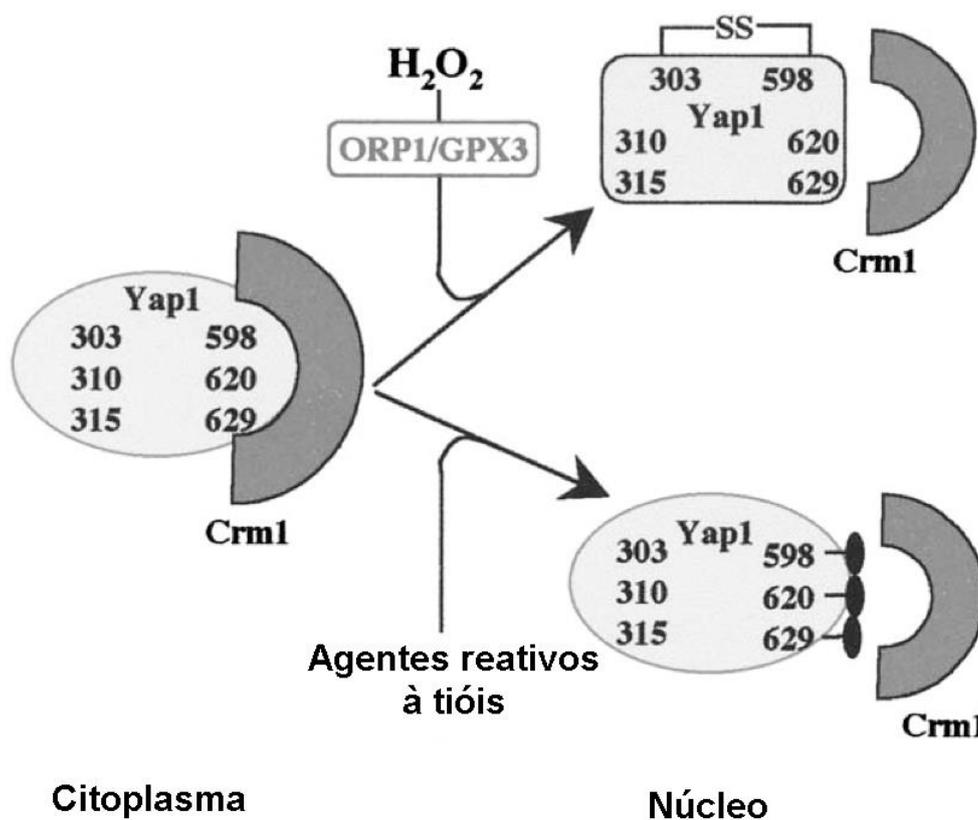


Fig. 7. Dois mecanismos de regulação realizados por Yap1 em *S. cerevisiae*. Modelo que representa dois centros redox dentro de Yap1: resposta a H_2O_2 e a agentes reativos à tióis. Os números são os resíduos de cisteínas. A parte superior da figura representa a formação de pontes dissulfeto induzida por H_2O_2 de forma dependente da peroxirredoxina Gpx3/Orp1; a parte inferior da figura representa a oxidação direta dos resíduos de cisteína por agentes reativos à tióis. O lado esquerdo mostra Crm1 reconhecendo o NES e Yap1 localizada no citoplasma; o lado direito mostra o NES mascarado pela formação de pontes dissulfeto, não reconhecido por Crm1 e Yap1 localizada no núcleo (Adaptado de Azevedo et al. 2003).

A formação de pontes dissulfeto entre diferentes resíduos de cisteína do C-terminal de Yap1 leva a distintas respostas celulares a estresses específicos. A natureza das pontes dissulfeto formadas no c-CRD de Yap1 e sua localização celular afetam a expressão de genes-alvo e a tolerância ao estresse (Temple et al. 2005).

Ainda, Ouyang e colaboradores (2011) demonstraram que os mecanismos distintos de ativação de Yap1 por H_2O_2 e agentes reativos à tióis faz com que diferentes conjuntos de genes sejam ativados.

Os efeitos de Yap1 na defesa celular também estão relacionados com a ativação de diferentes genes que atuam em estresses específicos. Nesse contexto, muitos estudos mostram que Yap1 ativa a expressão de genes em resposta ao cobalto, arsênio, ferro, acroleína, N-etilmaleimida, menadiona, entre outros.

Em resposta ao cádmio, Yap1 ativa a transcrição de *GSH1*, *GTT2* e *YCF1*, que participam no processo de desintoxicação deste metal (Figura 4).

2.2.3.2. Yap2

O segundo fator de transcrição desta família é correspondente à Yap2, uma proteína de 45 kDa que também se liga a ARE. Inicialmente foi chamado de Cad1, uma vez que este gene proporcionava resistência contra o cádmio quando superexpresso (Hirata et al. 1994).

Yap2 é o membro da Família Yap que possui maior homologia com Yap1 e, assim como acontece em Yap1, Yap2 apresenta um domínio b-ZIP no N-terminal que possui homologia com Gcn4 e também possui semelhanças na região C-terminal e interna adjacente ao domínio b-ZIP (Rodrigues-Pousada et al. 2010).

Embora exista grande similaridade entre Yap1 e Yap2, principalmente no C-terminal, essas proteínas são fisiologicamente distintas. Como já mencionado anteriormente, o c-CRD de Yap1 responde a sinais de estresse gerados por H_2O_2 e agentes reativos à tióis, como cádmio por exemplo, enquanto o c-CRD de Yap2 responde ao cádmio, mas não ao H_2O_2 . Azevedo e colaboradores (2007) comprovaram, assim, que as diferentes formas de ativação de Yap1 e Yap2 por cádmio e H_2O_2 baseiam-se no c-CRD de cada proteína. Os autores substituíram o c-CRD de Yap1 pelo correspondente de Yap2 (Figura 8) e verificaram que a proteína passou a responder apenas ao cádmio. O que confirma que a especificidade do c-CRD de Yap1 na resposta ao H_2O_2 não é conservada em seu homólogo Yap2.

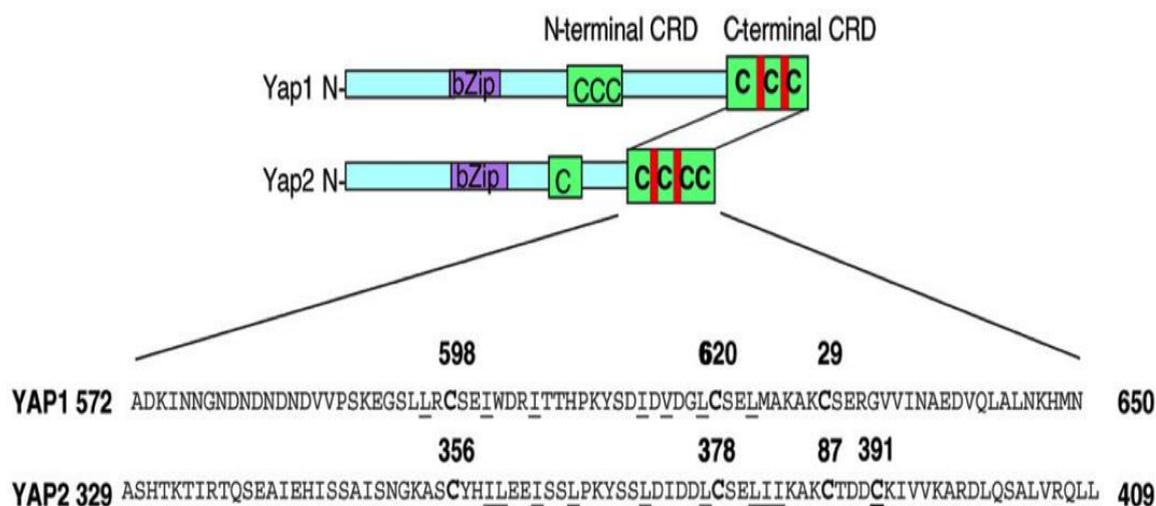


Fig. 8. Visão esquemática da homologia entre o c-CRD de Yap1 e Yap2 e a representação da substituição da região inteira de Yap1 pela de Yap2. Os resíduos de cisteína importantes para o NES estão sublinhados (Azevedo et al. 2007).

Por outro lado, o mecanismo de ativação pelo cádmio é muito parecido em Yap1 e Yap2. Da mesma forma como ocorre em Yap1, os resíduos de cisteína de Yap2 são decisivos na sinalização para o cádmio. No entanto, outras cisteínas - Cys356, Cys387 e Cys391 – foram determinantes para a localização de Yap2 no núcleo e seu papel na ativação dos genes necessários para a defesa contra o cádmio. Em contrapartida, a Cys598 que é importante para a formação da ponte dissulfeto intermolecular que ocorre entre Yap1 e Gpx3, não é relevante para a localização nuclear de Yap2, mostrando que a oxidação das cisteínas de Yap2 ocorre de forma direta, sendo independente de uma peroxirredoxina (Azevedo et al. 2007).

Além disso, de uma forma semelhante à que ocorre em Yap1, a oxidação das cisteínas e a consequente formação de pontes dissulfeto torna o NES imperceptível a Crm1, inibe a interação desta proteína de exportação nuclear com Yap2, promovendo o acúmulo do fator de transcrição no núcleo (Azevedo et al. 2007).

Apesar da exposição ao cádmio levar ao acúmulo de Yap2 no núcleo (Azevedo et al. 2007), estimular a sua ativação transcricional e da superexpressão de *YAP2* aumentar a tolerância ao cádmio, a cepa mutante *yap2Δ* não apresenta

hipersensibilidade ao cádmio ou a outra forma de estresse (Wu et al. 1993; Bossier et al. 1993; Hirata et al. 1994; Lesuisse e Labbe 1995; Azevedo et al. 2007). Nesse contexto, muitas dúvidas ainda permanecem sobre o papel real de Yap2 na defesa contra o cádmio em *S. cerevisiae*. Talvez o envolvimento de alguns genes com Yap2 possam vir a esclarecer e responder algumas das questões permanentes sobre a função desse fator de transcrição na desintoxicação do cádmio.

Análises usando a técnica de Microarranjo mostraram que Yap2 controla um conjunto de genes com função de estabilização e enovelamento de proteínas em um ambiente oxidativo (Cohen et al. 2002).

Bang e colaboradores (2013) fizeram análise proteômica a fim de buscar novos alvos de Yap2. Os autores utilizaram uma cepa com a superexpressão de *YAP2* em condições fisiológicas e encontraram os genes-alvo *GPM1*, *YNL134C* e *YDL124W*. *Gpm1* é uma fosfoglicerato mutase, uma enzima tetramérica responsável por catalisar a conversão da 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato durante a glicólise e a reação reversa na gliconeogênese, assim, *Gpm1* é necessária para o crescimento em glicose, glicerol ou etanol como origem de carbono. As funções de *Ynl134c* e *Ydl124w* ainda não são bem conhecidas, a primeira proteína foi induzida em resposta ao agente causador de dano ao DNA, Metil Sulfonil Metano (MSM), e sua mutação confere resistência a rapamicina; a segunda é pertencente à família aldo-ceto redutase.

Em contrapartida, um gene mostrou ter relação com Yap2 e com cádmio na levedura. Em uma análise proteômica de uma cepa mutante no gene *YAP1* (*yap1Δ*) que superexpressa *YAP2* após o tratamento com cádmio mostrou uma proteína até então desconhecida que, após sequenciada, revelou ser *Frm2*. Esse resultado ainda foi validado através da técnica de Northern blot, que demonstrou o gene *FRM2* induzido por cádmio de uma maneira dependente de Yap2 e não de Yap1 (Azevedo et al. 2007).

Fatty acid Repression Mutant (*Frm2*) é uma proteína envolvida na via de sinalização lipídica (McHale et al. 1996) e foi primeiramente identificada em um rastreamento de mutantes com defeito na repressão de *OLE1* por ácidos graxos insaturados. Sua função no metabolismo lipídico foi proposta com base na sensibilidade apresentada pela mutante *frm2Δ* ao ácido araquidônico (Ball et al. 2000). Sabendo que cádmio induz peroxidação lipídica e que Yap2 regula a resposta ao cádmio, pode ser que Yap2 esteja envolvido juntamente com *Frm2* na resposta a peroxidação lipídica

causada por este metal pesado. No entanto, ainda faltam dados suficientes que comprovem essa hipótese (Azevedo et al. 2007).

A literatura também apontou a ligação da proteína Rck1 com Yap2. *Radiation sensitivity Complementing Kinase* (Rck1) é uma proteína cinase envolvida na resposta ao estresse oxidativo, que participa de uma via de sinalização ativada por estresse, chamada via Hog. Bilsland e colaboradores (2004) mostraram em seu estudo que Rck1 interage com Yap2 em condições fisiológicas, resultados comprovados através de ensaios de duplo-híbrido e co-imunoprecipitação. Assim, Rck1 como uma proteína que possui forte relação com estresse oxidativo e com Yap2, ainda precisa de mais estudos que demonstrem a sua associação com mecanismos de resposta ao cádmio.

2.2.3.3. Outros fatores de transcrição da Família Yap

Além desses dois fatores de transcrição, outros desta mesma família são deveras importantes para a defesa contra diversos tipos de estresse em *S. cerevisiae*.

Yap4 e Yap6 são as proteínas da Família Yap responsáveis, principalmente, pela resposta a estresse osmótico e conferem tolerância ao sal (Mendizabal et al. 1998). Além disso, a superexpressão de *YAP4/YAP6* mostrou um aumento da resistência a drogas antimaláricas (cloroquina, quinina e mefloquina) e a agentes quimioterapêuticos (cisplatina) (Delling et al. 1998; Furuchi et al. 2001). Yap4 ainda é induzido por diversos estresses, como estresse oxidativo, estresse osmótico, choque-térmico, por metais, entre outros (Nevitt et al. 2004). A regulação de Yap4 e Yap6 em condições de alta osmolaridade é feita por Msn2 em uma via dependente de Hog1, enquanto a regulação em resposta ao estresse oxidativo é dependente de Msn2 e Yap1. O estresse hiperosmótico muda a transcrição de genes de resposta ao estresse e aumenta o metabolismo do glicerol. Este mecanismo é mediado pelas proteínas MAP cinases da via *High Osmolarity Glycerol* (HOG) e vários fatores de transcrição parecem ser controlados pela MAP cinase Hog1, dentre eles está Msn2, um fator de transcrição de resposta ao estresse requerido para estimular a expressão de genes que atuam na defesa contra o choque osmótico, estresse oxidativo, deficiência de nutrientes e outros

estímulos ambientais (Rep et al. 2000; Posas et al. 2000; Marchler et al. 1993; Wieser et al. 1991; Kobayashi e McEntee 1993).

A proteína Yap5 está intimamente ligada à regulação do ferro na levedura, controlando o armazenamento deste metal através da expressão de uma proteína de transporte vacuolar de ferro – Ccc1. Ainda, os resíduos de cisteína mutados em Yap5 inibem sua atividade transcricional e afetam a sua função, aumentando a toxicidade causada pelo excesso de ferro (Li et al. 2008).

Outro fator de transcrição com um papel fundamental em *S. cerevisiae* é Yap8, uma proteína que tem como função central responder ao estresse provocado pelo arsênio. Yap8 medeia a ativação transcricional de *ARC2* e *ACR3*, que codificam a proteína arsenato redutase e uma proteína da membrana plasmática responsável pelo transporte de arsenito para fora da célula, assim, essas proteínas são consideradas a primeira linha de defesa contra o arsênio na levedura (Menezes et al. 2004; Wysocki et al. 2004). Yap1 também participa do processo de desintoxicação do arsênio, mas Yap8 ainda é o principal regulador dessa resposta. Nesse sentido, a mutante *yap8Δ* propicia o acúmulo de altos níveis de As(III), ativando genes-alvo de Yap1 de grande importância na resposta antioxidante – *TRX2*, *GSH1* e *SOD1* (Menezes et al. 2004).

Outros fatores de transcrição da Família Yap, Yap3 e Yap7, ainda têm a função muito pouco conhecida. Apenas o que tem sido relatado na literatura é que o ortólogo de Yap3 em *Cândida albicans*, o gene *FCR3*, quando superexpresso, confere resistência ao Fluconazol (Yang et al. 2001).

O resumo das interações entre os Fatores de Transcrição da Família Yap segundo suas funções, se encontra na Figura 9.

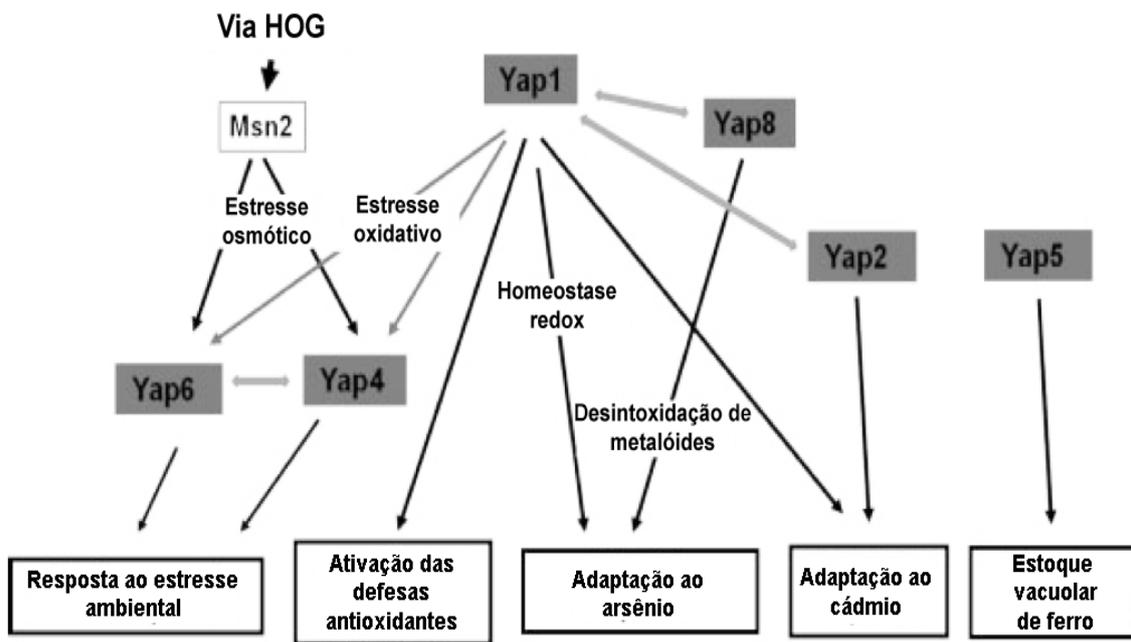


Fig. 9. Potencial efeito combinado entre membros da Família Yap. As setas cinzas mostram as interações entre os fatores de transcrição e as setas pretas indicam o efeito regulatório (Adaptado de Rodrigues-Pousada et al. 2010).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo desvendar a via de sinalização celular orquestrada pelo fator de transcrição Yap2 em resposta ao cádmio em *S. cerevisiae*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se o fator de transcrição Yap2 é requerido para a defesa contra o cádmio em *S. cerevisiae*;
- Avaliar o papel da proteína cinase Rck1 na via de sinalização induzida pelo cádmio e sua relação com Yap1 e Yap2;
- Estabelecer o tipo de função regulatória exercida por Yap1, Yap2 e possíveis genes envolvidos na via de sinalização em resposta ao cádmio.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Todos os materiais e soluções utilizados em experimentos com DNA e RNA foram preparados em condições livres de DNase e RNase e o material plástico foi tratado com SDS 0,1 % e água (H₂O) bidestilada estéril. As vidrarias, soluções e meios de cultura foram submetidos ao processo de esterilização a 120 °C por 15 minutos. No entanto, algumas soluções sensíveis a altas temperaturas foram esterilizadas por filtração usando membranas tipo Millipore com poro de 0,22 µm. As soluções foram preparadas usualmente com H₂O bidestilada. As exceções são relatadas no decorrer da Tese.

4.2. MICRORGANISMOS UTILIZADOS

As linhagens de levedura *S. cerevisiae* e de bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) estão descritas em Tabela 1 e Tabela 2, respectivamente, bem como os seus genótipos e suas referências / origens.

4.3. MEIOS DE CULTURA

As cepas de *S. cerevisiae* foram estocadas a 4 °C em meio YPD 2 % sólido (1 % extrato de lêvedo [DIFCO], 2 % glicose e 2 % peptona [DIFCO]). As cepas transformadas com plasmídeos com marcadores de seleção foram cultivadas em meio sintético completo (meio SC): 0,67 % de base nitrogenada sem aminoácido [DIFCO], 0,67 % de casamino ácido [DIFCO], 2 % de glicose e suplementado com 0,01 % de cada um dos requerimentos nutricionais apropriados para a cepa ou meio sintético mínimo (meio SD): é o meio SC, ausente em casamino ácido.

Para cultivo de *E. coli* foram utilizados os seguintes meios: (a) *Luria-Bertani* (meio LB): 1 % de triptona [DIFCO], 0,5 % de extrato de lvedo e 1 % de NaCl [Merck]; (b) *Super Optimal Broth* (meio SOB): 2 % de triptona, 0,5 % de extrato de lvedo, 2,5 mM de KCl [Merck], 10 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂ [Merck] e 10 mM de MgSO₄ [AMRESCO]; (c) *Super Optimal Broth with Catabolic repressor* (meio SOC):  o meio SOB contendo 20 mM glicose.

Para meio slido foi acrescentado 2 % gar bacteriolgico (Merck).

Tabela 1. *S. cerevisiae*

Cepas	Gentipo em estudo	Origem
BY4742	<i>MATa, his3Δ 1, leu2Δ 0, lys2Δ 0, ura3Δ 0</i>	Euroscarf
<i>yap1</i>	Isognica  BY4742 exceto <i>yap1::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>yap2</i>	Isognica  BY4742 exceto <i>yap2::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>rck1</i>	Isognica  BY4742 exceto <i>rck1::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>slt2</i>	Isognica  BY4742 exceto <i>slt2::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>rlm1</i>	Isognica  BY4742 exceto <i>rlm1::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>yap1yap2</i>	Isognica  BY4742 exceto <i>yap2::kanMX4, yap1::HIS3</i>	G&S*
<i>yap1rck1</i>	Isognica  BY4742 exceto <i>rck1::kanMX4, yap1::HIS3</i>	Este estudo
<i>yap2rck1</i>	Isognica  BY4742 exceto <i>rck1::kanMX4, yap2::HIS3</i>	Este estudo
<i>slt2yap2</i>	Isognica  BY4742 exceto <i>slt2::kanMX4, yap2::HIS3</i>	Este estudo
<i>rlm1yap2</i>	Isognica  BY4742 exceto <i>rlm1::kanMX4, yap2::HIS3</i>	Este estudo
<i>slt2rck1</i>	Isognica  BY4742 exceto <i>slt2::kanMX4, rck1::HIS3</i>	Este estudo
<i>rlm1rck1</i>	Isognica  BY4742 exceto <i>rlm1::kanMX4, rck1::HIS3</i>	Este estudo
<i>yap1yap2rck1</i>	Isognica  BY4742 exceto <i>yap1::kanMX4, yap2::HIS3, rck1::URA3</i>	Este estudo
FY1679-01B	<i>MATa, his3Δ 200, leu2Δ 1, trp1Δ 61, ura3-52</i>	Euroscarf
<i>yap1</i>	Isognica  FY1679-01B exceto <i>yap1::kanMX4</i>	Este estudo
<i>rck1</i>	Isognica  FY1679-01B exceto <i>rck1::HIS3</i>	Este estudo

* Laboratrio Genomics and Stress, ITQB, UNL - Portugal

Tabela 2. *E. coli*

Cepas	Genótipo em estudo	Referência / Origem
DH5 α	<i>EndA1, recA1, hsdR17, supE44, gyrA96, thi-1, relA1, DlacU169 (f80lacZDM15)</i>	(Sambrook e Russell, 2001)
XL1-Blue	<i>EndA1, gyrA96, thi- 1, recA1, relA1, hsdR17, supE44, lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15]</i>	(Stratagene)

4.4. ESTOQUE E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As cepas de levedura e bactéria foram estocadas em freezer a -80 °C em meio de cultura YPD 2 % e LB, respectivamente, com 25 % de glicerol.

Para crescimento celular, as cepas de levedura foram cultivadas em meio YPD 2 %, SC ou SD, incubadas a 30 °C em *shaker* ajustado para 200 rpm e coletadas na fase exponencial de crescimento. As cepas de bactéria foram crescidas em meio LB e incubadas a 37 °C em *shaker* a 200 rpm.

4.5. OLIGONUCLEOTÍDEOS (*PRIMERS*)

Os oligonucleotídeos usados estão listados na Tabela 3 e Tabela 4 com suas respectivas sequências. Os códons de iniciação e terminação da tradução estão em negrito e os sublinhados são complementares aos códons da cassete a ser amplificada (*KanMX4*, *HIS3* e *URA3*) ou ao epítipo HA. Os *primers* foram desenhados a partir de sequências depositadas no banco de dados NCBI e *Saccharomyces Genome Database* (SGD), com o *Software Clone Manager Basic* 9.0. Todos os *primers* foram sintetizados pela empresa Stab Vida (Portugal) e foram dissolvidos em H₂O Milli-Q para uma concentração de 100 pmol/ μ L para serem estocados em freezer a -20 °C.

4.6. VETORES

Todos os vetores utilizados neste estudo estão descritos na Tabela 5 e seus mapas apresentados nos Anexos. A construção dos vetores pRS416YAP1-HA, pRS416YAP2-HA, pRS416RCK1-HA e pMet-RCK1-HA está detalhada no item 4.13. Todos os vetores foram propagados em bactéria, extraídos com QIAprep Spin Miniprep Kit da QIAGEN, quantificados e estocados em freezer a -20 °C.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados nas construções

<i>Primers</i>	Sequência (5' → 3')
pLF1_Fw	tcgctggatgctgtttctcc
pLF1_Rv	ccgattttgggcagtcctct
YAP1_KAN_Fw	ccacccaaaacgtttaaagaaggaaaagttc <u>gtacgctgcaggcgcac</u>
YAP1_KAN_Rv	gaaaaagttctttcggttaccagttttccgcataggccactagtggatctg
RCK1HIS.Fw	ggctacatatcatataaaataagtcacatagagaaaaaa atg tcagtaaaccagaattatc <u>gtacgc</u> <u>tgcagg</u>
RCK1HIS.Rv	attttcgaatatgctgggtgcgtttccactggataagagtt ta accagaagaatatctt <u>gttagggagac</u> <u>cggcagat</u>
RCK1_URA_K7_Fw	ggctacatatcatataaaataagtcacatagagaaaaaa atg tcagtaaaccagaattagcttttcaa <u>ttcaattcatc</u>
RCK1_URA_K7_Rv	attttcgaatatgctgggtgcgtttccactggataagagtt ta accagaagaatatctt <u>gataactgatata</u> <u>attaaattg</u>
YAP2HIS.Fw	aaggacgacatataagcaatggaacgaccagttaagataaa atg ggcaatatecttcggaaatc <u>gtac</u> <u>gctgcagg</u>
YAP2HIS.Rv	tctcatccaacattatgtatactcaagatatgtttatatg ctac aggagctgtctaaccattagggagacc <u>ggcagat</u>
A1_RCK1	accttttgatgaggagtgc
A4_RCK1	ttaagtctgttagcacagttgt
Yap2_HA_Fwd	<u>gatgtccagattacgcttag</u> catataaacatatcttgagtatacataatgttg
Yap2_HA_Rev	tgtttatatg cta atctggaacatcgtatgggtac cat caggagctgtctaaccaga
A1Yap2_n	ctcgaggaagagtgaggttttc
A4Yap2_n	ccaagatgtcagtcacacg
YAP1_HA_Fwd	<u>gatgtccagattacgcttaa</u> agcgggaactttatggaaaactgggtaaccgaaa
YAP1_HA_Rev	agttcccgtttaagc gta atctggaacatcgtatgggtac cat gttcatatgcttattcaaa
A1_yap1	gggcagagttgttcttcgac
A4_yap1	tatgagtgccgtggaaaggt
YAP1TermRv	ggcgaaaaggcgaagcaaggt
RCK1_HA_Fw	<u>gatgtccagattacgcttaa</u> actcttatccagtggaacgcaccagcatattcg
RCK1_HA_Rv	gataagagtttaagc gta atctggaacatcgtatgggtac cat ccagaagaatatcttgttct

RCK1_ATG_Fw	atgtcagtaaaccagaatttatag
RCK1_T_Kpn1_Rv	ggggtaccagaaacgaaaacagtggatc
RCK1_A1	gaagcggaaaaacaatggaa
RCK1_A4	gccagaaacgaaaacagtgg

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados para qRT-PCR

<i>Primers</i>	Sequência (5' → 3')
YAP2_qRT_Fw	gaagtacagccgcacactca
YAP2_qRT_Rv	gtaacggcacctgttcgatt
YAP1_qRT_Fw	agccaattgacacaccaat
YAP1_qRT_Rv	ttgtcgttgctggtgctggt
FRM2_qRT_Fw	tggactgccctcgaactatt
FRM2_qRT_Rv	cagtccacgcaataggaaca
TRX2_qRT_Fw	tgattgcaccaatgattgaaa
TRX2_qRT_Rv	ggcatggaagaaactcagc
GPX2_qRT_Fw	cggaagtaatgctgactctgctc
GPX2_qRT_Rv	ggccaaggacgatgggttt
RCK1_qRT_Fw	tacaccactcctttgcatcg
RCK1_qRT_Rv	ttccaagcagctctgttca
SLT2_qRT_Fw	acagcaacagcaacagcaac
SLT2_qRT_Rv	ttgtggcgcaacagaattag
RLM1_qRT_Fw	gcgctaacgggttctaacia
RLM1_qRT_Rv	tggcaatgtatggctgtgtt
CHS1_qRT_Fw	cagccatggcatatgttgac
CHS1_qRT_Rv	cccatgataagtcgtggac
ACT1_qRT_Fw	ctattggtaacgaaagattca
ACT1_qRT_Rv	ccttacggacatcgacatca

Tabela 5. Vetores utilizados neste trabalho

Plasmídeo	Descrição	Origem
pLF1	Molde para amplificação da cassete <i>HIS3</i>	Fernandes et al. (resultados não publicados)
pUG6	Molde para amplificação da cassete <i>kanMX4</i>	Güldener et al. 1996
pFA6a-His3MX6	Molde para amplificação da cassete <i>HIS3MX6</i>	Longtine et al. 1998
pRS416	Molde para ampliações e construções	Stratagene
pUG35	Vetor de expressão contendo promotor MET17	Güldener e Hegemann (resultados não publicados)
pRS315YAP2-GFP	Vetor de expressão	Azevedo et al. 2007
pRS314YAP1-GFP	Vetor de expressão	Kuge et al. 1997
pRS416YAP1-HA	Vetor de expressão	Este estudo
pRS416RCK1-HA	Vetor de expressão	Este estudo
pMET-RCK1-HA	Vetor de expressão	Este estudo

4.7. FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

Tabela 6. Ferramentas de Bioinformática e seus sites

Nome	Utilidade	Endereço
SGD	Informações sobre genoma e características funcionais de <i>S. cerevisiae</i>	http://www.yeastgenome.org/
NCBI	Pesquisa bibliográfica e banco de dados	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
STRING	Pesquisa de interação entre proteínas	http://string-dt.org
Primer3 Input	Desenho de <i>primers</i>	http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/
BLAST	Alinhamento das sequências	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
NebCutter (BioLabs®)	Análise de restrição	http://nc2.neb.com/NEBcutter2/

4.8. CÉLULAS COMPETENTES DE BACTÉRIA

A preparação de células competentes de bactéria iniciou-se com a incubação de uma colônia isolada de *E. coli*, proveniente de um repique em placa com meio LB, em 10 mL de meio SOB em Erlenmeyer de 50 mL, *over night* (O.N, \pm 16 horas) em *shaker* a 37 °C, com agitação de 200 rpm. As células, em fase estacionária, foram diluídas para uma densidade óptica de 600 nm (OD_{600nm}) = 0,1 em 300 mL de SOB e incubadas em *shaker* a 24 °C com rotação de 200 rpm O.N, até a obtenção de uma OD_{600nm} = 0,6. Ao atingirem a densidade óptica ideal, as células foram incubadas no gelo durante 10 minutos e centrifugadas a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. O centrifugado foi ressuspenso em 96 mL de *Terrific Broth* (TB, 10 mM de PIPES [Sigma]; 15 mM de $CaCl_2$ [Merck]; 250 mM de KCl; 55 mM de $MnCl_2$ [Sigma], pH 6,7 ajustado com KOH [Riedel-de Haën]) e incubado no gelo durante 10 minutos. As células foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C e, novamente, o centrifugado foi ressuspenso em 24 mL de TB refrigerado. Adicionou-se 3,36 mL de dimetilsulfóxido

(DMSO [Baker]) e, após incubação no gelo durante 10 minutos e congelamento rápido com nitrogênio líquido, as células competentes foram alíquotadas e armazenadas em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.9. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Para a transformação das bactérias, a cada alíquota de $250\text{ }\mu\text{L}$ de células competentes de *E. coli*, adicionou-se $0,2 - 0,4\text{ }\mu\text{g}$ ($1 - 2\text{ }\mu\text{L}$) de DNA plasmidial em tubo de $1,5\text{ mL}$. A mistura foi incubada no gelo durante 30 minutos e as células foram submetidas a um choque térmico de $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos. Adicionou-se $800\text{ }\mu\text{L}$ de meio SOC e incubou-se a cultura em *shaker* durante 1 hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ com agitação de 200 rpm . As células foram centrifugadas durante 1 minuto a 13.000 rpm e plaqueadas em LB suplementado com $0,1\text{ mg/mL}$ de ampicilina.

Após incubação das placas em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ O.N, as colônias isoladas foram selecionadas, inoculadas em tubo de ensaio contendo 2 mL de meio líquido LB suplementado com ampicilina e incubadas O.N em *shaker* a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 rpm . A extração de DNA plasmidial foi feita com o QIAprep Spin Miniprep Kit da QIAGEN a partir da cultura crescida O.N. A quantificação de DNA presente na amostra final purificada foi realizada através de espectrofotômetro Epoch 2 Spectrophotometer e a concentração de DNA foi expressa em $\text{ng}/\mu\text{L}$.

4.10. CÉLULA COMPETENTE DE LEVEDURA

Para tornar as células de levedura competentes, as cepas de *S. cerevisiae* foram cultivadas em meio YPD 2 % até atingirem a fase estacionária e, então, foi feito um re-inóculo em 20 mL meio YPD 2 % em Erlenmeyer de 100 mL , onde as células foram diluídas para $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,1$ e crescidas até atingirem $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,7 - 0,8$. As células foram centrifugadas por 1 minuto a 5.000 rpm e, após desprezar o sobrenadante, foram lavadas com H_2O bidestilada esterilizada. Esse processo de lavagem foi repetido mais uma vez e, após a última lavagem, o centrifugado foi ressuspenso em 1 mL de H_2O

bidestilada, o volume foi passado para um tubo de 1,5 mL e centrifugado novamente. As células foram ressuspensas, lavadas com 1 mL de solução C (100 mM de acetato de lítio e tampão TE – 0,1 mM Tris-HCl [Roche], pH 7,5; 10 mM EDTA [Merck] pH 8,0) e centrifugadas. Por fim, o centrifugado foi ressuspensão em 400 µL de solução C e as células foram mantidas a 4 °C O.N.

4.11. TRANSFORMAÇÃO EM LEVEDURA COM PLASMÍDEO NÃO-RECOMBINANTE

Para a transformação de plasmídeos não integrativos, foram adicionados em um tubo de 1,5 mL, 200 ng de DNA plasmidial à 50 µL das células competentes de levedura juntamente com 50 µg de DNA de esperma de salmão (Sigma) previamente desnaturado (5 minutos a 100 °C e 2 minutos no gelo) e 300 µL de solução T (PEG3350 40 % [Sigma], 100 mM de acetato de lítio e tampão TE). As células foram homogeneizadas, incubadas a 30 °C durante 30 minutos a 200 rpm e submetidas a um choque térmico em banho-maria a 42 °C, durante 15 minutos. Adicionou-se às amostras 800 µL de H₂O bidestilada estéril e estas foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 1 minuto. O centrifugado foi ressuspensão em 100 µL de H₂O bidestilada e as células foram plaqueadas em meio seletivo SC ou SD sem o aminoácido do marcador de seleção de cada plasmídeo. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C durante 48 horas e, após o crescimento das colônias, foi feito o repique de quatro colônias isoladas de cada transformada e crescidas por mais 48 horas.

4.12. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

O gel foi preparado a quente com agarose a 1 % em 200 mL do tampão TAE 1 X (TAE 50 X para 1 L: 242 g de Tris-Base; 57,1 mL de ácido acético glacial [Merck], 100 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0). Foi adicionado ao gel, após frio e ainda em estado líquido, 0,5 µg/mL de brometo de etídio (MPBiomedical). Após o gel ter sido solidificado, as amostras foram aplicadas nos poços (cavidades equidistantes das fontes de tensão), bem

como o marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England BioLabs). Em seguida, o gel foi submetido a uma eletroforese em tampão de corrida TAE 1X, com os parâmetros ajustados em até 5 V/cm e amperagem livre, durante 30 minutos. A visualização dos ácidos nucleicos foi feita sobre a luz UV de um transiluminador e a imagem foi digitalizada.

4.13. CONSTRUÇÃO DOS VETORES CONTENDO OS GENES *YAP1*, *YAP2* E *RCK1* LIGADOS AO EPÍTOPO HA

Para a construção do vetor contendo o gene *YAP1* ligado ao epítipo hemaglutinina (HA), este foi inserido *upstream* ao códon terminador de *YAP1* por meio de três passos de PCR. Inicialmente, a região promotora e a sequência codificante de *YAP1* foi amplificada por dois passos de PCR. O primeiro PCR (A) foi feito usando os pares de *primers* A1_yap1 e YAP1_HA_Rev, este último contendo a sequência HA. O segundo PCR (B) foi realizado utilizando os *primers* YAP1_HA_Fwd e A4_YAP1, que amplificam a região terminadora de *YAP1* contendo o códon de terminação. A construção do vetor contendo o gene *YAP2* ligado ao epítipo HA foi realizada com a mesma estratégia utilizada para *YAP1*, sendo que PCR (A) foi feito usando os pares de *primers* A1Yap2_n e Yap2_HA_Rev, este último contendo a sequência HA e o segundo PCR (B) foi realizado utilizando os *primers* Yap2_HA_Fwd e A4Yap2_n, que amplificam a região terminadora de *YAP2* contendo o códon de terminação. E a construção do vetor contendo o gene *RCK1* ligado ao epítipo HA foi realizada com o PCR (A) usando os pares de *primers* A1_rck1 e RCK1_HA_Rev, este último contendo a sequência HA e o segundo PCR (B) foi realizado utilizando os *primers* RCK1_HA_Fwd e A4_rck1, que amplificam a região terminadora de *RCK1* contendo o códon de terminação.

As duas primeiras reações de PCR utilizaram 100 ng de DNA genômico de BY4742 como *template* (DNA molde). A reação de PCR de fusão foi feita utilizando 0,5 µL de cada purificação dos PCRs A e B como *template*. Em cada reação de PCR foi adicionado 0,2 mM de cada dNTP, 10 pmol/µL de cada *primer*, 1 X Phusion HF Buffer (Thermo Fisher Scientific), 0,5 µL da enzima Phusion DNA Polymerase (Thermo

Fisher Scientific) e água livre de DNase para completar o volume final de 50 µL de reação. As condições de PCR foram as seguintes: um ciclo de desnaturação inicial de 30 segundos a 98 °C; 25 ciclos, contendo processo de desnaturação de 10 segundos a 98 °C; *annealing* de 30 segundos a 55 °C; extensão de 1 minuto a 72 °C para PCR A e 15 segundos a 72 °C para PCR B e extensão final de 2 minutos a 72 °C.

Os produtos amplificados dos dois PCR foram purificados com o QIAquick PCR Purification Kit da QIAGEN. O primeiro e segundo *primers* da primeira e segunda reação de PCR, respectivamente, foram usados para fazer uma terceira reação de PCR – chamado de PCR de fusão (Figura 10 A) – a qual manteve as mesmas condições de PCR, exceto pela temperatura de *annealing* de 64 °C e pelo tempo de extensão que foi de 1 minuto para *YAP1*, 75 segundos para *YAP2* e 1 minuto e 30 segundos para *RCK1*.

Este produto de PCR de fusão foi purificado e ligado ao plasmídeo pRS416 (Figura 10 B). Para isso, primeiramente, 1 µg do plasmídeo pRS416 foi digerido com 5 U da enzima *SmaI* (Thermo Fisher Scientific), utilizando o tampão compatível para essa digestão 1 X Tango Buffer (Thermo Fisher Scientific) e água livre de DNase para completar o volume final de 20 µL de reação. A digestão foi incubada a 30 °C por 2 horas, o produto digerido foi purificado com QIAquick PCR Purification Kit da QIAGEN e a amostra foi quantificada. Após, a ligação foi feita utilizando 20 ng do plasmídeo digerido com *SmaI* e purificado, 50 ng do inserto *YAP1*-HA, *YAP2*-HA ou *RCK1*-HA (produto final do PCR), 1X T4 DNA Ligase Reaction Buffer (New England BioLabs), 0,5 µL de T4 DNA Ligase (New England BioLabs) e água livre de DNase para completar o volume final de 20 µL de reação. A reação foi incubada a 16 °C por 16 horas, a enzima foi inativada a 65 °C por 10 minutos. Os vetores resultantes são pRS416YAP1-HA, pRS416YAP2-HA, pRS416RCK1-HA.

O vetor resultante pRS416RCK1-HA foi utilizado como template para amplificar a ORF e a região terminadora por PCR, utilizando os primers *RCK1_ATG_Fw* e *RCK1_T_KpnI_Rv* (Figura 11 A). As condições de PCR foram as mesmas descritas acima utilizando a enzima Phusion DNA Polymerase e o tempo de extensão foi de 1 minuto. O produto de PCR purificado foi digerido com a enzima de restrição *KpnI* (New England BioLabs) com o tampão CutSmart (New England BioLabs) por 1 hora a 37 °C. Após a inativação da enzima durante 20 minutos a 80 °C, o produto digerido foi ligado ao vetor pUG35 (Figura 11 B), o qual foi digerido

primeiramente com a enzima de restrição *SmaI* (New England BioLabs) com o tampão CutSmart (New England BioLabs) por 1 hora a 30 °C e, após, adicionada a enzima *KpnI* (New England BioLabs) que digeriu por mais 1 hora a 37 °C. Por fim, a enzima foi inativada durante 20 minutos a 80 °C. Desta forma, o vetor final pMet-RCK1-HA contém RCK1-HA sob controle do promotor MET17.

Todo o volume de reação (20 µL) foi utilizado para transformar em bactéria, a qual seguiu o protocolo experimental delineado no item 4.12, diferindo apenas pelo fato de que as células foram plaqueadas em meio LB suplementado com ampicilina, com 40 µL de X-Gal (Sigma) 40 µg/mL e 100 µL de IPTG (Thermo Fisher Scientific) 100 mM espalhados homogeneamente à superfície da placa com o objetivo de selecionar os plasmídeos recombinantes. Após incubação das placas a 37 °C O.N, as colônias brancas selecionadas foram incubadas em meio líquido LB suplementado com ampicilina a 37 °C O.N. Procedeu-se então ao isolamento do DNA plasmidial e os clones foram analisados através da digestão com enzimas de restrição específicas e posterior separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose.

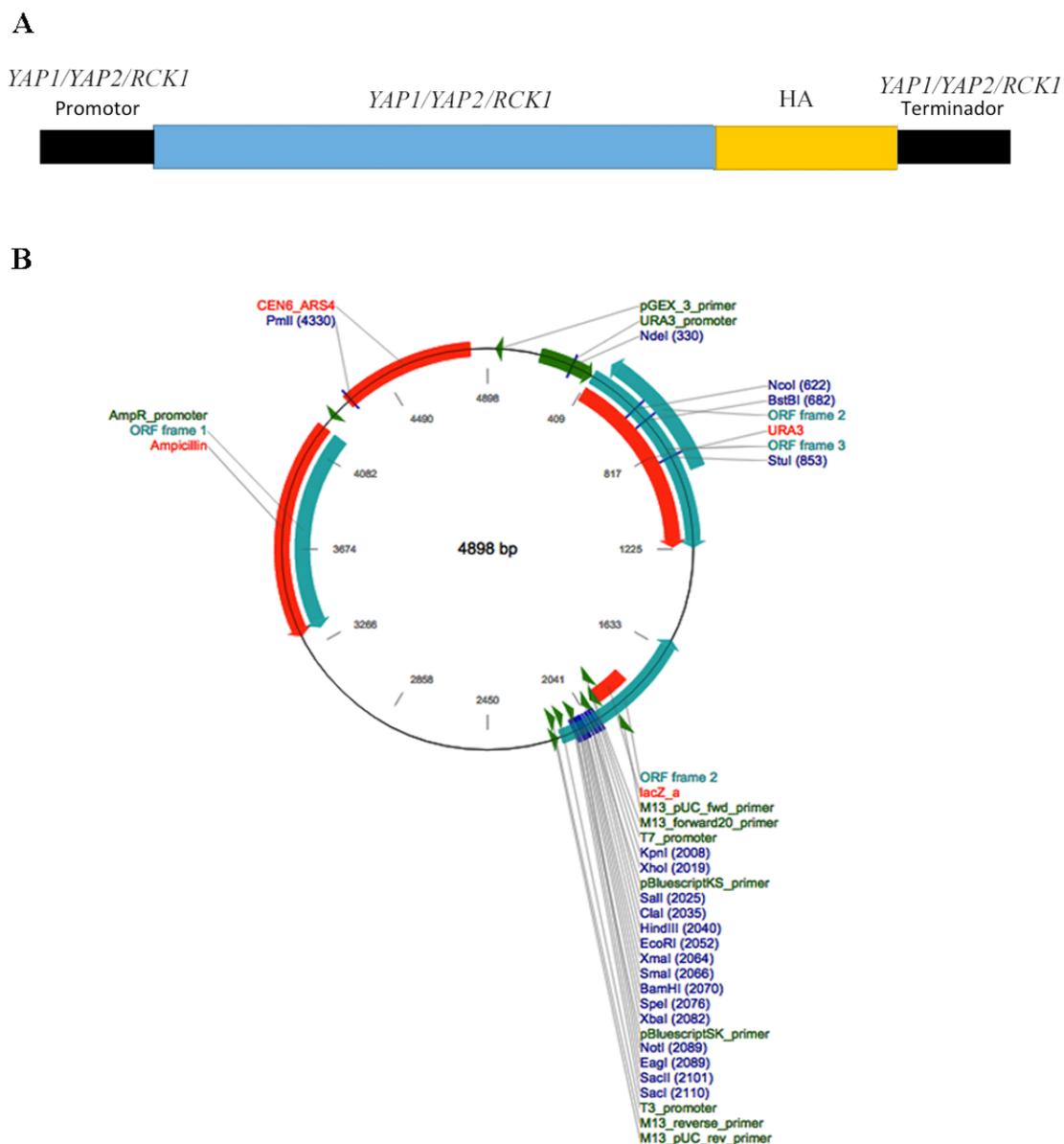


Fig. 10. Produtos finais utilizados na construção dos plasmídeos pRS416YAP1-HA, pRS416YAP2-HA e pRS416RCK1-HA. A) Produto de PCR utilizado como inserto. B) Plasmídeo pRS416 com marcador de seleção *URA3* que foi digerido com a enzima de restrição *SmaI*.

A



B

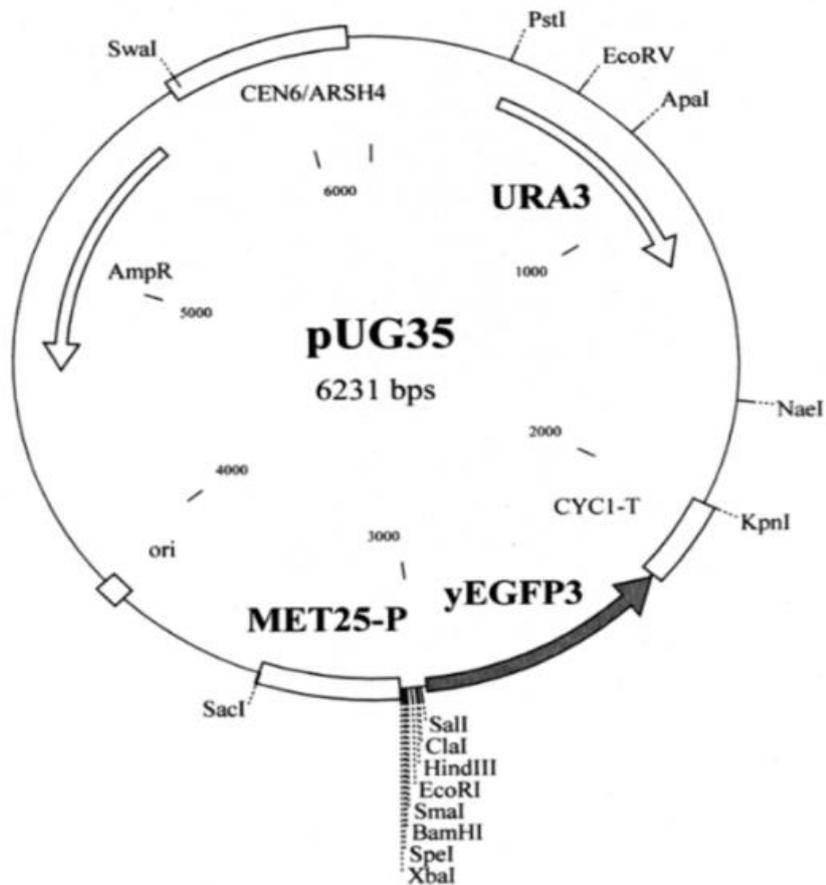


Fig. 11. Produtos finais utilizados na construção do plasmídeo pMet-RCK1-HA. A) Produto de PCR utilizado como inserto. B) Plasmídeo pUG35 com marcador de seleção *URA3* que foi digerido com as enzimas de restrição *SmaI* e *KpnI*.

4.14. CONSTRUÇÃO DAS MUTANTES PELA TÉCNICA DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

4.14.1. Construção das cassetes de interrupção

Para a obtenção das cepas mutantes foram utilizadas cassetes de canamicina, histidina e uracila que substituíram a *open reading frame* (ORF) de cada gene por completo. Para cada ORF foi desenhado um par de *primers* híbridos (*forward* e *reverse*) com 60 bases homólogas ao gene de interesse e 15 a 22 bases homólogas à região do *polylinker* dos plasmídeos pUG6 (cassete de canamicina, *KanMX4*), pFA6a-His3MX3 (cassete de histidina, *HIS3*) e pRS416 (cassete de uracila, *URA3*). O *primer forward* foi composto por 60 bases (40 *upstream* e 20 na ORF) homólogas com a sequência codificante na extremidade 5' da ORF que se pretendeu interromper e por 15 a 22 bases homólogas ao *polylinker* do plasmídeo (5' do módulo *KanMX4/HIS3/URA3*). O *primer reverse* consiste em 60 bases (40 *downstream* e 20 dentro da ORF) homólogas com a sequência codificante na extremidade 3' da ORF e por 15 a 22 bases homólogas ao *polylinker* do plasmídeo (3' do módulo *KanMX4/HIS3/URA3*).

As respectivas cassetes de interrupção foram amplificadas por PCR utilizando-se os plasmídeos pUG6, pFA6a-His3MX3 e pRS416 como *template* e os *primers* listados na Tabela 3.

As reações de PCR foram realizadas de acordo com as seguintes condições: 50 ng de *template*; 25 pmol de cada *primer*; 0,2 mM de cada dNTP; tampão da reação contendo 1,5 mM de MgCl₂; 1,25 U de GoTaq[®] DNA polimerase (Promega) e água livre de DNase para completar um volume final de 50 µL. Os ciclos de PCR foram realizados no termociclador Trio-Thermoblock (Biometra) conforme se segue: um ciclo de desnaturação inicial de 3 minutos a 95 °C; 35 ciclos, contendo processo de desnaturação de 30 segundos a 95 °C, *annealing* de 30 segundos a 60 °C, extensão 2 minutos a 72 °C para amplificação da cassete de canamicina; *annealing* de 30 segundos a 55 °C, extensão 2 minutos a 72 °C para amplificação da cassete de histidina; *annealing* de 30 segundos a 60 °C, extensão 1 minuto e 20 segundos a 72 °C para amplificação da cassete de uracila e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

Foi feita a monitorização do produto de PCR por eletroforese em gel de agarose e as bandas do gel foram purificadas com o QIAquick Gel Extraction da QIAGEN. A quantidade de DNA foi quantificada e este foi utilizado para transformar células competentes de levedura.

4.14.2. Transformação em levedura com plasmídeo recombinante

As cepas a serem utilizadas para tornar as células competentes para o processo de transformação e recombinação homóloga, dependeram do tipo de mutação a ser feita. Nesse sentido, foram feitas células competentes da cepa selvagem (WT) de *S. cerevisiae* – FY1679-01B – para a construção das mutantes simples *yap1Δ* (utilizando a cassette *YAPIKanMX4*) e *rck1Δ* (utilizando a cassette *RCK1HIS3*). Já no conjunto BY4742 foram construídas as duplas mutantes: a) *yap2Δrck1Δ*, utilizando célula competente da cepa mutante simples *rck1Δ* e a cassette *YAP2HIS3*; b) *slt2Δyap2Δ*, utilizando célula competente da cepa mutante simples *slt2Δ* e a cassette *YAP2HIS3*; c) *rlm1Δyap2Δ*, utilizando célula competente da cepa mutante simples *rlm1Δ* e a cassette *YAP2HIS3*; d) *slt2Δrck1Δ*, utilizando célula competente da cepa mutante simples *slt2Δ* e a cassette *RCK1HIS3*; e) *rlm1Δrck1Δ*, utilizando célula competente da cepa mutante simples *rlm1Δ* e a cassette *RCK1HIS3*. A tripla mutante *yap1Δyap2Δrck1Δ* utilizando célula competente da cepa dupla mutante *yap1Δyap2Δ* e a cassette *RCK1URA3*.

A dupla mutante *yap1Δrck1Δ* do conjunto BY4742 foi construída utilizando célula competente de *rck1Δ*, no entanto a cassette utilizada foi originária do plasmídeo pLF1 que expressa a cassette de interrupção de histidina para o gene *YAPI*. Assim, 1 µg do plasmídeo pLF1 foi parcialmente digerido com 2 U da enzima de restrição *KpnI* (New England BioLabs), utilizando o tampão específico NEBuffer 1 (1X) (New England BioLabs) a 37 °C por 10 minutos. Após a inativação da enzima durante 20 minutos a 80 °C, o produto digerido foi transformado como descrito a seguir.

A fim de obter a recombinação homóloga, as células competentes foram transformadas com as devidas cassetes provenientes dos produtos de PCR ou do plasmídeo digerido. Assim, em um tubo de 1,5 mL, 4 µg de cassette de interrupção (12-15 µL) foram adicionados a 50 µL das células competentes de levedura, juntamente com

50 µg de DNA de esperma de salmão previamente desnaturado e 300 µL de solução T. As células foram homogeneizadas, incubadas a 30 °C durante 40 minutos a 200 rpm e, em seguida, foi adicionado 40 µL de DMSO. Então, foram submetidas a um choque térmico em banho-maria a 42 °C, durante 20 minutos. Adicionou-se às amostras 800 µL de H₂O bidestilada estéril e estas foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 1 minuto. O centrifugado foi ressuspensão em 1 mL de YPD 2 % e as células foram incubadas a 30 °C por 3 horas para permitir sua recuperação. Por fim, as células foram centrifugadas, ressuspensas em 100 µL de H₂O bidestilada, plaqueadas em meio seletivo (YPD geneticina [100 µg/µL, Sigma]; meio SC sem histidina ou sem uracila) e incubadas em estufa a 30 °C durante 48 horas.

Após o crescimento das colônias, foi feito o repique de quatro colônias isoladas de cada transformada no mesmo meio seletivo e crescidas por mais 48 horas. A correta inserção da cassette de interrupção no genoma de levedura foi confirmada por PCR de colônia.

4.15. PCR DE COLÔNIA

Após o crescimento das células transformadas, foi feito um PCR de colônia para verificar se a recombinação homóloga ocorreu. Assim, uma quantidade mínima de colônia (usada como *template*) foi coletada com a ponta de um palito previamente esterilizado e muito bem estriada em um tubo de PCR. O tubo aberto foi colocado em um micro-ondas durante 5 minutos a fim de romper as células. Após o tubo resfriado no gelo, foram adicionados os reagentes de PCR.

Os *primers* utilizados para testar as mutantes (Tabela 3) foram: a) *primers* A1 (*upstream* ao gene: A1_yap1; A1Yap2_n; A1_RCK1) e os *primers reverse* das cassetes (YAP1_KAN_Rv; YAP2HIS.Rv; RCK1HIS.Rv; RCK1_URA_K7_Rv); b) *primers forward* das cassetes (YAP1_KAN_Fw; YAP2HIS.Fw; RCK1HIS.Fw; RCK1_URA_K7_Fw) e *primers* A4 (*downstream* ao gene: YAP1TermRv; A4Yap2_n; A4_RCK1); c) *primers* A1 e A4. Para testar as mutantes construídas com o plasmídeo pLF1, foram utilizados os *primers* pLF1_Fw e pLF1_Rv.

Todos os PCR foram feitos utilizando como *template* as transformadas e um controle positivo (colônia ou DNA genômico de BY4742 / FY1679-01B).

Os ciclos de PCR foram realizados no termociclador Trio-Thermoblock (Biometra). Levou-se em consideração que a colônia no tubo correspondeu ao volume de 1 μL e os reagentes adicionados foram: 25 pmol de cada *primer*; 0,2 mM de cada dNTP; tampão da reação contendo 1,5 mM de MgCl_2 ; 1 U de NZYTaq DNA polymerase (Nzytech) e água livre de DNase para completar um volume final de 20 μL . As condições ajustadas para a realização do PCR foram: um ciclo de desnaturação inicial de 45 segundos a 94 °C; 35 ciclos, contendo processo de desnaturação de 30 segundos a 94 °C; *annealing* de 30 segundos a 57 °C; extensão 2 minutos a 72 °C para a confirmação da inserção das cassetes *YAP1HIS3*, *YAP2HIS3* e *RCK1HIS3* e extensão 2 minutos e 30 segundos a 72 °C para a confirmação da inserção da cassette *RCK1KanMX4*; e extensão final de 2 minutos a 72 °C.

A confirmação da inserção da cassette *URA3* foi feita através da reação de PCR adicionando ao tubo de PCR já com a colônia: 0,2 mM de cada dNTP, 10 pmol/ μL de cada *primer*, 1 X Phusion HF Buffer (Thermo Fisher Scientific), 0,2 μL da enzima Phusion DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) e água livre de DNase para completa o volume final de 20 μL de reação. As condições de PCR foram as seguintes: um ciclo de desnaturação inicial de 30 segundos a 98 °C; 35 ciclos, contendo processo de desnaturação de 10 segundos a 98 °C; *annealing* de 30 segundos a 48 °C; extensão de 2 minutos a 72 °C e extensão final de 5 minutos a 72 °C.

Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose e foi feita a eletroforese para a verificação e confirmação das mutantes, sempre em comparação com o controle positivo contendo o genoma completo.

4.16. CURVA DE CRESCIMENTO E ENSAIO DE SENSIBILIDADE

Para realizar a curva de crescimento e o ensaio de sensibilidade, as cepas WT e *rck1 Δ* do conjunto BY4742 foram crescidas em triplicatas em meio SC até atingirem a fase estacionária. A cultura foi diluída para $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,1$ em 100 μL de meio SC em placa de Elisa de 96 poços. As mesmas células foram diluídas, induzidas com 25 e 50

μM de CdCl_2 e colocadas nos poços da placa. Além disso, foram feitos dois poços controle contendo apenas meio SC e meio SC com $25 \mu\text{M}$ de CdCl_2 . As células com e sem cádmio foram crescidas a 30°C e 200 rpm durante 25 horas e a $\text{OD}_{600\text{nm}}$ celular foi medida a cada hora no espectrofotômetro PowerWave HT Microplate Spectrophotometer da BioTek.

4.17. TOLERÂNCIA AO ESTRESSE

Todas as cepas do conjunto BY4742 foram usadas para o ensaio de tolerância ao estresse por cádmio, que foi realizado através da técnica de *Replica Plate*. As células foram crescidas em meio YPD 2 % e meio SC até atingirem a fase estacionária e, então, foi feito um re-inóculo em 3 mL de meio YPD 2 % e meio SC em tubos de ensaio, onde as células foram diluídas para $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,1$ e crescidas até a fase exponencial a 0,5. As culturas foram diluídas em *Phosphate Buffered Saline* (PBS) para estarem igualmente a uma $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,4$ em um volume final de 1 mL em tubos de 1,5 mL. No primeiro poço da placa de Elisa, foram aplicados 50 μL da amostra diluída a 150 μL de PBS e foram feitas 5 diluições seriadas de 10 X. Após, 5 μL de cada diluição de cada cepa foi aplicado com uma pipeta multicanal diretamente na placa de Petri contendo meio YPD 2 % ou meio SC sólidos e estes meios com diferentes concentrações de CdCl_2 . As placas foram incubadas em estufa a 30°C e fotos foram tiradas em scanner após 48 horas de crescimento. As imagens foram tratadas com o Software Adobe® Photoshop® CS6 versão 13.0 x64.

4.18. CONTEÚDO INTRACELULAR DE CÁDMIO

Existem diversas técnicas analíticas com o objetivo de mensurar metais em amostras clínicas. Dentre elas, a Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-MS) possui muitas vantagens perante as outras uma vez que possibilita a análise multielementar, elevada sensibilidade e alta taxa de amostragem (Flament et al. 2002).

Assim, antes da análise por ICP-MS, as cepas WT, *yap2Δ*, *rck1Δ*, *yap2Δrck1Δ* do conjunto BY4742 foram crescidas em triplicatas em meio SC até atingir a fase estacionária e, então, foi feito um re-inóculo em 40 mL de meio SC em Erlenmeyer de 250 mL, onde as células foram diluídas para $OD_{600nm} = 0,1$ e crescidas até a fase exponencial a 0,5. Foram induzidas com 25 μ M de $CdCl_2$ e mantidas a 30 °C e 200 rpm durante 6 horas. A cultura foi passada para um tubo de 50 mL, centrifugada durante 5 minutos a 4.000 rpm, lavada uma vez com 5 mL de EDTA 10 mM pH 8,0, duas vezes com H₂O Milli-Q, centrifugada novamente e ressuspensa em exatos 5 mL de H₂O Milli-Q. Foi realizada uma leitura em espectrofotômetro a OD_{600nm} e retirado 4 mL para criotubos novos. Essas amostras foram centrifugadas, o sobrenadante foi retirado com cuidado e descartado. O centrifugado foi ressuspensa em 1 mL de ácido nítrico ultrapuro a 10 % e permitido digerir durante 18 horas a 98 °C. Foi adicionado 3 mL de H₂O Milli-Q em cada suspensão digerida e as amostras foram centrifugadas. Os sobrenadantes foram transferidos para criotubos novos e as amostras foram analisadas na Rede de Química e Tecnologia (REQUIMTE – Universidade Nova de Lisboa, Portugal) através da técnica de ICP-MS. Os dados foram normalizados contra OD_{600nm} .

4.19. EXPRESSÃO DE RNAM

As cepas do conjunto BY4742 foram crescidas em triplicatas em meio SC até atingir a fase estacionária. Foi feito um re-inóculo em 120 mL de meio SC em Erlenmeyer de 1 L, onde as células foram diluídas para $OD_{600nm} = 0,1$ e crescidas até a fase exponencial a 0,5. Foram retirados 30 mL de cultura correspondente ao ponto controle (ponto 0) e passados para um tubo de 50 mL. Exatos 90 mL de cultura foram induzidos com 1 mM de $CdCl_2$ em *shaker* com rotação de 200 rpm a 30 °C. Após, 30 mL de cultura foram retirados para cada ponto referente a 30 e 60 minutos de indução com cádmio e passados para tubos de 50 mL. Depois de cada ponto ser recolhido, as amostras foram diretamente centrifugadas durante 2 minutos a 4.000 rpm, o sobrenadante foi descartado, os centrifugados foram congelados bruscamente em nitrogênio líquido e mantidos em freezer a -20 °C para posterior extração de RNA.

4.19.1. Extração de RNA total

Os centrifugados nos tubos de 50 mL foram permitidos descongelar submersos no gelo. Então foram ressuspensos em 1 mL de H₂O bidestilada gelada e passados para tubos de 2 mL gelados. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 1 minuto a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao centrifugado 350 µL de tampão LETS (0,1 M de LiCl; 0,01 M de Na₂EDTA; 0,01 M de Tris-HCl, pH 7,4; 0,2 % de SDS e H₂O), 350 µL de ácido fenol-clorofórmio e 250 µL de pérola de vidro. As amostras foram vortexadas em alta velocidade durante 10 minutos e, após intervalo de 10 minutos no gelo, foram vortexadas por 5 minutos adicionais. Então, foram centrifugadas por 10 minutos, a 14.000 rpm e a 4 °C para a separação da fração orgânica da fração líquida. Tubos de 2 mL com 1 mL de etanol 100 % previamente preparados e gelados receberam a fração líquida e as amostras ficaram precipitando O.N em freezer a -20 °C.

As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, a 4 °C durante 45 minutos e o sobrenadante foi descartado. O centrifugado foi lavado com 200 µL de etanol 70 % gelado e as amostras foram centrifugadas por mais 30 minutos. O sobrenadante foi retirado e deixado secar na Capela de Exaustão de Gases. Após seco, o centrifugado foi ressuspensão com 50 µL de H₂O DEPC e incubado em banho-maria a 65 °C por 15 minutos. As amostras foram congeladas em freezer a -80 °C.

4.19.2. Verificação da integridade do RNA por eletroforese

Amostras foram descongeladas submersas no gelo, diluídas 10 X e 2 µL da diluição foram utilizados para a quantificação de RNA em espectrofotômetro Epoch 2 Spectrophotometer, sendo que a concentração de RNA foi expressa em ng/µL. Para a verificação da integridade do RNA, foi feita uma eletroforese em gel de agarose. Cada amostra a ser aplicada no gel foi preparada utilizando 1 µg de RNA, 5 µL de formaldeído 37 %, 5 µL de formamida 99,5 % e 3 µL de *loading dye* (0,25 % m/v azul de bromofenol, 0,25 % m/v cianol de xileno, 50 % v/v glicerol em 1mM EDTA pH 8,0).

A cuba e a cama onde a eletroforese foi feita, foram lavadas com SDS 0,1 %, H₂O bidestilada esterilizada, etanol e esperado secar. O volume total de cada amostra foi aplicado em cada poço do gel e foi feita a eletroforese durante 30 minutos. Os ácidos nucléicos foram visualizados através de luz UV por um transiluminador e a imagem foi digitalizada. A existência de duas bandas de RNAr (28S e 18S) claras e fortes demonstram que o RNA total aplicado no gel está intacto. Por outro lado, se existir qualquer indício de degradação do RNA, uma mancha (borrão) aparece no gel.

4.19.3. Digestão com DNase e purificação do RNA

Com a confirmação do RNA não degradado, seguiu-se para a digestão com DNase. Para isso, 10 µg de RNA foram colocados em um tubo de PCR e adicionados a ele 1 X TURBO™ DNase buffer (Ambion), 2 U da enzima TURBO™ DNase (Ambion) e H₂O para completar um volume final de 50 µL de reação. As amostras foram incubadas a 37 °C por 45 minutos. Os RNA foram purificados com o RNeasy Mini Kit da QIAGEN e estocados em tubo de 1,5 mL em freezer a -80°C.

4.19.4. Obtenção do cDNA

Uma nova eletroforese em gel de agarose foi feita para verificar se houve degradação do RNA com os tratamentos e purificação. Após a confirmação da integridade do RNA, este foi utilizado como molde para a síntese de cDNA, a qual foi realizada utilizando a enzima transcriptase reversa SuperScript® III Reverse Transcriptase (Roche), o tampão específico para enzima Reverse Transcriptase Buffer (Roche) e dNTP (Thermo Fisher Scientific). A quantidade de RNA utilizada na reação foi de 1 µg e o primer usado na reação foi o oligodT 15 T (Stab Vida).

4.19.5. Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) - SYBR Green

A análise de expressão de RNAm foi feita pela técnica Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) utilizando o equipamento Light Cycler 1.5 Real-Time PCR System (Roche). O kit de detecção utilizado foi o Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche). A reação e o ciclo foram os recomendados pelo fabricante. Para uma reação de 20 μL , foram adicionados SYBR Green 1X concentrado; 0,5 μM de cada *primer*, sendo 2 μL do mix de *primers*; 5 μL do cDNA diluído 10 X; água livre de DNase e RNase para completar o volume. O programa para a reação foi: pré-incubação de 95 °C durante 10 segundos, com uma *RampRate* de 4, 4 °C / segundo; amplificação de 40 ciclos de 95 °C durante 10 segundos e *RampRate* de 4, 4 °C / segundo, 56 °C durante 10 segundos e *RampRate* de 2,2 °C / segundo, 72 °C durante 6 segundos e *RampRate* de 4,4 °C / segundo. A especificidade do produto formado foi verificada por meio da curva de dissociação (*Melting curve*) feita logo após a reação conforme o programa: 95 °C durante 1 segundo, com uma *RampRate* de 4, 4 °C / segundo, 50 °C durante 1 segundo e *RampRate* de 2,2 °C / segundo, 98 °C e *RampRate* de 0,11 °C / segundo (5 aquisições / segundo); resfriamento a 4 °C durante 30 segundos e *RampRate* de 2,2 °C / segundo.

A análise dos dados foi feita pelo método *Advanced Relative Quantification* e a expressão da β -actina foi utilizada para normalizar os dados. As reações foram feitas em triplicata.

4.20. EXPRESSÃO PROTEICA

As cepas WT e *rck1Δ* do conjunto BY4742 foram transformadas com os plasmídeos não-recombinantes contendo as proteínas Yap1 e Yap2 ligadas ao epítipo HA (pRS416YAP1-HA e pRS416YAP2-HA, *URA3*). A cepa WT foi transformada com o plasmídeo não-recombinante contendo a proteína Rck1 ligada ao epítipo HA (pMet-RCK1-HA, *URA3*). As células foram crescidas em triplicatas em meio SC sem uracila (SC-URA) até atingir a fase estacionária. Foi feito um re-inóculo em 150 mL de meio SC-URA em Erlenmeyer de 1 L, onde as células foram diluídas para $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,1$ e

crescidas até a fase exponencial a 0,5. Foram retirados 30 mL de cultura correspondente ao ponto controle (ponto 0) e passados para um tubo de 50 mL. Exatos 120 mL de cultura foram induzidos com 1 mM de CdCl₂ em *shaker* com rotação de 200 rpm a 30 °C. Após, 30 mL de cultura foram retirados para cada ponto referente a 30, 60, 90 e 120 minutos de indução com cádmio. Depois de cada ponto ser recolhido, as amostras foram diretamente centrifugadas durante 2 minutos a 4.000 rpm, o sobrenadante foi descartado, os centrifugados foram congelados bruscamente em nitrogênio líquido e mantidos em freezer a -20 °C para posterior preparo do extrato proteico.

4.20.1. Extrato proteico

Os centrifugados nos tubos de 50 mL foram permitidos descongelar submersos no gelo. Então foram ressuspensos em 1 mL de H₂O bidestilada gelada e passados para tubo de 2 mL gelado. As amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 2 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O centrifugado foi lavado com 1 mL de solução de lise (50 mM de HEPES pH 7,4; 100 mM de KCl; 1 mM de EDTA; 0,1 % de NP-40; 10 % de glicerol; H₂O; suplementado com PMSF [Thermo Scientific] e Inibidor de Protease [Roche]) e centrifugado novamente. Após o sobrenadante ser retirado, o centrifugado foi ressuspense em 200 µL de solução de lise e adicionado 250 µL de pérola de vidro.

As amostras foram vortexadas em alta velocidade durante 10 minutos e, após intervalo de 10 minutos no gelo, foram vortexadas por 5 minutos adicionais. Foram centrifugadas por 40 minutos, a 14.000 rpm, a 4 °C, o sobrenadante foi passado para um tubo de 1,5 mL e as amostras foram mantidas no gelo ou estocadas em freezer a -20 °C.

4.20.2. Quantificação de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford. Assim, em um tubo novo de 2 mL foram adicionados 800 µL de H₂O bidestilada, 1 µL de extrato e 200 µL de Bradford (Biorad). Foi feito um tubo controle, com 1 µL de solução de lise

substituindo a amostra. Os tubos foram invertidos, a fim de misturar a amostra, no momento da adição do Bradford e, após 5 minutos de reação, foi feita a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 595 nm. O cálculo foi feito multiplicando a OD pelo fator calculado para o Bradford e a concentração foi determinada em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

4.20.3. Western blot

A eletroforese em gel de poliacrilamida, em uma dimensão, foi utilizada para a separação de proteínas de acordo com seu peso molecular a partir da aplicação de uma corrente elétrica. As soluções para o preparo do gel de poliacrilamida utilizadas nesse experimento estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7. Soluções utilizadas para preparo do gel de poliacrilamida

	<i>Running</i> 10 %	<i>Stacking</i> 4 %
	Volume (mL)	
H ₂ O bidestilada	6,150	3,075
<i>Running</i> : 1,5 M Tris-HCl, pH 8.8 <i>Stacking</i> : 0,5 M Tris-HCl, pH 6.8	3,750	1,250
20 % (w/v) SDS	0,075	0,025
Acrilamida 30 % / Bis Acrilamida 8 %	4,450	0,670
10 % Persulfato de amônio	0,075	0,025
TEMED	0,010	0,005

Após polimerizado, o gel foi colocado dentro do aparelho Mini-PROTEAN 3 Cell (Biorad), o qual foi preenchido com o tampão de corrida TrisGlicina (Glicina 14 % [Sigma], Tris Base 3 %, SDS 1 %).

As amostras foram preparadas da seguinte forma: 100 μg de proteínas foram colocadas em um tubo de 1,5 mL, juntamente com um volume correspondente a 1/3 do

volume de proteína de tampão *Laemmli* (62,5 mM de Tris-HCl, pH 6,8; SDS 2 %; β -mercaptoetanol 5 % [Merck]; glicerol 10 %; azul de bromofenol 0,01 %) e fervidas a 100 °C durante 5 minutos. Após resfriadas no gelo, cada amostra foi aplicada em um poço do gel e este foi submetido a eletroforese com os parâmetros ajustados para 120 V, com amperagem livre, durante 2 horas.

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare Life Science) através do sistema Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Biorad). O sistema foi montado sob o aparelho de transferência utilizando-se um papel de filtro 3MM (Whatman) grosso seguido de três folhas de papel 3MM fino e da membrana de nitrocelulose. Seguidamente foram colocados o gel, três folhas de papel 3 MM fino e um papel 3 MM grosso, todos eles umedecidos em tampão de transferência (Tris Base 0,4 %; Glicina 0,3 %; metanol 10 % [Sigma]; SDS 0,2 %). A transferência foi efetuada por 1 hora e 15 minutos a 20 V e a membrana foi corada com 10 mL de Ponceau S (Sigma) para controle da qualidade da transferência.

A membrana foi bloqueada com leite desnatado 5 % (Nestlé) em PBS/Tween 0,1 % (Merck) durante 1 hora em temperatura ambiente e com agitação. Para a detecção das proteínas contendo o epítipo HA, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-HA conjugado com peroxidase (Roche) diluído 1:1.000, O.N a 4 °C com agitação. A membrana foi lavada nas mesmas condições descritas acima.

O sinal da proteína foi detectado utilizando o kit Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante e as membranas foram utilizadas para impressionar uma película fotográfica (GE Healthcare) numa cassete (Kodak BioMax MS Intensifying Screen) durante o tempo necessário para a obtenção de sinal. As películas foram manualmente reveladas utilizando soluções reveladora e fixadora da Kodak.

O anticorpo anti-a-Pgk1 foi utilizado como controle interno para normalizar os níveis de proteína.

4.21. ESTABILIDADE DAS PROTEÍNAS

As cepas WT e *rck1Δ* do conjunto BY4742 transformadas com os plasmídeos pRS416YAP1-HA e pRS416YAP2-HA (URA) foram cultivadas em triplicatas em meio SC-URA até atingir a fase estacionária. Foi feito um re-inóculo, onde as células foram diluídas para $OD_{600nm} = 0,1$ e crescidas até a fase exponencial a 0,5. Para esse ensaio, foram feitos dois tipos de recolhas de células:

(a) Indução com cádmio e inibição com cicloheximida (CHX) – de 270 mL de cultura de células cultivadas em Erlenmeyer de 1 L foram retirados 30 mL de cultura correspondente ao ponto controle (ponto 0) e passados para um tubo de 50 mL. Exatos 240 mL de cultura foram induzidos com 1 mM de $CdCl_2$ e colocados em *shaker* com rotação de 200 rpm a 30 °C. Após, 30 mL de cultura foram retirados correspondendo ao ponto 10 minutos de indução com cádmio e exatos 210 mL de cultura foram induzidos com 100 µg/mL de CHX e colocados em *shaker*. A seguir, 30 mL de cultura foram retirados para cada ponto referente a 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos de indução.

(b) Inibição com CHX – de 210 mL de cultura de células cultivadas em Erlenmeyer de 1 L, foram retirados 30 mL de cultura correspondendo ao ponto controle (ponto 0) em um tubo de 50 mL. Exatos 180 mL de cultura foram induzidos com 100 µg/mL de CHX e colocados em *shaker*. A seguir, 30 mL de cultura foram retirados para cada ponto referente a 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos de indução.

Depois de cada ponto ser recolhido, as amostras foram diretamente centrifugadas durante 2 minutos a 4.000 rpm, o sobrenadante foi descartado, os centrifugados foram congelados bruscamente em nitrogênio líquido e mantidos em freezer a -20 °C. Posteriormente foi feito o extrato proteico, quantificação das proteínas e western blot como descrito nos itens anteriores.

As imagens foram digitalizadas e a densitometria absoluta das bandas foi quantificada a partir dos dados obtidos através do Software Adobe® Photoshop® CS6 versão 13.0 x64. A densitometria real foi calculada normalizando a densitometria absoluta das bandas de Yap1-HA e Yap2-HA pela densitometria absoluta do controle interno Pgk1. O controle induzido apenas com cádmio durante 10 minutos foi considerado 100 % de proteína remanescente e, a partir deste, foi calculada a

porcentagem de proteína remanescente de cada ponto da cinética das amostras induzidas com cádmio e CHX.

O tempo de meia-vida da proteína foi considerado o tempo em que havia 50 % de proteína remanescente após a adição da CHX.

4.22. ENSAIO DE FOSFORILAÇÃO

Para a análise da fosforilação, o protocolo utilizado foi baseado no apresentado em outros estudos, os quais o aplicaram anteriormente em levedura (*S. cerevisiae*) e em plantas (*L. japonicus* e *P. sativum*) (Pereira et al. 2009; Yoshida e Parniske 2005; Nevitt et al. 2004; Delaunay et al. 2000). Esta análise baseia-se em tratar as células com fosfatase alcalina, pois esta possui o potencial de remover fosfatos de resíduos de fosfoserinas, fosfotreoninas e fosfotirosinas em proteínas. O site <http://neb.com/faqs/1/01/01/will-cip-dephosphorylate-proteins> esclarece como a enzima fosfatase alcalina Calf Intestinal Phosphatase (CIP), pode ser utilizada como agente desfosforilante de proteínas.

Para a realização desse experimento, inicialmente as cepas WT e *rck1Δ* do conjunto BY4742 transformadas com os plasmídeos pRS416YAP1-HA e pRS416YAP2-HA foram cultivadas em triplicatas em meio SC-URA até atingir a fase estacionária. Foi feito um re-inóculo em 60 mL de meio SC-URA em Erlenmeyer de 250 mL, onde as células foram diluídas para $OD_{600nm} = 0,1$ e cultivadas até a fase exponencial a 0,5. Foram retirados 30 mL de cultura correspondente ao ponto controle (ponto 0) e passados para um tubo de 50 mL. Exatos 30 mL de cultura foram induzidos com 1 mM de $CdCl_2$ durante 60 minutos em *shaker* com rotação de 200 rpm a 30 °C. Depois de cada ponto ser recolhido, as amostras foram diretamente centrifugadas durante 2 minutos a 4.000 rpm, o sobrenadante foi descartado, os centrifugados foram congelados bruscamente em nitrogênio líquido e mantidos em freezer a -20 °C. O extrato proteico e a quantificação das proteínas foram feitos como descrito nos itens anteriores.

A partir deste momento, 100 mg de proteína foram tratadas com 5 U da CIP (New England BioLabs®) e seu buffer 3, durante 1 hora a 37 °C. Uma quantidade de

100 µg de proteínas foi colocada em um tubo de 1,5 mL juntamente com tampão *Laemmli* e as amostras foram fervidas a 100 °C durante 5 minutos. Após resfriadas no gelo, as amostras foram aplicadas no gel de poliacrilamida para a eletroforese. O western blot foi realizado como descrito anteriormente.

4.23. LOCALIZAÇÃO CELULAR

As cepas WT e *rck1Δ* do conjunto FY1679-01B foram transformadas com os plasmídeos não-recombinantes contendo os genes *YAP2* e *YAP1* ligados ao gene repórter da proteína fluorescente verde (GFP, *Green Fluorescent Protein*) - pRS315YAP2-GFP (*LEU2*) e pRS314YAP1-GFP (*TRP1*). As células foram crescidas em meio SD sem leucina (SD-LEU) ou sem triptofano (SD-TRP) até atingir a fase estacionária. Foi feito um re-inóculo em 25 mL de meio SD-LEU ou SD-TRP em Erlenmeyer de 125 mL, onde as células foram diluídas para OD_{600nm} = 0,1 e crescidas até a fase exponencial a 0,5. Foram retirados 2 mL referente ao ponto controle (ponto 0) para um tubo de 2 mL e induzido com 10 µg/mL de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, [Sigma]) durante 7 minutos em *shaker* a 30 °C e 200 rpm. A amostra foi centrifugada a 4.000 rpm durante 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e o centrifugado lavado duas vezes com PBS. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi retirado com uma bomba a vácuo, o centrifugado foi ressuspensão em 15 µL da solução de DABCO (200 mM de 1,4-diazadicyclo[2.2.2]octane; PBS 0,25x; glicerol 75 %) e mantido no escuro durante o preparo da lâmina.

A lâmina para a microscopia foi previamente lavada com detergente, H₂O corrente, H₂O bidestilada e etanol 100 %. Com a lâmina seca, foi feita uma camada fina de agarose 0,8 % sobre a lâmina, aplicado 5 µL da célula ressuspensão com DABCO e colocada uma lamínula sobre a amostra e a agarose. A lâmina ficou no escuro até o momento da análise.

Após retirado o ponto controle, exatos 23 mL de cultura foram induzidos com 1 mM de CdCl₂ em *shaker* com rotação de 200 rpm a 30 °C. Assim, 2 mL de cultura foram retirados para cada ponto referente a 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos

de indução com cádmio. Depois de cada ponto ser recolhido, as amostras passaram pela mesma estratégia experimental descrita para o ponto controle.

Para o ensaio de localização celular, as lâminas foram analisadas por microscopia e as células visualizadas através do microscópio de fluorescência Leica DMRXA equipado com uma câmera Roper Scientific Micro-Max *cooled CCD (charge coupled device)* e um Software MetaMorph (Universal Imaging Inc.). A visualização foi feita com microscopia de contraste de fase e com microscopia de fluorescência através dos filtros FITC (GFP: excitação de 495 nm e 525 nm, em verde) e DAPI (excitação de 340 nm e 488 nm, em azul).

4.24. PROTEÍNA CARBONILADA

As cepas *yap2Δ*, *rck1Δ* e *yap2Δrck1Δ* do conjunto BY4742 foram cultivadas em meio SC até atingir a fase estacionária. Foi feito um re-inóculo em 90 mL de meio SC em Erlenmeyer de 500 mL, onde as células foram diluídas para $OD_{600nm} = 0,1$ e crescidas até a fase exponencial a 0,5. Exatos 60 mL de cultura foram induzidos com 1 mM de $CdCl_2$ a 200 rpm e 30 °C. Após, 30 mL de cultura foram retirados para cada ponto referente a 90 e 120 minutos de indução com cádmio. Depois de cada ponto ser recolhido, as amostras foram diretamente centrifugadas durante 2 minutos a 4.000 rpm, o sobrenadante foi descartado, os pellets foram congelados bruscamente em nitrogênio líquido e mantidos em freezer a -20 °C para posterior preparo do extrato proteico, o qual está descrito no tópico 4.21.1. Para avaliar a presença de grupos carbonil, foi utilizado o OxyBlot™ Protein Oxidation Detection kit (Millipore).

As amostras tratadas com o kit foram aplicadas no gel de poliacrilamida, a eletroforese e a transferência para a membrana de nitrocelulose ocorreram como descrito no tópico 4.20.3.

A membrana foi incubada por 5 minutos em solução 0,1 mg / mL de dinitrofenilhidrazina (DNPH [Sigma]) preparada em HCl 2 M, de modo a permitir a reação entre o DNPH e as carbonilas presentes nas cadeias laterais das proteínas oxidadas. Após a incubação, a membrana foi lavada com HCl 5 M para retirar o excesso de DNPH não reagido. A membrana foi bloqueada durante 1 hora e foi incubada com

anticorpo anti-DNP (desenvolvido em coelhos [Sigma]) O.N. Após, a membrana foi lavada e incubada com anticorpo secundário (anti-rabbit IgG Peroxidase Conjugate [Sigma]). Por fim, a membrana foi lavada e o sinal da proteína foi detectado utilizando o kit Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate e as membranas foram utilizadas para impressionar uma película fotográfica numa cassete durante o tempo necessário para a obtenção de sinal. As películas foram manualmente reveladas utilizando soluções reveladora e fixadora.

O anticorpo anti-a-Pgk1 foi utilizado como controle interno para normalizar os níveis de proteína.

4.25. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

As cepas WT e *rck1Δ* do conjunto BY4742 foram crescidas em meio YPD 2 % até atingir a fase estacionária e, então, foi feito um re-inóculo em 250 mL de meio YPD 2 % em Erlenmeyer de 1 L para as células crescerem e atingirem a fase exponencial. Para calcular a massa de células, foi feita leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda ajustado para OD_{570nm} e a absorbância foi multiplicada pela diluição e pelo fator calculado para as cepas (BY4742 = 0,7). Assim, o resultado desse cálculo representou a massa celular em mg/mL.

Uma massa de células correspondente a 50 mg foi coletada para o ponto controle (ponto 0) e o restante do volume (100 mL) foi induzido com 1 mM de CdSO₄ em *shaker* a 30 °C e rotação de 200 rpm. Então foram retirados 50 mg de células referente ao ponto de 12 horas de indução com cádmio.

O volume correspondente foi centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos e o centrifugado foi lavado duas vezes com H₂O bidestilada gelada. O centrifugado foi ressuspenso em 5 mL de H₂O bidestilada e quantificado em espectrofotômetro a OD_{570nm}. As amostras foram centrifugadas novamente e, após o sobrenadante ser descartado, o centrifugado foi ressuspenso em 500 µL de ácido tri-cloro acético (TCA) 10 % gelado e passado para um tubo de parede grossa contendo 1,5 g de pérolas de vidro. As células foram rompidas com agitação vigorosa, alternando-se períodos de 20 segundos de agitação com períodos de 20 segundos de descanso no gelo. Este

procedimento foi repetido 6 vezes. Foram adicionados 500 µL de TCA 10 % para lavar a parede de cada tubo, o homogeneizado foi transferido para um tubo de 2 mL e centrifugado a 4000 rpm por 4 minutos.

O sobrenadante foi utilizado para o ensaio de determinação de lipídios peroxidados pelo método de TBARS (Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) (Steels et al. 1994). Em outro tubo de 2 mL foram adicionados 0,1 mL de EDTA 0,1 M, 0,15 mL do homogeneizado de células, 0,15 mL de TCA 10 % e 0,6 mL de ácido tiobarbitúrico 1 % (p/v) em NaOH 0,05 M. As amostras foram preparadas em duplicata técnica e foi preparado um branco reacional contendo 0,3 mL de TCA 10 % sem o homogeneizado de células. As misturas reacionais foram incubadas por 15 minutos a 100 °C, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e a absorbância medida espectrofotometricamente a OD_{532nm}.

Os resultados são expressos em pmoles de MDA/mg de células e o cálculo é apresentado a seguir:

$$\text{pmoles MDA/mg células} = \frac{[\text{OD}_{532\text{nm}} \times 11,5\text{nmoles MDA}] \times 1000}{[\text{OD}_{570\text{nm}} \times \text{fator celular} \times 100] \times 4,9 \times 0,15}$$

4.26. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Para a comparação entre grupos foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) quando a distribuição foi normal ou Kruskal-Wallis quando a distribuição dos dados foi não-normal. Na comparação intragrupo foi utilizado Teste *t* de Student para distribuição normal ou Wilcoxon para distribuição não-normal dos dados. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos com $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CAPÍTULO 1: ATIVAÇÃO DE YAP2 NA RESPOSTA AO CÁDMIO

S. cerevisiae possui a Família Yap composta por oito fatores de transcrição que respondem a diversos tipos de estresse, dentre eles, Yap1 é o que tem a função mais esclarecida na literatura e é considerado o principal fator de transcrição na defesa contra o estresse oxidativo. Yap2 é outro membro desta família e quem possui maior homologia com Yap1 e, por este motivo, encorajou muitos estudos a buscarem a sua função na levedura (Rodrigues-Pousada et al. 2010). Inicialmente Yap2 era conhecido como Cad1, uma vez que alguns autores indicaram que a sua superexpressão proporcionava maior resistência ao cádmio (Hirata et al. 1994). E, a partir desses achados, algumas publicações surgiram relacionando os dois fatores de transcrição com a defesa contra o cádmio, mostrando que a falta do gene *YAP1* tornava a célula altamente sensível na presença de cádmio (Wemmie et al. 1994; Azevedo et al. 2003; Gomes et al. 2005; Azevedo et al. 2007) e que, independente da ausência do gene *YAP2* não tornar as células mais sensíveis ao cádmio, a superexpressão deste gene na mutante *yap1Δ* resgatava a tolerância ao estressor (Hirata et al. 1994).

Desse modo, os resultados referentes a Yap2 que a literatura trouxe até os dias atuais deixaram dúvidas sobre a real função desse fator de transcrição em *S. cerevisiae* e direcionaram este estudo a levantar as seguintes hipóteses: A) Yap2 poderia ter um papel secundário, atuando na defesa contra o cádmio apenas quando a defesa regida por Yap1 fosse insuficiente, no caso da presença de altas concentrações do metal ou por Yap1 estar inativo; B) Yap2 poderia ter uma função específica contra o cádmio, atuando em conjunto com outros genes em uma via de sinalização independente de Yap1.

5.1.1. Yap1 e Yap2 na tolerância ao cádmio

Para verificar a importância de Yap1 e Yap2 na defesa contra o estresse provocado pelo cádmio, primeiramente foi realizado um ensaio de tolerância ao cádmio através do *Replica Plate* em cepas mutantes nesses genes. Dessa forma, as cepas WT, *yap1Δ* e *yap2Δ* foram expostas a concentrações crescentes de cádmio, como mostra a Figura 12.

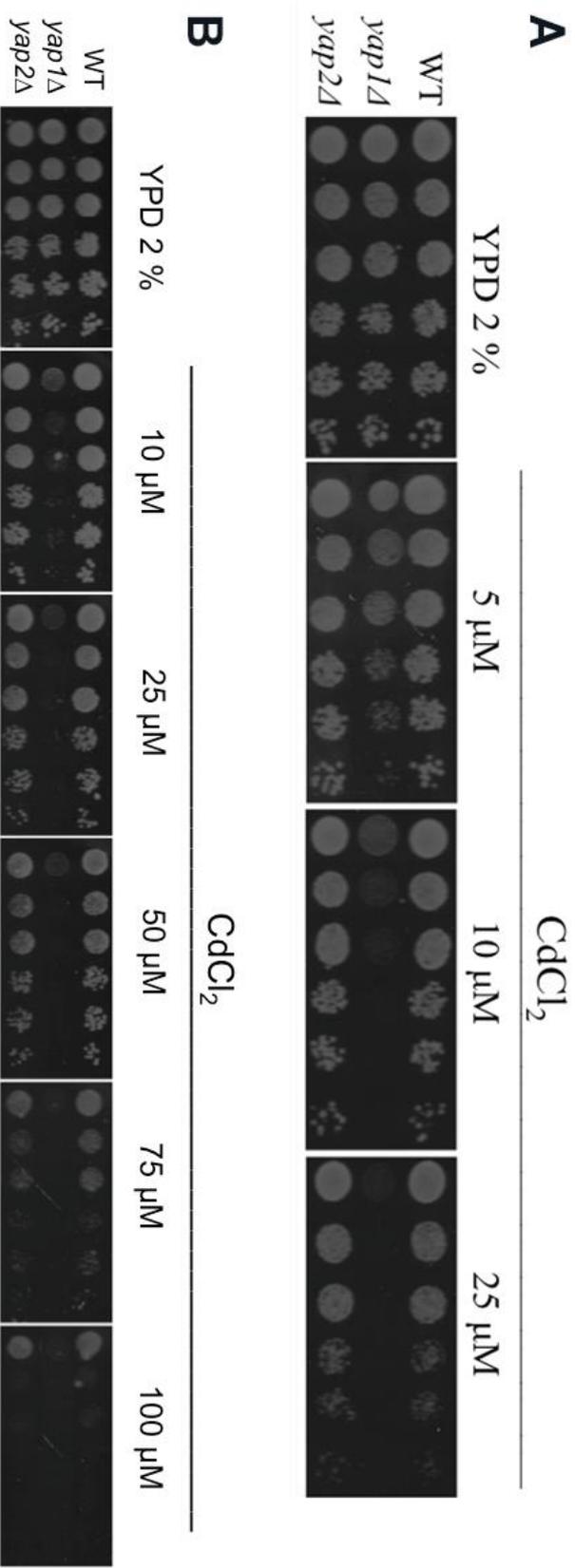


Fig. 12. Análise da tolerância ao cádmio das cepas mutantes nos genes *YAP1* e *YAP2* de *S. cerevisiae*. As cepas WT (BY4742), *yap1Δ* e *yap2Δ* foram cultivadas até a fase exponencial em glicose (meio YPD 2 %) e diluídas em série para serem colocadas em spots em placas contendo apenas meio YPD 2 % sólido e meio YPD 2 % sólido acrescido de elevadas concentrações de CdCl_2 . Em (A) concentrações mais baixas de cádmio; em (B) concentrações mais elevadas de cádmio.

Como é possível observar na Figura 12 A, a falta do gene *YAPI* (*yap1Δ*) torna a cepa altamente sensível nas menores concentrações de cádmio apresentadas (5 μ M e 10 μ M de CdCl_2). Esses resultados corroboram com os apresentados na literatura, os quais mostram a mutante *yap1Δ* sensível ao cádmio em outras cepas de *S. cerevisiae* e induzidas com outras concentrações (Wemmie et al. 1994; Azevedo et al. 2003; Gomes et al. 2005; Azevedo et al. 2007). Como o fator de transcrição Yap1 é responsável pela regulação de diversos genes como *YCF1* (Wemmie et al. 1994), *GSH1* (Wu e Moye-Rowley 1994), *GTT2* (Barreto et al. 2006), *CUP1* (Gomes et al. 2005), dentre outros que atuam na defesa contra o cádmio, pode-se afirmar que Yap1 é determinante para a sobrevivência quando a célula é exposta a este metal.

Por outro lado, como pode ser observado na Figura 12 B, mesmo as mais altas concentrações de cádmio não causaram qualquer perfil de sensibilidade na mutante *yap2Δ* quando comparada com a cepa selvagem, concordando com os achados da literatura que apontam que a ausência do gene *YAP2*, em outros conjuntos de cepas, não torna a cepa mais sensível a diversas concentrações de cádmio (Wu et al. 1993; Bossier et al. 1993; Hirata et al. 1994; Lesuisse e Labbe 1995; Azevedo et al. 2007).

Mesmo com os dados demonstrando a falta de sensibilidade ao cádmio pela mutante *yap2Δ*, Wu e colaboradores em 1993, quando descobriram Cad1 (Yap2) como um homólogo de Yap1, já demonstraram que a superexpressão de *YAP2* aumenta a resistência ao cádmio e, a seguir, outros autores também o comprovaram superexpressando *YAP2* em diferentes conjuntos de cepas (Bossier et al. 1993; Hirata et al. 1994; Lesuisse e Labbe 1995). Esse fato dá a ideia de que Yap2 possui um papel importante na regulação do estresse ocasionado por cádmio, porém se torna preciso esclarecer se Yap2 é requerido apenas na ausência de Yap1 ou possui um papel central na defesa celular.

5.1.2. Cádmio induz a expressão de *YAPI* e *YAP2*

A fim de verificar se o cádmio induz a expressão de *YAPI* e *YAP2*, foi realizado um qRT-PCR para mensurar os níveis de RNAm dos dois genes e o nível das proteínas

Yap1 e Yap2 por Western blot, utilizando as quimeras Yap1-HA, Yap2-HA e o anticorpo anti-HA, após a indução com 1 mM de CdCl₂.

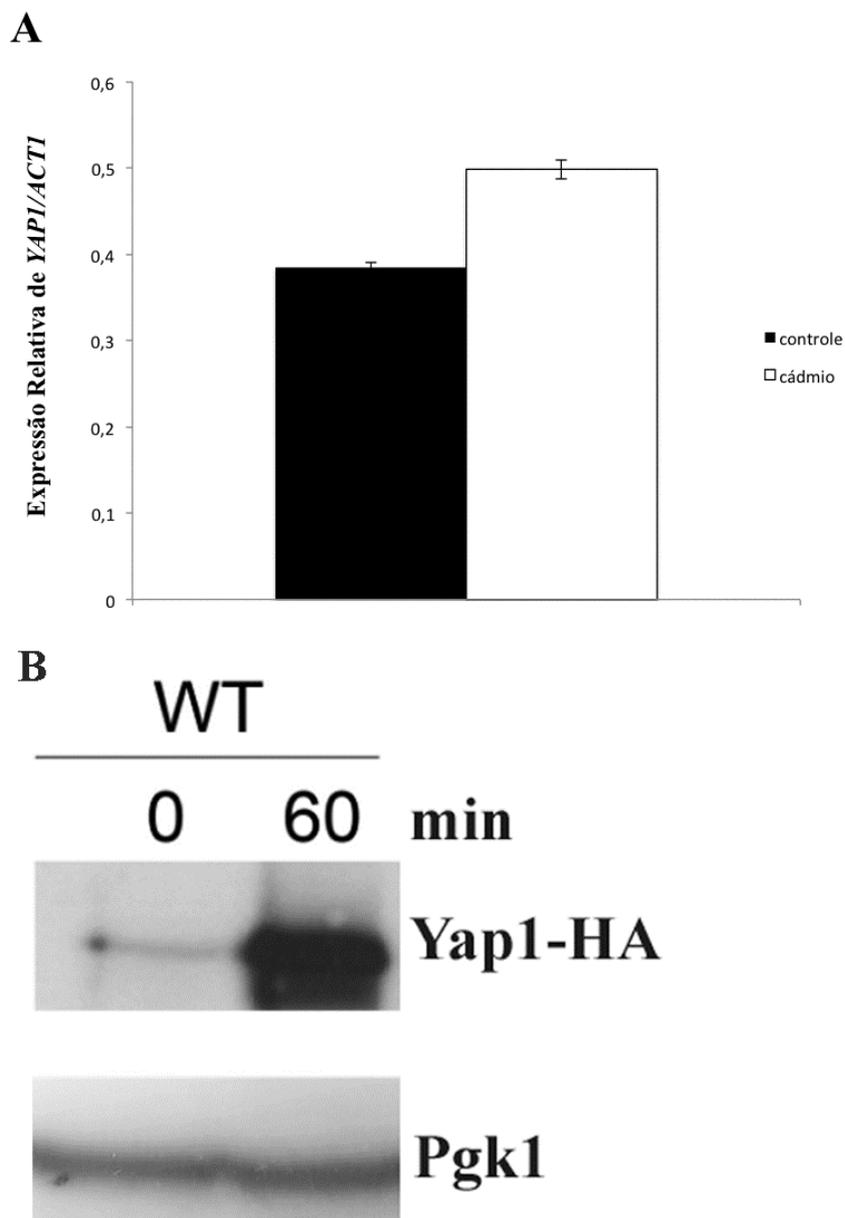


Fig. 13. Efeito do cádmio na expressão de RNAm de *YAP1* e no nível da proteína *Yap1*. (A) A expressão relativa de *YAP1* foi avaliada por qRT-PCR na cepa WT (BY4742) sem indução e com indução de 1 mM de CdCl₂ por 30 minutos. Os valores apresentados são média e desvio padrão de triplicatas biológicas. O gene *ACT1* foi utilizado como um gene de referência. Os resultados tiveram diferença estatisticamente significativa entre a situação controle e a situação com cádmio ($p < 0,0001$). (B) Células da cepa WT (BY4742) transformadas com vetor contendo Yap1-HA foram tratadas ou não com 1 mM de CdCl₂, coletadas conforme os tempos indicados e analisadas por Western blot. A proteína Pgk1 foi utilizada como controle interno.

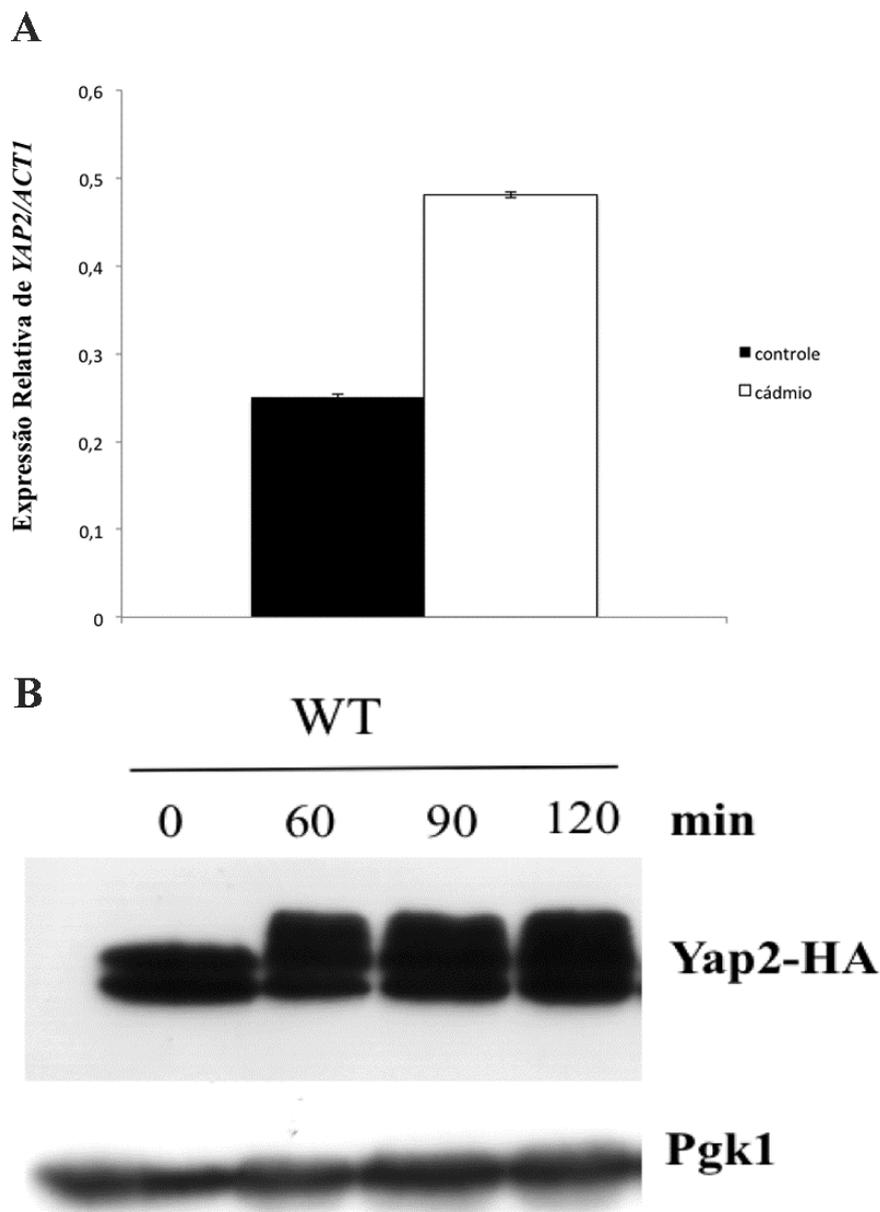


Fig. 14. Efeito do cádmio na expressão de RNAm de *YAP2* e no nível da proteína **Yap2**. (A) A expressão relativa de *YAP2* foi avaliada por qRT-PCR na cepa WT (BY4742) sem indução e com indução de 1 mM de CdCl_2 por 30 minutos. Os valores apresentados são média e desvio padrão de triplicatas biológicas. O gene *ACT1* foi utilizado como um gene de referência. Os resultados tiveram diferença estatisticamente significativa entre a situação controle e a situação com cádmio ($p < 0,0001$). (B) Células da cepa WT (BY4742) transformadas com vetor contendo Yap2-HA foram tratadas ou não com 1 mM de CdCl_2 , coletadas conforme os tempos indicados e analisadas por Western blot. A proteína Pgk1 foi utilizada como controle interno.

É possível verificar que houve um aumento significativo na expressão de RNAm tanto de *YAP1* (Figura 13 A) quanto de *YAP2* na cepa WT (Figura 14 A) e que os níveis das proteínas Yap1 e Yap2 aumentam após a indução com cádmio (Figuras 13 B e 14 B).

Os resultados que demonstram o aumento na expressão de *YAP1* corroboram com os resultados de tolerância apresentados anteriormente, nos quais Yap1 mostrou-se determinante para a sobrevivência da célula exposta ao cádmio. Na presença do estresse por este metal, o fator de transcrição Yap1 é altamente induzido tanto nos níveis gênicos quanto proteicos. No entanto, apesar de a falta de Yap2 não ter aumentado a sensibilidade ao cádmio, esses resultados comprovam que o estresse pelo metal induz a expressão gênica e proteica de Yap2.

Além disso, foi verificado que os níveis de expressão diferem entre os genes, uma vez que o aumento que ocorre na expressão de *YAP2* após o estresse com cádmio é ainda maior do que o observado na expressão de *YAP1* ($p < 0,0001$). Fernandes e colaboradores (1997) analisaram o potencial de ativação transcricional de Yap1 e Yap2 avaliando a atividade da β -Galactosidase, uma vez que expressaram em células de *S. cerevisiae* um vetor contendo Yap1 ou Yap2 fusionados a LexA e outro vetor contendo o gene repórter *LacZ* fusionado a *HIS3* com sítio de reconhecimento para LexA. A partir da análise por Northern blot, evidenciaram que a ativação transcricional por Yap2 aumenta cinco vezes após a indução com 400 μ M de CdCl_2 durante 4 horas, enquanto que o aumento na ativação transcricional de Yap1 foi de apenas 1,6 vezes. Ademais, comprovaram que a superexpressão de *YAP2* em uma mutante *yap1 Δ* foi capaz de aumentar 7,3 vezes a transcrição de *HIS3* após a adição de cádmio, em contrapartida, a ativação por Yap1 foi fortemente induzida por H_2O_2 , mas não por cádmio. No entanto, é possível observar que a expressão proteica de Yap1 aumenta consideravelmente após a indução com cádmio, sugerindo que este metal tenha um efeito mais relevante na expressão de Yap1 de um modo pós-transcricional.

Mesmo sabendo que os fatores de transcrição da Família Yap, principalmente Yap1 e Yap2, possuem diversas propriedades em comum, essas proteínas são funcionalmente distintas. Fernandes e colaboradores (1997) definiram que alguns promotores de levedura podem ser ativados de forma diferente por cada proteína da

Família Yap, as quais irão afetar de forma variada a resposta aos diversos agentes estressores.

Reunidos, esses dados sugerem que tanto Yap1 quanto Yap2 são fortemente induzidos pelo estresse provocado pelo cádmio.

Assim, este estudo buscou verificar se Yap1 pode controlar a expressão de *YAP2* na presença do cádmio. Para isso, foi realizado um qRT-PCR para mensurar os níveis de RNAm de *YAP2* após a indução com 1 mM de CdCl₂.

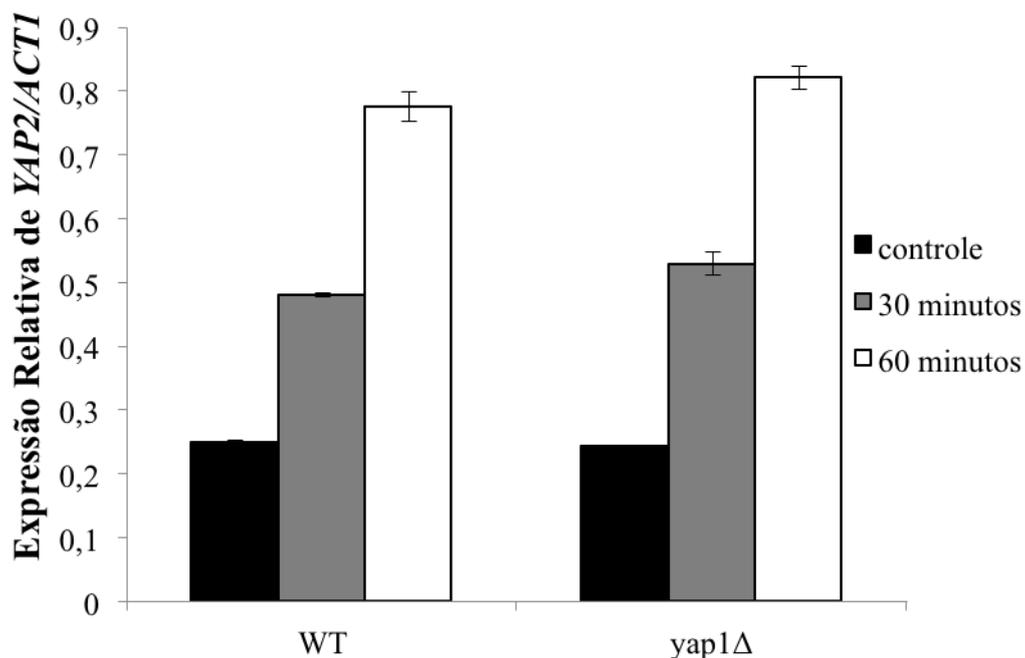


Fig. 15. Análise do efeito do cádmio e do envolvimento de Yap1 na expressão de RNAm de *YAP2*. A expressão relativa de *YAP2* foi avaliada por qRT-PCR nas cepas WT (BY4742) e *yap1Δ* sem indução e com indução de 1 mM de CdCl₂ por 30 e 60 minutos. Os valores apresentados são média e desvio padrão de triplicatas biológicas. O gene *ACT1* foi utilizado como um gene de referência. Os resultados tiveram diferença estatisticamente significativa entre a situação controle e as situações com cádmio ($p < 0,0001$).

Como é possível observar nos resultados apresentados na Figura 15, após a indução com cádmio os níveis de *YAP2* aumentam significativamente na WT e na mutante *yap1Δ*, sugerindo que a expressão de *YAP2* ocorre de forma independente de Yap1 com o estresse provocado pelo metal.

5.1.3. Yap2 está ativo na resposta ao cádmio

Sabendo que o gene *YAP2* é altamente induzido e a sua proteína altamente expressa em condições de estresse por cádmio, de forma independente de Yap1, este estudo buscou verificar se Yap2 está ativo na célula estimulando a expressão de um gene-alvo específico.

Azevedo e colaboradores (2007) verificaram que a proteína Frm2 seria um alvo específico de *YAP2* quando superexpressaram esse gene em uma mutante *yap1Δ* em condições de estresse com cádmio. Os autores verificaram o aparecimento de uma mancha em um gel bidimensional de proteína que, após sequenciada, mostrou ser a proteína Frm2.

Nesse sentido, a expressão de *FRM2* foi utilizada neste estudo a fim de testar a atividade de Yap2 e, para isso, os níveis de expressão de RNAm de *FRM2* foram analisados nas cepas WT e mutantes *yap1Δ*, *yap2Δ* e *yap1Δyap2Δ* induzidas durante 30 minutos com 1 mM de CdCl₂.

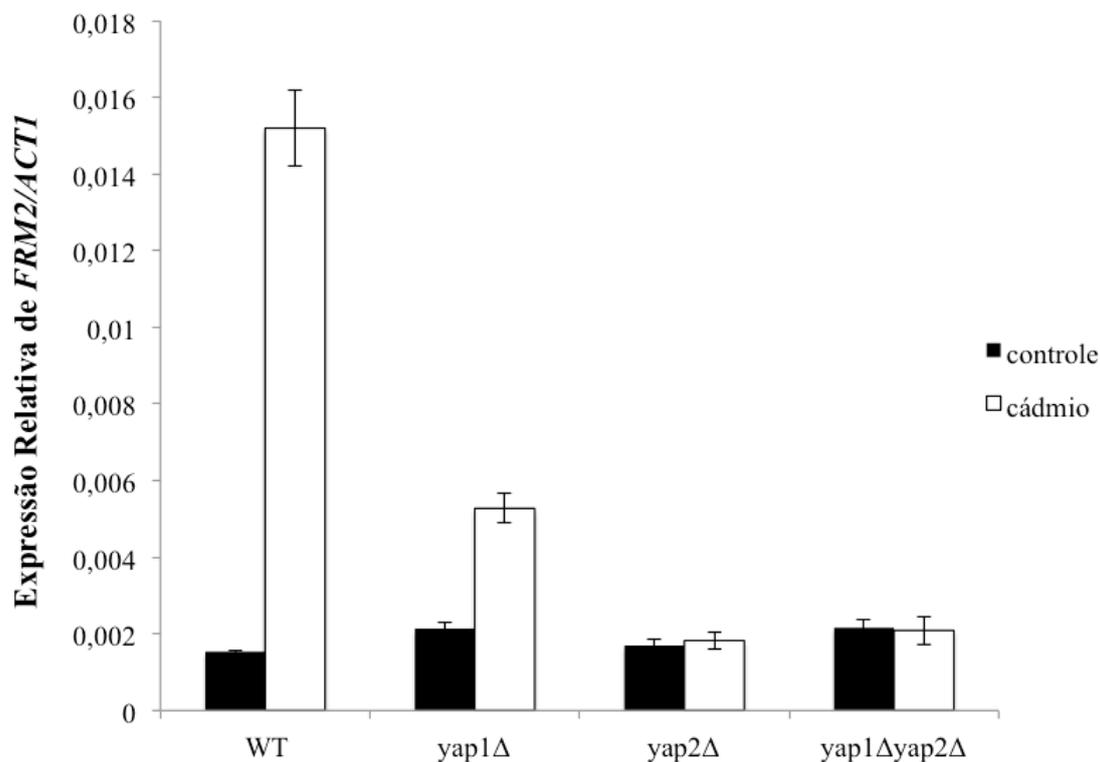


Fig. 16. Efeito do cádmio na atividade de Yap2 e expressão de RNAm de *FRM2*. A expressão relativa de *FRM2* foi avaliada por qRT-PCR nas cepas WT (BY4742), *yap1Δ*, *yap2Δ* e *yap1Δyap2Δ* sem indução (barras pretas, situação controle, sem estresse) e com indução de 1 mM de CdCl₂ (barras brancas, cádmio) por 30 minutos. Os valores apresentados são média e desvio padrão de triplicatas biológicas. Os resultados tiveram diferença estatisticamente significativa entre a situação controle e a situação com cádmio na cepa WT ($p < 0,0001$) e na cepa *yap1Δ* ($p < 0,001$).

A Figura 16 mostra que a expressão de *FRM2* aumenta significativamente após estresse com cádmio e que na ausência de *YAP2* (*yap2Δ*) a expressão de *FRM2* não é induzida em resposta ao cádmio. Quando comparada com a cepa WT, a mutante *yap1Δ* também apresentou uma menor indução da expressão de *FRM2*. No entanto, mesmo na ausência de *YAP1* observou-se um aumento significativo nos níveis de expressão de *FRM2* após indução com cádmio, que foi abolido na ausência de *YAP2*.

Os dados apresentados na literatura salientam que Frm2 é um alvo específico de

Yap2, já que a expressão desta proteína foi vista em uma mutante *yap1Δ* (Azevedo et al. 2007). No entanto, é possível dizer que a expressão de *FRM2* é parcialmente regulada por Yap1 em resposta ao cádmio, mas Yap2 é o seu principal regulador. Como a proteína Frm2 mostrou-se envolvida na via de sinalização de ácidos graxos (Ball et al. 2000), foi sugerido que Frm2 está envolvido no metabolismo lipídico e, como cádmio é um estressor com alto potencial de gerar peroxidação lipídica (Reiser et al. 1999), Yap2 poderia estar ligado a Frm2 na resposta ao estresse oxidativo causado pelo cádmio (Azevedo et al. 2007). Bang e colaboradores (2013) verificaram que a superexpressão de *YAP2* em condições fisiológicas causa um aumento de quase cinco vezes da expressão de *FRM2* e que os níveis de expressão do gene reduziram à metade na mutante *yap2Δ* quando comparada com a WT.

Todos esses dados sugerem que Yap2 está ativo quando a célula é induzida por cádmio e, como um fator de transcrição, estimula a expressão de genes-alvo, como *FRM2*, que atuam na célula em defesa contra o cádmio.

5.2. CAPÍTULO 2: RCK1 REGULA OS FATORES DE TRANSCRIÇÃO YAP1 E YAP2 EM RESPOSTA AO CÁDMIO

De acordo com os resultados acima (Capítulo1) Yap2 seria importante para defesa contra o cádmio: sua expressão é induzida fortemente em resposta ao metal, levando a indução de fatores de proteção relacionados ao metabolismo lipídico, Frm2. Como a via de sinalização em resposta ao cádmio regida por Yap1 está bem esclarecida na literatura e pouco se sabe sobre o papel de Yap2 na defesa contra este metal, neste capítulo buscou-se desvendar a via de sinalização celular em resposta ao cádmio que é orquestrada por Yap2, buscando possíveis genes e proteínas envolvidos nesse mecanismo regulatório.

Para identificar proteínas da via de sinalização ligada à Yap2, inicialmente usou-se a ferramenta de bioinformática STRING, que recupera interações entre genes/proteínas (interatomas). O nome “Yap2/Cad1” foi utilizado como isca para encontrar as proteínas que se relacionam com Yap2 e, dentre outras proteínas, a ferramenta mostrou uma interação a nível experimental entre Yap2 e a proteína Rck1 (Figura 17), com um escore de interação funcional de 0,735, considerado um nível alto de confiança.

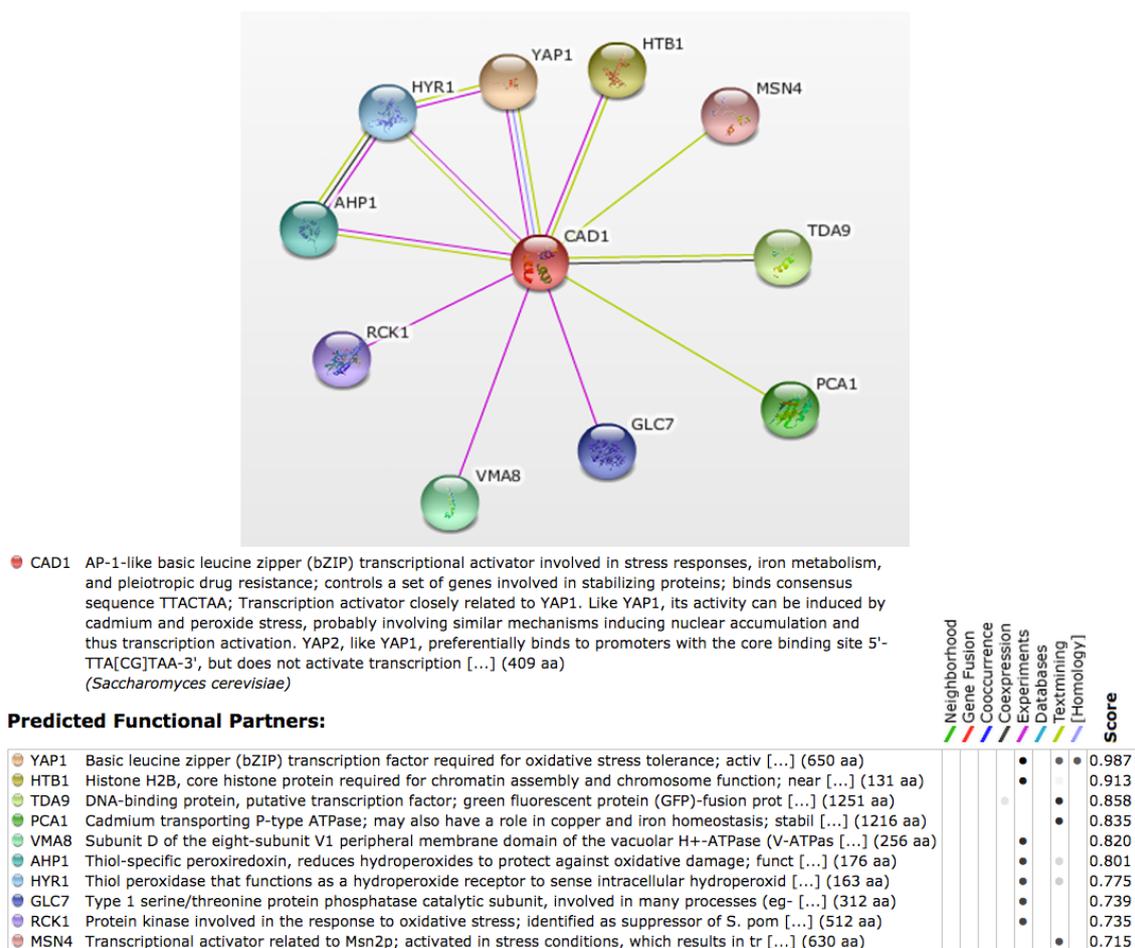


Fig. 17. Busca pelo interatoma ligado a Yap2 através da ferramenta de bioinformática STRING. (<http://string-db.org/> acessado em 14/05/2015). As cores das linhas significam as formas que a literatura apresenta a interação (linha rosa = experimental). As cores das esferas são as referências para as legendas que se encontram na parte inferior da figura com as especificações de cada proteína. Ao lado direito e inferior da figura estão os níveis de confiança dos escores de interação das proteínas com Yap2.

A pesquisa através da ferramenta trouxe à tona a publicação de Bilslund e colaboradores (2004), na qual apresenta a interação entre Yap2 e Rck1 em condições fisiológicas através dos ensaios de Duplo-Híbrido e Co-imunoprecipitação.

O gene *RCK1* foi primeiramente isolado de uma biblioteca genômica de *S. cerevisiae* pela sua habilidade de suprimir a sensibilidade à luz UV da mutante *rad1Δ* em *Schizosaccharomyces pombe* (Nasmyth e Tatchell 1980). A ORF *RCK1* encontrada

e sequenciada foi ligada à atividade de restauração da resistência à radiação e seu gene mostrou codificar a proteína cinase Rck1 de 58 kDa (Dahlkvist e Sunnerhagen 1994) da subfamília das MAP cinases. Quando, em 1990, Sunnerhagen e colaboradores construíram a mutante *rck1Δ* a partir da cepa W303-1A, analisaram a tolerância desta cepa à radiação e não verificaram qualquer alteração no perfil de resistência a radiação UV ou γ quando comparada com a WT. Além disso, também não observaram mudanças entre a mutante e a WT quando avaliadas taxa de crescimento, morfologia, meiose, esporulação, faixa de temperatura, sensibilidade osmótica e sensibilidade ao inibidor de mitose methylbenzimidazole-2-yl-carbamate (Sunnerhagen et al. 1990). Esse perfil de viabilidade inalterada contra diversos estressores deixou dúvidas ao longo dos anos quanto ao papel dessa cinase na resposta a tóxicos e mutagênicos.

5.2.1 Proteína Rck1 envolvida na resposta ao cádmio

Enquanto não havia uma função bem determinada para a proteína Rck1 em *S. cerevisiae*, Bilsland e colaboradores (2004) buscaram verificar o papel dessa proteína cinase na resposta ao estresse oxidativo, avaliando o perfil de crescimento da mutante *rck1Δ* na presença de outros estressores, como o tBOOH e cádmio. No entanto, os autores verificaram que Rck1 parecia estar envolvido apenas na resposta ao estresse por tBOOH, já que não mostrou sensibilidade ao cádmio.

O presente trabalho inicialmente buscou verificar se a proteína Rck1 possui algum papel na defesa contra o cádmio. Nesse sentido, foram feitas curva de crescimento e ensaio de sensibilidade ao cádmio utilizando as cepas WT e mutante *rck1Δ* na presença de 25 e 50 μ M de CdCl₂. Foi observado que, em condições fisiológicas, as duas cepas não apresentam diferenças no perfil de crescimento (Figura 18 A). Ambas as cepas tiveram o crescimento inibido pelo cádmio, mas este efeito foi mais pronunciado na WT (Figura 18 B e C).

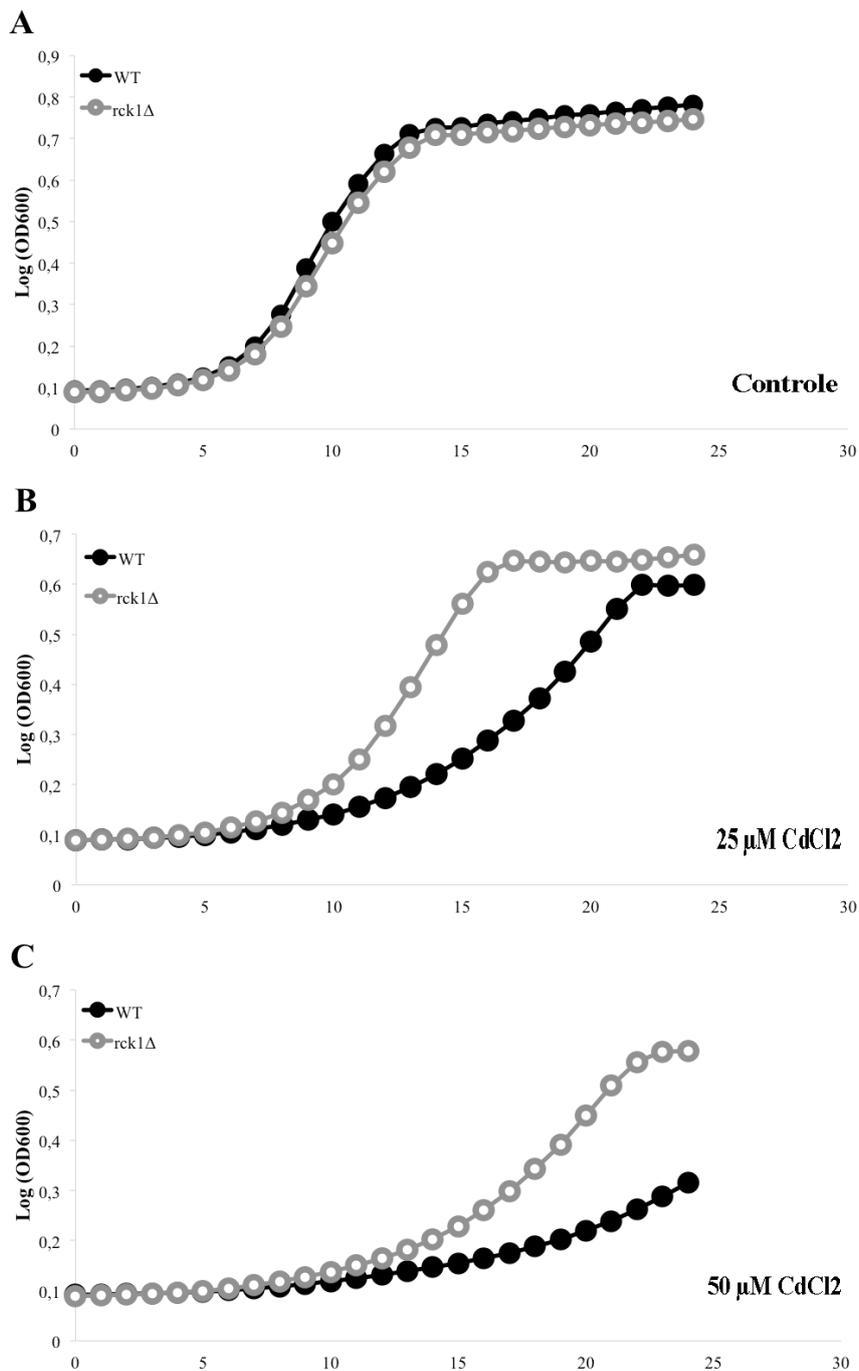


Fig. 18. Efeito do cádmio no crescimento celular da cepa mutante no gene *RCK1* de *S. cerevisiae*. Curva de crescimento da cepa WT (BY4742) e da mutante *rck1 Δ* em meio SC não induzido (A) e induzido com 25 μ M (B) e 50 μ M de CdCl₂ (C). As cepas foram cultivadas durante 25 horas a 30 °C e 200 rpm e a absorvância a 600 nm (OD_{600nm}) foi avaliada a cada hora.

Ainda, o perfil fenotípico de tolerância ao cádmio foi analisado através da técnica de *Replica Plate*. Sendo assim, as cepas foram submetidas a crescentes concentrações de CdCl_2 e os resultados apresentados na Figura 19 demonstram que a mutante *rck1Δ* mostra uma alta taxa de sobrevivência mesmo em altas concentrações de cádmio e tolera mais o estresse que a cepa WT. Também foi construída a dupla mutante *yap1Δrck1Δ* a fim de verificar se o perfil de resistência ao cádmio da mutante *rck1Δ* permanece em condições de alta toxicidade apresentada pela falta do gene *YAP1*. É possível observar que a mutante *yap1Δ* é altamente sensível ao cádmio, no entanto, quando *Rck1* é ausente nesta cepa (*yap1Δrck1Δ*), a torna mais tolerante ao estresse (Figura 19).

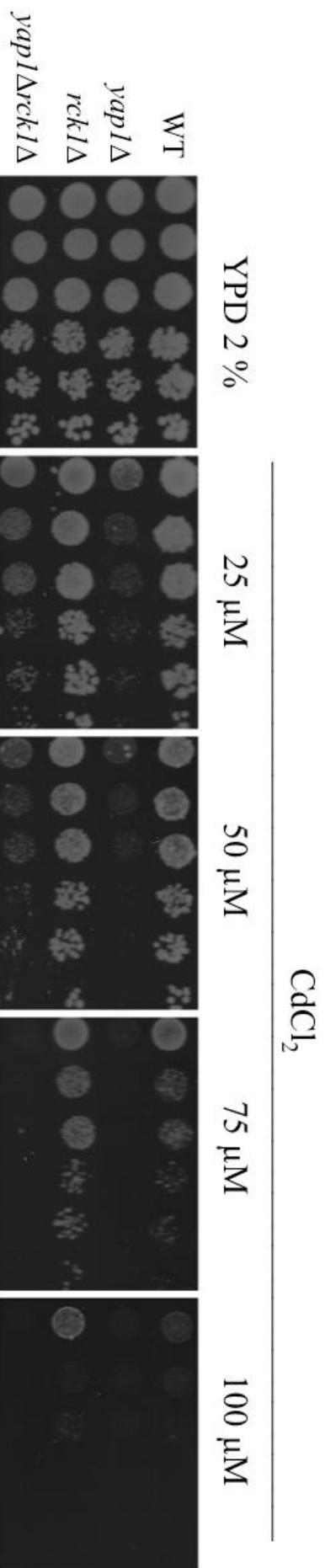


Fig. 19. Análise da tolerância ao cádmio das cepas mutantes no gene *RCK1* de *S. cerevisiae*. As cepas WT (BY4742), *yap1Δ*, *rck1Δ* e *yap1Δrck1Δ* foram cultivadas até a fase exponencial em glicose (meio YPD 2 %) e diluídas em série para serem colocadas em spots em placas contendo apenas meio YPD 2 % sólido e meio YPD 2 % sólido acrescido de elevadas concentrações de CdCl₂.

A partir dos resultados apresentados neste estudo, pode-se dizer que a mutante *rck1Δ* tem o mesmo perfil de crescimento que a WT em condições fisiológicas, mas apresenta um surpreendente perfil de resistência quando induzida com cádmio. Quando Bilslund e colaboradores (2004) analisaram o perfil de crescimento da mutante *rck1Δ*, verificaram apenas que esta cepa apresentou um crescimento mais lento comparado com a WT (W303-1A) na presença de 0,5 mM de tBOOH, enquanto que com 15 μM de Cd²⁺ não observaram diferença. Pode-se observar nos resultados dos autores que a mutante *rck1Δ* não foi sensível ao cádmio e que, no gráfico apresentado por eles, a linha que representa a mutante se localiza ligeiramente acima da linha da WT. É possível que, pelo fato de muitas outras cepas terem sido mostradas no mesmo gráfico, o eixo y (com a escala logarítmica que corresponde a leitura da OD) ficou mais condensado que o apresentado neste estudo e tenha mascarado a resistência da mutante *rck1Δ*.

Os resultados obtidos neste estudo pelo ensaio de tolerância confirmam e realçam, de um modo qualitativo, que a mutante *rck1Δ* mostra alta tolerância até a mais alta concentração de CdCl₂ apresentada.

A fim de verificar se o perfil de resistência ao estresse apresentado pela mutante *rck1Δ* permanece mesmo em condições de alta toxicidade de cádmio, foi construída a dupla mutante *yap1Δrck1Δ* de modo a simular altas concentrações intracelulares de cádmio e elevada toxicidade pela falta do gene *YAP1*. Optou-se por avaliar o efeito da falta de *RCK1* na mutante deficiente em *YAP1*, uma vez que está bem demonstrado na literatura a importância de Yap1 na defesa contra o cádmio ao regular a expressão de genes vitais, como *YCF1* (Li et al. 1997), *GSH1* (Que Moye-Rowley 1994), *GTT2* (Barreto et al. 2006) e *CUP1* (Gomes et al. 2005), dentre outros. Nesse sentido, foi possível constatar que a mutante *yap1Δ* é altamente sensível ao cádmio, porém, quando *RCK1* é retirado desta cepa para formar a dupla mutação *yap1Δrck1Δ*, a célula resgata parcialmente a tolerância que havia sido perdida na mutante simples *yap1Δ* (Figura 19).

Todos esses achados sugerem que, interessantemente, a falta do gene *RCK1* confere resistência celular à toxicidade do cádmio. Este fato, juntamente com os dados que comprovam a existência de interação entre Yap2 e Rck1 em condições fisiológicas, direcionou este estudo a pesquisar se Yap2 possui algum envolvimento no mecanismo de tolerância de *rck1Δ* ao cádmio.

No entanto, como a ausência de *RCK1* confere vantagem na sobrevivência celular na presença do cádmio, este estudo buscou avaliar se este metal interfere nos níveis proteicos de Rck1. Nesse sentido, *RCK1* foi ligado ao epítipo HA e os níveis dessa proteína foram avaliados na presença de 1 mM de CdCl₂ por Western blot. Como não foi possível detectar a expressão de Rck1 utilizando o promotor natural de *RCK1*, a fusão RCK1-HA foi inserida em um plasmídeo para estar sob o controle do promotor MET17, o qual é altamente induzido por cádmio e reprimido por metionina. Além disso, a quantificação da densitometria das bandas foi feita utilizando o Software Adobe® Photoshop® CS6 versão 13.0 x64. Para os tempos de indução com cádmio, o cálculo da densitometria real foi feito normalizando a densitometria absoluta das bandas de Rck1-HA pela densitometria absoluta do controle interno Pgk1.

Os resultados apresentados na Figura 20 A e B mostram que os níveis da proteína Rck1 não variam de forma significativa no decorrer do tempo de indução com cádmio, sugerindo que o metal não afeta os níveis proteicos de Rck1.

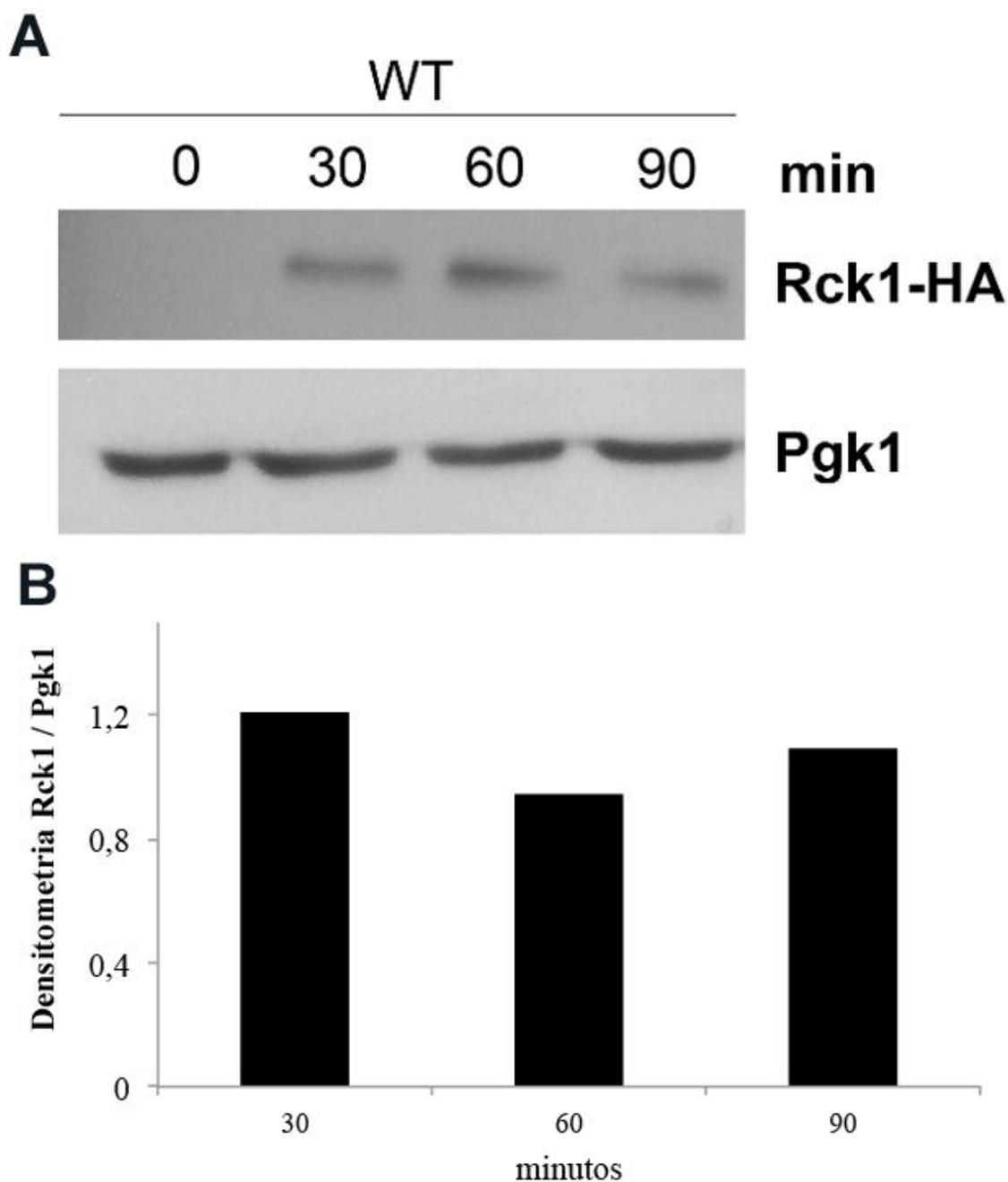


Fig. 20. Efeito do cádmio no nível da proteína Rck1. (A) Células da cepa WT (BY4742) transformadas com vetor contendo Rck1-HA foram tratadas ou não com 1 mM de CdCl₂, coletadas conforme os tempos indicados e analisadas por Western blot. A proteína Pgk1 foi utilizada como controle interno. (B) Os níveis da proteína Rck1 foram quantificados e normalizados com o controle interno Pgk1.

Além disso, pelo fato da mutante *rck1Δ* demonstrar um fenótipo de resistência ao estresse, a ausência da expressão da proteína Rck1 poderia ter afetado os níveis intracelulares de cádmio na levedura. Assim, o conteúdo de cádmio dentro da célula foi analisado por ICP-MS após exposição das cepas a 25 μM de CdCl₂ durante 6 horas. A Tabela 8 mostra que a mutante *rck1Δ* teve o conteúdo de cádmio levemente menor que a cepa WT ($p < 0,05$). Não houve diferença no conteúdo intracelular de cádmio entre as cepas mutantes *rck1Δ* e *yap2Δrck1Δ*.

Tabela 8. Conteúdo intracelular de cádmio (ICP-MS)

Cepa	Cd nmol/10 ³ células
WT	3,647 ± 0,027
<i>yap2Δ</i>	3,683 ± 0,076
<i>rck1Δ</i>	3,018 ± 0,214
<i>yap2Δrck1Δ</i>	3,018 ± 0,012

Interessantemente, a ausência do gene *RCK1* causou significativa diminuição no conteúdo intracelular de cádmio, no entanto esse mecanismo não pode ser relacionado com o fator de transcrição Yap2. É provável que Rck1 interfira no conteúdo intracelular de cádmio regulando outro fator de transcrição ou transportador de membrana.

Caetano e colaboradores (2015) verificaram que Yap1 controla a entrada de cádmio em *S. cerevisiae*. Inicialmente, Jensen e Culotta (2002) mostraram que Rox1 é um regulador negativo de Fet4, um transportador de baixa afinidade de ferro, e em condições aeróbicas, Rox1 minimiza a toxicidade por cádmio. Os autores mostraram que a mutante *rox1Δ* causou um aumento da sensibilidade ao cádmio, uma vez que levou a perda da repressão e, conseqüentemente, maior indução de Fet4, além disso, a ausência de *FET4* diminuiu a toxicidade causada por este metal. Nesse contexto, Caetano e colaboradores (2015) verificaram que Yap1 controla positivamente o gene

ROX1, o repressor de *FET4*. Com isso, por intermédio de Rox1, Yap1 regula a entrada de cádmio na célula através do controle negativo de Fet4 e esse mecanismo serve como proteção contra a toxicidade do cádmio em *S. cerevisiae*.

Apesar de não haver dados na literatura mostrando o envolvimento de Rck1 com Yap1, é possível que exista uma relação entre essas duas proteínas na regulação da entrada de cádmio na célula. No entanto, neste estudo não foi possível dar respostas à esta questão.

5.2.2. Yap1 e Yap2 medeiam a resistência da mutante *rck1Δ* ao cádmio

Mesmo que a existência da interação entre Yap2 e Rck1 já tenha sido comprovada anteriormente, o impacto dessa interação, principalmente na presença de estresse ainda precisa ser elucidado. Para entender se Yap2 possui algum papel intermediador na resistência de *rck1Δ* ao cádmio, primeiramente o perfil fenotípico das cepas foi verificado em diversas concentrações de cádmio no ensaio de tolerância por *Replica Plate*. Os resultados demonstram que a cepa dupla mutante *yap2Δrck1Δ* mostrou maior resistência que a mutante *yap2Δ* (Figura 21 B), além disso a dupla mutante *yap1Δrck1Δ* foi mais resistente que a cepa *yap1Δ* (Figura 21 A e B). Pode-se observar também que a mutante simples *yap1Δ* e a dupla mutante *yap1Δyap2Δ* possuem o mesmo perfil de sensibilidade ao cádmio que a tripla mutante *yap1Δyap2Δrck1Δ* (Figura 21 A e B).

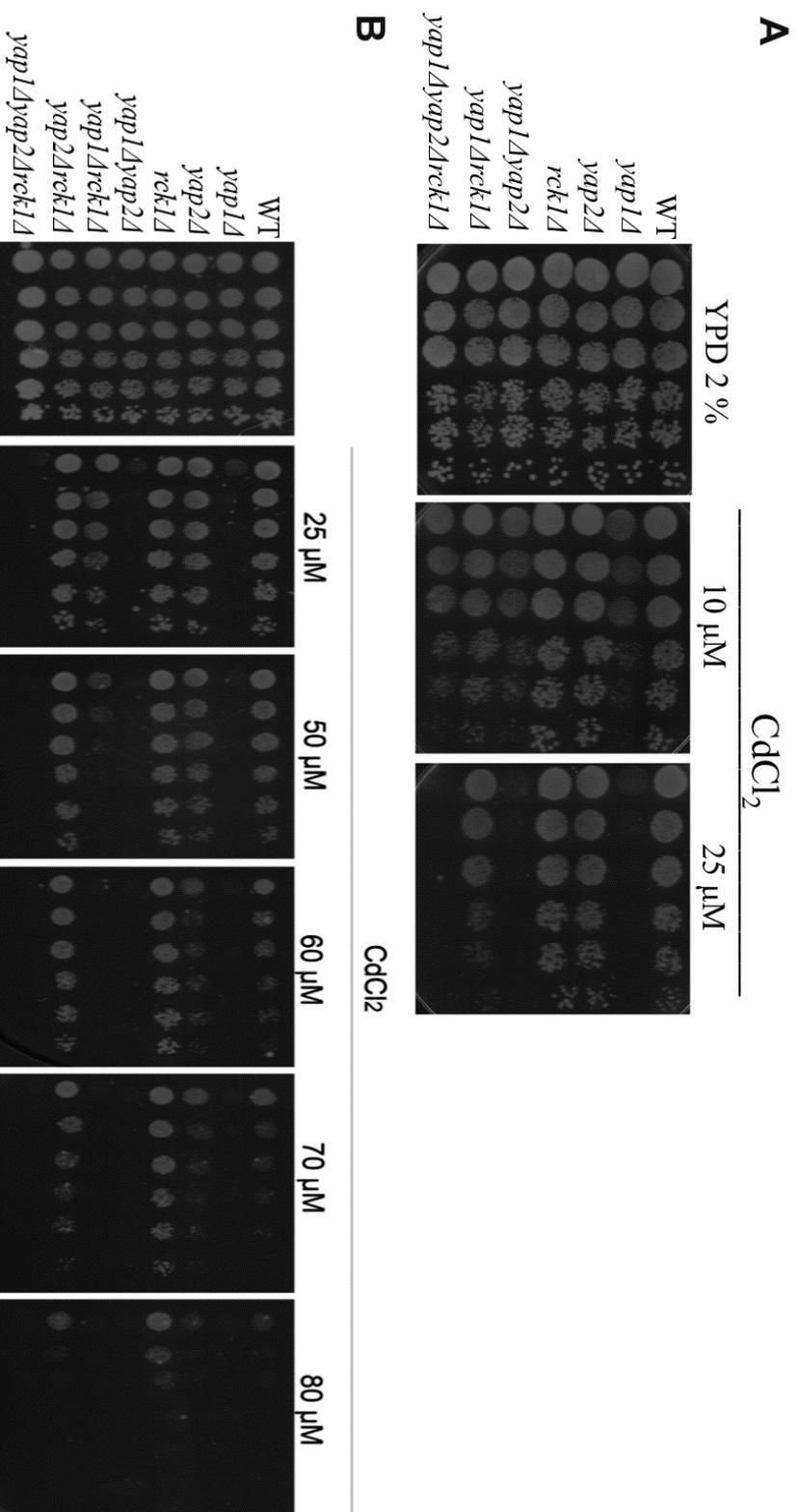


Fig. 21. Análise da tolerância ao cádmio das duplas e tripla mutantes construídas neste estudo. As cepas WT (BY4742), *yap1 Δ* , *yap2 Δ* , *rck1 Δ* , *yap1 Δ yap2 Δ* , *yap1 Δ rck1 Δ* , *rck1 Δ* , *yap1 Δ yap2 Δ* , *yap1 Δ rck1 Δ* e *yap1 Δ yap2 Δ rck1 Δ* (B) foram cultivadas até a fase exponencial em glicose (meio YPD 2 %) e diluídas em série para serem colocadas em spots em placas contendo apenas meio YPD 2 % sólido e meio YPD 2 % sólido acrescido de elevadas concentrações de CdCl_2 . As células foram crescidas a 30 °C durante 48 horas.

A partir dos resultados apresentados acima, este estudo sugere novas funções regulatórias para a proteína Rck1.

De acordo com os dados apresentados, a maior tolerância ao cádmio da mutante *rck1Δ* foi perdida quando o gene *YAP2* foi retirado desta cepa, o que pode ser observado quando comparada a dupla mutante *yap2Δrck1Δ* com a mutante *rck1Δ* (Figura 21 B). Este resultado sugere que Yap2 pode mediar a resistência ao cádmio conferida pela mutante *rck1Δ*. Esse dado ainda pode ser confirmado com os resultados apresentados na Figura 21 A e B, uma vez que a deleção de *RCK1* na mutante *yap1Δ* aumentou a tolerância ao cádmio, mas a retirada do gene *YAP2* dessa cepa (*yap1Δyap2Δrck1Δ*) não foi capaz de aumentar a tolerância ao metal. O mesmo pode ser sugerido sobre Yap1, pois com a retirada do gene *YAP1* da cepa mutante *rck1Δ* a tolerância ao cádmio é perdida. Desse modo, pode-se pensar que Rck1 tenha um papel regulatório sobre Yap1 e Yap2 e influencie sobrevivência celular frente ao estresse provocado pelo cádmio.

Existem dados na literatura apontando que alguns fatores de transcrição da Família Yap têm as suas atividades prejudicadas por cinases. Fernandes e colaboradores (1997) mostraram que a proteína cinase A (PKA) inibe a atividade de alguns fatores de transcrição da Família Yap – Yap1, Yap2 e Yap3 – verificando que, em condições fisiológicas, a atividade transcricional, os níveis de RNAm e de proteína são reduzidos por esta proteína cinase. Outro estudo verificou que a via de sinalização em resposta ao estresse oxidativo regulada por Yap1 é prejudicada pela PKA (Charizanis et al. 1999).

Nesse contexto, a fim de verificar se a cinase Rck1 modula a atividade de Yap2, foi testado se esta proteína interfere na indução do gene-alvo de Yap2. Dessa maneira, a realização de qRT-PCR permitiu monitorar a expressão de *FRM2* após a indução com 1 mM de CdCl_2 durante 30 minutos. A Figura 22 mostra que a expressão de *FRM2* aumenta significativamente após indução com cádmio em uma mutante *rck1Δ*, assim, os resultados indicam que este gene é fortemente induzido na ausência do gene *RCK1*. A dupla mutante *yap2Δrck1Δ* também demonstra um aumento significativo na indução de *FRM2* após o estresse com cádmio, porém, o aumento foi relativamente menor que o observado na mutante *rck1Δ*.

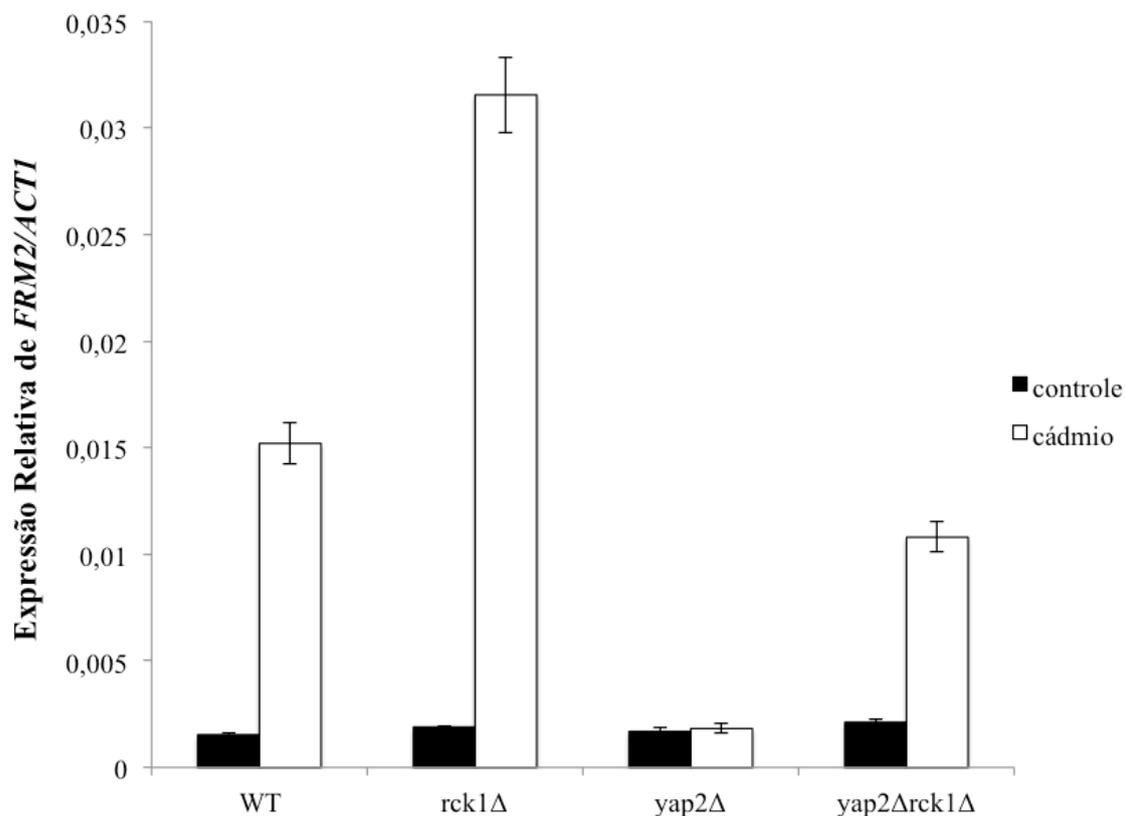


Fig. 22. Análise do efeito do cádmio e do envolvimento de Rck1 na atividade de Yap2 e expressão de RNAm de *FRM2*. A expressão relativa de *FRM2* foi avaliada por qRT-PCR nas cepas WT (BY4742), *rck1Δ*, *yap2Δ* e *yap2Δrck1Δ* sem indução (barras pretas, situação controle, sem estresse) e com indução de 1 mM de CdCl₂ (barras brancas, cádmio) por 30 minutos. Os valores apresentados são média e desvio padrão de triplicatas biológicas. Os resultados tiveram diferença estatisticamente significativa entre a situação controle e a situação com cádmio ($p < 0,0001$).

Através dos resultados obtidos com esse experimento, foi possível demonstrar que Rck1 possui um papel inibitório sobre a atividade de Yap2, uma vez que a ausência de *RCK1* levou a maior indução de Yap2, aumentando de forma importante os níveis do seu gene-alvo *FRM2*.

Dados apresentados na literatura comprovam que Rck1 possui um papel inibitório em algumas proteínas envolvidas com o estresse. Chang e colaboradores (2013) mostraram, através da análise pela técnica de Microarranjo, que a

superexpressão de *RCK1* provocou a diminuição da expressão de Ptp2, Bck1, Mkk1 e Pkc1, as quais são MAP cinases da via HOG de *S. cerevisiae* que respondem ao estresse osmótico. No entanto, os autores não respondem como ou porquê esse mecanismo inibitório ocorre.

Embora não exista qualquer evidência na literatura sobre Rck1 regular negativamente algum fator de transcrição da Família Yap em *S. cerevisiae*, este estudo procurou investigar como ocorre o mecanismo inibitório de Rck1 sobre Yap2.

5.2.3. Rck1 parece não afetar a fosforilação e a expressão de YAP2/Yap2

Como Rck1 é uma proteína cinase, foi analisado se o potencial de fosforilação de Yap2 é prejudicado por Rck1. Para isso, as células foram tratadas ou não com a fosfatase alcalina CIP, uma vez que essa enzima remove fosfatos de resíduos em proteínas. Assim, pode-se notar que a proteína Yap2 parece ser altamente fosforilada quando submetida a 1 mM de CdCl₂ por 1 hora, visto que o padrão de bandas que aparecem no Western blot somem após o tratamento com a fosfatase alcalina. No entanto, a falta de Rck1 não pareceu alterar o padrão de fosforilação da proteína Yap2 (Figura 23).

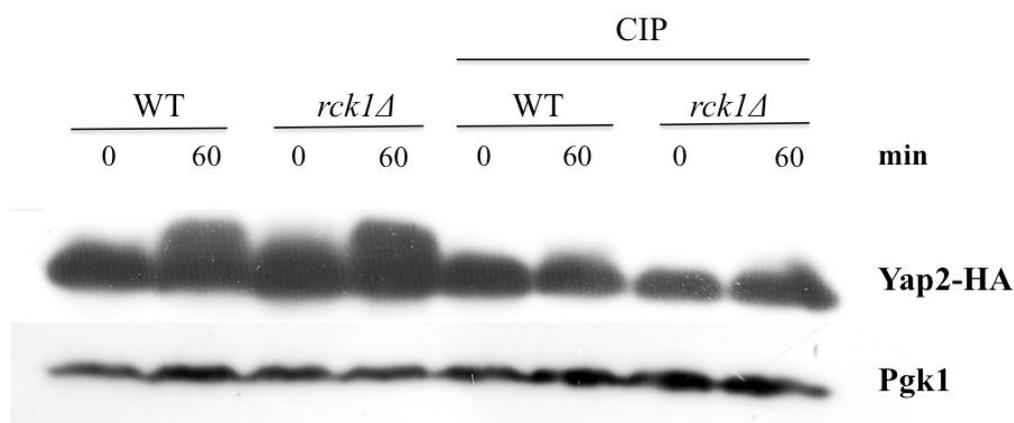


Fig. 23. Análise do efeito do cádmio e do envolvimento de Rck1 na fosforilação de Yap2. Células da cepa WT (BY4742) e *rck1Δ* transformadas com o vetor contendo Yap2-HA foram tratadas ou não com 1 mM de CdCl₂ por 1 hora e analisadas por Western blot. O extrato proteico foi tratado ou não em paralelo com fosfatase alcalina CIP para analisar o padrão de fosforilação de Yap2-HA. A proteína Pgk1 foi utilizada como controle interno.

Os resultados deste estudo sugerem que Yap2 é altamente fosforilado em condições de estresse por cádmio e que o aumento das bandas após a indução com cádmio na Figura 14 B, nos resultados mostrados anteriormente são, provavelmente, causados por fosforilação. Em contrapartida, não existem dados na literatura que indiquem cinases com potencial de fosforilar Yap2 e esta é a primeira vez que um trabalho mostra que Yap2 é fosforilado após indução com cádmio. Através da análise pela ferramenta PHOSIDA (<http://phosida.com>; data: 28/03/2014), um banco de dados que faz predições de sítios de fosforilação, pôde-se verificar que Yap2 possui apenas um sítio de fosforilação em *S. cerevisiae*, uma serina na posição 151, localizada em um peptídeo com sequência que pode ser reconhecida e fosforilada por uma caseína cinase do tipo I. Segundo dados encontrados na ferramenta SGD, em *S. cerevisiae* existem três caseínas cinases – Yck1, Yck2 e Yck3 – no entanto, não foi encontrada na literatura interação direta entre essas caseínas cinases e a proteína Yap2. Além disso, este estudo não verificou uma relação entre o peptídeo fosforilado de Yap2 com Rck1.

A literatura aponta que Rck1 possui um papel inibitório sobre a função de fosforilação de outras proteínas. Quando superexpresso, *RCK1* inibe a fosforilação da proteína Mkk2, uma MAP cinase que fosforila Slt2 na via HOG de resposta ao estresse (Chang et al. 2013).

Nesse sentido, como não foi possível encontrar relação direta que aponte regulação negativa de Yap2 através de fosforilação por Rck1, este estudo manteve-se focado em desvendar como Rck1 afeta a atividade de Yap2, e não aprofundou a busca por proteínas que pudessem estar envolvidas em uma via de fosforilação em resposta ao estresse.

Assim, buscou-se saber se Rck1 interfere na expressão de *YAP2* e, para esse fim, foi feita análise de expressão de RNAm de *YAP2* por qRT-PCR nas cepas WT e *rck1Δ*.

A expressão de RNAm de *YAP2* foi analisada após a exposição das cepas a 1 mM de CdCl₂ durante 30 e 60 minutos. Os resultados mostram que os níveis de RNAm de *YAP2* aumentam significativamente após a indução com cádmio, mas não houve diferença entre o aumento observado quando comparadas as duas cepas (Figura 24).

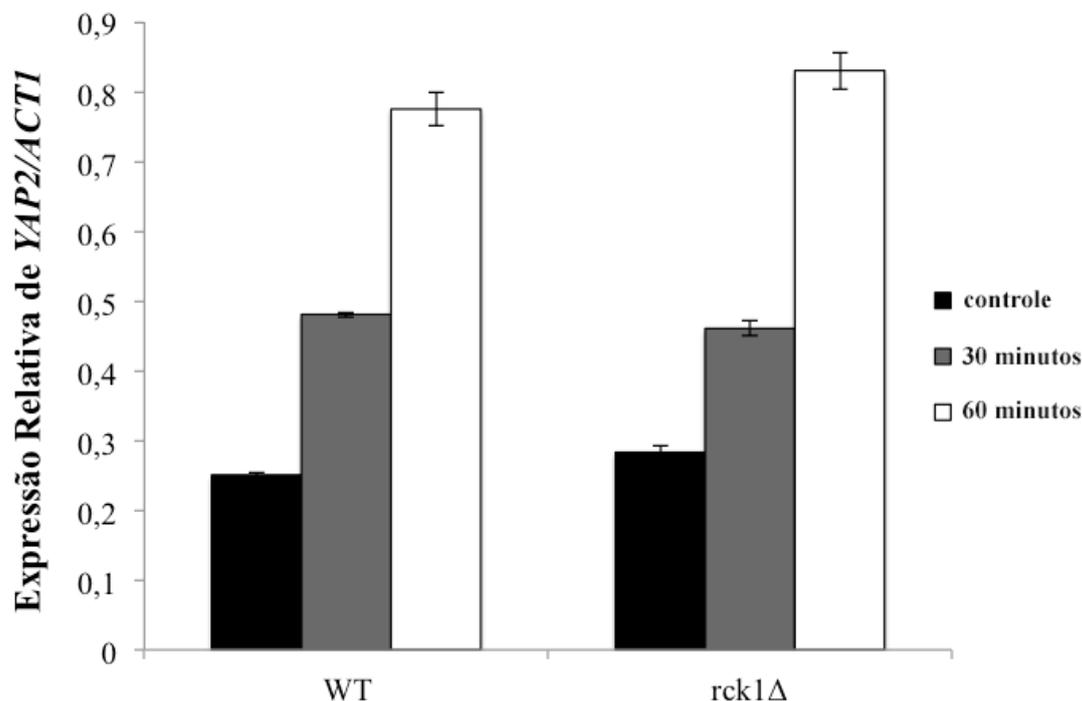


Fig. 24. Análise do efeito do cádmio e do envolvimento de Rck1 na expressão de RNAm de YAP2. A expressão relativa de YAP2 foi avaliada por qRT-PCR nas cepas WT (BY4742) e *rck1Δ* sem indução (barras pretas, situação controle, sem estresse), com indução de 1 mM de CdCl₂ por 30 minutos (barras cinzas) e por 60 minutos (barras brancas). Os valores apresentados são média e desvio padrão de triplicatas biológicas. Os resultados tiveram diferença estatisticamente significativa entre a situação controle e a situação com cádmio ($p < 0,0001$).

Corroborando com os resultados anteriores que mostraram que a falta do gene *RCK1* não altera a expressão proteica de Yap2, na Figura 24 pode ser visto que o estresse causado pelo cádmio aumenta a expressão de YAP2, no entanto, a expressão ocorre de forma independente de Rck1.

Por outro lado, muitos genes e proteínas da via HOG de resposta ao estresse possuem redução importante nas suas expressões quando *RCK1* é superexpresso. Assim, a expressão de Ptp2 é inibida por Rck1, sendo que esta proteína é um regulador negativo de Hog1, a qual é uma cinase com importante função na resposta ao estresse osmótico e, conseqüentemente, Hog1 também teve sua expressão diminuída nessas

condições. Proteínas importantes na via de integridade da parede celular (CWI – *Cell Wall Integrity*), como Kdx1 e Slt2, também tem sua expressão reduzida quando *RCK1* é superexpresso (Chang et al. 2013).

Apesar de Rck1 ter um papel negativo e direto na expressão de algumas proteínas responsáveis pela resposta ao estresse osmótico e na integridade da parede, não parece interferir na expressão de *YAP2* em resposta ao estresse por cádmio.

5.2.4. Rck1 diminui a estabilidade e o tempo de meia-vida de Yap2

Ainda com a finalidade de entender como Rck1 afeta a atividade de Yap2, buscou-se saber se Rck1 interfere na estabilidade e se altera o tempo de meia-vida da proteína Yap2 na resposta ao cádmio.

Para este fim, o experimento baseou-se na indução com cádmio e CHX, esta última muito utilizada como ferramenta experimental pelo seu potencial de inibição da biossíntese proteica em eucariotos. A CHX é uma molécula produzida pela bactéria *Streptomyces griseus* e, pelo seu efeito no bloqueio da fase de alongamento durante a tradução, tem sido aplicada em estudos para determinar a meia-vida de proteínas.

Primeiramente, foi verificado se Rck1 afeta a degradação de Yap2-HA, assim, as células foram induzidas com cádmio durante 10 minutos, a síntese proteica foi inibida com CHX e a cinética de tempo de indução com os estressores foi analisada através de Western blot.

Os resultados apresentados na figura 25 A apontam que Yap2 começa a ser degradado antes na cepa WT quando comparado com a mutante *rck1Δ*.

Para complementar esses dados, o tempo de meia-vida de Yap2-HA foi calculado nas duas cepas e os resultados apresentados na Figura 25 B mostram que o *turnover* de Yap2 é claramente mais lento (meia-vida de 158 minutos) na mutante *rck1Δ* quando comparado a WT (meia-vida de 84 minutos).

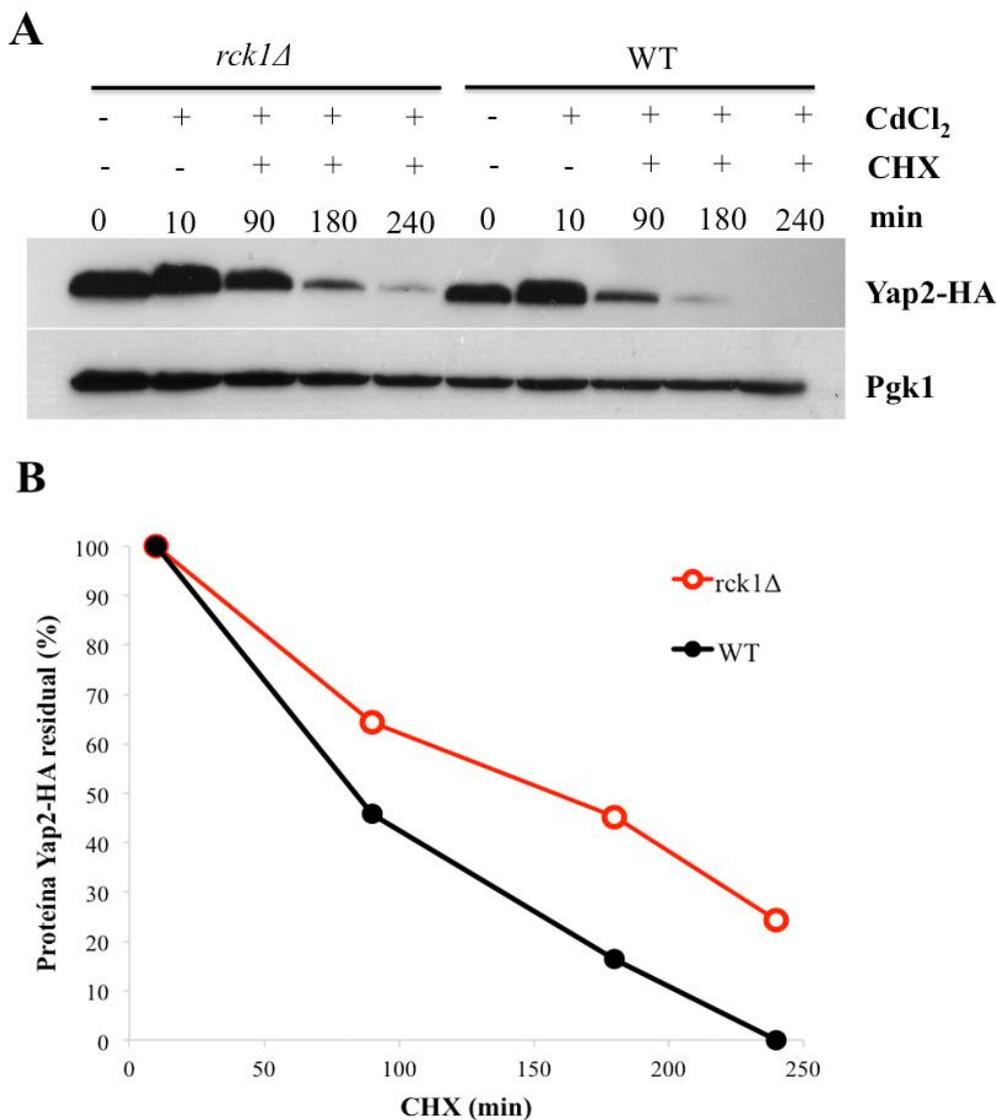


Fig. 25. Análise do efeito do cádmio e do envolvimento de Rck1 na estabilidade e no tempo de meia-vida da proteína Yap2. A) A estabilidade da proteína Yap2 foi avaliada por Western blot após as cepas WT (BY4742) e *rck1Δ*, transformadas com o plasmídeo contendo Yap2-HA, serem tratadas ou não com 1 mM de CdCl₂ por 10 minutos, expostas a 100 µg/mL de CHX e coletadas conforme os tempos indicados. A proteína Pgk1 foi utilizada como controle interno. B) O gráfico representa a porcentagem de proteína Yap2-HA residual após a adição de cádmio e CHX.

A partir desses achados, é possível afirmar que Rck1 possui influência na estabilidade da proteína Yap2, uma vez que a falta do gene *RCK1* causou menor

degradação de Yap2 e, como consequência, o tempo de meia vida dessa proteína se tornou maior na mutante em condições de estresse por cádmio. Esse dado explica o fato pelo qual a mutante *rck1Δ* torna Yap2 mais ativo em resposta ao estresse causado pelo cádmio.

5.2.5. A exportação nuclear de Yap2 é afetada por Rck1

Como cádmio estimula o acúmulo de Yap2 no núcleo para que ative seus genes-alvo como mecanismo de defesa, este estudo também avaliou a cinética de localização celular de Yap2 nas cepas WT e *rck1Δ*. Esse ensaio foi realizado analisando as células com microscopia de fluorescência a partir de cepas que continham o gene *YAP2* ligado a proteína verde fluorescente GFP.

A análise mostrou que a proteína Yap2 permanece mais tempo no núcleo na mutante *rck1Δ* que na WT. Pode-se notar na Figura 26 que a proteína Yap2 se desloca para o núcleo no tempo de 15 minutos de estresse com cádmio nas duas cepas. Com 120 minutos de indução, algumas células já apresentam fluorescência mais difusa na WT, enquanto a mutante *rck1Δ* ainda apresenta fluorescência estritamente nuclear. Aos 180 minutos, Yap2 já se encontra distribuído entre núcleo e citoplasma na WT, ao passo que Yap2 permanece no núcleo na ausência de *RCK1* até 240 minutos de estresse com cádmio.

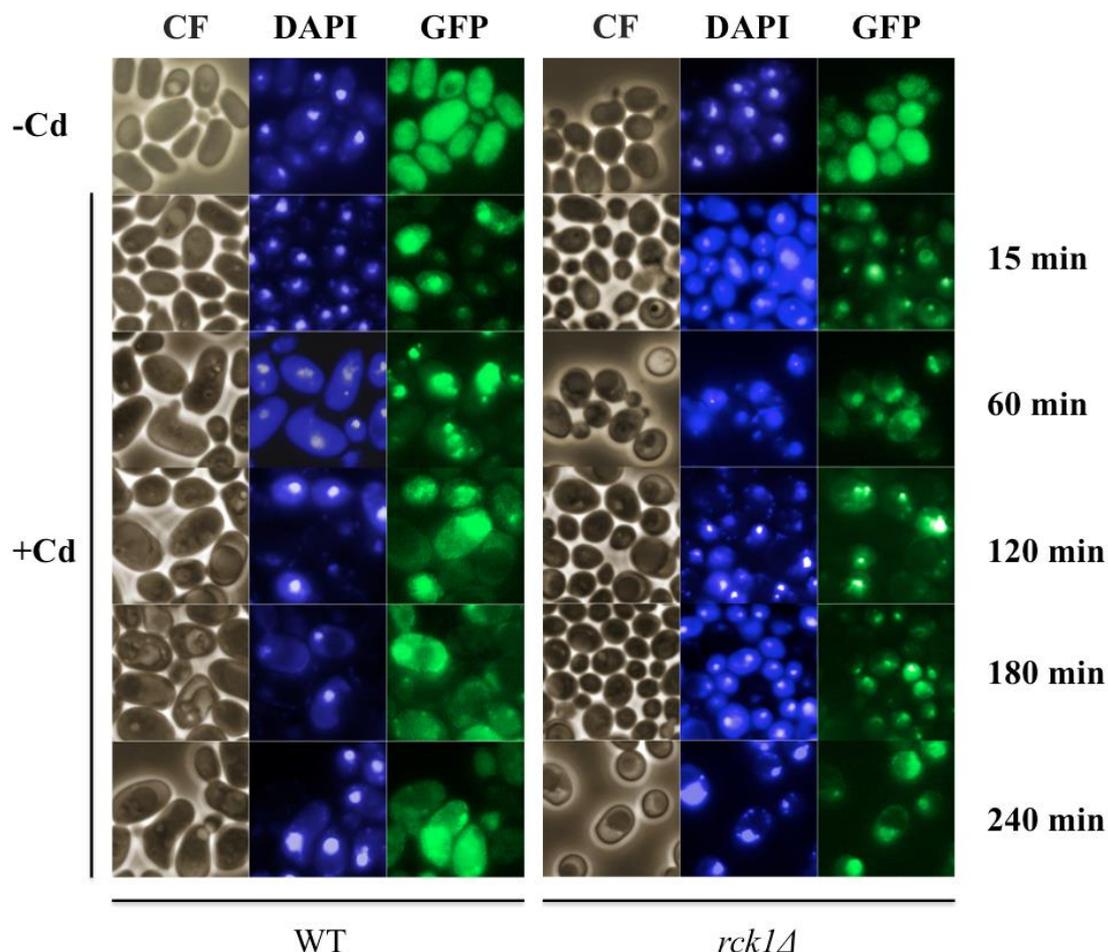


Fig. 26. Análise do efeito do cádmio e do envolvimento de Rck1 na localização celular de Yap2. As cepas WT (FY1679-01B) e *rck1Δ* expressando *YAP2* fusionado ao GFP, foram crescidas em meio SD-LEU sem indução (-Cd) e com indução de 1 mM de CdCl_2 (+Cd), coletadas nos tempos indicados e analisadas por microscopia de fluorescência. CF, contraste de fase; DAPI, marcação do núcleo; GFP, fluorescência.

É sabido que, com o estímulo do cádmio, Yap2 desloca para o núcleo e, após aproximadamente duas horas, retorna para o citoplasma (Azevedo et al. 2007; Bilsland et al. 2004). O mecanismo de defesa contra o cádmio realizado pelo fator de transcrição Yap2 depende da sua localização nuclear ativando seus genes-alvo na resposta ao estresse. Quando o estresse cessa, Yap2 volta para o citoplasma através da proteína de membrana nuclear Crm1 que reconhece o NES de Yap2 (Azevedo et al. 2007). No presente estudo foi verificado que a fluorescência passa a ser difusa nas células da cepa

WT a partir de 120 minutos de estresse com cádmio. Interessantemente, os resultados comprovam que Rck1 influencia a localização celular de Yap2, uma vez que foi mostrado que o retorno de Yap2 para o citoplasma é atrasado na mutante *rck1Δ*.

Como Rck1 afeta o retorno de Yap2 para o citoplasma, inicialmente pensou-se que Rck1 pudesse alterar a conformação da proteína Yap2 e, assim, pudesse indiretamente mascarar o NES que seria reconhecido por Crm1, tornando a exportação de Yap2 prejudicada. No entanto, Rck1 não interfere na fosforilação de Yap2 e, portanto, não poderia alterar a conformação desta proteína. Este estudo não realizou mais experimentos a fim de desvendar de que forma Rck1 afeta o deslocamento de Yap2 para o citoplasma, sugere-se que futuros trabalhos sejam realizados a fim de verificar se tal hipótese procede.

Os achados desse estudo apresentam um papel de Rck1 como inibidor da atividade de Yap2. Foi mostrado que Rck1 reduz o tempo de meia-vida da proteína Yap2, encurtando o período de tempo que Yap2 permanece no núcleo, assim, esse fator de transcrição tem sua função de indução de genes de defesa contra o cádmio prejudicada. Dessa forma, o prolongado tempo de meia-vida apresentado pela mutante *rck1Δ* pode ser uma consequência do ineficiente deslocamento de Yap2 para o citoplasma, uma vez que a degradação de Yap2 ocorre no citoplasma.

Como Yap2, Yap1 também se desloca para o núcleo na presença do cádmio para ativar seus genes-alvo importantes na defesa contra o estresse. Desse modo, buscou-se saber se Rck1 interfere na localização celular do fator de transcrição Yap1.

A cinética de localização de Yap1 nas cepas WT e *rck1Δ* foi avaliada e o ensaio utilizou de microscopia de fluorescência para visualizar as células contendo o gene *YAP1* ligado a proteína verde fluorescente GFP.

Os dados apresentados na Figura 27 indicam que aos 15 minutos *YAP1* está parcialmente no núcleo e aos 30 minutos pode-se verificar o seu acúmulo nuclear. Com 90 minutos de indução com cádmio, *YAP1* se encontra novamente no citoplasma. Não foi possível observar diferenças de localização celular de *YAP1* entre as cepas WT e *rck1Δ*.

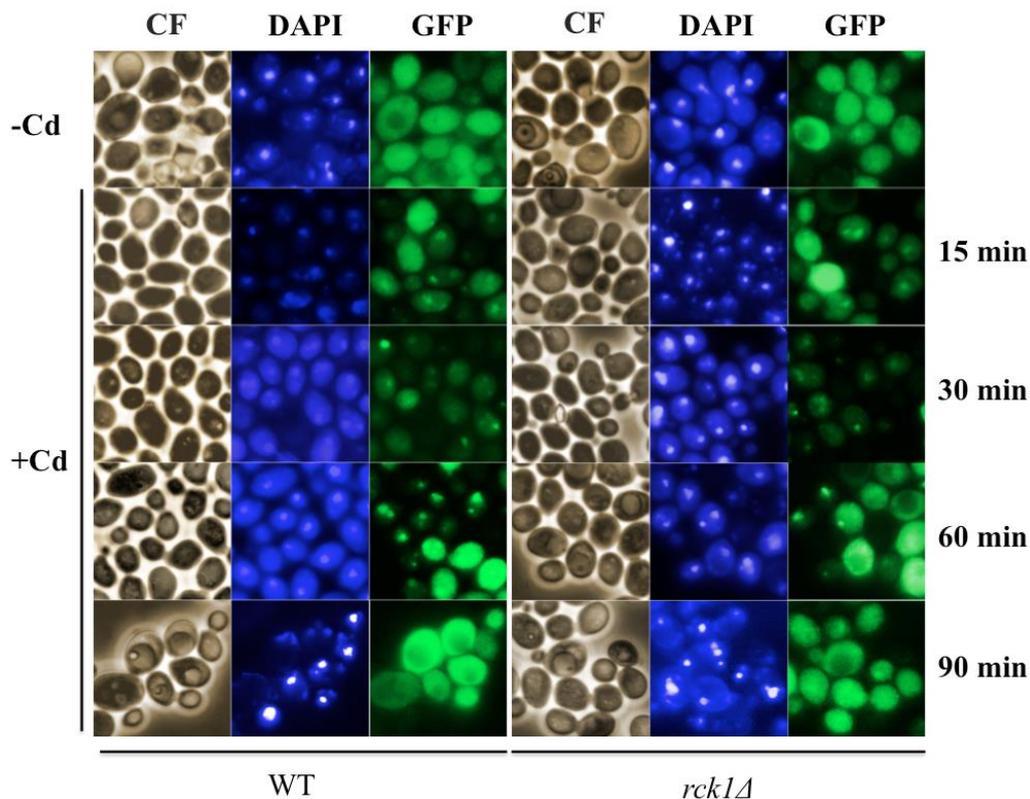


Fig. 27. Análise do efeito do cádmio e do envolvimento de Rck1 na localização celular de Yap1. As cepas WT (FY1679-01B) e *rck1Δ* expressando *YAP1* fusionado ao GFP, foram crescidas em meio SD-TRP sem indução (-Cd) e com indução de 1 mM de CdCl₂ (+Cd), coletadas nos tempos indicados e analisadas por microscopia de fluorescência. CF, contraste de fase; DAPI, marcação do núcleo; GFP, fluorescência.

Os resultados obtidos a partir do ensaio de localização celular mostraram que Rck1 não parece afetar o deslocamento nuclear de Yap1, uma vez que Yap1 tem o mesmo perfil de distribuição de fluorescência na cepa WT e na mutante *rck1Δ*.

Apesar de Rck1 não alterar o padrão de localização celular de Yap1, este estudo buscou saber se essa cinase possui algum efeito sobre Yap1 através de mecanismos de fosforilação e/ou nos seus níveis proteicos.

5.2.6. Rck1 interfere na expressão e na estabilidade de Yap1

Para verificar se existe relação entre Yap1 e Rck1, este trabalho verificou se Rck1 interfere no potencial de fosforilação, nos níveis de proteína e na estabilidade de Yap1. Para avaliar a expressão proteica e a fosforilação de Yap1 nas cepas WT e *rck1Δ* por Western blot, as células foram induzidas ou não com 1 mM de CdCl₂ por 1 hora e tratadas ou não com a fosfatase alcalina CIP (Figura 28 A). Também foi verificado se Rck1 afeta a estabilidade da proteína Yap1, desta forma, as células foram induzidas com cádmio durante 10 minutos, a síntese proteica foi inibida com CHX e a cinética de tempo de indução com os estressores foi analisada através de Western blot (Figura 28 B).

Como pode ser visto na Figura 28 A, o resultado indica que cádmio não ativa a fosforilação de Yap1. Por outro lado, a mutante *rck1Δ* apresentou menores níveis de expressão proteica (Figura 28 A) e menor estabilidade da proteína Yap1 (Figura 28 B).

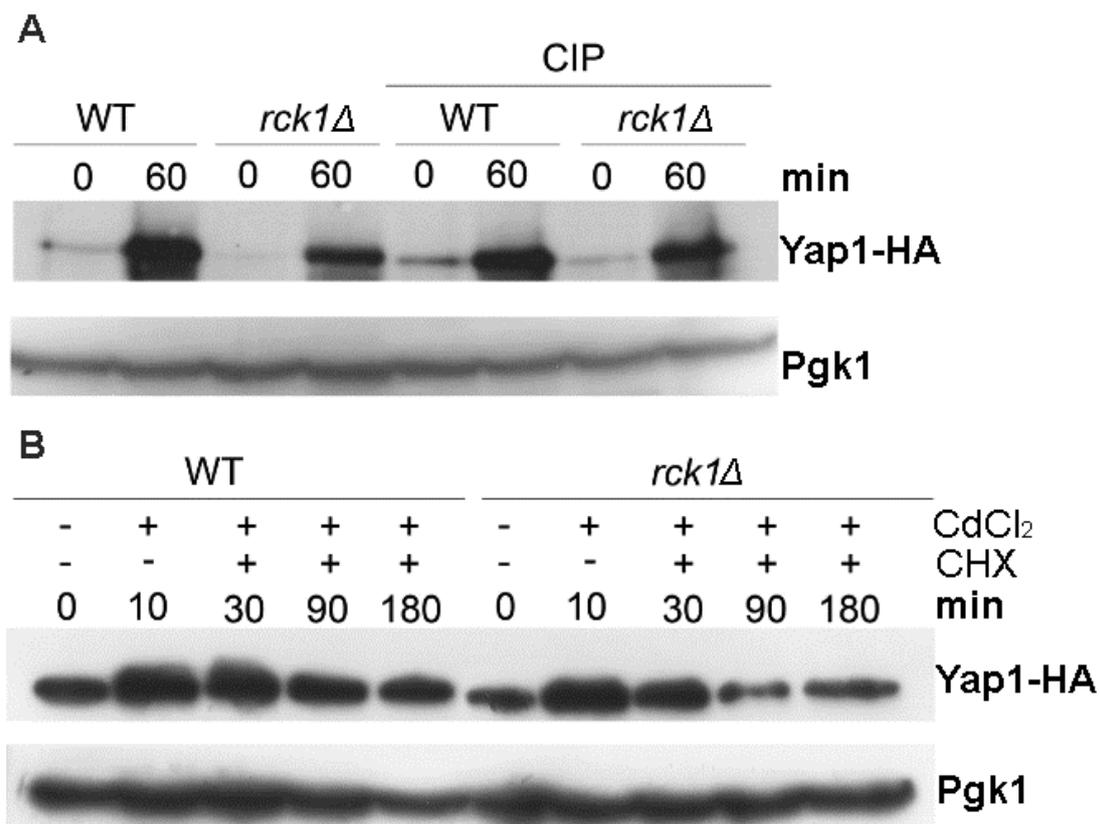


Fig. 28. Análise do efeito do cádmio e do envolvimento de Rck1 na fosforilação, no nível da proteína e na estabilidade da proteína Yap1. As cepas WT (BY4742) e *rck1Δ* transformadas com o vetor contendo Yap1-HA. A) As células foram tratadas ou não com 1 mM de CdCl₂ por 1 hora, o extrato proteico foi tratado ou não em paralelo com fosfatase alcalina CIP para analisar o padrão de fosforilação de Yap1-HA. B) As células foram tratadas ou não com 1 mM de CdCl₂ por 10 minutos, expostas a 100 µg/mL de CHX e coletadas conforme os tempos indicados. As amostras foram analisadas por Western blot e a proteína Pgk1 foi utilizada como controle interno.

Não existe nenhuma interação entre Yap1 e Rck1 descrita na literatura, nem mesmo quando a análise de interação entre proteínas é feita pela ferramenta de bioinformática STRING, a qual também mostra proteínas citadas ao mesmo tempo em uma mesma publicação. Esse resultado é o primeiro a demonstrar uma relação entre Yap1 e Rck1.

Interessantemente, neste trabalho foi verificado que, diferente do que ocorre com Yap2, Rck1 parece estabilizar a proteína Yap1. Nesse sentido, pode ser que, pelo fato da mutante *rck1Δ* ocasionar uma redução nos níveis proteicos de Yap1, a estabilização de Yap2 ocorra como uma forma da célula contornar a deficiência em Yap1. Isso pode ocorrer através da formação de um heterodímero Yap1/Yap2. Apesar de não ter sido verificado neste estudo, Cohen e colaboradores (2002) sugeriram que, durante o estresse oxidativo, homodímeros de Yap1 e Yap2 ativam diferentes genes-alvo, no entanto, heterodímero de Yap1 e Yap2 colaboram para regular um alvo específico.

Como Yap1 e Yap2 são os principais fatores de transcrição envolvidos na resposta ao estresse oxidativo causado por cádmio, este trabalho buscou saber se a hipótese de uma possível formação de heterodímero entre Yap1 e Yap2 pode ocorrer a fim de garantir uma maior indução de genes de defesa antioxidantes.

5.2.7. Yap1 e Yap2 medeiam a indução de genes de defesa antioxidante observados na mutante *rck1Δ*

A formação de radicais livres na célula derivados do processo oxidativo causado por estressores como metais e drogas faz com que organismos aeróbicos tenham que manter um ambiente redox reduzido na célula. Portanto, quando ocorre a indução celular com elevadas concentrações de radicais a consequência é de extrema relevância, uma vez que acarretam danos aos lipídios, proteínas e DNA, podendo levar a morte celular. Assim, os organismos vivos percebem e se adaptam às perturbações redox pelas quais são acometidos (Lee et al. 1999).

Muitas publicações surgiram ao longo dos anos mostrando a importância de dois fatores de transcrição Yap1 e Skn7 na resposta ao estresse oxidativo em *S. cerevisiae* através das suas funções na indução de importantes genes de defesa (Tsuzi et al.2004; Lee et al. 1999; Mulford e Fassler 2011; Gómez-Pastor et al. 2013). Yap1 é um fator de transcrição determinante para a defesa contra uma ampla gama de estressores além do H₂O₂, como tBOOH, metilglioxal, CHX, diamida, dietilmaleato, *N*-etilmaleimida, cádmio, dentre outros (Rodrigues-Pousada et al. 2010). Skn7 é um fator de transcrição

de extrema importância no mecanismo regulatório do estresse oxidativo provocado por choque-térmico e do estresse osmótico (He et al. 2009; Lu et al. 2003).

A tolerância aos estressores que Yap1 e Skn7 proporcionam é determinada pelas suas funções regulatórias de importantes genes de defesa, sendo que, cada estresse gera um estímulo diferenciado que induz um conjunto de genes específicos. Das 71 proteínas induzidas por estresse oxidativo, aproximadamente a metade são reguladas por Yap1 (Delaunay et al. 2000; Kuge et al. 2001), enquanto que a outra metade é regulada por Yap1 e Skn7 (Lee et al. 1999). Nesse contexto, dois genes altamente requeridos para a resposta ao estresse oxidativo em *S. cerevisiae*, *TRX2* e *GPX2*, são alvos de Yap1 e Skn7 bem descritos na literatura e são induzidos sob estresse causado pelo H₂O₂ (Lee et al. 1999; Tsuzi et al. 2004).

O gene *TRX2* codifica a proteína Tiorredoxina II (Trx2) citoplasmática de apenas 11 kDa com atividade de oxidoreductase de pontes dissulfeto de grupos tióis (Holmgren 1989) que atua na proteção contra ERO como um sinalizador para H₂O₂ (Kuge e Jones 1994). O gene *GPX2* codifica a proteína Glutationa Peroxidase II (Gpx2) de 18 kDa que atua na redução de hidroperóxidos (Avery e Avery 2001).

Alguns estudos mostraram que Yap2 possui um papel na resposta ao estresse oxidativo e, além da regulação no estresse oxidativo provocado pelo cádmio, também participa no mecanismo regulatório do metabolismo de ferro e zinco (Bossier et al. 1993; Lesuisse e Labbe 1995). Contudo, ainda existem poucas evidências de genes de defesa induzidos por Yap2 que atuem em resposta ao estresse oxidativo.

Mesmo sendo notória a diversidade de publicações esclarecendo a relevância de genes na resposta ao estresse oxidativo provocado por H₂O₂, sabe-se que o cádmio, apesar de ser um metal não redox, pode causar estresse oxidativo de forma indireta (Stohs e Bagchi 1995). São necessários mais estudos que demonstrem genes importantes na defesa contra o estresse causado pelo cádmio.

A partir desses dados, este estudo procurou avaliar se Rck1 afeta a indução desses dois genes que possuem alto potencial antioxidante, *TRX2* e *GPX2*, em resposta ao cádmio, uma vez que Rck1 possui efeito diferente nos dois principais reguladores transcricionais de resposta ao cádmio, Yap1 e Yap2. Para testar isso, foi mensurada a expressão de *TRX2* e *GPX2* por qRT-PCR.

É possível verificar na Figura 29 A e B que os níveis de expressão de *TRX2* e *GPX2* aumentam significativamente após a indução com cádmio na mutante *rck1Δ* bem como na WT ($p < 0,0001$), no entanto, é evidente que o aumento é maior na cepa mutante.

A expressão de *TRX2* também aumenta na mutante *yap1Δ* com o estresse por cádmio ($p < 0,0001$), no entanto, os níveis de expressão são muito menores que na WT e na mutante *rck1Δ* (Figura 29 A). Além disso, a mutante *yap1Δ* é responsável por uma expressão extremamente baixa de *GPX2* (Figura 29 B).

Pode-se notar que as expressões de *TRX2* e *GPX2* são bastante reduzidas na mutante *yap2Δ* e diminuem significativamente após a indução com cádmio ($p < 0,05$ e $p < 0,0001$, respectivamente).

Também é possível verificar na Figura 29 A e B que o aumento da indução de *TRX2* e *GPX2* que ocorre após o estresse com cádmio na dupla mutante *yap1Δrck1Δ* é significativamente maior que o observado na mutante simples *yap1Δ* ($p < 0,0001$).

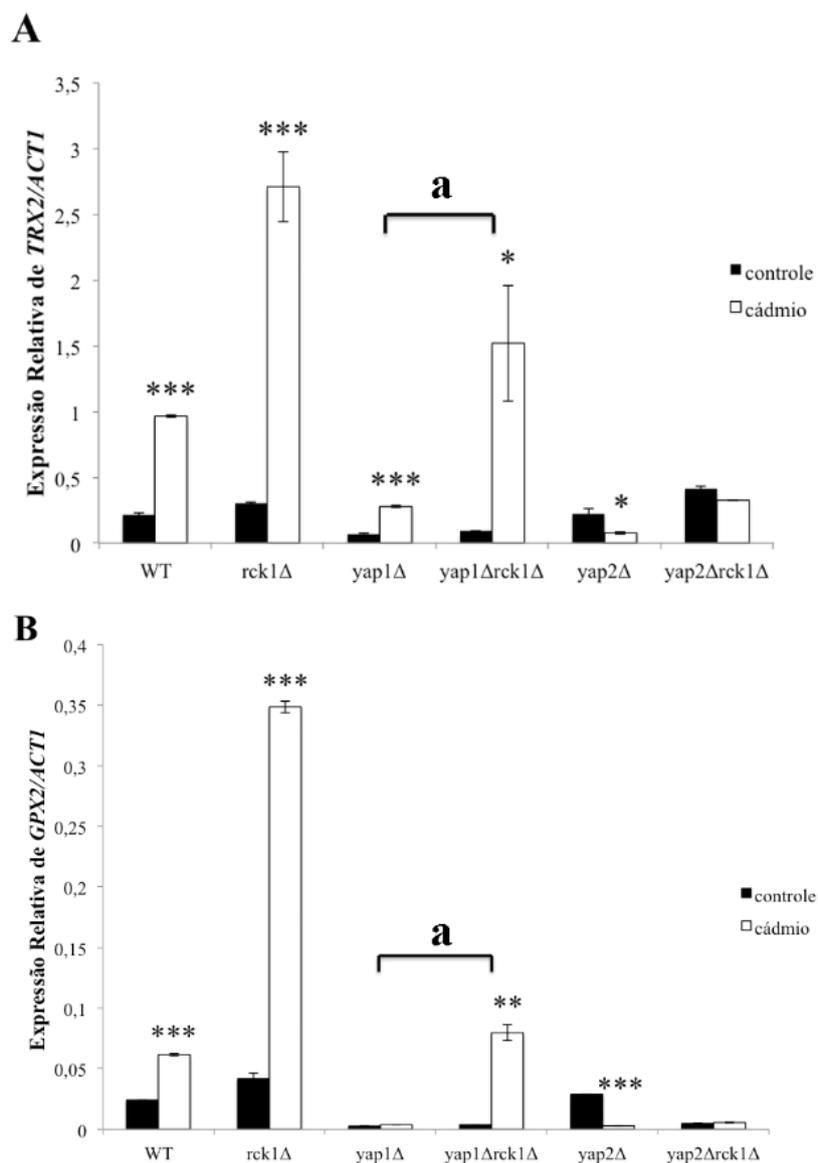


Fig. 29. Análise do efeito do cádmio e do envolvimento de Rck1 na expressão de RNAm de *TRX2* e *GPX2*. As expressões relativas de *TRX2* (A) e *GPX2* (B) foram avaliadas por qRT-PCR nas cepas WT (BY4742) e *rck1Δ*, *yap1Δ*, *yap1Δrck1Δ*, *yap2Δ* e *yap2Δrck1Δ* sem indução (barras pretas, situação controle, sem estresse) e com indução de 1 mM de CdCl_2 por 30 minutos (barras brancas, cádmio). Os valores apresentados são média e desvio padrão de triplicatas biológicas. A marcação com asteriscos significa que houve diferença estatisticamente significativa entre as situações controle e com cádmio. A marcação (a) significa que houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre as cepas.

Segundo alguns autores, a proteína Trx2 responde apenas a estímulos gerados por peróxidos e não é requerida para a resposta ao cádmio (Stephen et al. 1995; Lee et al. 1999). No entanto, esses dados não concordam com os apresentados por este estudo, uma vez que foi possível observar o aumento nos níveis de *TRX2* e *GPX2* após a indução com cádmio. Liu e colaboradores (2005) mostraram que a atividade enzimática da glutathiona peroxidase aumenta após a indução com CdCl_2 .

Surpreendentemente, *TRX2* e *GPX2* mostraram-se reguladas não apenas por Yap1, mas também por Yap2, uma vez que a falta do gene *YAP2* causou uma redução significativa na expressão desses genes após a indução com cádmio. Stephen e colaboradores (1995) buscaram verificar se a expressão do gene *TRX2* através da análise da atividade de β -Galactosidase era dependente de Yap1 e Yap2 após estresse provocado por H_2O_2 e menadiona. Os autores mostraram que *TRX2* não é regulado por Yap2, em contrapartida, os resultados do presente estudo não vão de encontro aos obtidos pelos autores. Além disso, não há indícios na literatura que relacione Gpx2 como alvo de Yap2.

Assim sendo, este estudo fornece dados que indicam os genes *TRX2* e *GPX2* como alvos tanto de Yap1 como de Yap2 na resposta ao estresse oxidativo causado pelo cádmio.

Este trabalho também mostra que Rck1 afeta a expressão dos genes de defesa antioxidante *TRX2* e *GPX2*, dado que a falta do gene *RCK1* aumentou notoriamente a expressão desses genes. De fato, a regulação negativa dos genes de defesa antioxidantes por Rck1 ocorre de forma dependente de Yap2, como mostra a Figura 28. Isso pode ser sugerido já que a dupla mutante *yap1 Δ rck1 Δ* recupera a indução dos genes perdida na mutante simples *yap1 Δ* , uma vez que ocorre maior indução dos genes de defesa provavelmente pela maior atividade de Yap2.

Concordando com esses dados, os resultados anteriormente apresentados neste trabalho (Figura 22) comprovam que Rck1 também afeta a regulação de genes de defesa antioxidante de resposta ao cádmio através de Yap2, dado que a expressão do gene *FRM2*, importante na defesa contra a peroxidação lipídica causada pelo cádmio, aumentou significativamente na mutante *rck1 Δ* .

Foi então examinado se o aumento da expressão de genes com potencial antioxidante poderia ser traduzido em diferenças oxidativas. Dessa forma, foram

analisadas possíveis mudanças no estado de carbonilação de proteínas nas células expostas ao cádmio por Western blot, uma vez que a análise de carbonilação de proteínas é utilizada como um indicador da oxidação de proteínas, pois resultam das modificações oxidativas nos resíduos de aminoácidos e da clivagem oxidativa da cadeia peptídica (Dalle-Donne et al. 2003). Também foram analisadas possíveis alterações no estado de oxidação de lipídeos, avaliando a formação de MDA (um produto da peroxidação lipídica) nas cepas WT e *rck1Δ* após a indução com cádmio.

Assim, o resultado que pode ser visto na Figura 30 mostra que, em condições de estresse por cádmio, a quantidade de proteína carbonilada é menor na mutante *rck1Δ* que em *yap2Δ* e na dupla mutante *yap2Δrck1Δ*. E na Figura 31 pode verificar que na cepa WT houve um maior aumento na peroxidação lipídica quando os resultados são comparados ao apresentado na mutante *rck1Δ*.

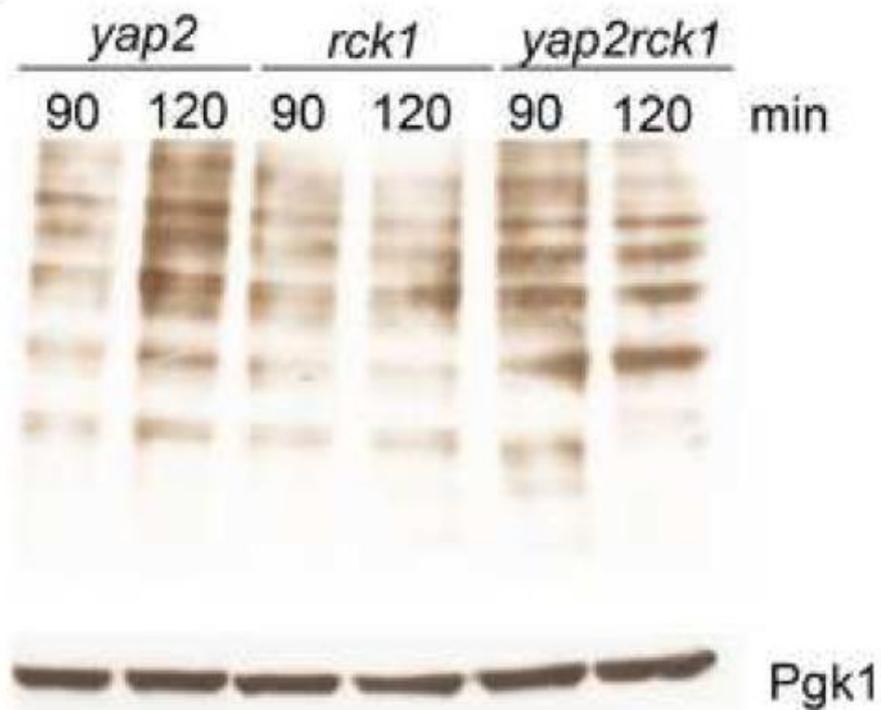


Fig. 30. Análise do estado de carbonilação de proteínas. O conteúdo de grupos carbonil nas proteínas após indução com 1 mM de CdCl_2 foi avaliado nas cepas *yap2Δ*, *rck1Δ* e *yap2Δrck1Δ* por Western blot com DNP e anticorpo anti-DNP. As células foram coletadas nos tempos indicados. Pgk1 foi usado como controle no Western blot.

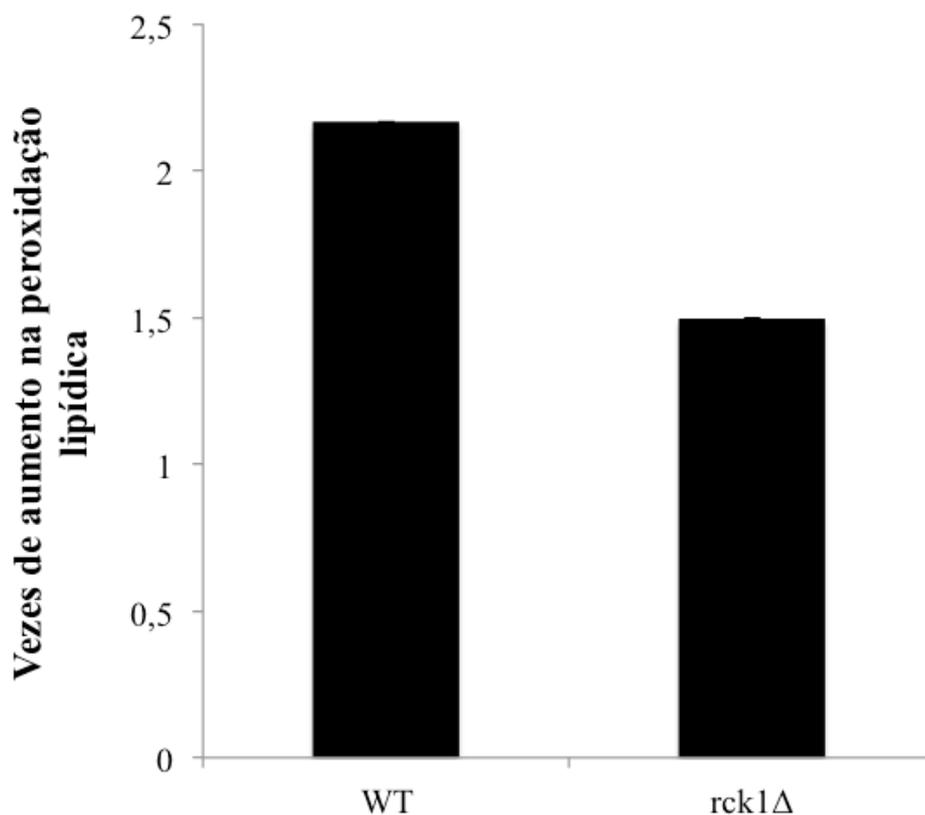


Fig. 31. Análise do conteúdo de peróxidos lipídicos. As cepas WT e *rck1Δ* foram crescidas exponencialmente em meio YPD 2 %, coletadas e induzidas ou não com 1 mM de CdCl₂ por 12 horas. Foi feita a análise de média e desvio padrão de triplicatas experimentais e duplicatas biológicas. Os resultados são apresentados em número de vezes de aumento após a indução com cádmio.

Os resultados obtidos através da análise do conteúdo de peróxidos lipídicos concordam com os dados apresentados na literatura que comprovam que o cádmio causa estresse oxidativo. No estudo de Howlett e Avery (1997), foi mostrado que a produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) aumentou consideravelmente na cepa WT após o estresse com 50 ou 100 μM de Cd(NO₃)₂. Liu e colaboradores (2005) mostraram que 250 μM de CdCl₂ levaram ao aumento acima de 3 vezes na peroxidação lipídica e Adamis e colaboradores (2007) comprovaram que cádmio causa aumentos significativos na peroxidação lipídica, oxidação intracelular e carbonilação de proteínas.

Entretanto, é a primeira vez que um estudo mostra uma relação entre Rck1 e o estresse oxidativo causado pelo cádmio.

Parece que Rck1 regula negativamente a resposta das células contra o estresse oxidativo quando *S. cerevisiae* é exposta ao cádmio, dado que a cepa mutante *rck1Δ* teve menor quantidade de proteína carbonilada que as outras cepas.

A despeito de ser bem descrito na literatura que cádmio causa estresse oxidativo e que Yap2 possui um papel na resposta ao estresse oxidativo (Stephen et al. 1995; Cohen et al. 2002), o aumento da tolerância ao cádmio causado pela mutante *rck1Δ* e, presumidamente mediada pela hiperativação de Yap2, não pode ser completamente atribuído à uma vantagem de lidar com o dano oxidativo induzido pelo cádmio. Isso pode ser afirmado já que Yap2 medeia a superexpressão de genes de defesa antioxidantes pela mutante *rck1Δ* (Figura 28), mas os níveis bioquímicos não mostraram diferenças oxidativas entre *rck1Δ* e a dupla mutante *yap2Δrck1Δ*.

Em contrapartida, Yap1 também mostrou mediar a indução dos genes de defesa antioxidante conduzida pela mutante *rck1Δ* (Figura 28) e, portanto, Rck1 poderia estar envolvido no aumento do estresse oxidativo por intermédio de Yap1. No entanto, os experimentos oxidativos realizados neste estudo não incluíram Yap1. Dado que Yap1 é o fator de transcrição mais importante na resposta ao estresse oxidativo, sugere-se que pesquisas futuras aprofundem o estudo do envolvimento de Rck1 com Yap1 no mecanismo regulatório do estresse oxidativo provocado pelo cádmio.

Como o cádmio causa danos a membrana plasmática da célula de *S. cerevisiae* pelo aumento da peroxidação lipídica, uma vez que tem alta afinidade pelos ácidos graxos insaturados que compõe a estrutura molecular das membranas, este estudo buscou verificar se cádmio pode afetar a parede celular desta levedura.

5.3. CAPÍTULO 3: YAP2 REGULA GENES DA VIA DE INTEGRIDADE DA PAREDE CELULAR

A parede celular da levedura é uma estrutura rígida com 100 a 200 nm de espessura e constitui aproximadamente 25 % do peso seco total da célula. É composta por polissacarídeos filamentosos interconectados e glicoproteínas não-filamentosas (Figura 32). Dentre os componente filamentosos, a quitina e o β -(1,3)-glucano são os polissacarídeos mais abundantes (Feldmann 2011). O β -(1,3)-glucano possui extremidades não-redutoras que funcionam como sítios de ligação covalente para outros polissacarídeos (Klis et al. 2006). Outro componente não-filamentoso é o β -(1,6)-glucano, porém é encontrado em menor quantidade (Orlean 2012). A quitina é um polímero constituído por N-acetilglucosamina unido por ligações β -1,4 (Takeshita 2006) e é essencial para manter a morfogênese e a divisão celular (Shaw et al. 1991).

Os principais componentes não-filamentosos da parede celular são as glicomanoproteínas, as quais são glicoproteínas contendo manose e são tipicamente encontradas na parte mais externa da parede celular (Okada et al. 2014).

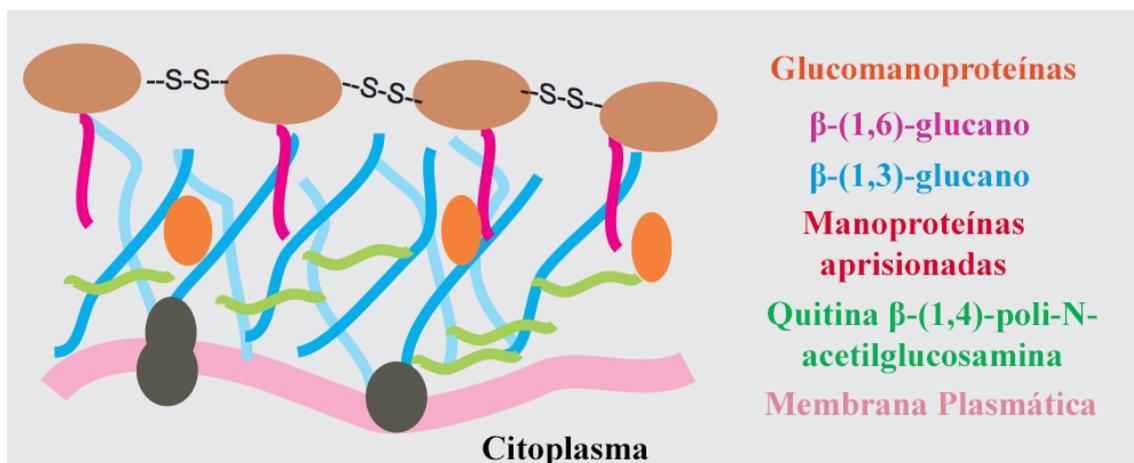


Fig. 32. Representação esquemática da parede celular de levedura (Adaptado de Feldmann 2011).

A parede celular dos fungos é uma defesa chave contra as adversidades ambientais (Fuchs e Mylonakis 2009). Com a exposição a ambientes hostis, a parede

celular necessita ser reparada e fortificada através da biossíntese e integração dos componentes da parede celular (Errede et al. 1995; Oehlen e Cross 1994; Cid et al. 1995), uma vez que mesmo uma pequena lesão na parede da célula pode levar à sua morte (Cabib et al. 1989).

De fato, a parede celular é onde ocorre o primeiro contato com metais pesados e as características de sua composição a torna hábil para ligar-se covalentemente e/ou não-covalentemente a esses metais (Parrotta et al 2015).

Alguns estudos têm mostrado os efeitos do cádmio na parede celular de plantas, os quais foram discutidos em uma revisão de literatura de Parrotta e colaboradores (2015). Esses autores mostraram que o cádmio possui atividade tóxica de diferentes formas: a) alterando a estrutura física da parede celular por interagir com moléculas carregadas negativamente (exemplo, grupos carboxila e sulfatos); b) modificando a resistência da parede pela pressão de turgescência, tornando a célula mais fraca; c) interagindo com componentes polissacarídeos, cádmio pode afetar a atividade enzimática presente na parede celular; d) pode afetar direta ou indiretamente a síntese de componentes da parede celular.

Variados tipos de estresse que afetam a parede celular são reconhecidos por um sistema de sensores localizado na membrana plasmática, de onde o sinal é transferido para o espaço intracelular por MAP cinases (Errede et al. 1995; Oehlen e Cross 1994; Cid et al. 1995). Nesse sentido, o mecanismo de sinalização é realizado através da ativação da via CWI (Levin 2005).

Em *S. cerevisiae*, a via CWI está envolvida na resposta ao estresse osmótico, estresse por choque-térmico, despolimerização da actina e agentes tóxicos à membrana celular (Nobel et al. 2000; Errede et al. 1995; Oehlen e Cross 1994; Cid et al. 1995; Qi e Elion 2005). As proteínas Mid2, Wsc1-4 e Mtl1 que estão localizadas na membrana plasmática, reconhecem o sinal de estresse, transferem o sinal para as MAP cinases Bck1, Mkk1, Mkk2 que, por sua vez, sinalizam para a MAP cinase Slr2 pela ativação de Pkc1. Slr2 é o ativador final do fator de transcrição Rlm1, responsável pela indução de seus genes-alvo envolvidos na resposta ao estresse. Dentre estes, o gene *CHS1* que codifica a proteína Quitina Sintase I (Watanabe et al. 1997; Ketela et al. 1999; Jung e Levin 1999; Heinisch et al. 1999; Baetz et al. 2001; Garcia et al. 2004; Levin 2005), importante no processo de síntese da quitina. A proteína Chs1 é requerida especialmente

quando há perda excessiva de polissacarídeos pela presença de tóxicos, auxiliando na síntese adicional de quitina em caso de emergência celular (Cabib et al. 1989).

Recentemente, Elsztein e colaboradores (2011) sugeriram que Yap1 pode ter um papel regulatório importante na manutenção da parede celular pelo controle da expressão de genes da via CWI. Esses autores mostraram que a Yap1 regula a expressão dos genes *SLT2*, *RLM1* e *CHS1* quando a levedura é exposta à hidrócloro de poli-hexametileno guanidina (PHMG), um agente que tem o potencial de se ligar aos fosfolipídeos da membrana da célula.

Mesmo havendo dados suficientes na literatura que comprovem os efeitos negativos do cádmio na membrana plasmática através da indução de peroxidação lipídica e alteração da permeabilidade da membrana, não existem dados na literatura que apontem o envolvimento dos genes da via CWI na resposta ao estresse provocado pelo cádmio. Além disso, o fator de transcrição Yap2, importante na defesa contra o cádmio, também não tem sido relacionado com os genes da via CWI em publicações.

Esses fatos, levaram este estudo a investigar se Yap2 pode regular a expressão dos genes da via CWI em resposta ao estresse com cádmio. Dessa forma, foi avaliada a expressão de *SLT2*, *RLM1* e *CHS1* por qRT-PCR nas cepas WT, *yap2Δ*, *yap1Δ*, *rck1Δ* e *yap1Δyap2Δ* induzidas com 1 mM de CdCl₂ por 30 minutos (Figura 33). Para verificar a importância dos genes da via CWI na defesa contra o cádmio, foi verificado se a ausência deles causava algum tipo de sensibilidade na presença do metal. Desse modo, o perfil fenotípico das cepas foi verificado frente a diversas concentrações de cádmio no ensaio de tolerância por *Replica Plate* (Figura 34).

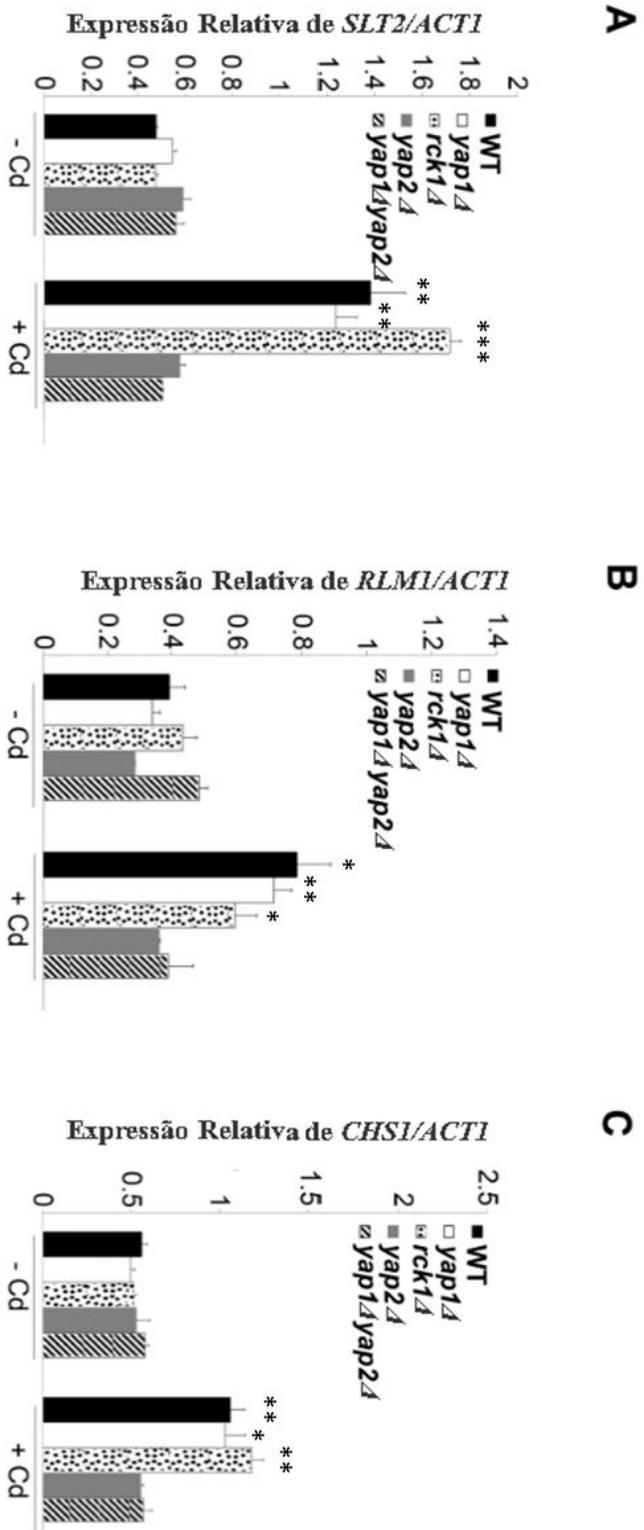


Fig. 33. Análise do efeito do cádmio e do envolvimento de Yap1 e Yap2 na expressão de RNAm dos genes da via CWI. As expressões relativas de (A) *SLT2*, (B) *RLM1* e (C) *CHS1*, foram avaliadas por qRT-PCR nas cepas WT (BY4742), *yap2Δ*, *yap1Δ* e *yap1Δyap2Δ* sem indução (barras pretas, situação controle, sem estresse) e com indução de 1 mM de CdCl₂ por 30 minutos (barras brancas, cádmio). Os valores apresentados são média e desvio padrão de triplicatas biológicas. A marcação com asteriscos significa que houve diferença estatisticamente significativa entre a situação controle e a situação com cádmio.

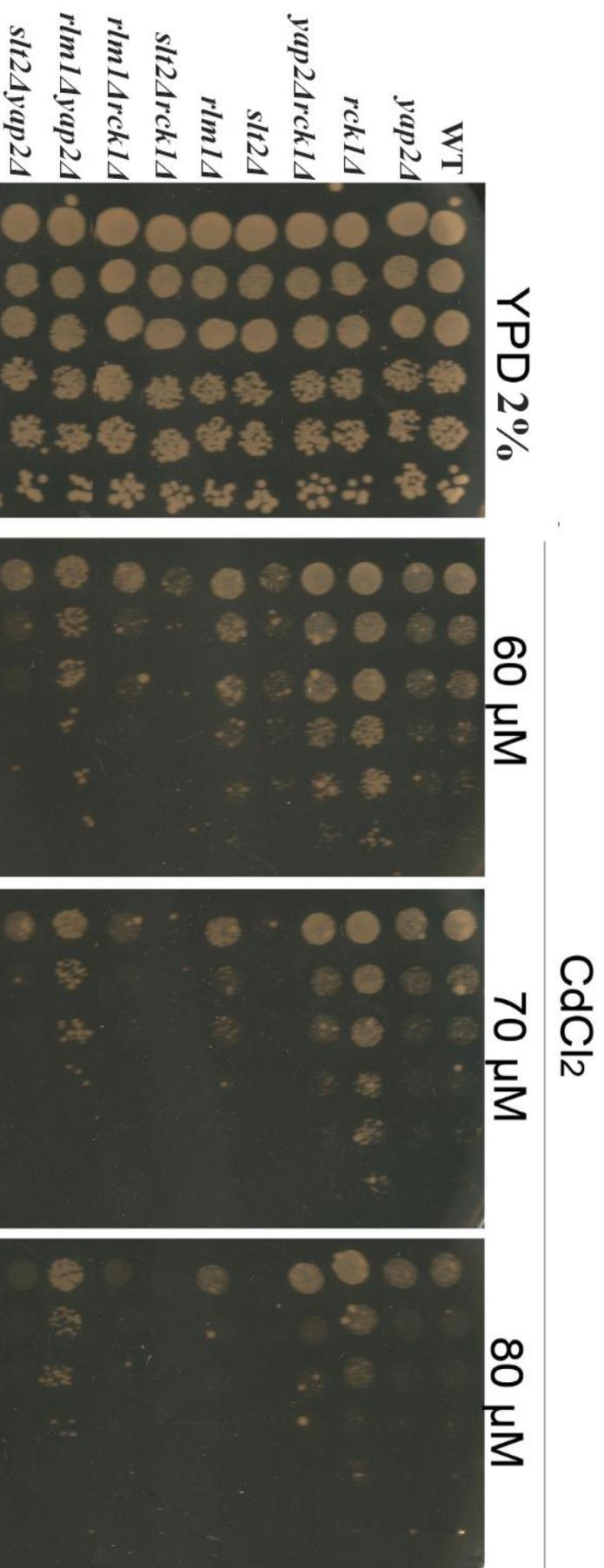


Fig. 34. Análise da tolerância ao cádmio das cepas mutantes nos genes da via CWI de *S. cerevisiae*. As cepas WT (BY4742), *yap2Δ*, *rck1Δ*, *yap2Δrck1Δ*, *sth2Δ*, *rlm1Δ*, *sth2Δrck1Δ*, *rlm1Δyap2Δ* e *sth2Δyap2Δ* foram cultivadas até a fase exponencial em glicose (meio YPD 2 %) e diluídas em série para serem colocadas em spots em placas contendo apenas meio YPD 2 % sólido e meio YPD 2 % sólido acrescido de elevadas concentrações de CdCl₂.

Os resultados estão apresentados na Figura 33 A-C e apontam que os genes da via CWI tiveram a sua expressão aumentada significativamente após a indução com CdCl_2 (*SLT2* e *CHS1*, $p < 0,005$; *RLM1*, $p < 0,05$). Também é possível verificar que na mutante *yap1Δ* houve um aumento similar à WT na expressão dos genes após estresse com cádmio (*SLT2* e *RLM1*, $p < 0,005$; *CHS1*, $p < 0,05$), a mutante *rck1Δ* também se comportou como a WT, exceto pela maior expressão de *SLT2* apresentada após indução com cádmio ($p < 0,0001$). Em contrapartida, a expressão dos genes da via CWI não aumentaram após a adição de cádmio nas mutantes *yap2Δ* e *yap1Δyap2Δ*.

Na Figura 34 pode ser observado que a cepa *slt2Δ* é altamente sensível ao cádmio e que a mutante *rlm1Δ* não apresentou sensibilidade ao cádmio quando comparada à cepa WT. Além disso, a dupla mutante *slt2Δyap2Δ* é mais sensível que a mutante simples *yap2Δ*. Ao que se refere a Rck1, a retirada do gene *RCK1* das cepas mutantes *slt2Δ* e *rlm1Δ* não proporcionou maior tolerância ao cádmio.

Os achados do presente estudo sugerem que os genes testados, que participam da via de sinalização celular CWI, são altamente induzidos com o estresse provocado pelo cádmio (Figura 33), além disso Slt2 parece determinante para a sobrevivência celular na presença do metal (Figura 34). Esses dados possuem uma relação direta com o que foi discutido anteriormente, afirmando que a toxicidade provocada pelo cádmio causa dano a membrana celular e, conseqüentemente, à parede celular, ativando a via de sinalização CWI que, por sua vez, induz a expressão de genes-alvo, como *CHS1*, que atuam na defesa contra o estresse à parede.

Apesar de Yap1 ter sido ligado com os genes desta via em resposta ao antisséptico PHMG (Elsztein et al. 2011), o presente trabalho mostrou que esse fator de transcrição não possui envolvimento na indução dos genes da via CWI em resposta ao cádmio. Em contrapartida, este estudo mostrou que os genes da via CWI são altamente regulados pelo fator de transcrição Yap2 em condições de estresse por cádmio.

Há poucas evidências na literatura que mostram o papel de Yap2 na resposta ao estresse oxidativo que ocorre em lipídeos, proteínas ou DNA e existem apenas dados que apontam alguns genes como alvo de Yap2 em *S. cerevisiae*. No entanto, sabe-se que cádmio provoca aumento da peroxidação lipídica e Yap2 é importante na resposta ao cádmio, além disso, este fator de transcrição regula a expressão do seu gene-alvo *FRM2*,

o qual codifica a proteína Frm2 envolvida na via de sinalização lipídica. Nesse contexto, este estudo trouxe dados que sugerem um importante papel de Yap2 na resposta a danos que afetam a parede celular da levedura em decorrência da toxicidade causada por cádmio e que essa resposta ocorre através da sua função regulatória sobre os genes de defesa da via de sinalização celular CWI.

É importante ressaltar que esses resultados também mostram que Yap2 não é o único regulador transcricional dos genes da via CWI na defesa contra o cádmio, uma vez que, mesmo na ausência de *YAP2*, a expressão dos genes não foi completamente abolida.

Também foi verificado que a regulação dos genes da via CWI não foi afetada por Rck1 em resposta ao cádmio. Em contrapartida, houve maior expressão de *SLT2* na mutante *rck1Δ* que a apresentada na cepa WT após o estresse com cádmio. Chang e colaboradores (2013) verificaram que a superexpressão de *RCK1* levou a uma menor expressão de genes que fazem parte da via CWI, como *KDX1* que é positivamente regulado por Slt2, além disso, os autores também verificaram que os níveis de *SLT2* são reduzidos quando *RCK1* é superexpresso. No entanto, é importante salientar que a proteína cinase Slt2 está envolvida em diversos processos celulares, que não apenas a via CWI, como também a via de resposta ao choque térmico, via HOG de resposta ao estresse osmótico, participa na progressão do ciclo celular, dentre outros. Assim sendo, Rck1 pode ter efeito repressor sobre Slt2 em resposta ao estresse causado pelo cádmio por outra via que não a CWI, uma vez que não alterou os níveis dos outros dois genes de função relevante nesta via. Além disso, como as duplas mutantes *slt2Δrck1Δ* e *rlm1Δrck1Δ* são mais sensíveis que a mutante *rck1Δ*, parece que Rck1 atua em uma via de sinalização diferente em resposta ao cádmio.

Desse modo, de acordo com os resultados apresentados nesta Tese e os dados da literatura, são propostos dois modelos de sinalização celular em *S. cerevisiae* em resposta ao cádmio, esquematizados na Figura 35 e Figura 36.

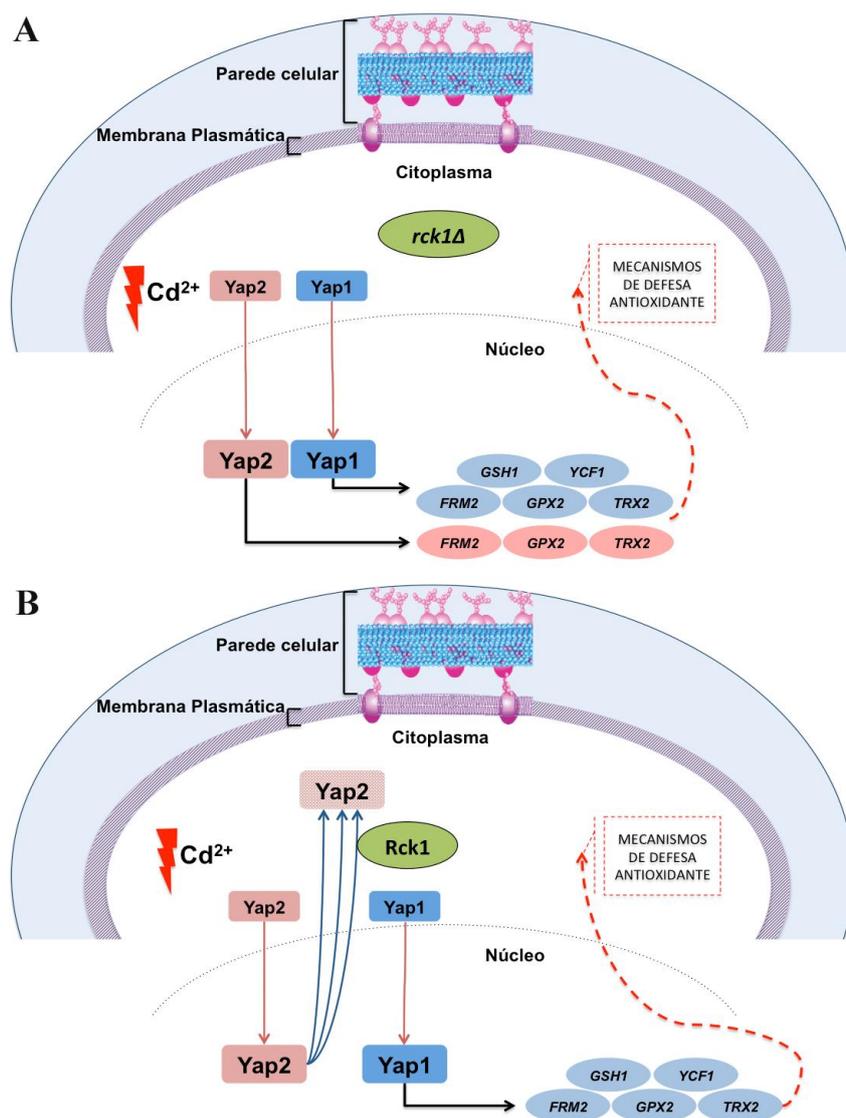


Fig. 35. Representação do mecanismo de sinalização celular regido por Yap1, Yap2 e dependente de Rck1 em *S. cerevisiae* em resposta ao estresse oxidativo gerado pelo cádmio. Em (A), na presença de cádmio e na ausência de Rck1, Yap1 e Yap2 deslocam para o núcleo ativando seus genes-alvo que atuam na defesa contra o estresse oxidativo. Em (B), na presença de cádmio e de Rck1, Yap2 permanece menos tempo no núcleo e é mais degradado no citoplasma. A expressão da proteína Yap1 aumenta e esse fator de transcrição induz a expressão de seus genes-alvo que atuam na defesa contra o estresse oxidativo. Setas rosas - deslocamento das proteínas do citoplasma para o núcleo; setas azuis - deslocamento das proteínas do núcleo para o citoplasma; setas pretas - indução da expressão de genes-alvo; setas vermelhas pontilhadas - ativação da resposta ao estresse.

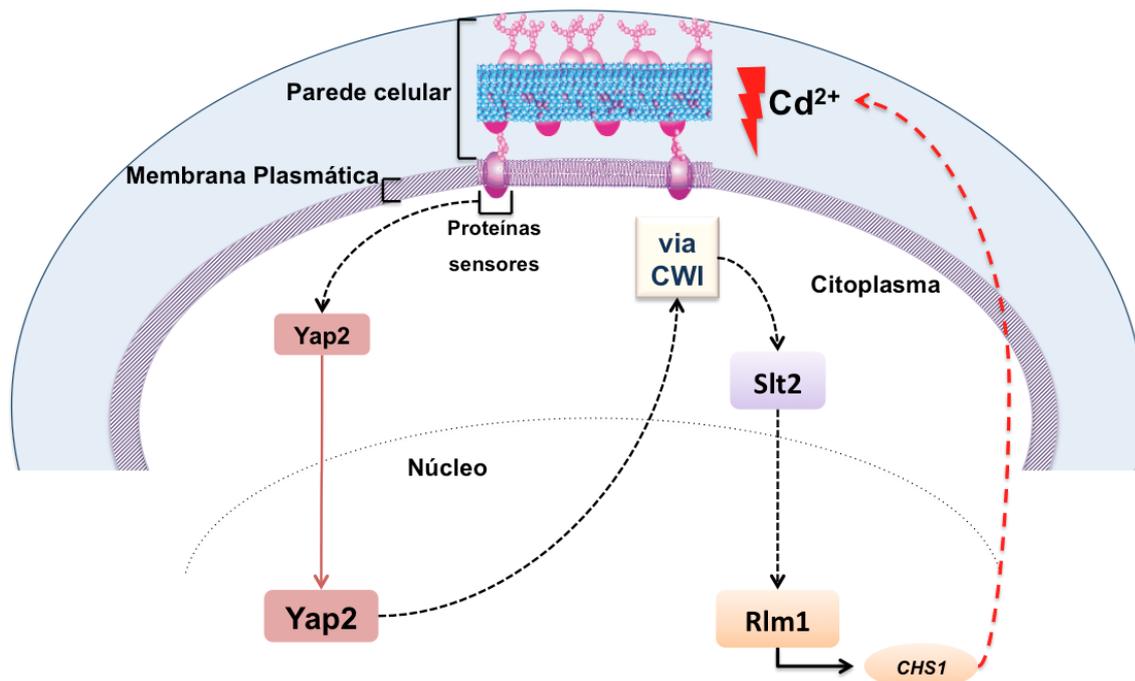


Fig. 36. Representação do mecanismo de sinalização celular regido por Yap2 em *S. cerevisiae* em resposta aos danos à parede celular gerados pelo cádmio. O contato do cádmio com a parede celular ativa proteínas de membrana que sinalizam para Yap2. Este se desloca para o núcleo e ativa a via de sinalização celular CWI em resposta aos danos causados à parede celular. Seta rosa - deslocamento da proteína do citoplasma para o núcleo; setas pretas pontilhadas - mecanismo de ativação; seta preta integra - indução da expressão do gene-alvo; setas vermelhas pontilhadas - ativação da resposta ao estresse.

Os modelos propostos na Figura 35 e Figura 36 representam a célula de *S. cerevisiae* em contato com cádmio.

A Figura 35 faz uma representação do mecanismo de sinalização em resposta aos danos oxidativos causados pelo cádmio. A presença desse metal pesado na célula gera danos oxidativos em importantes estruturas celulares como DNA, mitocôndria e membrana plasmática (Fatur et al. 2003; Oh et al. 2004; Howlett e Avery 1997). Sendo assim, como mostra a Figura 35 A, ocorre a ativação dos fatores de transcrição Yap1 e Yap2 quando o cádmio entra em contato com a célula, fazendo com que essas duas

proteínas tenham suas localizações celulares serem predominantemente nucleares. Entretanto, com a ausência de expressão de Rck1, Yap2 permanece mais tempo no núcleo. Assim, os dois fatores de transcrição, Yap1 e Yap2, induzem a expressão de genes que codificam proteínas responsáveis pela defesa antioxidante, como *FRM2*, *GPX2* e *TRX2*. Mesmo sabendo que Yap1 também regula a expressão do gene *FRM2*, Yap2 parece ser o seu principal regulador. Além disso, Yap1 no núcleo também induz a expressão de importantes genes responsáveis pela defesa contra o cádmio – *YFC1* e *GSH1*.

A Figura 35 B representa a regulação dos fatores de transcrição Yap1 e Yap2 pela proteína cinase Rck1 na via de sinalização em resposta ao estresse oxidativo gerado por cádmio. A presença do metal pesado na célula faz com que as proteínas Yap1 e Yap2 sejam predominantemente nucleares. No entanto, com a presença de Rck1 na célula Yap2 permanece menos tempo no núcleo e é mais degradada no citoplasma, desse modo, o tempo de meia-vida e a estabilidade da proteína Yap2 são diminuídos. Em contrapartida, como mecanismo de controle celular, parece que os níveis de proteína Yap1 aumentam tornando essa proteína mais estável. Nesse sentido, os dois fatores de transcrição trabalham juntos para a regulação de alvos específicos como os genes *FRM2*, *GPX2* e *TRX2*, que irão atuar como agentes antioxidantes na defesa contra o estresse oxidativo gerado pelo cádmio.

A atividade dos dois principais fatores de transcrição de resposta ao cádmio é alterada pela presença de Rck1 na célula, ocorre a redução da indução dos genes determinantes para a defesa contra o estresse, que pode ser uma das causas da diminuição da sobrevivência celular na presença do cádmio.

No último capítulo da Tese, foi proposta uma nova função regulatória para Yap2 em resposta ao cádmio, como pode ser observado no modelo proposto apresentado na Figura 36. A presença do cádmio na célula de *S. cerevisiae* causa danos à parede celular da levedura. Quando este metal faz o primeiro contato com a parede celular, proteínas localizadas na membrana plasmática que atuam como sensores de estresse desencadeiam a ativação de um sistema de defesa aprimorado, orquestrado pelo fator de transcrição Yap2. Essas proteínas sinalizam, ativando Yap2, o qual terá a sua localização predominantemente nuclear e induz a expressão de genes que codificam proteínas da via CWI, tais como Slt2 e Rlm1, este último um fator de transcrição

importante na indução de genes que atuam na recuperação dos danos à parede celular. Dentre esses genes, *CHS1* causados pelo cádmio.

Ainda são necessários mais estudos a fim de verificar quais proteínas dessa via interagem diretamente com Yap2 para desvendar o mecanismo de sinalização da via CWI em resposta ao cádmio.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- O fator de transcrição Yap2 é requerido na resposta ao cádmio e estimula a expressão de seus genes-alvo na defesa contra o estresse causado por este metal.
- A proteína cinase Rck1 está envolvida na via de sinalização celular em resposta ao estresse por cádmio e, nessas condições, parece exercer um papel regulatório sobre Yap1 e Yap2.
- Com o estresse causado por cádmio, Rck1 reduz o tempo de meia-vida e a estabilidade da proteína Yap2, diminuindo o período de tempo que Yap2 permanece no núcleo, dessa forma, Yap1 é mais expresso e se torna mais estável. A alteração da função dos dois fatores de transcrição, torna debilitada a indução de genes responsáveis pelas defesas antioxidantes e, conseqüentemente, afeta a sobrevivência celular.
- Em resposta ao cádmio, Yap2 parece estar envolvido na regulação da via de sinalização CWI que atua na manutenção da integridade da parede celular, regulando a expressão dos genes *SLT2*, *RLM1* e *CHS1*.

PERSPECTIVAS

7. PERSPECTIVAS

- Aprofundar o estudo do envolvimento de Rck1 com o fator de transcrição Yap1;
- Continuar a estudar a via de sinalização CWI na defesa contra o cádmio, desvendar que proteínas dessa via interagem com Yap2 e esclarecer o mecanismo de sinalização;

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Achanzar WE, Achanzar KB, Lewis JG, Webber MM, Waalkes MP. 2000. Cadmium induces c-myc, p53, and c-jun expression in normal human prostate epithelial cells as a prelude to apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* **164**:291-300.

Adamis PD, Mannarino SC, Eleutherio EC. 2009. Glutathione and gamma-glutamyl transferases are involved in the formation of cadmium-glutathione complex. *FEBS Lett* **583**:1489-1492.

Adamis PD, Mannarino SC, Riger CJ, Duarte g, Cruz A, Pereira MD, Eleutherio EC. 2008. Lap4, a vacuolar aminopeptidase I, is involved in cadmium-glutathione metabolism. *Biometals* **22**:243-249.

Adamis PD, Panek AD, Eleutherio EC. 2007. Vacuolar compartmentation of the cadmium-glutathione complex protects *Saccharomyces cerevisiae* from mutagenesis. *Toxicol Lett* **173**:1-7.

Adamis PD, Panek AD, Leite SGF, Eleutherio EC. 2003. Factors involved with cadmium absorption by a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology* **34**:55-60.

Adle DJ, Sinani D, Kim H, Lee J. 2007. A cadmium-transporting P1B-type ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **282**:947-955.

Aimola P, Carmignani M, Volpe AR, Di Benedetto A, Claudio L, Waalkes MP, van Bokhoven A, Tokar EJ, Claudio PP. 2012. Cadmium induces p53-dependent apoptosis in human prostate epithelial cells. *PLoS One* **7**:e33647.

Ali H, Khan E, Sajad MA. 2013. Phytoremediation of heavy metals--concepts and applications. *Chemosphere* **91**:869-881.

Anderson ME. 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact* **111-112**:1-14.

Anetor JI. 2012. Rising environmental cadmium levels in developing countries: threat to genome stability and health. *Niger J Physiol Sci* **27**:103-115.

Angel P, Karin M. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* **1072**:129-157.

Avery AM, Avery SV. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J Biol Chem* **276**:33730-33735.

Ayres RU. 1992. Toxic heavy metals: materials cycle optimization. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:815-820.

Azevedo D, Nascimento L, Labarre J, Toledano MB, Rodrigues-Pousada C. 2007. The *S. cerevisiae* Yap1 and Yap2 transcription factors share a common cadmium-sensing domain. *FEBS Lett* **581**:187-195.

Azevedo D, Tacnet F, Delaunay A, Rodrigues-Pousada C, Toledano MB. 2003. Two redox centers within Yap1 for H₂O₂ and thiol-reactive chemicals signaling. *Free Radic Biol Med* **35**:889-900.

Baetz K, Moffat J, Haynes J, Chang M, Andrews B. 2001. Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Slt2 and the cell cycle regulator Swi4. *Mol Cell Biol* **21**:6515-6528.

Ball CA, Dolinski K, Dwight SS, Harris MA, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Scafe CR, Sherlock G, Binkley G, Jin H, Kaloper M, Orr SD, Schroeder M, Weng S, Zhu Y, Botstein D, Cherry JM. 2000. Integrating functional genomic information into the *Saccharomyces* genome database. *Nucleic Acids Res* **28**:77-80.

Bang SY, Kim JH, Lee PY, Chi SW, Cho S, Yi GS, Myung PK, Park BC, Bae KH, Park SG. 2013. Candidate target genes for the *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor, Yap2. *Folia Microbiol (Praha)* **58**:403-408.

Barreto L, Garcera A, Jansson K, Sunnerhagen P, Herrero E. 2006. A peroxisomal glutathione transferase of *Saccharomyces cerevisiae* is functionally related to sulfur amino acid metabolism. *Eukaryot Cell* **5**:1748-1759.

Bertin G, Averbeck D. 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* **88**:1549-1559.

Billard P, Dumond H, Bolotin-Fukuhara M. 1997. Characterization of an AP-1-like transcription factor that mediates an oxidative stress response in *Kluyveromyces lactis*. *Mol Gen Genet* **257**:62-70.

Bilsland E, Molin C, Swaminathan S, Ramne A, Sunnerhagen P. 2004. Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Mol Microbiol* **53**:1743-1756.

Bishak YK, Payahoo L, Osatdrahimi A, Nourazarian A. 2015. Mechanisms of cadmium carcinogenicity in the gastrointestinal tract. *Asian Pac J Cancer Prev* **16**:9-21.

Bohmann D, Bos TJ, Admon A, Nishimura T, Vogt PK, Tjian R. 1987. Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* **238**:1386-1392.

Bossier P, Fernandes L, Rocha D, Rodrigues-Pousada C. 1993. Overexpression of YAP2, coding for a new yAP protein, and YAP1 in *Saccharomyces cerevisiae* alleviates growth inhibition caused by 1,10-phenanthroline. *J Biol Chem* **268**:23640-23645.

Botstein D, Fink GR. 2011. Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics* **189**:695-704.

Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. 2001. Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food Chem Toxicol* **39**:967-980.

Bussereau F, Casaregola S, Lafay JF, Bolotin-Fukuhara M. 2006. The *Kluyveromyces lactis* repertoire of transcriptional regulators. *FEMS Yeast Res* **6**:325-335.

Cabib E, Sburlati A, Bowers B, Silverman S. 1989. Chitin Synthase 1, an Auxiliary Enzyme for Chitin Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **108**:1665-1672.

Caetano SM, Menezes R, Amaral C, Rodrigues-Pousada C, Pimentel C. 2015. Repression of the Low Affinity Iron Transporter Gene FET4. A NOVEL MECHANISM AGAINST CADMIUM TOXICITY ORCHESTRED BY YAP1 VIA ROX1. *J Biol Chem* **290**:18584-18595.

Chang M, Kang HJ, Baek IJ, Kang CM, Park YS, Yun CW. 2013. Rck1 up-regulates Hog1 activity by down-regulating Slt2 activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **440**:119-124.

Chang SL, Leu JY. 2011. A tradeoff drives the evolution of reduced metal resistance in natural populations of yeast. *PLoS Genet* **7**:e1002034.

Charizanis C, Juhnke H, Krems B, Entian KD. 1999. The oxidative stress response mediated via Pos9/Skn7 is negatively regulated by the Ras/PKA pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **261**:740-752.

Cheung MR, Kang J, Ouyang D, Yeung V. 2014. Association between urinary cadmium and all cause, all cancer and prostate cancer specific mortalities for men: an

analysis of national health and nutrition examination survey (NHANES III) data. *Asian Pac J Cancer Prev* **15**:483-488.

Cid VJ, Duran A, del Rey F, Snyder MP, Nombela C, Sanchez M. 1995. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **59**:345-386.

Clemens S, Antosiewicz DM, Ward JM, Schachtman DP, Schroeder JI. 1998. The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:12043-12048.

Cohen BA, Pilpel Y, Mitra RD, Church GM. 2002. Discrimination between paralogs using microarray analysis: application to the Yap1p and Yap2p transcriptional networks. *Mol Biol Cell* **13**:1608-1614.

Collinson EJ, Wheeler GL, Garrido EO, Avery AM, Avery SV, Grant CM. 2002. The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J Biol Chem* **277**:16712-16717.

Dahlkvist A, Sunnerhagen P. 1994. Two novel deduced serine/threonine protein kinases from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **139**:27-33.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* **329**:23-38.

Delaunay A, Isnard AD, Toledano MB. 2000. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J* **19**:5157-5166.

Delling U, Raymond M, Schurr E. 1998. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes conferring resistance to quinoline ring-containing antimalarial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:1034-1041.

Distel RJ, Ro HS, Rosen BS, Groves DL, Spiegelman BM. 1987. Nucleoprotein complexes that regulate gene expression in adipocyte differentiation: direct participation of c-fos. *Cell* **49**:835-844.

Ellenberger TE, Brandl CJ, Struhl K, Harrison SC. 1992. The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* **71**:1223-1237.

Elsztein C, de Lucena RM, de Morais MA, Jr. 2011. The resistance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to the biocide polyhexamethylene biguanide: involvement of cell wall integrity pathway and emerging role for YAP1. *BMC Mol Biol* **12**:38.

Emamverdian A, Ding Y, Mokhberdoran F, Xie Y. 2015. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *ScientificWorldJournal* **2015**:756120.

Eng BH, Guerinot ML, Eide D, Saier MH, Jr. 1998. Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins. *J Membr Biol* **166**:1-7.

Errede B, Cade RM, Yashar BM, Kamada Y, Levin DE, Irie K, Matsumoto K. 1995. Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol Reprod Dev* **42**:477-485.

Esteller M, Risques RA, Toyota M, Capella G, Moreno V, Peinado MA, Baylin SB, Herman JG. 2001. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine–DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* **61**:4689–4692.

Fatur T, Lah TT, Filipic M. 2003. Cadmium inhibits repair of UV-, methyl methanesulfonate- and N-methyl-N-nitrosourea-induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* **529**:109-116.

Fauchon M, Lagniel G, Aude JC, Lombardia L, Soularue P, Petat C, Marguerie G, Sentenac A, Werner M, Labarre J. 2002. Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. *Mol Cell* **9**:713-723.

Feldmann H. *Yeast: Molecular and Cell Biology.* Germany: Wiley-Blackwell, 2nd Edition, 2011

Fernandes L, Rodrigues-Pousada C, Struhl K. 1997. Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol Cell Biol* **17**:6982-6993.

Fuchs BB, Mylonakis E. 2009. Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. *Eukaryot Cell* **8**:1616-1625.

Fulekar MH, Sharma J. 2008. Bioinformatics applied in bioremediation. *Innov Rom Food Biotechnol* **2**:28-36.

Furuchi T, Ishikawa H, Miura N, Ishizuka M, Kajiya K, Kuge S, Naganuma A. 2001. Two nuclear proteins, Cin5 and Ydr259c, confer resistance to cisplatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharmacol* **59**:470-474.

Garcia-Fernandez AJ, Bayoumi AE, Perez-Pertejo Y, Motas M, Reguera RM, Ordonez C, Balana-Fouce R, Ordonez D. 2002. Alterations of the glutathione-redox balance induced by metals in CHO-K1 cells. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **132**:365-373.

Garcia R, Bermejo C, Grau C, Perez R, Rodriguez-Pena JM, Francois J, Nombela C, Arroyo J. 2004. The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem* **279**:15183-15195.

Giaginis C, Gatzidou E, Theocharis S. 2006. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **213**:282-290.

Gitan RS, Shababi M, Kramer M, Eide DJ. 2003. A cytosolic domain of the yeast Zrt1 zinc transporter is required for its post-translational inactivation in response to zinc and cadmium. *J Biol Chem* **278**:39558-39564.

Gomes DS, Fragoso LC, Riger CJ, Panek AD, Eleutherio EC. 2002. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1573**:21-25.

Gomes DS, Riger CJ, Pinto ML, Panek AD, Eleutherio EC. 2005. Evaluation of the role of Ace1 and Yap1 in cadmium absorption using the eukaryotic cell model *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Toxicol Pharmacol* **20**:383-389.

Gomez-Pastor R, Garre E, Perez-Torrado R, Matallana E. 2013. Trx2p-dependent regulation of *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response by the Skn7p transcription factor under respiring conditions. *PLoS One* **8**:e85404.

Haider S, Anis L, Batool Z, Sajid I, Naqvi F, Khaliq S, Ahmed S. 2015. Short term cadmium administration dose dependently elicits immediate biochemical, neurochemical and neurobehavioral dysfunction in male rats. *Metab Brain Dis* **30**:83-92.

Hartwig A. 2013. Cadmium and cancer. *Met Ions Life Sci* **11**:491-507.

Hartwig A, Asmuss M, Blessing H, Hoffmann S, Jahnke G, Khandelwal S, Pelzer A, Burkle A. 2002. Interference by toxic metal ions with zinc-dependent proteins involved in maintaining genomic stability. *Food Chem Toxicol* **40**:1179-1184.

He XJ, Mulford KE, Fassler JS. 2009. Oxidative stress function of the *Saccharomyces cerevisiae* Skn7 receiver domain. *Eukaryot Cell* **8**:768-778.

Heinisch JJ, Lorberg A, Schmitz HP, Jacoby JJ. 1999. The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **32**:671-680.

Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**:770-776.

Hinnebusch AG. 1988. Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **52**:248-273.

Hirata D, Yano K, Miyakawa T. 1994. Stress-induced transcriptional activation mediated by YAP1 and YAP2 genes that encode the Jun family of transcriptional activators in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **242**:250-256.

Hodgson E. 2004. *A Text Book of Modern Toxicology*.

Holmgren A. 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* **264**:13963-13966.

Hope IA, Struhl K. 1985. GCN4 protein, synthesized in vitro, binds HIS3 regulatory sequences: implications for general control of amino acid biosynthetic genes in yeast. *Cell* **43**:177-188.

Howlett NG, Avery SV. 1997. Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Appl Environ Microbiol* **63**:2971-2976.

Huang D, Zhang Y, Qi Y, Chen C, Ji W. 2008. Global DNA hypomethylation, rather than reactive oxygen species (ROS), a potential facilitator of cadmium-stimulated K562 cell proliferation. *Toxicol Lett* **179**:43-47.

IARC. 1993. Cadmium and cadmium compounds. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum **58**:119-237.

Il'yasova D, Schwartz GG. 2005. Cadmium and renal cancer. Toxicol Appl Pharmacol **207**:179-186.

Jarup L, Akesson A. 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. Toxicol Appl Pharmacol **238**:201-208.

Jensen LT, Culotta VC. 2002. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* FET4 by oxygen and iron. J Mol Biol **318**:251-260.

Jin YH, Clark AB, Slebos RJ, Al-Refai H, Taylor JA, Kunkel TA, Resnick MA, Gordenin DA. 2003. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. Nat Genet **34**:326-329.

Joseph P. 2009. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. Toxicol Appl Pharmacol **238**:272-279.

Julin B, Wolk A, Johansson JE, Andersson SO, Andren O, Akesson A. 2012. Dietary cadmium exposure and prostate cancer incidence: a population-based prospective cohort study. Br J Cancer **107**:895-900.

Jung US, Levin DE. 1999. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. Mol Microbiol **34**:1049-1057.

Kachroo AH, Laurent JM, Yellman CM, Meyer AG, Wilke CO, Marcotte EM. 2015. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity. Science **348**:921-925.

Kamizono A, Nishizawa M, Teranishi Y, Murata K, Kimura A. 1989. Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **219**:161-167.

Karin M. 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **270**:16483-16486.

Kazi TG, Memon AR, Afridi HI, Jamali MK, Arain MB, Jalbani N, Sarfraz RA. 2008. Determination of cadmium in whole blood and scalp hair samples of Pakistani male lung cancer patients by electrothermal atomic absorption spectrometer. *Sci Total Environ* **389**:270-276.

Kellen E, Zeegers MP, Hond ED, Buntinx F. 2006. Blood cadmium may be associated with bladder carcinogens: The belgian case-control study on bladder cancer. *Cancer Detect Prev* **31**:77-82.

Kern AL, Bonatto D, Dias JF, Yoneama ML, Brendel M, Pegas Henriques JA. 2005. The function of Alr1p of *Saccharomyces cerevisiae* in cadmium detoxification: insights from phylogenetic studies and particle-induced X-ray emission. *Biometals* **18**:31-41.

Ketela T, Green R, Bussey H. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J Bacteriol* **181**:3330-3340.

Khurana V, Lindquist S. 2010. Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast? *Nat Rev Neurosci* **11**:436-449.

Klis FM, Boorsma A, De Groot PWJ. 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**:185-202.

Kobayashi N, McEntee K. 1993. Identification of *cis*- and *trans*-components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 248–256.

Kuge S, Arita M, Murayama A, Maeta K, Izawa S, Inoue Y, Nomoto A. 2001. Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol Cell Biol* **21**:6139-6150.

Kuge S, Jones N. 1994. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J* **13**:655-664.

Kuge S, Jones N, Nomoto A. 1997. Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J* **16**:1710-1720.

Lafaye A, Junot C, Pereira Y, Lagniel G, Tabet JC, Ezan E, Labarre J. 2005. Combined proteome and metabolite-profiling analyses reveal surprising insights into yeast sulfur metabolism. *J Biol Chem* **280**:24723-24730.

Laird PW. 1997. Oncogenic mechanisms mediated by DNA methylation. *Mol Med Today* **3**:223–229.

Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**:1759-1764.

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

Lesuisse E, Labbe P. 1995. Effects of cadmium and of YAP1 and CAD1/YAP2 genes on iron metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **141** (Pt 11):2937-2943.

Levin DE. 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**:262-291.

Li L, Bagley D, Ward DM, Kaplan J. 2008. Yap5 is an iron-responsive transcriptional activator that regulates vacuolar iron storage in yeast. *Mol Cell Biol* **28**:1326-1337.

Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczypka M, Thiele DJ, Rea PA. 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:42-47.

Lin YS, Caffrey JL, Lin JW, Bayliss D, Faramawi MF, Bateson TF, Sonawane B. 2013. Increased risk of cancer mortality associated with cadmium exposures in older Americans with low zinc intake. *J Toxicol Environ Health A* **76**:1-15.

Liu J, Zhang Y, Huang D, Song G. 2005. Cadmium induced MTs synthesis via oxidative stress in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem* **280**:139-145.

Lu JM, Deschenes RJ, Fassler JS. 2003. *Saccharomyces cerevisiae* histidine phosphotransferase Ypd1p shuttles between the nucleus and cytoplasm for SLN1-dependent phosphorylation of Ssk1p and Skn7p. *Eukaryot Cell* **2**:1304-1314.

Lushchak VI. 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* **224C**:164-175.

Lutzen A, Liberti SE, Rasmussen LJ. 2004. Cadmium inhibits human DNA mismatch repair in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **321**:21-25.

Marchler G, Schuller C, Adam G, Ruis H. 1993. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* **12**, 1997–2003.

Marder L, Bernardes AM, Ferreira JZ. 2004. Cadmium electroplating wastewater treatment using a laboratory-scale electro dialysis system. *Separation and Purification Technology* **37**:247-255.

Marettova E, Marett M, Legath J. 2015. Toxic effects of cadmium on testis of birds and mammals: A review. *Anim Reprod Sci* **155**:1-10.

Martelli A, Rousselet E, Dycke C, Bouron A, Moulis JM. 2006. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie* **88**:1807-1814.

McHale MW, Kroening KD, Bernlohr DA. 1996. Identification of a class of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in fatty acid repression of gene transcription and analysis of the *frm2* gene. *Yeast* **12**:319-331.

Memisoglu A, Samson L. 2000. Contribution of base excision repair, nucleotide excision repair, and DNA recombination to alkylation resistance of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* **182**:2104-2112.

Mendizabal I, Rios G, Mulet JM, Serrano R, de Larrinoa IF. 1998. Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett* **425**:323-328.

Menezes RA, Amaral C, Delaunay A, Toledano M, Rodrigues-Pousada C. 2004. Yap8p activation in *Saccharomyces cerevisiae* under arsenic conditions. *FEBS Lett* **566**:141-146.

Moore MR. 2004. A commentary on the impacts of metals and metalloids in the environment upon the metabolism of drugs and chemicals. *Toxicol Lett* **148**:153-158.

Mortada WI, Sobh MA, El-Defrawy MM. 2004. The exposure to cadmium, lead and mercury from smoking and its impact on renal integrity. *Med Sci Monit* **10**:CR112-116.

Moye-Rowley WS, Harshman KD, Parker CS. 1989. Yeast YAP1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes Dev* **3**:283-292.

Mulford KE, Fassler JS. 2011. Association of the Skn7 and Yap1 transcription factors in the *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Eukaryot Cell* **10**:761-769.

Musk AW, de Klerk NH. 2003. History of tobacco and health. *Respirology* **8**:286-290.

Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* **8**:199-216.

Nagy Z, Montigny C, Leverrier P, Yeh S, Goffeau A, Garrigos M, Falson P. 2006. Role of the yeast ABC transporter Yor1p in cadmium detoxification. *Biochimie* **88**:1665-1671.

Nasmyth KA, Tatchell K. 1980. The structure of transposable yeast mating type loci. *Cell* **19**:753-764.

Nevitt T, Pereira J, Rodrigues-Pousada C. 2004. YAP4 gene expression is induced in response to several forms of stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**:1365-1374.

Nilsen H, Krokan HE. 2001. Base excision repair in a network of defence and tolerance. *Carcinogenesis* **22**:987-998.

Nobel H, Ruiz C, Martin H, Morris W, Brul S, Molina M, Klis FM. 2000. Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slr2/Mpk1 MAP kinase and in an Slr2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology* **146 (Pt 9)**:2121-2132.

Oehlen B, Cross FR. 1994. Signal transduction in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Cell Biol* **6**:836-841.

Oh SH, Lee BH, Lim SC. 2004. Cadmium induces apoptotic cell death in WI 38 cells via caspase-dependent Bid cleavage and calpain-mediated mitochondrial Bax cleavage by Bcl-2-independent pathway. *Biochem Pharmacol* **68**:1845-1855.

Okada H, Ohnuki S, Roncero C, Konopka JB, Ohya Y. 2014. Distinct roles of cell wall biogenesis in yeast morphogenesis as revealed by multivariate analysis of high-dimensional morphometric data. *Mol Biol Cell* **25**:222-233.

Oliviero S, Robinson GS, Struhl K, Spiegelman BM. 1992. Yeast GCN4 as a probe for oncogenesis by AP-1 transcription factors: transcriptional activation through AP-1 sites is not sufficient for cellular transformation. *Genes Dev* **6**:1799-1809.

Oliviero S, Struhl K. 1991. Synergistic transcriptional enhancement does not depend on the number of acidic activation domains bound to the promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:224-228.

Orlean P. 2012. Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics* **192**:775–818.

O'Shea EK, Klemm JD, Kim PS, Alber T. 1991. X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* **254**:539-544.

Ouyang X, Tran QT, Goodwin S, Wible RS, Sutter CH, Sutter TR. 2011. Yap1 activation by H₂O₂ or thiol-reactive chemicals elicits distinct adaptive gene responses. *Free Radic Biol Med* **50**:1-13.

Parrotta L, Guerriero G, Sergeant K, Cai G, Hausman J-F. 2015. Target or barrier? The cell wall of early- and later-diverging plants vs cadmium toxicity: differences in the response mechanisms. *Front Plant Sci* **6**: 1-16.

Pereira J, Pimentel C, Amaral C, Menezes RA, Rodrigues-Pousada C. 2009. Yap4 PKA- and GSK3-dependent phosphorylation affects its stability but not its nuclear localization. *Yeast* **26**:641-653.

Posas F, Chambers JR, Heyman JA, Hoeffler JP, de Nadal E, Arino J. 2000. The transcriptional response of yeast to saline stress. *J. Biol. Chem.* **275**, 17249–17255.

Pulido MD, Parrish AR. 2003. Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat Res* **533**:227-241.

Qi M, Elion EA. 2005. MAP kinase pathways. *J Cell Sci* **118**:3569-3572.

Ransone LJ, Verma IM. 1990. Nuclear proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Cell Biol* **6**:539-557.

Rebbeor JF, Connolly GC, Dumont ME, Ballatori N. 1998. ATP-dependent transport of reduced glutathione on YCF1, the yeast orthologue of mammalian multidrug resistance associated proteins. *J Biol Chem* **273**:33449-33454.

Reiser V, Ruis H, Ammerer G. 1999. Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**:1147-1161.

Rep M, Krantz M, Thevelein JM, Hohmann S. 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J. Biol. Chem.* **275**:8290–8300.

Riger CJ, Fernandes PN, Vilela LF, Mielniczki-Pereira AA, Bonatto D, Henriques JA, Eleutherio EC. 2011. Evaluation of heavy metal toxicity in eukaryotes using a simple functional assay. *Metallomics* **3**:1355-1361.

Robertson KD, Jones PA. 2000. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* **21**:461-467.

Rodrigues-Pousada C, Menezes RA, Pimentel C. 2010. The Yap family and its role in stress response. *Yeast* **27**:245-258.

Ruotolo R, Marchini G, Ottonello S. 2008. Membrane transporters and protein traffic networks differentially affecting metal tolerance: a genomic phenotyping study in yeast. *Genome Biol* **9**:R67.

Sahmoun AE, Case LD, Jackson SA, Schwartz GG. 2005. Cadmium and prostate cancer: a critical epidemiologic analysis. *Cancer Invest* **23**:256-263.

Satarug S, Baker JR, Urbenjapol S, Haswell-Elkins M, Reilly PE, Williams DJ, Moore MR. 2003. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol Lett* **137**:65-83.

Satarug S, Moore MR. 2004. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ Health Perspect* **112**:1099-1103.

Shahid M, Pourrut B, Dumat C, Nadeem M, Aslam M, Pinelli E. 2014. Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. *Rev Environ Contam Toxicol* **232**:1-44.

Shaw JA, Mol PC, Bowers B, Silverman SJ, Valdivieso MH, Duran A, Cabib E. 1991. The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol* **114**:111-123.

Shin YH, Park EH, Fuchs JA, Lim CJ. 2002. Characterization, expression and regulation of a third gene encoding glutathione S-transferase from the fission yeast. *Biochim Biophys Acta* **1577**:164-170.

Spike BT, Wahl GM. 2011. p53, Stem Cells, and Reprogramming: Tumor Suppression beyond Guarding the Genome. *Genes Cancer* **2**:404-419.

Stohs SJ, Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free radic Biol Med* **18**:321-336.

Struhl K. 1987. The DNA-binding domains of the jun oncoprotein and the yeast GCN4 transcriptional activator protein are functionally homologous. *Cell* **50**:841-846.

Struhl K. 1988. The JUN oncoprotein, a vertebrate transcription factor, activates transcription in yeast. *Nature* **332**:649-650.

Szczyпка MS, Wemmie JA, Moye-Rowley WS, Thiele DJ. 1994. A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem* **269**:22853-22857.

Takeshita N, Yamashita S, Ohta A, Horiuchi H. 2006. *Aspergillus nidulans* class V and VI chitin synthases CsmA and CsmB, each with a myosin motor-like domain, perform compensatory functions that are essential for hyphal tip growth. *Mol Microbiol* **59**:1380-1394.

Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. 2012. Heavy metal toxicity and the environment. *EXS* **101**:133-164.

Temple MD, Perrone GG, Dawes IW. 2005. Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol* **15**:319-326.

Thevenod F, Lee WK. 2013. Cadmium and cellular signaling cascades: interactions between cell death and survival pathways. *Arch Toxicol* **87**:1743-1786.

Toda T, Shimanuki M, Yanagida M. 1991. Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases. *Genes Dev* **5**:60-73.

Tsuzi D, Maeta K, Takatsume Y, Izawa S, Inoue Y. 2004. Regulation of the yeast phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase GPX2 by oxidative stress is mediated by Yap1 and Skn7. *FEBS Lett* **565**:148-154.

USGS. 2015. Science for a changing world: minerals information. US Geological Survey (USGS):36-37.

Urani C, Melchiorretto P, Fabbri M, Bowe G, Maserati E, Gribaldo L. 2014. Cadmium Impairs p53 Activity in HepG2 Cells. *ISRN Toxicol* **2014**:976428.

Valko M, Morris H, Cronin MT. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* **12**:1161-1208.

van Wijngaarden E, Singer EA, Palapattu GS. 2008. Prostate-specific antigen levels in relation to cadmium exposure and zinc intake: results from the 2001-2002 National Health and Nutrition Examination Survey. *Prostate* **68**:122-128.

Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Grijalba MT, Meinicke AR, Castilho RF. 1997. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci Rep* **17**:43-52.

Vido K, Spector D, Lagniel G, Lopez S, Toledano MB, Labarre J. 2001. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**:8469-8474.

Vilela C, Linz B, Rodrigues-Pousada C, McCarthy JEG. 1998. The yeast transcription factor genes *YAP1* and *YAP2* are subject to differential control at the levels of both translation and mRNA stability. *Nucleic Acids Res* **26**:1150-1159.

Waalkes MP, Anver M, Diwan BA. 1999a. Carcinogenic effects of cadmium in the noble (NBL/Cr) rat: induction of pituitary, testicular, and injection site tumors and intraepithelial proliferative lesions of the dorsolateral prostate. *Toxicol Sci* **52**:154-161.

Waalkes MP, Anver MR, Diwan BA. 1999b. Chronic toxic and carcinogenic effects of oral cadmium in the Noble (NBL/Cr) rat: induction of neoplastic and proliferative lesions of the adrenal, kidney, prostate, and testes. *J Toxicol Environ Health A* **58**:199-214.

Waalkes MP, Rehm S, Cherian MG. 2000c. Repeated cadmium exposures enhance the malignant progression of ensuing tumors in rats. *Toxicol Sci* **54**:110-120.

Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* **192**:95-117.

Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KM. 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* **36**:1434-1443.

Watanabe Y, Takaesu G, Hagiwara M, Irie K, Matsumoto K. 1997. Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slr2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **17**:2615-2623.

Wemmie JA, Wu AL, Harshman KD, Parker CS, Moye-Rowley WS. 1994. Transcriptional activation mediated by the yeast AP-1 protein is required for normal cadmium tolerance. *J Biol Chem* **269**:14690-14697.

Wieland M, Levin MK, Hingorani KS, Biro FN, Hingorani MM. 2009. Mechanism of cadmium-mediated inhibition of Msh2-Msh6 function in DNA mismatch repair. *Biochemistry* **48**:9492-9502.

Wieser R, Adam G, Wagner A, Schuller C, Marchler G, Ruis H, Krawiec Z, Bilinski. 1991. Heat shock factor-independent heat control of transcription of the *CTTI* gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266**, 12406–12411.

Wu AL, Moye-Rowley WS. 1994. GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol Cell Biol* **14**:5832-5839.

Wu A, Wemmie JA, Edgington NP, Goebel M, Guevara JL, Moye-Rowley WS. 1993. Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. *J Biol Chem* **268**:18850-18858.

Wysocki R, Fortier PK, Maciaszczyk E, Thorsen M, Leduc A, Odhagen A, Owsianik G, Ulaszewski S, Ramotar D, Tamas MJ. 2004. Transcriptional activation of metalloid tolerance genes in *Saccharomyces cerevisiae* requires the AP-1-like proteins Yap1p and Yap8p. *Mol Biol Cell* **15**:2049-2060.

Wysocki R, Tamas MJ. 2010. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS Microbiol Rev* **34**:925-951.

Yang HC, Pon LA. 2003. Toxicity of metal ions used in dental alloys: a study in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Drug Chem Toxicol* **26**:75-85.

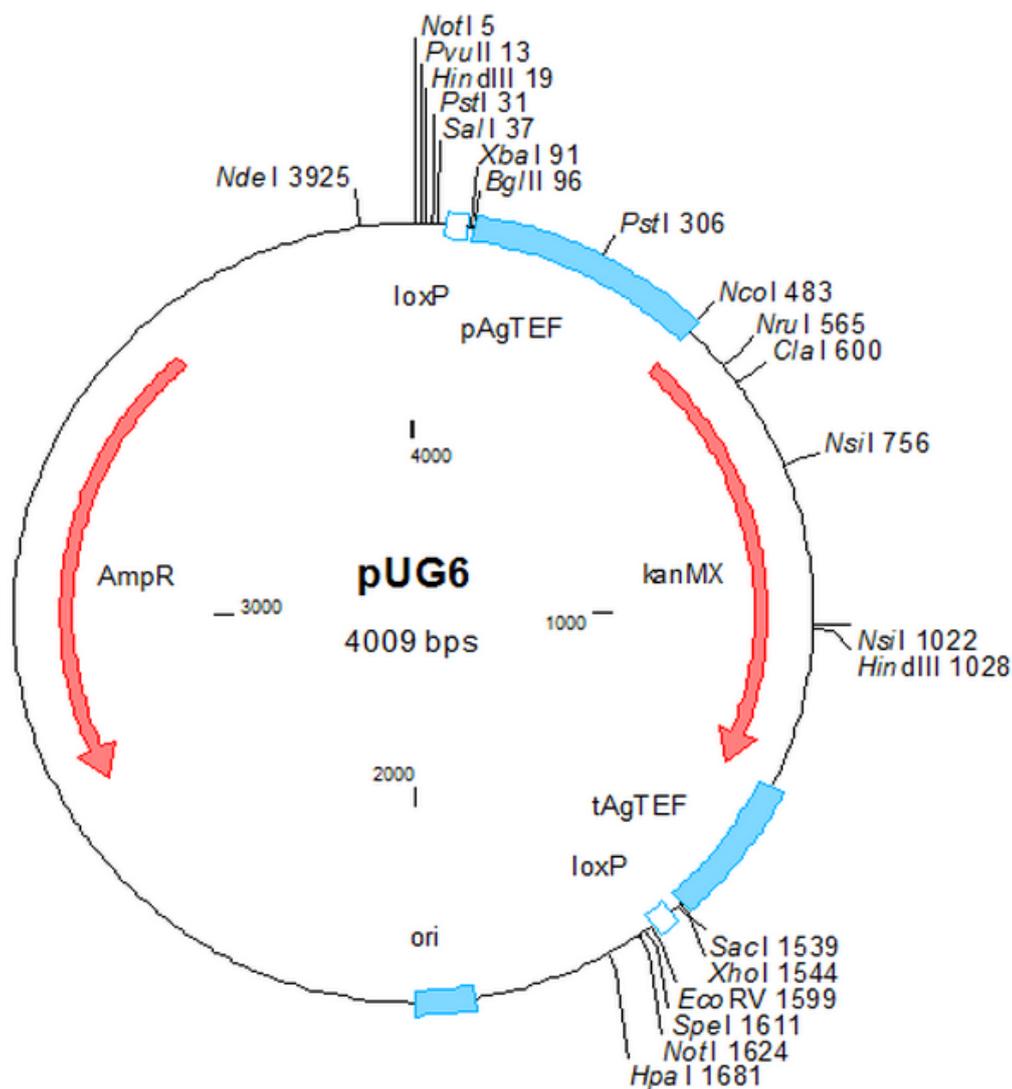
Yang X, Talibi D, Weber S, Poisson G, Raymond M. 2001. Functional isolation of the *Candida albicans* FCR3 gene encoding a bZip transcription factor homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Yap3p. *Yeast* **18**:1217-1225.

Yoshida S, Parniske M. 2005. Regulation of plant symbiosis receptor kinase through serine and threonine phosphorylation. *J Biol Chem* **280**:9203-9209.

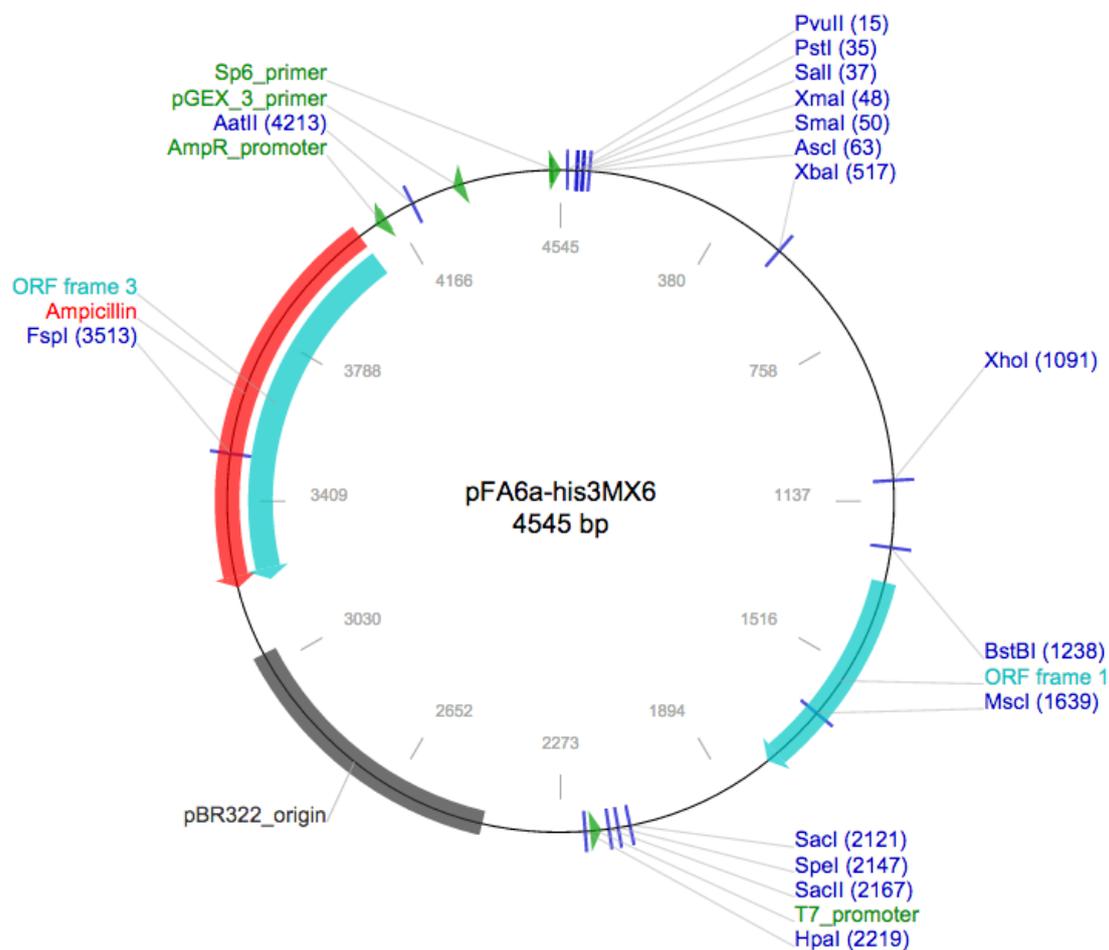
ANEXO

9. ANEXO

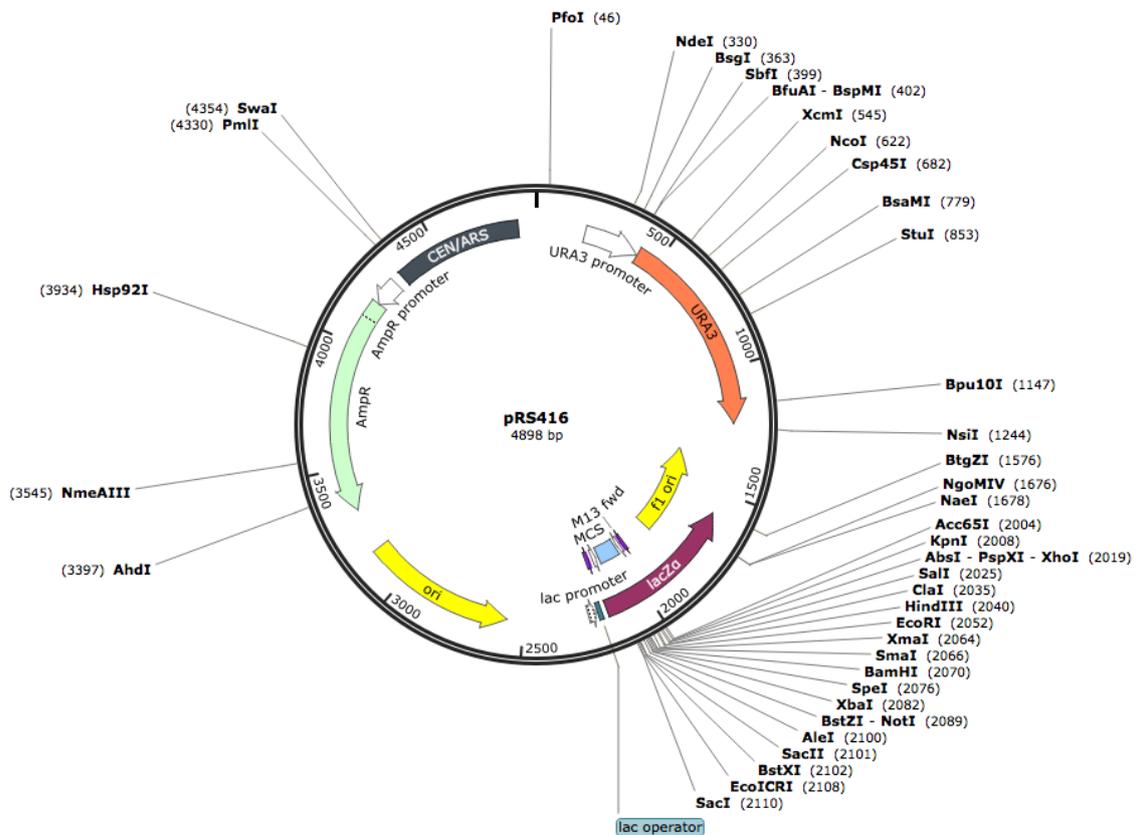
Mapas dos vetores de clonagem utilizados



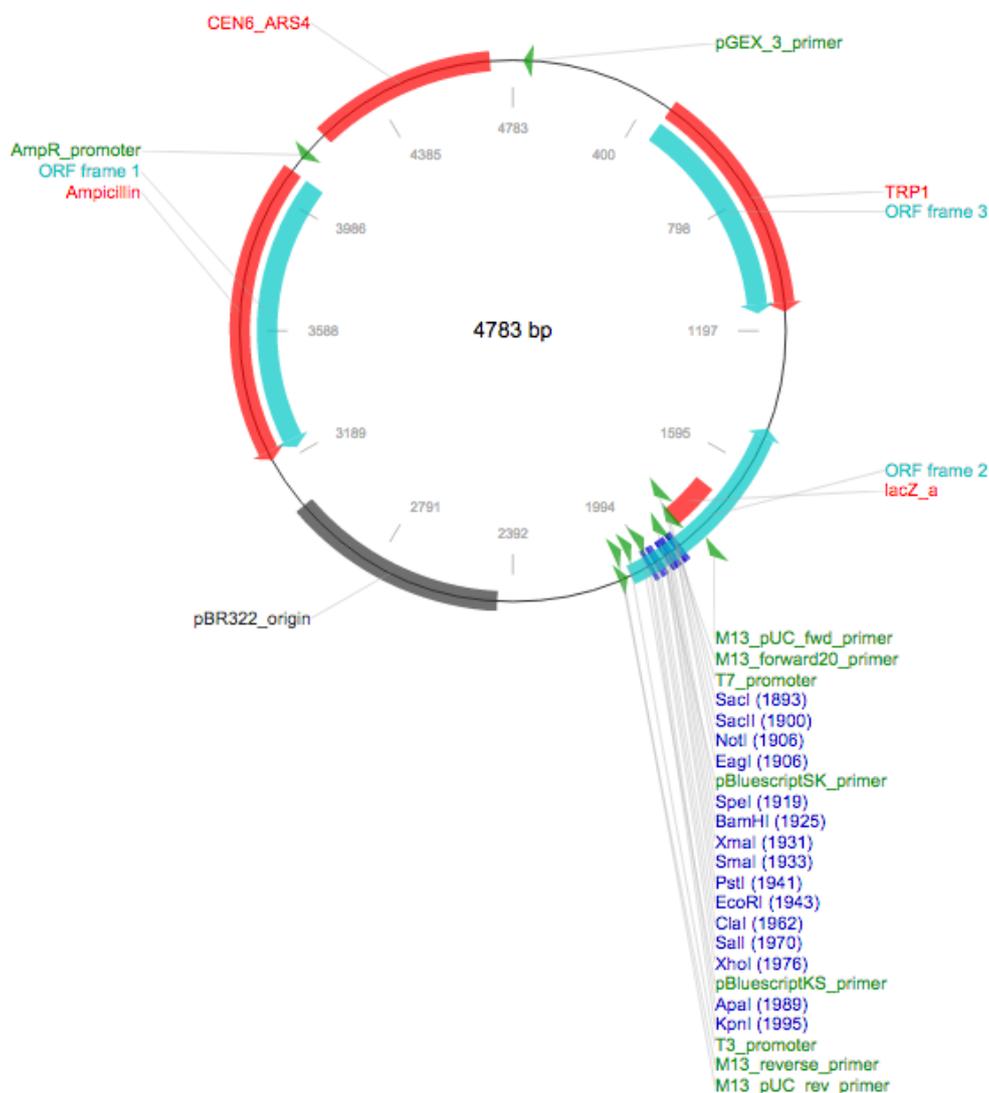
Mapa físico do vetor pUG6. Este vetor foi construído a partir do vetor original pFA6-kanMX4, no qual foi inserido uma cassete de interrupção de gene loxP-kanMX-loxP para uso em levedura. Possui origem de replicação do ColEI (ori), marca de seleção para ampicilina (AmpR) para bactéria e contém ainda o gene kanR que oferece resistência a geneticina para levedura, além de sítios de múltipla clonagem, MSC.



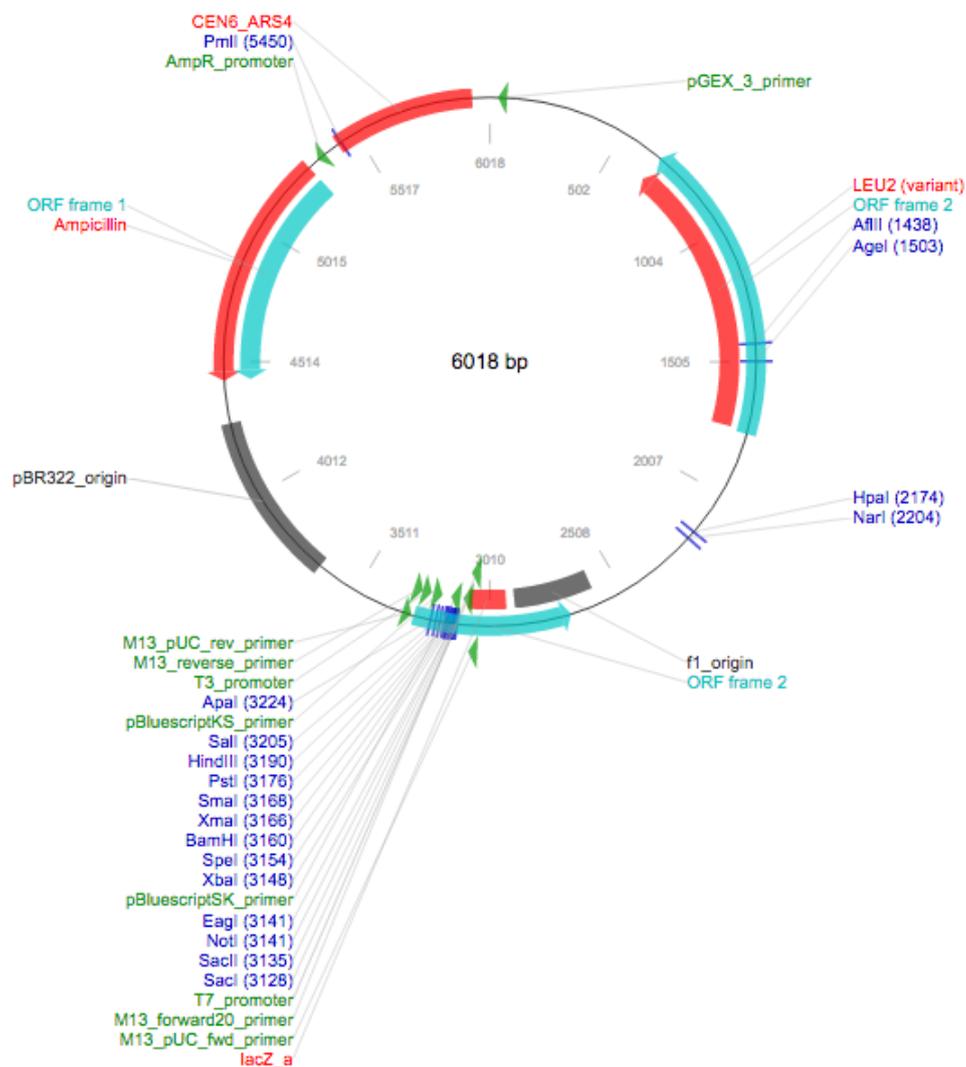
Mapa físico do vetor pFA6a-his3MX6. Este vetor contém uma cassete de interrupção de gene *HIS3* para uso em levedura. Possui origem de replicação do pBR322 (ori), marca de seleção para ampicilina (AmpR) para bactéria e marca de seleção *HIS3* para levedura. Também possui sítios de múltipla clonagem, MSC.



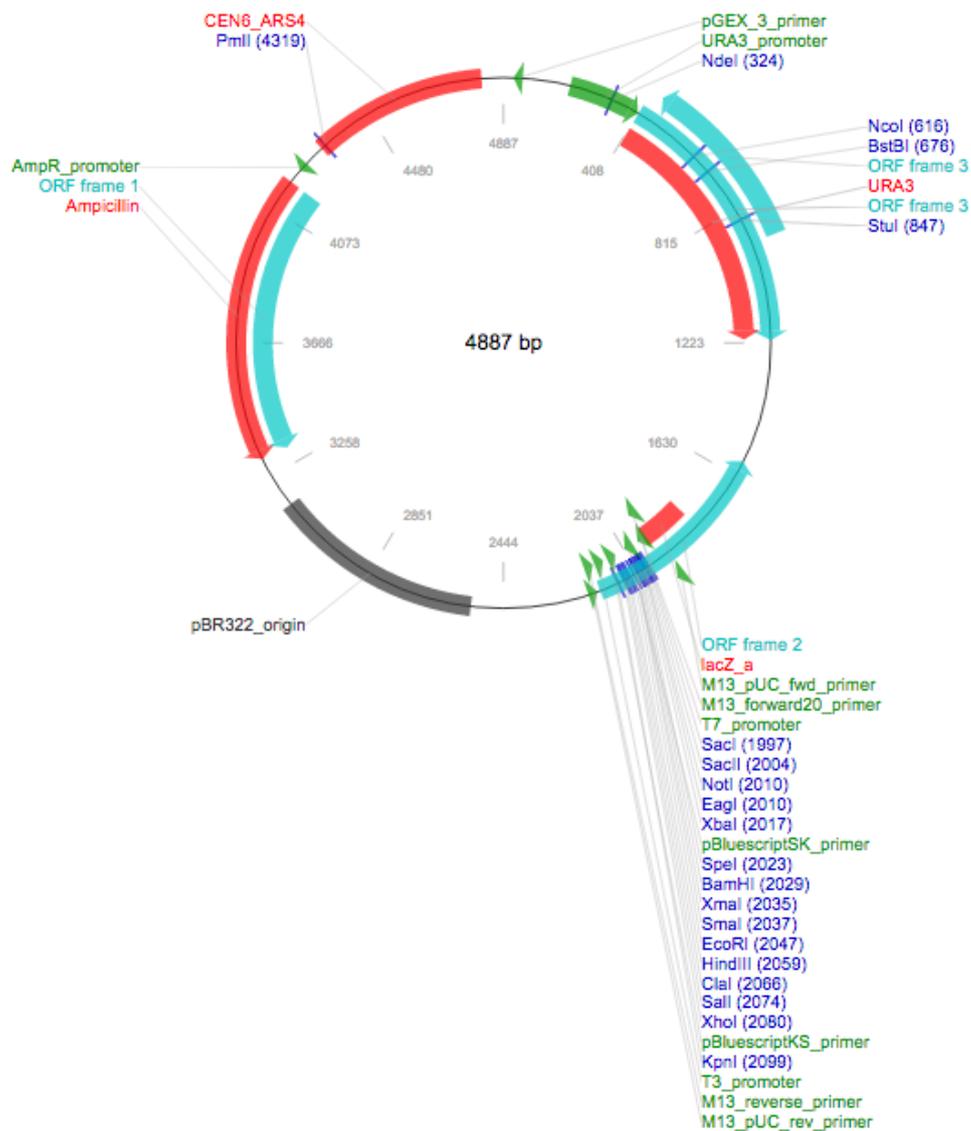
Mapa físico do vetor pRS416. Este vetor contém, além da região de reconhecimento para a amplificação da cassette de interrupção de gene *URA3* para uso em levedura, a origem de replicação do pMB1 (*ori*), marca de seleção para ampicilina (*AmpR*) para bactéria, origem de replicação cromossômico ARSH4 e marca de seleção *URA3* para levedura. Também possui o gene repórter *lacZ* sob controle do promotor Lac e sítios de múltipla clonagem, MSC.



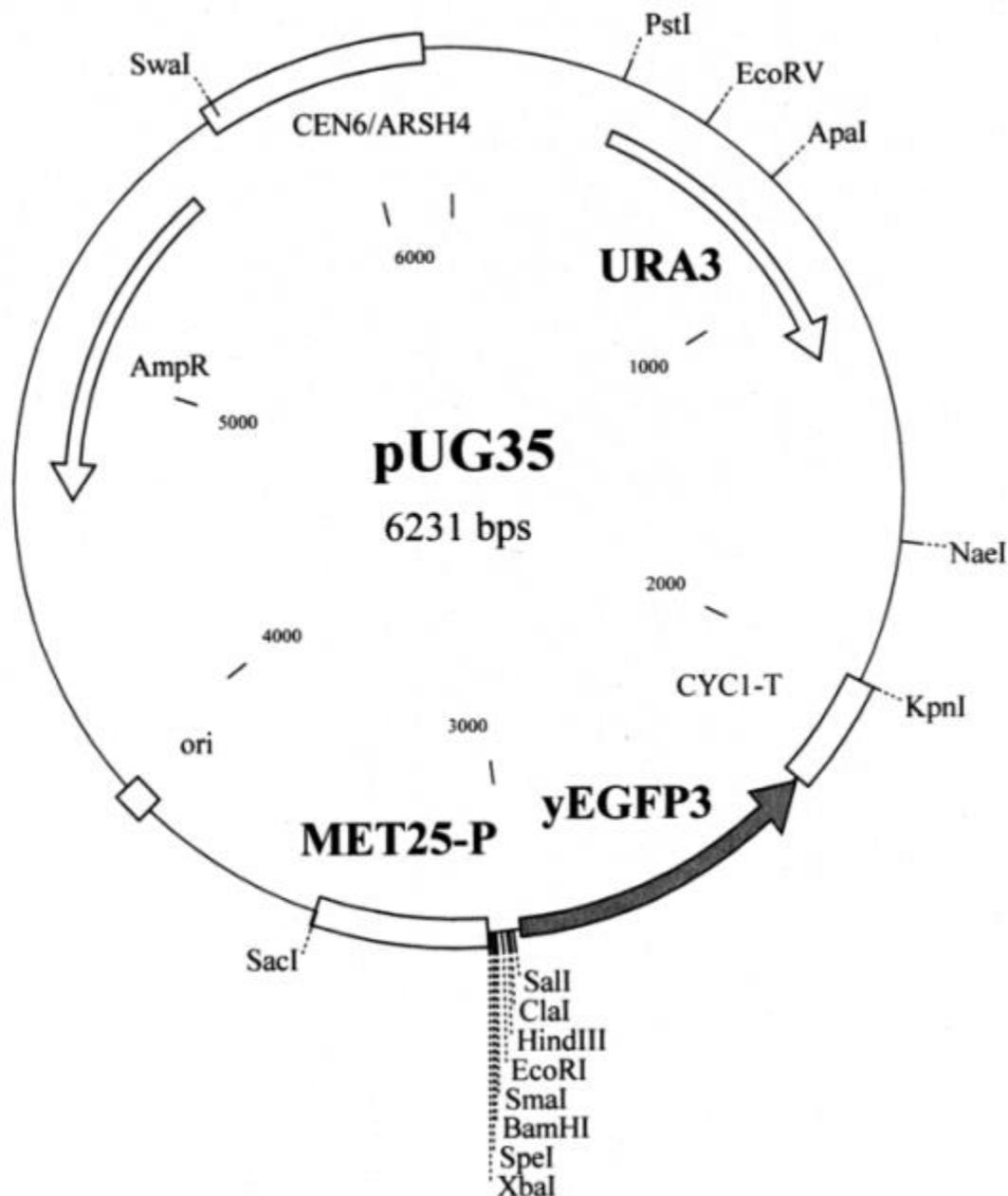
Mapa físico do vetor pRS314. Este vetor possui origem de replicação do pBR322 (ori), marca de seleção para ampicilina (AmpR) para bactéria, origem de replicação cromossômico ARSH4 e marca de seleção *TRP1* para levedura. Também possui o gene repórter *lacZ* sob controle do promotor T7 e sítios de múltipla clonagem, MSC. Este vetor original foi utilizado para a construção do **vetor de expressão pRS cup1 cp-GFP-YAP1 (pRS314YAP1-GFP)** por Kuge e colaboradores (1997), no qual foi inserida a região codificante de GFP sob controle do promotor CUP1 e, por fim, esta região foi ligada ao N-terminal da proteína Yap1.



Mapa físico do vetor pRS315. Este vetor possui origem de replicação do pBR322 (ori), marca de seleção para ampicilina (AmpR) para bactéria, origem de replicação cromossômico ARSH4 e marca de seleção *LEU2* para levedura. Também possui o gene repórter *lacZ* sob controle do promotor T7 e sítios de múltipla clonagem, MSC. Este vetor original foi utilizado para a construção do **vetor de expressão pRS cup1 cp-GFP-YAP1 (pRS315YAP2-GFP)** por Azevedo e colaboradores (2007), no qual foi inserida a região codificante de GFP sob controle do promotor CUP1 e, por fim, esta região foi ligada ao N-terminal da proteína Yap2.



Mapa físico do vetor pRS316. Este vetor possui origem de replicação do pBR322 (ori), marca de seleção para ampicilina (AmpR) para bactéria, origem de replicação cromossômico ARSH4 e marca de seleção *URA3* para levedura. Também possui o gene repórter *lacZ* sob controle do promotor T7 e sítios de múltipla clonagem, MSC. Este vetor original foi utilizado para a construção do **vetor de expressão pRS316YAP1-c-Myc** por Delaunay e colaboradores (2007), no qual foi inserida o epítipo Myc9 fusionado ao N-terminal da proteína Yap1.



Mapa físico do vetor pUG35. Este vetor possui origem de replicação do pBR322 (ori), marca de seleção para ampicilina (AmpR) para bactéria, origem de replicação cromossômico ARSH4 e marca de seleção *URA3* para levedura. Possui o promotor MET17 (alias à MET25) no N-terminal do gene que codifica a proteína Gfp e, também, sítio de múltipla clonagem, MSC. Este vetor original foi utilizado para a construção do **vetor de expressão pMet-RCK1-HA neste estudo**, no qual foi inserida o produto final de PCR RCK1-HA previamente amplificado do vetor pRS416, também construído neste estudo.