

Bruno Leonardo Bozaquel-Morais

**Identificação de Reguladores do Metabolismo de
Lipídios Neutros em *Saccharomyces cerevisiae*:
desenvolvimento e aplicação de um ensaio
fluorimétrico para o estudo de corpúsculos
lipídicos**

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Bioquímica Médica
Laboratório de Biologia Molecular de Leveduras

Novembro de 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

BRUNO L. B. MORAIS

IDENTIFICAÇÃO DE REGULADORES
DO METABOLISMO DE LÍPIDIOS
NEUTROS EM *S. cerevisiae*

UFRJ
V. I

Bruno Leonardo Bozaquel-Morais

IDENTIFICAÇÃO DE REGULADORES DO METABOLISMO DE LIPÍDIOS
NEUTROS EM *Saccharomyces cerevisiae*: desenvolvimento e aplicação de um
ensaio fluorimétrico para o estudo de corpúsculos lipídicos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Química Biológica,
Instituto de Bioquímica Médica, Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do título de
Doutor em Química Biológica

Orientadora: Mónica Montero-Lomeli

Rio de Janeiro
2010

Bruno Leonardo Bozaquel-Morais

IDENTIFICAÇÃO DE REGULADORES DO METABOLISMO DE LIPÍDIOS
NEUTROS EM *Saccharomyces cerevisiae*: desenvolvimento e aplicação de um
ensaio fluorimétrico para o estudo de corpúsculos lipídicos

Rio de Janeiro, 29 de novembro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Patrícia Torres Bozza

Doutora em Ciências (Farmacologia), Instituto Oswaldo Cruz.

Dr^a. Anna Lvovna Okorokova Façanha

Doutora em Química Biológica, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Dr^a. Kátia Calp Gondim

Doutora em Ciências (Biofísica), Instituto de Bioquímica Médica/UFRJ.

Suplente externa: Dr^a. Carmen Cabanelas Pazos de Moura

Doutora em Ciências (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas /UFRJ.

Revisora/Suplente interna: Dr^a. Geórgia Correa Atella

Doutora em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica/UFRJ.

Orientadora: Dr^a. Mónica Montero Lomeli

Doutora em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica/UFRJ.

Agradeço a Mónica Montero Lomeli por ter mantido as portas de seu laboratório sempre abertas nas minhas idas e vindas, desde a época da escola técnica até a conclusão do doutorado. Pelo apoio em mais de oito anos “não-contínuos” e pela paciência nessas três “temporadas” científicas, muito obrigado.

Agradeço a Cláudio Masuda, uma das pessoas mais solícitas desse instituto e testemunha dessas minhas idas e vindas. Sempre com aquela informação extra, pronto a discutir qualquer resultado, mesmo que às 9 horas da noite de uma sexta-feira, seus “uhmmms” e “*a priori*” foram o diferencial ao longo desse trabalho.

Agradeço a Clarissa Maya Monteiro, da Fiocruz, minha colaboradora, que me iniciou na microscopia e no trabalho – ingrato, eu diria – com lipídios.

Agradecimentos especiais a todos do laboratório (inclusive aos que já não estão mais aqui, como Willy, Ana, Gisele, Bianca, Cintia, Carol...). Não só pelos materiais estéreis emprestados, soluções furtadas, placas retiradas da estufa... Mas também pelas piadas (quase sempre infames) e por rirem nas minhas crises de mau humor. Cada um de vocês empresta um pouco para a personalidade do nosso grupo. A ciência extrema de Michel, a “severinice” de Thiago, o estado zen de Andréa, o sotaque de Leandro, os tapas no Antônio, o “estou com sorte” de Rodolfo, a dieta do club social de Juliana, a timidez de Camila, os berros da Aline... Aos poucos as novas aquisições do laboratório, Marcos, aka Chuchu, e Suelenen, irmã perdida de Gisele, também vão dando suas contribuições. A vocês meu muito obrigado.

Obrigado a minha família, que, mesmo sem compreender muito bem o que fazemos, consegue ver a peculiaridade da minha carreira e aceitaram a minha ausência em alguns momentos familiares.

Também agradeço a meus amigos de “fora do meio”, que, mesmo sem saber, contribuíram direta ou indiretamente. Phelipe, Thales e Kis, companhias nas minhas idas a São Paulo, quando precisava fugir um pouco. Anderson e Dani, que apesar de estarem no Rio, só nos encontramos uma vez por ano e mesmo assim não se irritam com minha preguiça aos finais de semana. E a muitos outros espalhados pelo Brasil, mas sempre presentes online: Ricardo, Inho, Álvaro, e vários outros...

Mais uma vez, obrigado.

“– Quarenta e dois.”

(Douglas Adams, O Guia do Mochileiro das Galáxias)

RESUMO

BOZAQUEL-MORAIS, Bruno Leonardo. **Identificação de Reguladores do Metabolismo de Lipídios Neutros em *Saccharomyces cerevisiae***: desenvolvimento e aplicação de um ensaio fluorimétrico para o estudo de corpúsculos lipídicos. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

O mundo observa atualmente uma escalada em uma série de patologias resultantes de anormalidades no metabolismo de lipídios neutros. Muitos esforços são feitos no desenvolvimento de fármacos contra tais enfermidades, contudo o metabolismo lipídico ainda não é completamente compreendido. Um exemplo disso é o caso dos corpúsculos lipídicos, estruturas intracelulares de armazenamento de lipídios neutros, cujo desequilíbrio de síntese e mobilização constitui um fator importante na patogênese de desordens como resistência a insulina e doenças cardiovasculares. O objetivo desta tese é o estudo da regulação do metabolismo de lipídios e sua relação com a dinâmica dos corpúsculos lipídicos. Como modelo experimental utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que além de vantagens práticas e econômicas, apresenta homólogos de muitos genes de mamíferos. Baseando-se na alta especificidade da sonda fluorescente BODIPY 493/503 para corpúsculos lipídicos, desenvolveu-se um método fluorimétrico para a avaliação de corpúsculos lipídicos no interior de células de leveduras. O ensaio revelou ter boa reprodutibilidade, além de ser rápido, sensível e ter baixo custo. Sua aplicação em um experimento de larga escala permitiu a identificação de 13 genes de proteína-fosfatases (subunidades catalíticas e regulatórias) cujas deleções causaram níveis anormais de corpúsculos lipídicos. A análise desses genes com ferramentas de biologia de sistemas identificou a proteína-fosfatase do tipo 2C, Ptc1p, como elemento central de uma sub-rede de regulação, além de fornecer 58 genes candidatos a integrarem as vias de sinalização reguladoras do metabolismo lipídico. O estudo dos mutantes com níveis reduzidos de corpúsculos lipídicos mostraram que a proteína-fosfatase do tipo 2A, Sit4p, juntamente com a sua subunidade regulatória Sap190p, interferem no metabolismo lipídico afetando o estado de fosforilação da quinase Snf1p/AMPK, que, estando fosforilada, torna-se ativa e inibe a síntese de ácidos graxos através da redução da atividade da acetil-coa carboxilase.

ABSTRACT

BOZAQUEL-MORAIS, Bruno Leonardo. **Identification of Neutral Lipid Metabolism Regulators in *Saccharomyces cerevisiae***: development and application of a fluorimetric assay for the study of lipid droplets. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

The world watches an increase in diseases resulting from abnormalities in the metabolism of neutral lipids. Many efforts are made to develop drugs against these diseases, but lipid metabolism is still not completely understood. One example is the case of intracellular lipid droplets, structures that store neutral lipids, whose imbalance of synthesis and mobilization is an important factor in the pathogenesis of disorders such as insulin resistance and cardiovascular diseases. This thesis aims to study the regulation of lipid metabolism and its relation to the dynamics of lipid droplets. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which, in addition to practical and economic advantages, presents homologous genes to mammals, was employed as an experimental model. Based on the high specificity of the fluorescent probe BODIPY 493/503 to lipid droplets, we developed a fluorimetric assay for the assessment of lipid droplets inside yeast cells. The assay proved to have good reproducibility, in addition to being fast, sensitive and have low cost. Its application in a large-scale experiment allowed us to identify 13 protein-phosphatase genes (catalytic and regulatory subunits) that caused abnormal levels of lipid droplets when deleted. The analysis of these genes with system biology tools has identified the protein phosphatase type 2C, Ptc1p as a central element of a regulation sub-network, and provided 58 genes which might integrate the signaling pathways regulating lipid metabolism. The study of mutants with reduced levels of lipid droplets showed that the protein phosphatase type-2A, Sit4p, together with its regulatory subunit Sap190p interfere with lipid metabolism by affecting the phosphorylation state of Snf1p/AMPK kinase, which, being phosphorylated, becomes active and inhibits the synthesis of fatty acids by reducing the activity of acetyl-CoA carboxylase.

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

24(28)DHE	24(28)dehidroergosterol
3'-UTR	Região 3-prima não traduzida (5-prime <u>un</u> translated <u>re</u> gion)
4E-BP1	proteína ligadora 1 do fator de iniciação de tradução 4E
5'-UTR	Região 5-prima não traduzida (5-prime <u>un</u> translated <u>re</u> gion)
ABS _{600nm}	Absorbância a 600 nm
ACCase	acetil-coa carboxilase
ACP	proteína carreadora de acila (acyl carrier protein)
AF/célula	área de fluorescência total por célula
AMP	adenosina monofostato
AMPK	proteína-quinase ativada por AMP
ATGL	Triacilglicerol lipase de adipócitos (<u>A</u> dipocytes <u>T</u> riacyl <u>g</u> lycerol <u>L</u> ipase)
cAMP	3',5' monofosfato cíclico de adenosina
CDC25	ciclo de divisão celular 25 (<u>C</u> ell <u>C</u> ycle <u>D</u> ivision 25)
cGMP	3',5' monofosfato cíclico de guanosina
CL/célula	número de corpúsculos lipídicos por célula
DO	densidade ótica
DAG	diacilglicerol
DGAT	acil-coa:diacilglicerol aciltransferase
DMAPP	dimetilalil pirofosfato
DNA	ácido desoxiribonucléico
dNTP	desoxiribonucleotídeo 5'-trifosfato
DSP	proteína fosfatase de dupla especificidade (Dual-specificity phosphatase)
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EE	éster de esterol
ensaio LRF	ensaio líquido de recuperação de fluorescência
ERGs	sigla para enzimas da via de síntese de ergosterol em leveduras (<u>E</u> R <u>G</u> osterol biosynthesis)
FABP4	proteína ligadora de ácidos graxos 4 (<u>F</u> atty <u>A</u> cid <u>B</u> inding <u>P</u> rotein 4)
FAZ	ácido graxo sintase (Fatty acid synthase)
FPP	farnesil pirofosfato
GMP	guanosina monofosfato
GO	ontologia genética (Gene Ontology)
GPP	geranil pirofosfato

<i>hlc</i>	alto conteúdo lipídico (<u>H</u> igh <u>L</u> ipid <u>C</u> ontent)
HMGR	3-hidroxi-3-metil-glutaril redutase
HSL	lipase estimulada por hormônios (<u>H</u> ormone <u>S</u> timulated <u>L</u> ipase)
IC ₅₀	dose necessária para obter 50% de inibição do crescimento
Índice CL	índice de corpúsculos lipídicos (fluorescência relativa obtida por unidade de densidade ótica de uma cultura de leveduras)
IPP	isopentenil pirofosfato
<i>KanR</i>	gene marcador, confere resistência a canamicina e geneticina
KI	iodeto de potássio
KOH	hidróxido de potássio
LCAT	lecitina:colesterol aciltransferase
<i>llc</i>	baixo conteúdo lipídico (<u>L</u> ow <u>L</u> ipid <u>C</u> ontent)
LMW	baixo peso molecular (<u>L</u> ow- <u>M</u> olecular- <u>W</u> eight)
MAG	monoacilglicerol
MGL	monoacilglicerol lipase
mTOR	proteína alvo de rapamicina de mamíferos (<u>m</u> ammalian <u>T</u> arget of <u>R</u> apamycin)
PAP	fosfatidato fosfatase (Phosphatidic Acid Phosphatase)
PAT	família de proteínas presentes no corpúsculo lipídico de animais (<u>P</u> erilipin, <u>A</u> dipophilin, <u>T</u> IP47)
PCR	reação em cadeia da polimerase (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
PDE3B	fosfodiesterase 3B
PEG 3550	Polietilenoglicol (peso molecular 3550 g/mol)
PKA	proteína-quinase tipo A (dependente de cAMP)
PKB	proteína-quinase tipo B (também conhecida como Akt)
PKG	proteína-quinase dependente de cGMP
PLNA	perilipina
PP	proteína-fosfatase
PP2A	proteína-fosfatase do tipo 2A
PPM	fosfoproteína fosfatase (<u>P</u> hosphoprotein <u>p</u> hosphatase <u>M</u> agnesium-dependent)
PPP	fosfoproteína fosfatase (<u>P</u> hosphoprotein <u>p</u> hosphatase)
PTP	fosfoproteína tirosina fosfatase (<u>P</u> hosprotein <u>T</u> yrosine <u>P</u> hosphatase)
PVDF	fluoreto de polivinilideno
R ²	R-quadrado da regressão, que mede a proporção da variabilidade em Y que é explicada por X
RNAse A	ribonuclease A
SAP	proteína associada a Sit4p (<u>S</u> it4-associated <u>p</u> rotein)
SD	meio mínimo, definido (<u>S</u> ynthetic <u>D</u> efined)
SDS	dodecil sulfato de sódio

Ser	resíduo serina
SGD	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> genome database (www.yeastgenome.org)
Sit4p	proteína-fosfatase semelhante a tipo 2A, homóloga a PP6 de mamíferos (S <u>u</u> ppressor of I <u>n</u> itiation of T <u>r</u> anscription)
Snf1p	proteína-quinase homóloga à AMPK de mamíferos (S <u>u</u> crose N <u>o</u> n-F <u>e</u> rmenting)
SREBPs	proteínas ligantes de elementos reguladores do esterol (S <u>t</u> erol R <u>e</u> gulatory E <u>l</u> ements B <u>i</u> nding P <u>r</u> oteins)
SREs	elementos reguladores do esterol (S <u>t</u> erol R <u>e</u> gulatory E <u>l</u> ements)
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TAG	triacilglicerol
TAP tag	epítipo marcador de proteínas para purificação por afinidade em sequência (T <u>a</u> ndem A <u>f</u> finity P <u>u</u> rification)
TaqPolimerase	DNA polimerase proveniente de <i>Thermus aquaticus</i>
TBS-T	Salina com tween-20 tamponada com Tris (Tris Buffered Saline Tween-20)
TE	tampão Tris-HCL contendo EDTA
Thr	resíduo treonina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
Tyr	resíduo tirosina

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura de lipídios neutros e vias de síntese	18
FIGURA 2. Síntese de ácidos graxos e TAGs.....	22
FIGURA 3. Síntese de ergosterol.....	29
FIGURA 4. Representação da estrutura dos corpúsculos lipídicos.....	30
FIGURA 5. Possíveis mecanismos de biogênese dos corpúsculos lipídicos ...	32
FIGURA 6. Modelo hipotético para lipólise em adipócito	36
FIGURA 7. Vias de transdução de sinais implicadas no controle hormonal da lipólise em adipócitos	38
FIGURA 8. Método de deleção por recombinação homóloga	45
FIGURA 9. Cassete de deleção SIT4-KAN	47
FIGURA 10. Confirmação da obtenção da cepa <i>BY4741 sit4Δ ERG3-TAP</i>	52
FIGURA 11. Ensaio Líquido de Recuperação de Fluorescência.....	54
FIGURA 12. Representação esquemática do ensaio de recuperação de fluorescência.	56
FIGURA 13. Ensaio Líquido de Recuperação de Fluorescência adaptado para experimento de larga escala	53
FIGURA 14. Espectros de absorção e emissão do BODIPY 493/503.....	64
FIGURA 15. Teste de <i>quencher</i> s para o BODIPY.....	66
FIGURA 16. Adição de células fixadas não altera as propriedades fluorimétricas do BODIPY	67
FIGURA 17. A adição de células ao meio é capaz de recuperar o sinal de fluorescência do BODIPY na presença de quencher.....	69
FIGURA 18. O ensaio líquido de recuperação de fluorescência é capaz de detectar a dinâmica do metabolismo de corpúsculos lipídicos.....	70
FIGURA 19. O ensaio LRF tem alta correlação com a variação de triacilgliceróis ao longo do crescimento	71
FIGURA 20 O ensaio líquido de recuperação de fluorescência é capaz de detectar a dinâmica do metabolismo de corpúsculos lipídicos.....	73
FIGURA 21. Análise estatística de um experimento de larga escala empregando o ensaio líquido de recuperação de fluorescência	75

FIGURA 22. Níveis de corpúsculos lipídicos nas mutantes <i>erg4Δ</i> e <i>erg5Δ</i> determinado por microscopia de fluorescência.	77
FIGURA 23. Mapa de interações entre os genes SIT4, SAP190 e REG1	79
FIGURA 24. Níveis de fosforilação da proteína quinase Snf1p/AMPK ao longo do crescimento	80
FIGURA 25. A deleção da proteína-quinase Snf1p/AMPK provoca aumento nas corpúsculos lipídicos	81
FIGURA 26. Níveis de corpúsculos lipídicos na cepa <i>sit4Δ</i> mantêm-se reduzidos ao longo de todo o crescimento	82
FIGURA 27. As cepas <i>llc</i> apresentam maior sensibilidade a soraphen A, um inibidor específico da enzima ACCase	83
FIGURA 28. Cepa mutante <i>sit4</i> apresenta maior sensibilidade a anfotericina B	85
FIGURA 29. Biosíntese de ergosterol não é afetada pela deleção de Sit4p	85
FIGURA 30. Perfil de resistência a soraphen A de mutante com níveis anormais de corpúsculos lipídicos	87
FIGURA 31. Mapa de interações diretas entre os genes identificados no <i>screening</i> para mutantes com níveis anormais de corpúsculos lipídicos	89
FIGURA 32. Análise de conectores entre os mutantes com níveis anormais de corpúsculos lipídicos	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Classificação das proteína-fosfatases	41
TABELA 2. Cepas empregadas neste trabalho.....	44
TABELA 3. Correlação entre fenótipo de corpúsculos lipídicos e resistência a soraphen A.....	87

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. TRIACILGLICERÓIS.....	19
1.1.1. ÁCIDOS GRAXOS: VISÃO GERAL	19
1.1.2. SÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS	19
1.1.3. SÍNTESE DE TRIACILGLICERÓIS.....	22
1.2. ÉSTERES DE ESTERÓIS	25
1.2.1. ESTERÓIS: VISÃO GERAL	25
1.2.2. SÍNTESE DE ESTERÓIS.....	25
1.2.3. ESTERIFICAÇÃO DE ESTERÓIS	27
1.3. CORPÚSCULOS LIPÍDICOS	29
1.3.1. ESTRUTURA E BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS....	30
1.3.2. PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO CORPÚSCULO LIPÍDICO.....	33
1.3.3. MOBILIZAÇÃO DE TAGs: REGULAÇÃO DA LIPÓLISE	35
1.4. FOSFORILAÇÃO REVERSÍVEL: PAPEL DE PROTEÍNA-FOSFATASES NA REGULAÇÃO DO METABOLISMO LIPÍDICO	38
2. OBJETIVOS	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1. REAGENTES, LEVEDURAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	43
3.2. DELEÇÃO DO GENE SIT4.....	44
3.2.1. Construção do cassete de deleção	44
3.2.2. Transformação com o cassete de deleção.....	47
3.2.3. Seleção de transformantes	48
3.2.4. Confirmação de deleção: extração de DNA genômico.....	49
3.2.5. Confirmação de deleção: PCR de confirmação	50
3.3. ENSAIO LÍQUIDO DE RECUPERAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA.....	52
3.4. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	54
3.5. SCREENING PARA IDENTIFICAÇÃO DE MUTANTES COM NÍVEIS ANORMAIS DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS	55
3.6. TESTES DE SENSIBILIDADE A DROGAS	57
3.7. EXTRATOS DE PROTEÍNAS TOTAIS E ELETROFORESE.....	58

3.8. WESTERN BLOT	59
3.9. DOSAGEM DE ERGOSTEROL TOTAL	60
3.10. DOSAGEM ENZIMÁTICA DE TRIACILGLICEROL	61
4. RESULTADOS	63
4.1. ESTABELECIMENTO DE UM MÉTODO FLUORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS.....	63
4.2. SCREENING DE MUTANTES PARA NIVEIS ANORMAIS DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS	74
4.2.1. O PAPEL DA SER/THR PROTEÍNA-FOSFATASE SIT4 NO METABOLISMO LIPÍDICO.....	78
4.2.2. IDENTIFICAÇÃO DE REDES DE REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS.....	86
5. DISCUSSÃO	93
5.1. ESTABELECIMENTO DE UM MÉTODO FLUORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS.....	93
5.2. APLICAÇÃO DO MÉTODO FLUORIMÉTRICO A EXPERIMENTOS DE LARGA ESCALA	96
5.3. IDENTIFICAÇÃO DE VIAS REGULADORAS DO METABOLISMO LIPÍDICO	97
5.4. O PAPEL DA SERINA-TREONINA PROTEÍNA-FOSFATASE SIT4	98
6. CONCLUSÕES	102
7. REFERÊNCIAS.....	104
APÊNDICES.....	119
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

Ácidos graxos e esteróis são lipídios integrantes do metabolismo e da composição básica de qualquer célula. Eles apresentam papel energético, como é o caso dos ácidos graxos que podem sofrer β -oxidação gerando energia, e estrutural, como é o caso dos esteróis que determinam a fluidez de membranas biológicas. Além disso, ácidos graxos e esteróis participam da regulação de expressão gênica, através da ligação a elementos reguladores (Duplus *et al.*, 2000; Shimano, 2001). Por suas propriedades físico-químicas, uma vez sintetizados, ácidos graxos e esteróis livres são capazes de se inserir em membranas biológicas, o que representa um risco lipotóxico¹ para as células (Henneberry & Sturley, 2005). Desse modo, a síntese desses lipídios deve ser regulada de maneira a se prevenir sua toxicidade sem que as funções celulares relacionadas sejam prejudicadas. De fato, esses lipídios são convertidos em lipídios neutros biologicamente mais inertes, os triacilgliceróis (TAGs) e ésteres de esteróis (EEs) (FIGURA 1F). A etapa final da esterificação de ácidos graxos e esteróis – que gera TAGs e EEs, respectivamente – ocorre predominantemente no retículo endoplasmático. Como TAGs e EEs não são capazes de compor membranas biológicas, à medida que são sintetizados, eles se depositam no retículo endoplasmático e se agrupam, dando origem às estruturas chamadas corpúsculos lipídicos (Garbarino & Sturley, 2005). Tais estruturas vêm recebendo maior atenção da comunidade científica já que desequilíbrios em seu metabolismo estão envolvidos na patogênese de uma série de desordens como resistência a insulina (Bostrom *et al.*, 2007), doenças neurodegenerativas (Cole *et al.*, 2002) e aterosclerose (Mori *et al.*, 2001). Contudo, pouco se sabe sobre os processos celulares que regulam a biogênese e mobilização destas organelas.

Nas próximas sessões serão discutidos o metabolismo dos lipídios envolvidos na biogênese de corpúsculos lipídicos, apresentando as vias de

¹ Nota do autor: o termo lipotoxicidade refere-se às disfunções decorrentes de níveis elevados de ácidos graxos e esteróis livres tanto no âmbito celular como no tecido/organismo como um todo, não se restringindo a adipócitos. Diversos trabalhos atuais já vêm empregando o termo, embora ainda não seja amplamente reconhecido na clínica (Unger & Zhou, 2001; Weinberg, 2006; Cusi, 2010).

síntese e seus mecanismos de regulação, altamente conservados entre mamíferos e a levedura *S. cerevisiae*, modelo experimental desta tese.

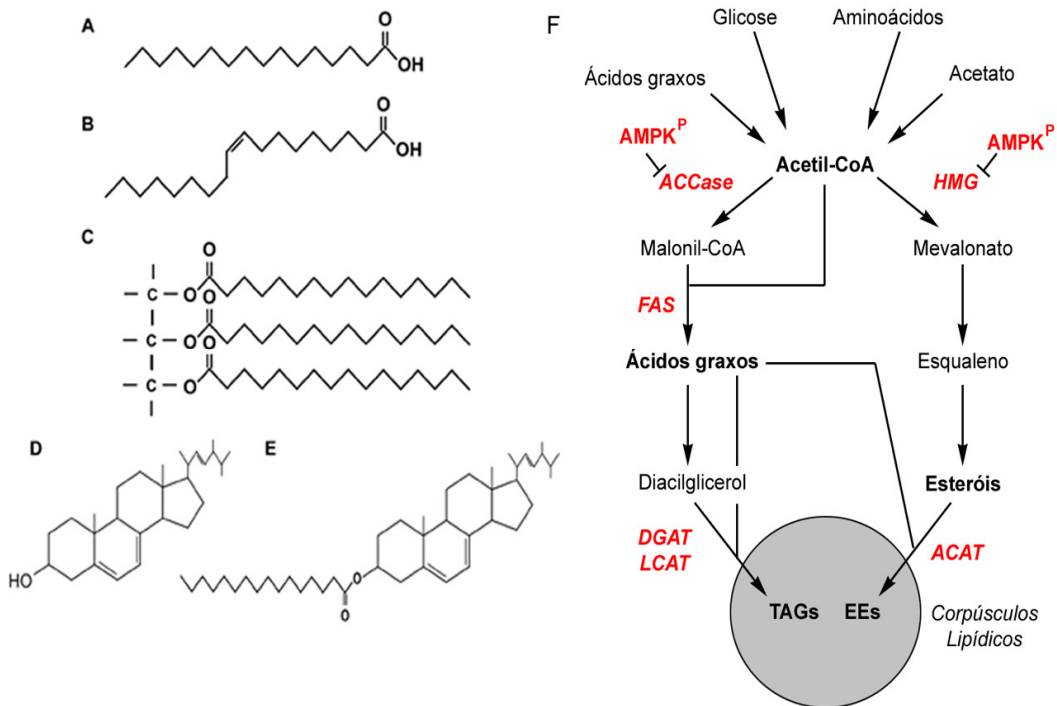


FIGURA 1. Estrutura de lipídios neutros e vias de síntese. A, Ácido graxo saturado (ácido palmítico). B, Ácido graxo apresentando uma insaturação (ácido oléico). C, Exemplo de uma molécula de triacilglicerol (tripalmitina). D, Ergosterol. E, Exemplo de um esteril éster (ergosteril palmitato). F, Acetil-coa gerado a partir de glicose, ácidos graxos, aminoácidos ou acetato, é direcionado para a síntese de ácidos graxos, pela enzima acetil-coa carboxilase (ACCase), ou síntese de esteróis, pela 3-Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMGR), ambas inibidas por fosforilação pela proteína-quinase ativada por AMP (AMPK). Pelo seu potencial lipotóxico, ácidos graxos e esteróis são convertidos a lipídios neutros mais inertes, os triacilgliceróis (TAGs) e ésteres de esterol (EEs), e estocados em corpúsculos lipídicos. Maiores detalhes sobre as vias e regulações se encontram no texto. AMPK^P – proteína-quinase ativada por AMP (forma fosforilada, ativa), FAS – ácido graxo sintase, DGAT – acil-coa:diacilglicerol aciltransferase, LCAT² - lecitina:colesterol aciltransferase, ACAT – acil-coa:colesterol aciltransferase.

² Na levedura *S. cerevisiae*, uma das proteínas responsáveis pela síntese de triacilgliceróis, Lro1p, é mencionada como uma LCAT por questão de homologia (Oelkers *et al.*,2000). No entanto, deve-se notar que ainda não foi demonstrada a participação de LCATs na síntese de triacilgliceróis em mamíferos.

1.1. TRIACILGLICERÓIS

1.1.1. ÁCIDOS GRAXOS: VISÃO GERAL

Por definição, ácidos graxos são ácidos monocarboxílicos, onde uma carboxila encontra-se ligada a uma longa cadeia de alquila que pode variar de tamanho (FIGURA 1A) e pode apresentar insaturações (FIGURA 1B). Os ácidos graxos desempenham papéis importantes na fisiologia celular. Por exemplo, o miristato (C:14) e o palmitato (C:16) podem ser empregados em modificações covalentes de proteínas, afetando sua localização celular (Resh, 1999). Por ser uma molécula altamente reduzida, o ácido graxo é o principal estoque celular de energia. Além disso, é base para a síntese de lipídios mais complexos. Assim, o ácido graxo é estocado na forma de TAG, um tri-éster proveniente de uma molécula de glicerol onde cada uma das três hidroxilas sofreu uma condensação carboxílica com um ácido graxo (FIGURA 1C). Os estoques de TAG podem ser mobilizados mediante hidrólise enzimática, o que promove a liberação de ácidos graxos prontamente utilizáveis pelas células.

1.1.2. SÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS

O acetil-coa, substrato inicial na síntese de ácidos graxos, pode ser obtido primariamente a partir da oxidação da glicose (via descarboxilação do piruvato), da β -oxidação de ácidos graxos, da quebra de aminoácidos (leucina, lisina e aminoácidos aromáticos) e, em menor extensão, a partir de acetato (FIGURA 1F). Uma vez gerado, o acetil-coa pode ser encaminhado para obtenção de energia, onde será completamente oxidado, ou ser empregado na síntese de outras biomoléculas, tais como lipídios.

A reação de comprometimento do acetil-coa com a biossíntese de ácidos graxos consiste em sua carboxilação, gerando malonil-CoA (FIGURA 1F). Essa reação é catalisada pela enzima acetil-coa carboxilase (ACCase). O malonil-CoA produzido será utilizado como blocos pela enzima ácido graxo sintase (FAS), que se apresenta na forma de um dímero multifuncional onde se desenrolam todos os passos de síntese. Os intermediários da síntese são deslocados entre os sítios catalíticos graças a uma proteína carreadora de acila

(ACP). O primeiro passo consiste na substituição dos grupamentos coenzima A das moléculas de acetil-coa e malonil-CoA pela ligação à ACP. A partir desta reação, seguem-se vários ciclos de condensação da cadeia nascente de ácido graxo com uma nova molécula de malonil-ACP, fase chamada de alongação. Os ciclos de condensação repetem-se até atingir uma cadeia entre 14 e 18 carbonos (FIGURA 2A).

A etapa limitante desta via sintética é a produção de malonil-CoA pela ação da ACCase. Em eucariotos, a ACCase apresenta-se como uma enzima multifuncional com três componentes – biotina carboxilase, proteína transportadora de biotinacarboxil e transcarboxilase (Hardie, 1989). No caso de mamíferos, são conhecidas duas isoformas, ACC1 (ou ACC α) e ACC2 (ou ACC β), com cerca de 265 kDa e 280 kDa, respectivamente. Diferentes na porção N-terminal, acredita-se, pela distribuição observada entre diferentes tecidos, que a primeira tenha função de síntese ao passo que a segunda, ligada à membrana externa da mitocôndria, tenha papel regulatório na β -oxidação (Munday, 2002). Assim como em mamíferos, a levedura *S. cerevisiae* também apresenta duas isoformas de ACCase, codificadas pelos genes *HFA1* (Kearsey, 1993) e *ACC1* (al-Feel *et al.*, 1992). A Hfa1p, embora mitocondrial como a ACC2 de mamíferos, localiza-se na matriz mitocondrial (Hoja *et al.*, 2004) onde participa de um segundo sistema de síntese de ácidos graxos (Brody *et al.*, 1997). Sua deleção é viável, contudo a mutante não é capaz de crescer em substratos não-fermentativos (Hoja *et al.*, 2004). Já a Acc1p é citoplasmática e apresenta-se como proteína homóloga à ACC1 de mamíferos. Sua deleção torna a célula inviável, ainda que se suplemente o meio com ácidos graxos, sendo sugerido que ela desempenhe outros papéis fisiológicos, de alguma forma influenciando sobre o transporte de RNAm para fora do núcleo (Schneiter *et al.*, 1996).

Em mamíferos, a síntese de ácidos graxos deve ser coordenada com o estado energético do organismo, o que é sinalizado por hormônios. A insulina, hormônio liberado quando a glicemia do sangue aumenta, promove a ativação da ACCase e a síntese de ácidos graxos, ao passo que glucagon e adrenalina, liberados quando a glicemia do sangue diminui, promovem sua inibição (Mabrouk *et al.*, 1990). A atividade de ACCase é finamente controlada por

fosforilação reversível e regulação alostérica. No primeiro caso, quando o estado energético da célula é baixo, a proteína-quinase ativada por AMP (AMPK), é a responsável por fosforilar diretamente a ACCase no resíduo Ser⁷⁹ inibindo a enzima (Munday *et al.*, 1988) (FIGURA 1F). Embora outros sítios de fosforilação tenham sido descobertos na estrutura da ACCase (Boone *et al.*, 1999), a fosforilação do resíduo Ser⁷⁹ parece ser a principal, já que foi mostrada sua correspondência com a inibição fisiológica de ACCase provocada pelo tratamento de hepatócitos com glucagon (Sim & Hardie, 1988). Ainda não está claro qual proteína-fosfatase é responsável pela desfosforilação e, portanto, ativação da ACCase. Experimentos da década de 80 apontam que uma proteína-fosfatase do tipo PP2A é capaz de desfosforilar uma ACCase *in vitro*, porém não se sabe a relevância fisiológica nem se esta fosfatase é a responsável pela defosforilação *in vivo* (Gaussin *et al.*, 1996).

Já a regulação alostérica tem como efetor o citrato, que age estimulando a atividade da enzima ao facilitar que os octâmeros de ACCase (forma inativa) se associem em filamentos (forma ativa). De fato, o citrato é capaz de reverter parcialmente os efeitos de fosforilação da ACCase (Munday, 2002).

Na levedura *S. cerevisiae*, a ACCase não é suscetível à ativação por citrato (Matshuhashi *et al.*, 1964), porém, assim como em mamíferos, é regulada por fosforilação reversível (Witters & Watts, 1990). A proteína-quinase Snf1p/AMPK, identificada como ortóloga a AMPK de mamíferos, é a principal proteína-quinase envolvida na fosforilação e inativação de ACCase *in vivo* (Woods *et al.*, 1994). Análises proteômicas em busca de peptídeos fosforilados revelaram apenas um sítio de fosforilação para a ACCase de levedura (Ser¹⁵⁷) (Ficarro *et al.*, 2002). Isto pode não representar a realidade, já que a ACCase de mamíferos apresenta múltiplos sítios. A proteína-fosfatase responsável pela desfosforilação e, portanto, ativação de ACCase ainda não é conhecida. No entanto, em experimentos de larga-escala, já foi identificada a interação física entre a serina-treonina proteína-fosfatase Sit4p e Acc1p (Ho *et al.*, 2002). Porém, ainda não foi demonstrado se Sit4p é realmente capaz de desfosforilar Acc1p.

1.1.3. SÍNTESE DE TRIACILGLICERÓIS

Em mamíferos, a síntese de TAGs ocorre principalmente no tecido adiposo, já que este é especializado no armazenamento de estoques lipídicos. Tanto em leveduras como nos adipócitos, a via pode ser dividida em duas etapas, primeiramente a produção de diacilglicerol e, em seguida, uma acilação final gerando o triacilglicerol (FIGURA 2B). A primeira reação consiste na acilação de uma molécula de glicerol-3-fosfato, intermediário da glicólise (embora exista uma via alternativa que utiliza a dihidroxiacetona fosfato). Essa reação, que

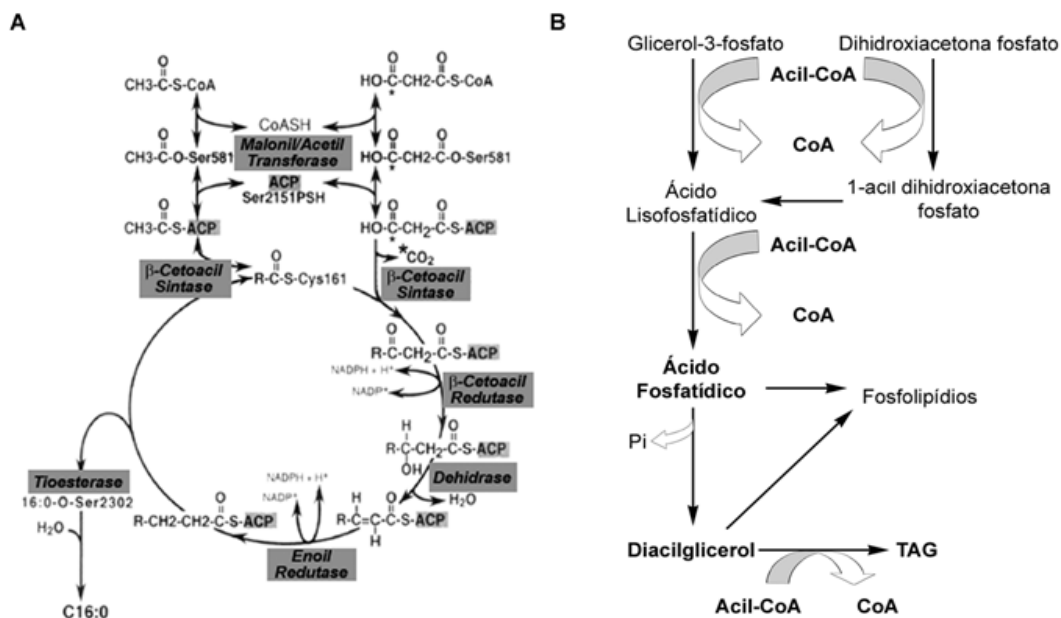


FIGURA 2. Síntese de ácidos graxos e TAGs. A, A síntese de ácidos graxos pode ser compreendida como um processo cíclico no qual uma molécula iniciadora de acetil sofre uma série de condensações com 7 moléculas “extensoras” de malonil (em média). A cada condensação o carbono beta de cada grupamento 3-cetoacil formado é completamente reduzido por um processo de cetoredução-desidratação-enoilredução. A cadeia formada em um ciclo serve como iniciador do ciclo seguinte, de maneira que a cada ciclo, a cadeia aumenta em dois carbonos e é liberada uma molécula de bicarbonato. O produto final é liberado como ácido graxo pela ácido graxo sintase em animais, ao passo que em leveduras, a enzima libera um acil-coa (Vance & Vance, 2006). B, A síntese de TAG consiste inicialmente na esterificação de ácidos graxos utilizando como esqueleto uma molécula de glicerol. Ocorrem a transferência de três acilas e uma desfosforilação ao longo da via, empregando, portanto, três moléculas de ácidos graxos. A primeira acilação pode empregar como acceptor o glicerol-3-fosfato ou dihidroxiacetona fosfato, dando origem a ácido lisofosfatídico. Este sofrerá nova acilação gerando ácido fosfatídico. O ácido fosfatídico é desfosforilado, gerando diacilglicerol, substrato da última acilação da via. Tanto o ácido fosfatídico quanto o diacilglicerol também participam de vias de síntese de fosfolípidios.

emprega uma molécula de acil-coa como doador de acilas, produz uma molécula de ácido lisofosfatídico e é catalisada pela glicerol-3-fosfato aciltransferase. Enquanto em mamíferos foram identificados quatro (Wendell *et al.*, 2009), em leveduras até o momento são conhecidas apenas duas isoformas dessa enzima, Gat1p e Gat2p, sendo Gat1p a principal já que não apresenta preferência aparente por ácidos graxos específicos e localiza-se tanto em corpúsculos lipídicos como no retículo endoplasmático.

Em seguida, o ácido lisofosfatídico sofre nova acilação gerando ácido fosfatídico, reação catalisada pela enzima 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferase. Enquanto mamíferos apresentam duas isoformas desta enzima, em leveduras, embora recentemente tenha sido identificada uma aciltransferase com preferência para fosfolipídios, apenas um homólogo funcional foi identificado (Slc1p). A Slc1p, assim como Gat1p, localiza-se em corpúsculos lipídicos e no retículo endoplasmático.

Finalmente, o ácido fosfatídico sofre desfosforilação sendo convertido a diacilglicerol pela enzima ácido fosfatídico fosfatase (PAP). Em levedura, a maior parte da atividade de PAP foi recentemente atribuída a Pah1p, ortóloga da lipina, proteína que desempenha semelhante papel em células de mamíferos. Outras proteínas também apresentam atividade PAP como os produtos dos genes *DPP1* e *LPP1*. Como tanto o ácido fosfatídico quanto o diacilglicerol podem ser encaminhados para a síntese de fosfolipídios e sinalizadores intracelulares, esta reação torna-se um ponto chave na regulação do metabolismo de lipídios de uma maneira geral. O ácido fosfatídico, sobretudo, participa de um sistema de regulação transcricional do metabolismo de inositol, envolvendo a proteína regulatória Opi1p e dois fatores de transcrição, Ino2p e Ino4p que promovem a transcrição do gene *INO1*. Opi1p se liga aos fatores Ino2p/Ino4p impedindo que estes ajam no núcleo, dessa forma a transcrição de *INO1* não está ocorrendo. Contudo, a proteína Opi1p é capaz de se ligar ao ácido fosfatídico presente nas membranas do retículo endoplasmático, sendo seqüestrada. Nessa situação os fatores Ino2p/Ino4p se deslocam para o núcleo promovendo a transcrição de *INO1* (Loewen *et al.*, 2004). Inclusive, parece que este mecanismo atua também na regulação da expressão de ACCase (Chirala *et al.*, 1994; Hasslacher *et al.*, 1993)

A síntese de TAGs conclui-se com uma terceira e última acilação (FIGURA 2B). Essa etapa pode se dar por duas reações diferentes. Uma delas, catalisada pela acil-coa:diacilglicerol aciltransferase (DGAT) Dga1p (Oelkers *et al.*, 2002), assim como as outras acilações da via, emprega como doador de acilas uma molécula de acil-coa. A enzima Dga1p é, de fato, a principal aciltransferase de leveduras e localiza-se principalmente em corpúsculos lipídicos. Alternativamente, pode ocorrer outra reação, envolvendo uma enzima homóloga à lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT) de mamíferos, Lro1p, que utiliza como doador de acilas moléculas de glicerofosfolipídios, sobretudo fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (Oelkers *et al.*, 2000). Foi verificado que a distribuição celular de Lro1p restringe-se ao retículo endoplasmático. A predominância de uma ou outra é dependente da fase de crescimento da cultura, de modo que Lro1p parece ser mais ativa na fase de crescimento exponencial ao passo que a atividade de Dga1p é mais pronunciada na fase estacionária (Kohlwein, 2010).

A regulação do metabolismo de TAGs ainda não é bem compreendida. A necessidade de TAG oscila entre a síntese de lipídios de membranas e obtenção de energia. Em resposta a estímulos proliferativos, a necessidade de formação de membranas promoverá a hidrólise de TAGs, o que irá fornecer blocos para síntese de fosfolipídios. Por outro lado, em situações de limitações de nutrientes a hidrólise de TAGs disponibilizará os estoques energéticos (Kurat *et al.*, 2006). Como ácidos graxos de fontes exógenas não são substrato facilmente assimiláveis pela *S. cerevisiae*, nesta levedura toda a necessidade global de triacilgliceróis e fosfolipídios deverá ser atendida pela síntese *de novo* de ácidos graxos pela enzima ACCase, já discutida no tópico anterior. .

Ainda não se compreende o impacto direto da atividade de ACCase na homeostase de TAGs e tampouco o papel de Snf1p/AMPK na coordenação entre os níveis de TAGs e as necessidades energéticas. Acredita-se que um ponto de regulação seja a conversão de ácido fosfatídico em diacilglicerol pelas enzimas PAPs, principalmente Pah1p em leveduras, já que esta enzima sofre fosforilação, forma na qual apresenta-se menos ativa (O'Hara *et al.*, 2006). Como já citado, o nível de ácido fosfatídico, dependente da atividade das PAPs, pode participar na regulação da transcrição de uma série de genes envolvidos no metabolismo lipídico, através do seqüestro da proteína

reguladora Opi1p. Além disso, foi demonstrado que Pah1p também afeta a expressão de genes de maneira não dependente de Opi1p (O'Hara *et al.*, 2006).

1.2. ÉSTERES DE ESTERÓIS

1.2.1. ESTERÓIS: VISÃO GERAL

Outro lipídio abordado neste trabalho é o esterol. Assim como os ácidos graxos, os esteróis são sintetizados a partir de acetil-coa. A estrutura básica de um esterol consiste em 17 carbonos formando 4 anéis interligados, apresentando cadeias laterais variáveis e uma hidroxila no carbono 3 (FIGURA 1D). Da mesma forma que os ácidos graxos, os esteróis são estocados em sua forma esterificada, os EEs, também classificados como lipídios neutros. Nesse caso, a hidroxila do esterol sofre condensação carboxílica com um ácido graxo, gerando o EE (FIGURA 1E), biologicamente menos ativo (Henneberry & Sturley, 2005). Diferentemente de células de mamíferos, cujo principal esterol é o colesterol, o ergosterol representa 90% dos esteróis totais da levedura *S. cerevisiae* (Ratray *et al.*, 1975). Não se sabe exatamente a vantagem evolutiva conferida pelo ergosterol às leveduras, já que as diferenças estruturais são mínimas entre este e o colesterol (que apresenta apenas uma dupla ligação no anel B e sua cadeia lateral é completamente saturada sem metilação no C24).

1.2.2. SÍNTESE DE ESTERÓIS

Para melhor compreensão, a síntese de esteróis pode ser dividida em duas fases (FIGURA 3). Primeiramente, 2 moléculas de acetil-coa são empregadas na síntese de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Nesse momento, são empregadas duas enzimas – uma tiolase, que irá gerar o acetoacetil-coa, e HMG-CoA sintase, que irá gerar o HMG-CoA. A reação seguinte catalisada pela HMG-CoA redutase é a etapa limitante da via do mevalonato, produto desta reação. Ao contrário de mamíferos, leveduras apresentam duas isoformas de HMG-CoA redutases, codificadas pelos genes *HMG1* e *HMG2*, e o produto final da via é o ergosterol e não o colesterol (Parks

et al., 1995). A deleção de uma ou outra isoforma não afeta significativamente o crescimento celular, porém a dupla deleção torna as células auxotróficas para mevalonato (Basson *et al.*, 1987). No entanto, as isoformas apresentam estabilidades e regulações distintas. Os produtos destes genes parecem diferir quanto à estabilidade, sendo Hmg2p uma proteína menos estável. Sua estabilidade é regulada pelo fluxo metabólico da via do mevalonato (Hampton & Rine, 1994) e sua degradação se dá por ubiquitinação (Hampton & Bhakta, 1997). Por outro lado, Hmg1p é uma proteína mais estável (Hampton & Rine, 1994) e sua regulação é postranscricional por *feedback* negativo sinalizado provavelmente por mevalonato, o produto de sua reação (Dimster-Denk *et al.*, 1994; Donald *et al.*, 1997). Interessante notar que embora seja conhecida a inibição da HMGR em mamíferos por fosforilação mediada pela proteína quinase AMPK (Hardie, 1992), o mesmo ainda não foi demonstrado para leveduras.

Uma vez sintetizado o mevalonato, a primeira reação da via de biossíntese de esteróis propriamente dita é catalisada pela enzima esqualeno sintase (codificada pelo gene *ERG9*). O esqualeno gerado passa por mais duas reações catalisadas pelas esqualeno epoxidase (*ERG1*) e 2,3-oxidoesqualeno ciclase (*ERG7*), nesta ordem, até que seja obtido o lanosterol, primeiro precursor esteróide da via. A partir deste ponto, uma complexa sequência de reações irá fornecer as diversas espécies interconversíveis de esteróis que fazem parte da composição lipídica da célula. O conjunto de enzimas envolvidas nesta via, em leveduras, é codificado por uma família de genes identificados como *ERGs* (biossíntese de ERGosterol) e são foco de grande interesse científico, já que muitos inibidores desta via constituem antimicóticos amplamente empregados na clínica, como é o caso dos azoles, inibidores de Erg11p (Barrett-Bee & Dixon, 1995). Embora a síntese de ergosterol não seja essencial para a célula de levedura (Sturley, 2000), a inibição de algumas enzimas da via sintética por ação de drogas acaba provocando o acúmulo de intermediários tóxicos (Carrillo-Munoz *et al.*, 2006).

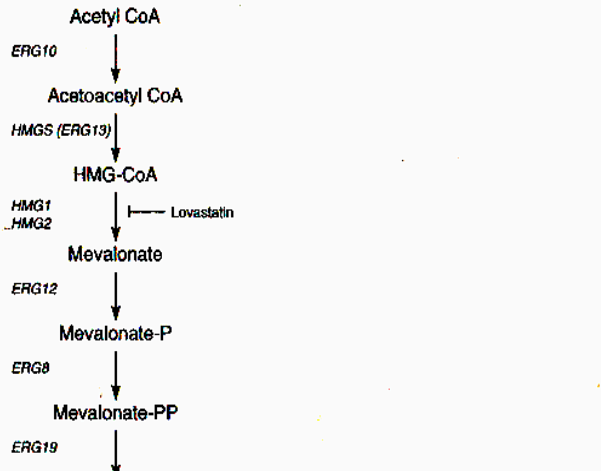
A regulação da via de síntese de ergosterol em leveduras ainda não é completamente entendida. Acredita-se que deva existir um mecanismo semelhante ao presente em mamíferos. Fatores de transcrição conhecidos como proteínas ligantes de elementos regulatórios do esterol (SREBPs),

codificados por dois genes homólogos SREBP-1 e SREBP-2, se encontram inseridos nas membranas do retículo endoplasmático (Brown & Goldstein, 1999). Com a queda dos níveis de esteróis, estas proteínas sofrem autoproteólise e são capazes de se deslocar para o núcleo, onde se ligarão a sequências promotoras conhecidas como elementos reguladores do esterol (SREs) ativando genes da síntese de esterol. De fato, análise de regiões promotoras de genes *ERGs* revelaram o que poderia ser uma sequência de consenso semelhante aos SREs de mamíferos (Dimster-Denk & Rine, 1996). Além disso, foram identificados fatores de transcrição que sejam possíveis SREBPs, tanto por estudos preditivos do genoma (Athanikar & Osborne, 1998) como estudos de mutantes (Vik & Rine, 2001). Mas ainda não está claro o mecanismo de ação, visto que ao contrário dos mamíferos, esses fatores de transcrição não apresentam domínios transmembranas. Outros fatores regulam a síntese de esteróis, como a disponibilidade de oxigênio e heme, refletindo a necessidade destes como co-fatores na via (Kwast *et al.*, 1998).

1.2.3. ESTERIFICAÇÃO DE ESTERÓIS

Em leveduras, grande parte dos esteróis encontra-se esterificada (Hunter & Rose, 1972). Essa esterificação, a qual emprega acil-coa, é catalisada por enzimas ditas acil-coa:colesterol *O*-aciltransferase (ACATs). Tanto mamíferos como leveduras apresentam duas ACATs, candidatas a alvos terapêuticos no tratamento de desordens lipídicas, como o depósito de placas nas artérias que ocorre na aterosclerose (Sturley, 2000). Em leveduras, o produto de dois genes *ARE1* e *ARE2* apresentam atividade ACAT (Yu *et al.*, 1996) que, assim como no caso de mamíferos, também se localizam no retículo endoplasmático (Zweytick *et al.*, 2000). Neste mesmo trabalho, Zweytick também demonstrou que *Are1p* e *Are2p* apresentam diferentes especificidades para as espécies de esteróis e que mutantes onde ambas as proteínas foram deletadas não apresentam ésteres de esterol (o que se reflete no aumento de esteróis livres medidos).

Mevalonate pathway



Oxygen-independent

 Oxygen-dependent

Ergosterol pathway

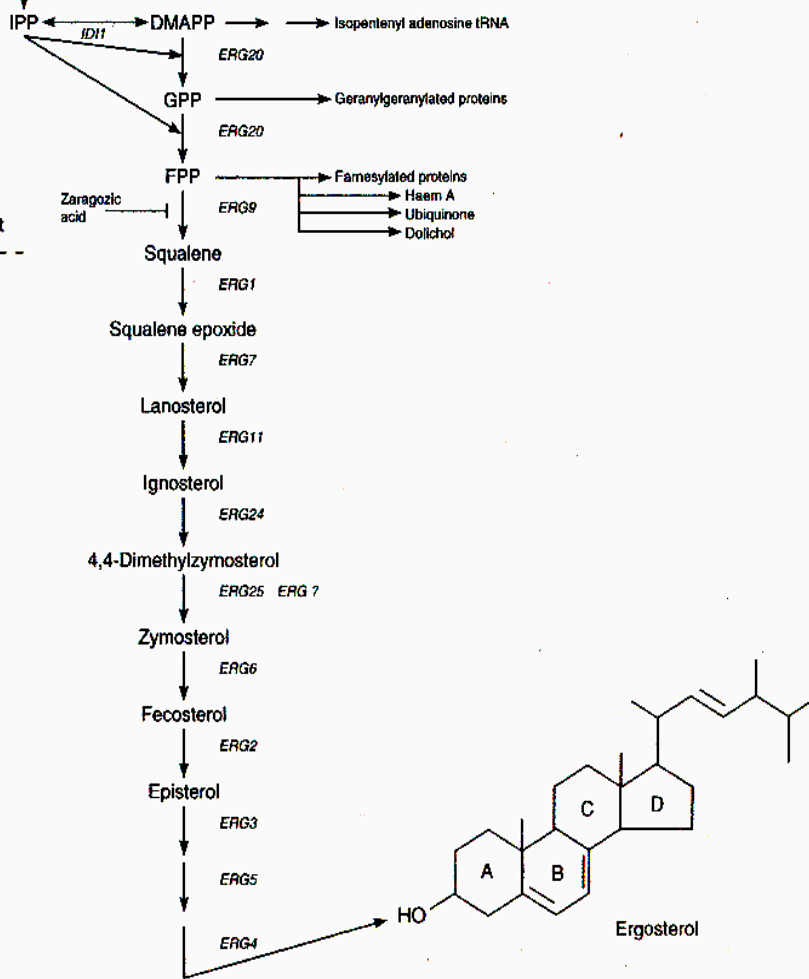


Figure 4.8 Mevalonate and ergosterol biosynthesis.

1.3. CORPÚSCULOS LIPÍDICOS

Em virtualmente todas as células, de procariotos a eucariotos, TAGs e EEs são acumulados nos corpúsculos lipídicos (Murphy, 2001). Talvez por sua ampla ocorrência, pesquisadores de campos distintos nomearam-lhes livremente, motivo pelo qual também são chamados de gotículas lipídicas ou partículas lipídicas, entre outros termos que já caíram em desuso. Estas estruturas foram descritas pela primeira vez em trabalhos do século XIX (Farese, Jr. & Walther, 2009). Inicialmente, por sua natureza lipofílica, assumiu-se que os corpúsculos lipídicos fossem meros reservatórios de lipídios. Grande parte dos trabalhos publicados até cerca de 20 anos atrás tratando de tais estruturas é de natureza meramente morfológica. Somente com a descoberta da perilipina (Greenberg *et al.*, 1991), uma fosfoproteína presente na superfície dos corpúsculos, veio o seu reconhecimento como organelas, o que os lançou como tópico atual nas ciências biológicas. Em mamíferos, entre outras funções, os corpúsculos estão envolvidos no controle de síntese e secreção de mediadores inflamatórios (Bozza & Viola, 2010) e parecem ter um papel na propagação de vírus (Samsa *et al.*, 2009).

FIGURA 3. Síntese de ergosterol. A via de síntese de esteróis pode ser dividida em dois momentos, primeiro, a via do mevalonato segue até obtenção de esqualeno. Essa via é independente da disponibilidade de oxigênio. Nesse processo são gerados precursores de outras vias sintéticas. O esqualeno é direcionado para a via de síntese de esterol propriamente dita (aqui, no caso, é mostrada a via de síntese do ergosterol, como encontrada em leveduras) e por uma série de reações complexas, gerando produtos interconversíveis (não mostrado), é sintetizado o ergosterol. Os compostos intermediários mais importantes são apresentados na FIGURA. IPP – isopentenil pirofosfato, DMAPP – dimetilalil pirofosfato, GPP – geranil pirofosfato, FPP – farnesil pirofosfato (Dickinson & Schweizer, 1999).

1.3.1. ESTRUTURA E BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS

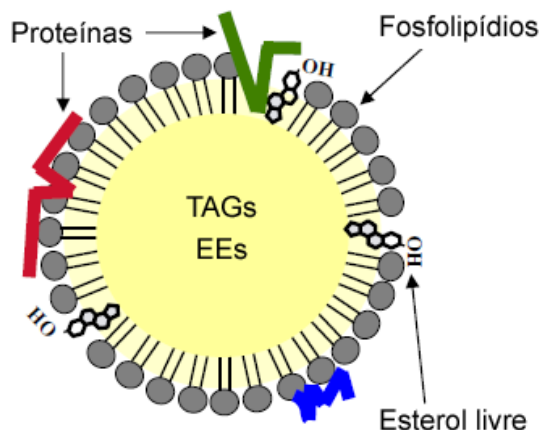


FIGURA 4. Representação da estrutura dos corpúsculos lipídicos. Os corpúsculos lipídicos são constituídos de um *core* lipídico, formado por triacilgliceróis (TAGs) e ésteres de esteróis (EEs), delimitado por uma monocamada de fosfolípidios provavelmente originária do retículo endoplasmático. Nesta camada também podem ser encontrados esteróis livres, em quantidade variável entre os tipos celulares. Associadas aos corpúsculos, cobrindo a superfície ou até mesmo inseridas na camada fosfolipídica, existem proteínas de função estrutural e enzimática. Já foram encontrados corpúsculos com membranas internas e ribossomos associados, mas o significado desse achado ainda está em discussão. Modificado de Fujimoto *et al.*, 2008.

Os corpúsculos lipídicos estão constitutivamente presentes em grande quantidade em células envolvidas na estocagem de gorduras, como adipócitos e células esteroideogênicas. Em outros tipos celulares, a sua formação está condicionada a certos estímulos fisiológicos, quando numerosos corpúsculos passam a ser observados (Bozza & Viola, 2010), ou das condições do meio, como demonstrado para células em cultura (Murphy, 2001). Os corpúsculos lipídicos apresentam um núcleo lipídico de TAGs e EEs (FIGURA 4), sendo que a proporção destes pode variar entre diferentes células, como é o caso das células adrenocorticais, nos quais EEs representam a maior parte do conteúdo lipídico, ao contrário de adipócitos, onde TAGs são o principal constituinte (Farese, Jr. & Walther, 2009). No caso de leveduras, os corpúsculos lipídicos extraídos de células em fase exponencial de crescimento revelaram uma proporção de 1:1 entre TAGs e EEs (Clausen *et al.*, 1974; Leber *et al.*, 1994).

Nos modelos eucarióticos discutidos, o núcleo lipídico encontra-se delimitado por uma monocamada de fosfolípidios (Leber *et al.*, 1994) (FIGURA 4). Os fosfolípidios mais abundantes, tanto em leveduras como em mamíferos,

são fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol. A comparação entre os perfis de fosfolipídios de membranas totais e a monocamada lipídica de corpúsculos, pelo menos no caso de mamíferos, mostra que esta última é enriquecida em lisofosfolipídios ao passo que apresenta menos esfingomiéline e ácido fosfatídico (Bartz *et al.*, 2007). Uma pequena fração de esteróis livres também é encontrada na composição de corpúsculos lipídicos.

Completando a estrutura dos corpúsculos lipídicos, são encontradas proteínas inseridas na monocamada lipídica (FIGURA 4). Trabalhos de proteômica de corpúsculos lipídicos em vários modelos revelam uma população muito especializada de proteínas associadas. Resta, contudo, ser esclarecido se existe algum sistema de direcionamento destas proteínas para os corpúsculos por sequência sinal, a exemplo de proteínas mitocondriais e peroxissomais.

Como mencionado até aqui, a síntese de TAGs e EEs propriamente dita ocorre no retículo endoplasmático, onde estão localizadas as enzimas responsáveis pela esterificação de diacilgliceróis (em leveduras, Dga1p e Lro1p) e esteróis (em leveduras, Are1p e Are2p). Os estudos de RMN sustentam que camadas bilipídicas compostas por fosfolipídios são capazes de acomodar até 3% de TAG e 5% EEs (em relação a sua composição) (Hamilton & Small, 1982; Hamilton, 1989). Esgotado esse limite, os TAGs e EEs se agrupam formando esferas que permanecem retidas no espaço intermembranas (FIGURA 5).

Acredita-se que, com a contínua deposição de lipídios neutros neste espaço, tais esferas aumentem de tamanho até que são liberadas do retículo, dando origem aos corpúsculos lipídicos (Murphy & Vance, 1999). Ainda são muitas as dúvidas sobre o mecanismo que promove essa liberação, chegando-se até aos questionamentos se esta de fato ocorre, já que é íntima a interação dos corpúsculos lipídicos com membranas do retículo (Goodman, 2008). De acordo com o modelo mais aceito, o acúmulo de TAGs e EEs no espaço intermembrana provoca um inchaço na membrana do retículo endoplasmático que se colapsa, liberando o corpúsculo em uma espécie de brotamento (FIGURA 5a), conforme já demonstrado para outras vesículas.

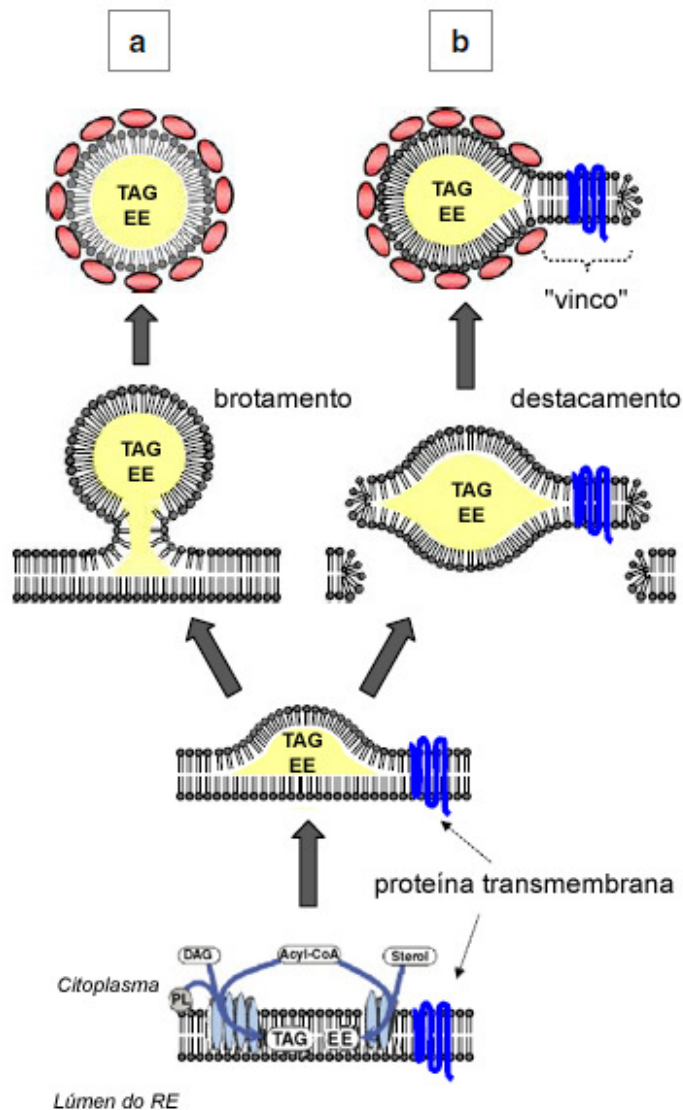


FIGURA 5. Possíveis mecanismos de biogênese dos corpúsculos lipídicos. Os lipídios neutros (TAG e EE) são sintetizados por enzimas localizadas na membrana do retículo endoplasmático. À medida que são sintetizados, se acumulam no espaço intermembranas do retículo endoplasmático, formando glóbulos. Isso forma um inchaço local da membrana, forma precursora de um corpúsculo lipídico, que pode ser liberado para o citoplasma por dois mecanismos propostos: brotamento³ (a) ou destacamento³ (b). A monocamada fosfolipídica dos corpúsculos nascentes pode ser derivada do folheto citoplasmático do retículo endoplasmático, no processo de brotamento, ou de ambos os folhetos, no caso da chocagem. No primeiro modelo, a membrana do retículo deve sofrer uma constrição para que o corpúsculo se libere, ao passo que no segundo, a membrana do retículo deve ser rompida em ambos os lados do corpúsculo nascente. Nesse último caso, pode ocorrer a liberação de porções adjacentes da membrana do retículo, formando espécie de vincos, o que permitiria que proteínas localizadas na membrana do retículo fossem carregadas com o corpúsculo. Isso explicaria a presença de proteínas transmembranares em corpúsculos lipídicos. Modificado de Fujimoto et al., 2008.

³ Nota do autor: o termo utilizado em inglês para descrever tal modelo é *hatching* que foi livremente traduzido como destacamento, para melhor evidenciar as diferenças entre os modelos propostos.

Mais recentemente foi sugerido outro modelo, chamado aqui de destacamento (FIGURA 5b), de acordo com o qual o corpúsculo se destaca da membrana do retículo. Deve-se notar que, neste novo modelo, o corpúsculo leva consigo os dois folhetos do retículo (lúmen e citoplasmático), ao passo que no modelo de brotamento, a monocamada de fosfolipídio é originária apenas do folheto citoplasmático do retículo. Além disso, no modelo de destacamento, a liberação do corpúsculo forma uma poro transitório no retículo endoplasmático, o que permitiria a translocação de proteínas com erro de enovelamento do lúmen para o citoplasma, onde seriam degradadas por proteossomos. De fato, foi observado em leveduras que condições indutoras de estresse de retículo endoplasmático – por meio de aumento de proteínas mal enoveladas no retículo – estimulam a formação de corpúsculos lipídicos (Fei *et al.*, 2009).

Um terceiro modelo para a biogênese dos corpúsculos lipídicos baseia-se no sistema de formação de vesículas da via secretória (e, portanto, carregando consigo os dois folhetos da membrana do retículo) (Walther & Farese, 2009). Os lipídios neutros preencheriam essas vesículas enquanto elas ainda se encontram contíguas ao retículo ou depois da liberação. O acúmulo de lipídios neutros acabaria por forçar a obliteração do lúmen vesicular. Isso poderia explicar alguns relatos de observação de membranas internas em alguns corpúsculos e até mesmo associação de ribossomos (Wan *et al.*, 2007; McGookey & Anderson, 1983).

1.3.2. PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO CORPÚSCULO LIPÍDICO

As proteínas associadas aos corpúsculos apresentam tanto função estrutural, de estabilização dos corpúsculos, como também enzimática, participando da síntese e mobilização de lipídios. Em leveduras, estas enzimas foram bem caracterizadas, tanto em experimentos de proteômica (Athenstaedt *et al.*, 1999) como em estudos de larga escala com proteínas marcadas (Natter *et al.*, 2005). Esses estudos mostram que várias enzimas da via de síntese de lipídios são compartilhadas entre o retículo endoplasmático e os corpúsculos lipídicos, no entanto, das enzimas responsáveis pela esterificação final na síntese de TAGs e EEs, apenas a Dga1p (Oelkers *et al.*, 2002) se localiza nos

corpúsculos. Outras enzimas encontradas são lipases, responsáveis pela mobilização dos estoques de lipídios neutros, TAG lipases (homólogas a triacilglicerol lipases de adipócitos, ATGL) – Tgl3p, Tgl4p e Tgl5p (Athenstaedt & Daum, 2003; Athenstaedt & Daum, 2005) – e EE hidrolases (Yeh1p e Tgl1p) (Koffel *et al.*, 2005). Todas restritas aos corpúsculos lipídicos. No entanto, também é conhecida uma terceira EE hidrolase, localizada na membrana plasmática, Yeh2p, que, curiosamente, responde pela maior parte da atividade de EE hidrolase celular (Müllner *et al.*, 2005).

No mínimo dez estudos proteômicos de corpúsculos lipídicos de células animais de diversos tipos e tecidos foram publicados até o ano de 2007 (Bartz *et al.*, 2007). Associadas aos corpúsculos foram encontradas proteínas relacionadas ao tráfego de vesículas, como proteínas rab e a caveolina, além de enzimas de síntese lipídica, como ACCase (ACC1), e lipases como a ATGL (Bartz *et al.*, 2007). Também são encontradas proteínas consideradas estruturais, que participam da regulação destas organelas. Dentre estas, as proteínas majoritárias são as perilipinas e a adipofilina, cujas localizações se restringem aos corpúsculos. Outra proteína encontrada, mas não restrita aos corpúsculos, é a TIP47. Baseando-se na homologia entre suas sequências, estas proteínas foram agrupadas em uma família batizada de PAT (Perilipina, Adipofilina e TIP47) (Londos *et al.*, 2005). É provável que estas proteínas interajam com os corpúsculos inserindo domínios constituídos por hélices hidrofóbicas na monocamada fosfolipídica, de acordo com estudos sobre a proteína TIP47 (Hickenbottom *et al.*, 2004).

A perilipina, presente em adipócitos e células esteroideogênicas, é fundamental na regulação da lipólise dos estoques de lipídios neutros (Murphy & Vance, 1999), tendo sido identificada como substrato da proteína quinase A (PKA) (Egan *et al.*, 1990). Já a adipofilina se encontra presente em corpúsculos lipídicos de diversos tipos celulares, mas, no caso dos adipócitos, a adipofilina é encontrada apenas nos estágios iniciais de diferenciação dando lugar mais tarde à perilipina. Uma possibilidade é que a adipofilina seja constituinte normal de corpúsculos lipídicos que, acredita-se, sofram *turnover* contínuo de seus lipídios neutros (Walther & Farese, Jr., 2009), sendo substituída pela perilipina para “travar” os estoques de lipídios neutros (Murphy, 2001). TIP47, por sua vez, é bastante semelhante à adipofilina e parece anteceder o surgimento

desta em corpúsculos lipídicos menores, porém sua função ainda não é clara (Ducharme & Bickel, 2008). No caso da levedura *S. cerevisiae*, tentativas de se encontrar homólogos a proteínas PAT foram infrutíferas.

1.3.3. MOBILIZAÇÃO DE TAGs: REGULAÇÃO DA LIPÓLISE

Embora todas as células sejam capazes de mobilizar TAGs armazenados em corpúsculos lipídicos, a lipólise vem sendo estudada há mais tempo em adipócitos. A mobilização de TAGs se dá em três reações catalisadas por lípases distintas. Primeiramente, a ATGL é responsável por hidrolisar a molécula de TAG gerando ácido graxo e diacilglicerol. De forma semelhante, o diacilglicerol será hidrolisado pela lipase estimulada por hormônio (HSL), gerando monoacilglicerol, substrato da monoacilglicerol lípase (MGL) (Bezair & Langin, 2009).

Um modelo recente propõe que num estado basal (FIGURA 6a) a ATGL estaria ligada aos corpúsculos lipídicos em associação com seu cofator, a proteína CGI-58, e este à perilipina. Nessa situação, a HSL se encontra na forma citoplasmática tendo pouco acesso ao diacilglicerol gerado. Mediante estímulo (FIGURA 6b), ocorre a fosforilação da perilipina com subsequente liberação de CGI-58/ATGL, aumentando a taxa de hidrólise de TAG. Paralelamente, ocorre a translocação de HSL para os corpúsculos, promovendo a hidrólise do diacilglicerol. A lipólise se completaria pela ação da MGL. No caso dos adipócitos, os ácidos graxos devem ser liberados na corrente sanguínea, processo assistido pela proteína FABP4, recrutada para os corpúsculos no momento da lipólise induzida.

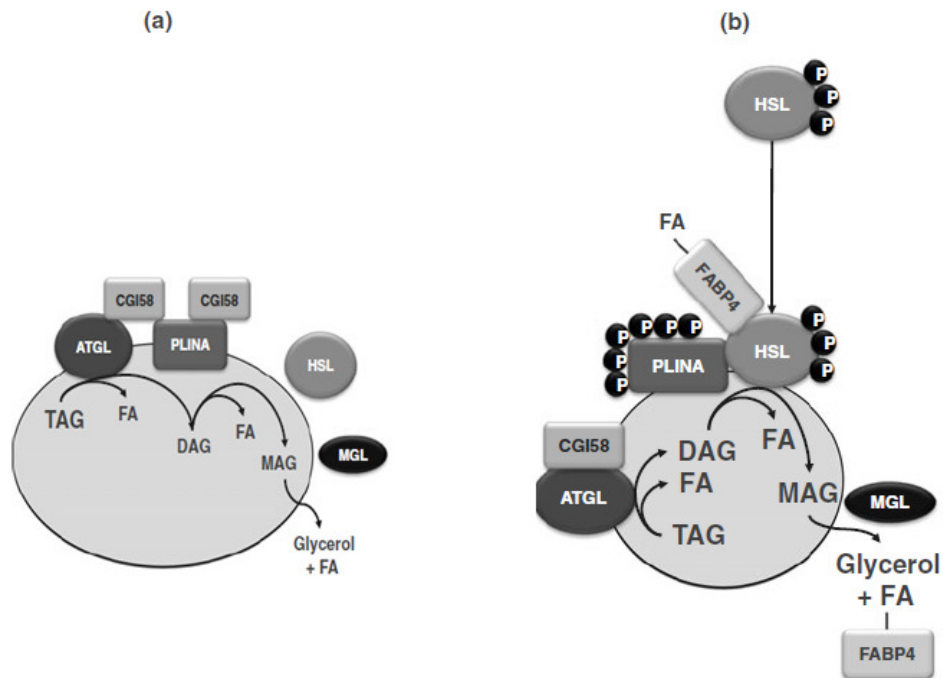


FIGURA 6. Modelo hipotético para lipólise basal (a) e estimulada por hormônio (b) em adipócito. Detalhes no texto. (Bezaire & Langin, 2009)

Esse processo é regulado hormonalmente, respondendo a catecolaminas, insulina, leptina e, no caso dos adipócitos humanos, peptídeos natriuréticos (FIGURA 7). A adrenalina e noradrenalina têm efeito lipolítico em adipócitos. A estimulação de receptores β -adrenérgicos promove a ativação da adenilil ciclase, via proteína G, aumentando os níveis intracelulares de cAMP. Esse sinalizador intracelular irá ativar a proteína quinase A (PKA) que, por sua vez, fosforila a enzima HSL, ativando-a. Outro alvo de PKA são as perilipinas presentes na superfície dos corpúsculos. A fosforilação das perilipinas e HSL parece permitir que estas interajam, favorecendo a translocação da lipase do citoplasma para os corpúsculos lipídicos. Outro estímulo lipolítico conhecido é exercido pelos peptídeos natriuréticos, nesse caso, participa da sinalização a proteína-quinase dependente de cGMP (PKG), de forma análoga a PKA. Esse estímulo é pronunciado durante exercícios físicos.

Os estímulos antilipolíticos mais comuns promoverão direta ou indiretamente a queda dos níveis intracelulares de cAMP, reduzindo a atividade de PKA. Isso ocorre mediado por catecolaminas, via receptores α 2-adrenérgicos, promovendo a inibição da adenilil ciclase, ou por insulina, via ativação da fosfodiesterase 3B, capaz de degradar o cAMP

A sinalização via insulina, além de inibir a lipólise interferindo no sistema de controle por fosforilação de HSL, também gera efeitos transcricionais. Além da inibição de PKA mediante redução dos níveis de cAMP, PKB é capaz de ativar as maquinarias de transcrição e tradução. Conforme demonstrado, adipócitos tratados com insulina aumentam a expressão de peripilina (Prusty *et al.*, 2002), favorecendo o acúmulo de corpúsculos lipídicos. Esse efeito provavelmente se dá via mTOR (Laplante & Sabatini *et al.*, 2009). Esta quinase é um regulador com efeito local, controlando do crescimento celular em resposta a nutrientes, e sistêmico, participando da regulação da massa corporal de organismos complexos. PKB atua impedindo a ação dos inibidores fisiológicos de mTOR, o que favorece sua ativação (Lindsley & Rutter, 2004) e resulta em estímulo à tradução de proteínas via ativação da quinase S6K e inibição do regulador de tradução 4E-BP1, efetores *downstream* da quinase mTOR. Interessantemente, o tratamento de adipócitos com rapamicina, inibidor específico da quinase mTOR, é capaz de reduzir em 50% o acúmulo de TAGs estimulado por insulina (Soliman *et al.*, 2010).

No que diz respeito à levedura *S. cerevisiae*, sabe-se que as partículas lipídicas são mobilizadas nas fases iniciais de crescimento da cultura. Acredita-se que a grande disponibilidade de nutrientes no meio fresco seja um estímulo proliferativo que gera a necessidade de “síntese” de membrana (Kurat *et al.*, 2006). Como resposta, as células hidrolisam seus estoques de TAG e EE para suprir precursores de lipídios estruturais. Essa mobilização ocorre até a fase de crescimento exponencial quando as células voltam a acumular partículas lipídicas até atingir o equilíbrio na fase estacionária (Kurat *et al.*, 2006). Contudo, nada se sabe sobre os sinais e vias que regulam essa dinâmica.

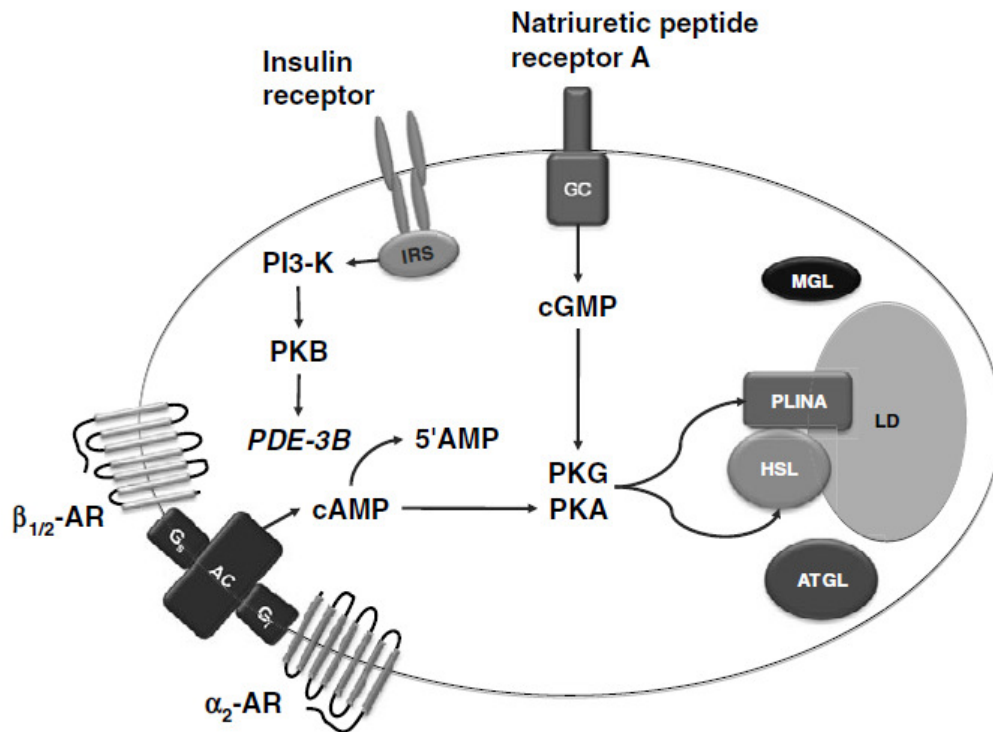


FIGURA 7. Vias de transdução de sinais implicadas no controle hormonal da lipólise em adipócitos. Acoplamento dos receptores adrenérgicos (AR) interferem na atividade da enzima adenilil ciclase (AC). Um aumento nos níveis intracelulares de AMP cíclico irá ativar a proteína-quinase A (PKA). A sinalização via insulina favorece a degradação de cAMP através da ativação da proteína-quinase B (PKB, também conhecida como Akt) e da fosfodiesterase 3B (PDE-3B). Peptídeos natriuréticos promovem acumulação de GMP cíclico (cGMP) ativando proteína-quinase dependente de cGMP (PKG). PKG e PKA fosforilam a perilipina (PLINA) e a lipase sensível a hormônio (HSL). Acredita-se que as TAG lipase do tecido adiposo (ATGL) e monoacilglicerol lipase (MGL) não são diretamente reguladas por hormônio. LD – corpúsculo lipídico (Bezaire & Langin, 2009).

1.4. FOSFORILAÇÃO REVERSÍVEL: PAPEL DE PROTEÍNA-FOSFATASES NA REGULAÇÃO DO METABOLISMO LIPÍDICO

Como visto, ainda que se reconheça a importância dos corpúsculos lipídicos, ainda é escassa a informação sobre a regulação de suas vias sintéticas. Um mecanismo recorrente de regulação bioquímica, fundamental para o controle de diversas funções celulares, é a fosforilação reversível de proteína (Cohen, 1997). Quinases e fosfatases, com alto grau de conservação entre diversos organismos, formam intrincadas redes de sinalização, promovendo a fosforilação/desfosforilação de resíduos de aminoácidos em proteínas, o que torna possível uma rápida resposta a estímulos (Johnson &

Barford, 1993). No entanto, apesar de tal mecanismo ser conhecido desde o início do século passado, a compreensão da modulação dos pares quinase/fosfatase ainda é um desafio para os pesquisadores. Primeiramente, o número de sítios alvos de fosforilação em proteínas é imenso quando comparado ao “limitado” arsenal de quinases/fosfatases codificadas no genoma. Ainda, é intrigante como estas enzimas encontram seus alvos específicos, já que, enquanto as quinases, bastante homogêneas, formam uma única família, as fosfatases apresentam grande variabilidade (Cohen, 1997).

O grupo de proteínas fosfatases eucarióticas constitui-se de enzimas funcional e estruturalmente diversas representadas por famílias, com domínios altamente conservados, sendo a diversidade funcional garantida por domínios regulatórios e subunidades distintas. Exemplo dessa diversidade funcional é o caso da família PP2A de mamíferos, composta por complexos triméricos. Esses complexos são formados por subunidades que se convencionou chamar de C (com atividade catalítica), A (de função estrutural, mantendo as outras duas subunidades ligadas) e B (com atividade regulatória, que pode determinar a localização do complexo e até a especificidade para o substrato) (Mayer-Jaekel & Hemmnings, 1994), cada qual codificada por genes distintos. Dessa forma, até 75 holoenzimas ABC da família PP2A podem ser formadas. Assim, a atividade PP2A celular é firmemente regulada por mecanismos que incluem a variação e fosforilação das subunidades que a compõem.

A identificação de fosfatases por abordagens bioquímicas no início dos anos 80, gerou uma classificação onde as Ser/Thr fosfatases, então chamadas PPs, eram divididas em tipos 1 e 2 (Ingebritsen & Cohen, 1983). Enquanto as fosfatases do primeiro grupo são inibidas por concentrações nanomolares de inibidores, o segundo grupo mostra-se muito mais resistente. Dentro das Ser/Thr fosfatases do tipo 2 são encontrados três grupos: tipo 2A (ativas na ausência de cátions divalentes), tipo 2B (cálcio-dependentes) e tipo 2C (magnésio-dependentes). A partir da década de 90, o desenvolvimento da biologia molecular, permitiu a comparação entre as sequências destas proteínas, sendo então proposta uma nova classificação (Cohen, 1990). Assim, as PPs foram agrupadas em duas famílias, PPP (Fosfoproteína fosfatase) e PPM (Fosfoproteína fosfatase dependente de magnésio). Assim, de acordo com a classificação corrente, as Ser/Thr proteínas fosfatases da família PPP

incluem homólogos das fosfatases tipo PP1, PP2A, PP2B e PP5 enquanto a família PPM consiste de fosfatases tipo PP2C.

Além das famílias PPP e PPM, existe um terceiro grupo, PTP (Fosfoproteína tirosina fosfatase), constituído por proteína-fosfatases capazes de desfosforilar resíduos de tirosina. A família PTP é dividida em 4 subfamílias: PTPs (Tirosina fosfatases específicas), DSPs (Proteína-fosfatase de dupla especificidade, capazes de desfosforilar tirosina, serina ou treonina), tipo Cdc25 e LMW (proteína-fosfatases de baixo peso molecular) (Jia, 1997; Tonks & Neel, 2001; Tonks, 2006). Esta classificação encontra-se de forma resumida na TABELA 1.

No que diz respeito à regulação por fosforilação de enzimas envolvidas no metabolismo de corpúsculos lipídicos, existem ainda poucos exemplos não completamente compreendidos, como o caso já citado da fosforilação de perilipina (Londos *et al.*, 1995), em mamíferos, e o caso da lipase Tgl4p, em leveduras que é fosforilada e ativada em resposta a estímulo proliferativo (Kurat *et al.*, 2009). O estudo da regulação por fosfatases esclarecerá muito as vias de sinalização envolvidas na regulação do metabolismo de corpúsculos lipídicos e até mesmo do metabolismo geral de lipídios.

TABELA 1. Classificação das proteína-fosfatases. Atual divisão das proteína-fosfatases (modificado de Moorhead *et al.*, 2007).

FAMÍLIA	SUB-FAMÍLIA	GENES	SUBUNIDADES	EXEMPLOS (FUNÇÃO OU SUBSTRATO)
<i>SER/THR fosfatase</i>				
PPP	PP1	3	>90	Condensação de cromossomos
	PP2A	2	A, B, etc.	Coesão de cromátides
	PP4	1	R1, R2, R3 α/β	Reparo de DNA
	PP5	1	Nenhuma	Estresse celular
	PP6	1	SAP1-3, etc.	via NF κ B
	PP2B	3	B-regulatória, CaM	Resposta Imune
	PP7	2	Desconhecida	
PPM	PP2C	18	Nenhuma	sinalização TGF β
<i>TYR fosfatase</i>				
PTP (CLASSE I)	RECEPTORES	21		Adesão celular
	NÃO-RECEPTORES	17		Receptor de Insulina
DSP	MAPKP	11		sinalização MAPK
	SLINGSHOTS	3		Dinâmica de actina
	PRLs	3		Desconhecida
	DSP atípica	19		Desconhecida
	CDC14	4		Citocinese
	PTEN	5		PIP3 fosfatase
	MIOTUBULARINAS	16		PtdIns3P, PtdIns(3,5)P2 fosfatase
PTP (CLASSE II)	CDC25s	3		Promove mitose
PTP (CLASSE III)	LMW	1		Desconhecida

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a identificação e caracterização de reguladores do metabolismo de lipídios neutros de *Saccharomyces cerevisiae*, focando-se nos corpúsculos lipídicos, reservatórios celulares destes lipídios.

Como estratégia, definiram-se os seguintes objetivos específicos deste trabalho:

1 – Desenvolver e validar um método fluorimétrico de baixo custo e fácil execução capaz de fornecer rapidamente informação sobre os estoques de lipídios neutros em células, sem a necessidade de extrações de lipídios.

2 – Aplicar o método em experimentos de larga escala para identificação de genes relacionados ao metabolismo lipídico.

3 – Identificar e caracterizar as vias de sinalização que participam da regulação do metabolismo lipídico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. REAGENTES, LEVEDURAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

A cepa de levedura *S. cerevisiae* empregada neste trabalho foi a BY4741 (MATa *his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) e derivadas (TABELA 2). No caso de cepas com deleções simples, estas foram obtidas da biblioteca “Gene Deletion Library” da Open Biosystems, na qual os genes foram deletados por recombinação homóloga, onde o gene deletado é substituído por um gene marcador *KanR*, conferindo resistência ao antibiótico geneticina. Utilizou-se também cepas ERG3-TAP (MATa *his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ERG3-TAP::HIS3*) obtida da biblioteca “TAP Tag Collection” que contém uma inserção de um epítipo artificial chamado TAP no carboxi-terminal da proteína estudada. Neste sistema, a sequência TAP apresenta um trecho da proteína A, proteína presente na parede celular de *Staphylococcus aureus*, capaz de interagir com a cadeia pesada de imunoglobulinas ligando-se, assim, à região Fc. Além disso, a construção carrega consigo a sequência codificante do gene HIS3, utilizado como marcador da cepa. Outras cepas utilizadas (TABELA 2), foram construídas neste trabalho ou gentilmente cedidas por Sepp D. Kohlwein (Universidade de Graz, Áustria).

As cepas foram cultivadas em meio rico YPD ou meio mínimo SD. O meio rico YPD é composto por 2% p/v de glicose (Sigma), 1% p/v de extrato de levedura (BD Company) e 2% p/v de peptona (BD Company). O meio SD é composto por 2% p/v de glicose (Sigma), 0,67% p/v de base nitrogenada de leveduras (Sigma) sem aminoácidos e suplementado com aminoácidos (Sigma) ou base nitrogenada conforme a auxotrofia das cepas estudadas (adicionados a partir de soluções estoques 0,3% p/v, concentração final de 0,003% p/v). Meios sólidos foram preparados adicionando-se ágar para concentração final de 2% p/v. Todos os meios de cultura, após o preparo, foram esterilizados em autoclave (15 minutos, 1 atm).

As leveduras foram mantidas em placas de meios YPD ou SD sólidos com colônias isoladas, estocadas de 8-10°C. As incubações foram realizadas a temperatura média de 30°C em estufa, no caso de meios sólidos em placa, ou sob agitação no caso de culturas em meio líquido. Neste último caso, o

crescimento das culturas foi avaliado mediante a leitura da absorção de amostras diluídas da cultura contra diluições equivalentes do meio de cultivo estéril em 600 nm. A turbidez do meio foi expressa em D.O. (densidade ótica de 1 mL da amostra em cubeta com 1 cm de caminho ótico). Para a levedura estudada, 1,0 D.O. equivale, aproximadamente, a 3×10^7 células.

CEPA	GENÓTIPO	ORIGEM
WT (BY4742)	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Sepp D. Kohlwein
<i>are1Δ are2Δ</i>	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 <i>are1Δ::KanMX are2Δ::KanMX</i></i>	Sepp D. Kohlwein
<i>dga1Δiro1Δ</i>	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 <i>dga1Δ::KanMX iro1Δ::KanMX</i></i>	Sepp D. Kohlwein
<i>sit4ΔERG3-TAP</i>	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ERG3- <i>TAP::HIS3 sit4Δ::kanMX</i></i>	Este trabalho

TABELA 2. Cepas empregadas neste trabalho. A construção das cepas cedidas por Sepp D. Kohlwein encontra-se descrita em trabalho previamente publicado (Petschnigg *et al.*, 2009).

3.2. DELEÇÃO DO GENE SIT4

3.2.1. Construção do cassete de deleção

Para se obter a cepa *sit4 Δ ERG3-TAP*, empregou-se o método de recombinação homóloga (Ausubel *et al.*, 1991; Wach *et al.*, 1994). O método é baseado na transformação de leveduras com um cassete de deleção produzido por reação de PCR (FIGURA 8). Tal cassete consiste na sequência de um gene marcador, no caso, um gene que confere resistência ao antibiótico geneticina (KanR), flanqueado por pequenas sequências homólogas às regiões 5'-UTR e 3'-UTR do gene a ser deletado (FIGURA 1). Para deletar o gene SIT4 na cepa *ERG3-TAP*, utilizamos oligonucleotídeos iniciadores complementares às regiões 5'-UTR (5'-TATTGAAGCTCAAAAACATCCATAATAAAAGGAACAATAACAATGGTACGTA CGCTGCAGGTCGAC-3') e 3'-UTR (5'-AATTATTTTTATTCGTCGAGTTAGGG AGGGCATGCCGTCGTGTTAATCGATGAATTCGACCTCG-3') de SIT4

(marcação em *itálico*) e com homologia ao gene KanMX (marcação em **negrito**) a partir do plasmídeo pFa6a-KanMX6.

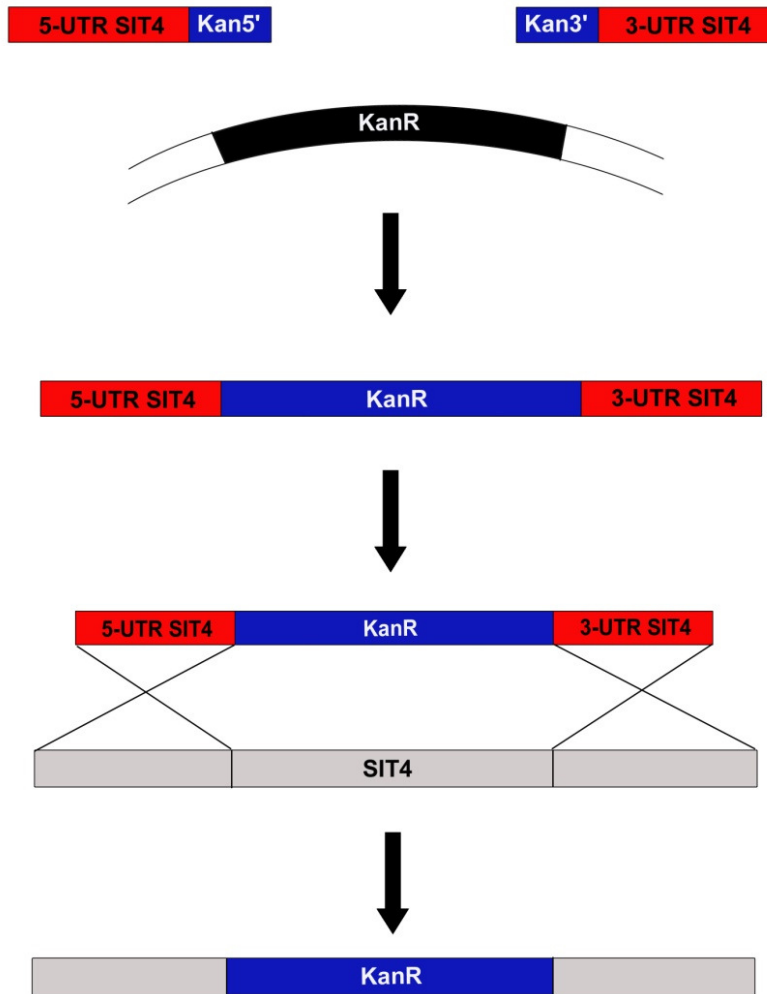


FIGURA 8. Método de deleção por recombinação homóloga. Através de uma reação de PCR é amplificado um gene marcador (KanR, preto) a partir do plasmídeo KanMX6 utilizando oligonucleotídeos iniciadores com homologia às regiões não codificantes do gene a ser deletado (vermelho). O fragmento obtido consiste na sequência codificante do gene marcador (KanR, azul) flanqueado por sequências das regiões não codificantes do gene de interesse (SIT4, vermelho). As células são transformadas com este fragmento e, naturalmente, ocorre a recombinação entre as regiões complementares do fragmento e do genoma da levedura. Tal evento promove a retirada do gene de interesse substituindo-o pelo gene marcador. Os transformantes são selecionados e confirma-se a deleção com um sistema de duas reações de PCR.

A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições:

	CONCENTRAÇÃO ESTOQUE	CONCENTRAÇÃO FINAL	REAÇÃO (50 µL)
Tampão fornecido com a Taq polimerase	10x	1x	5 µL
Cloreto de Magnésio	25 mM	1,5 mM	3 µL
dNTP	10 mM	0,2 mM	1 µL
Oligo 5'-UTR	10 µM	0,2 µM	1 µL
Oligo 3'-UTR	10 µM	0,2 µM	1 µL
Taq polimerase	5 U/µL	0,05 U/µL	0,5 µL
H ₂ O milliQ			36,5 µL

Após o preparo do meio de reação, adiciona-se:

pFa6a-KANMX6	250-750 ng/µL	10-30 ng total	2 µL
--------------	---------------	----------------	------

Todos os reagentes, com exceção dos oligonucleotídeos iniciadores, foram adquiridos de Fermentas. A reação foi incubada em um termociclador modelo Mastercycle (Eppendorf), utilizando o seguinte programa:

PASSO	TEMPERATURA	TEMPO
1.	94°C	5 min
2.	94°C	1 min
3.	55°C	1 min
4.	72°C	2 min
5.	<i>Retornar passo 2 (10 ciclos)</i>	
6.	94°C	1 min
7.	65°C	1 min
8.	72°C	2 min

9. *Retornar passo 6*
(20 ciclos)
10. 72°C 10 min
-

O produto da amplificação por PCR foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1% em TAE (Tampão Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM). Para tanto, a 5 µL do produto de PCR adicionou-se 1 µL de tampão de amostra (6x concentrado) e aplicou-se o volume total em um poço do gel (FIGURA 2).

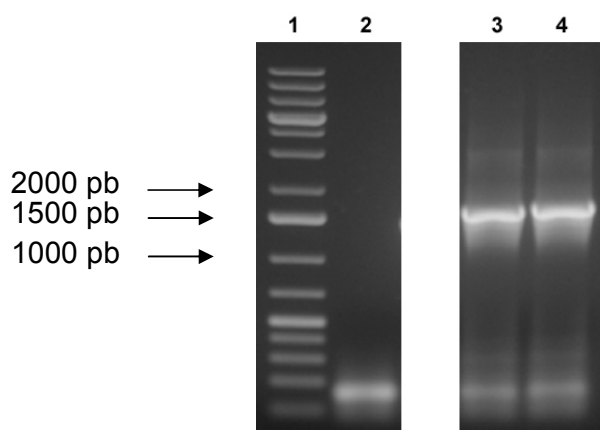


FIGURA 9. Cassete de deleção SIT4-KAN. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1,0% em tampão TAE. 1, padrão de peso GeneRuler 1 kb PLUS DNA ladder (Fermentas). 2, controle negativo da reação. 3 e 4, duplicatas das reações de amplificação de cassetes SIT4-KAN. As bandas correspondentes ao fragmento SIT4-KAN apresentaram 1676 pb (tamanho esperado 1617 pb).

3.2.2. Transformação com o cassete de deleção

Todo o procedimento foi realizado assepticamente em cabine de fluxo laminar. As células foram crescidas em 15 mL de meio rico YPD até atingir D.O. 0,7-2,5 e, então, recolhidas por centrifugação a 3000 xg por 5 minutos. A massa de células foi lavada sendo ressuspensa no dobro do volume inicial de água deionizada estéril gelada. Repetiu-se a centrifugação, e as células foram ressuspensas com o mesmo volume de solução estéril de acetato de lítio 0,1 M gelada. (Sigma) Após centrifugação conforme as anteriores, as células foram ressuspensas novamente em solução estéril de acetato de lítio 0,1 M gelada

de maneira a se obter uma suspensão a 100 D.O. (volume da solução foi igual ao produto da densidade ótica da cultura pelo volume de meio, dividido por 100). Adicionou-se então 1/9 do volume final de uma solução 10 mg/mL de DNA de esperma de salmão desnaturado (para tanto, a solução foi previamente fervida por 10 minutos e resfriada em gelo). Após homogeneização, alíquotas de 30 μ L desta suspensão foram separadas em tubos cônicos para microcentrifuga e mantidas em gelo.

Adicionou-se 15 μ L do cassete de deleção ou água (como controle negativo) às alíquotas e incubou-se por 15 minutos a 30°C. Em seguida, adicionou-se 150 μ L do tampão de transformação (preparado no momento do uso através da mistura de 0,1 mL de água deionizada estéril, 0,1 mL de solução de acetato de lítio 1 M estéril e 0,8 mL de solução estéril de PEG₃₅₅₀ – 15 de PEG₃₅₅₀ diluídos em 16,5 mL de água deionizada e esterilizado por microfiltração) e incubou-se por mais 30 minutos a 30°C. Ao final da incubação, foi dado um choque térmico nas células trocando-se os tubos para um banho a 42° e incubando-se por 15 minutos.

Finalmente, as células foram coletadas por centrifugação a 400 xg por 2 minutos. Aspirou-se cuidadosamente o sobrenadante e resuspendeu-se as células em 200 μ L de meio rico YPD. A suspensão foi incubada a 30°C por 1,5 horas e, ao final deste tempo, foram adicionados mais 200 μ L de meio rico YPD. Homogeneizou-se delicadamente a suspensão e 100 μ L foram plaqueados com o auxílio de uma alça de Drigalski em meio sólido YPD contendo geneticina (200 μ g/mL, BD Company). As placas foram incubadas em estufa a 30°C até o surgimento das primeiras colônias, o que levou em média 3 noites. Conforme esperado, a amostra do controle negativo (onde não foi adicionado o cassete de deleção) não apresentou crescimento.

3.2.3. Seleção de transformantes

Cinco colônias obtidas após a transformação das leveduras foram escolhidas aleatoriamente. Com o auxílio de palito estéril, as colônias foram uma a uma recolhidas e foram feitos estoques em 1 mL de solução de glicerol 10% estéril em tubo de microcentrifuga, posteriormente foram estocados a -

80°C. A partir das suspensões em glicerol, as colônias foram plaqueadas por estriamento nos seguintes meios:

SD +ura, +leu, +met

SD +ura, +leu

SD +ura, +met

SD +leu, +ura

As colônias capazes de crescer apenas no meio SD +ura, +leu, +met, após incubação a 30°C em estufa, foram selecionados como prováveis transformantes e, em seguida, foram inoculadas em 3 mL de meio rico YPD. Após incubação por uma noite a 30°C sob agitação em banho, as culturas tiveram o seu DNA genômico extraído.

3.2.4. Confirmação de deleção: extração de DNA genômico

Culturas de leveduras crescidas em meio rico YPD por uma noite (cerca de 3 mL) foram centrifugadas por 5 minutos a 3000 xg. O sobrenadante foi descartado e a massa de células ressuspendida no dobro do volume de água deionizada estéril. Repetiu-se a centrifugação, ao final da qual a massa de células foi ressuspendida em 500 µL de água deionizada estéril e transferidas para um tubo cônico de microcentrífuga. A suspensão foi rapidamente centrifugada (16000 xg por 10 segundos) e o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta. Em seguida, ressuspendeu-se o precipitado em tampão próprio para a lise (Tampão Tris-HCl 10 mM pH 8.0, Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, EDTA 1 mM), adicionou-se 0,3 g de pérolas de vidro (0.8 mm) e, posteriormente, 200 µL de uma solução de Fenol-Clorofórmio (1:1m, Merck). O tubo foi agitado em um aparelho vortex por 3 minutos ininterruptos e, então, adicionou-se 200 µL de tampão TE (Tampão Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM). Após homogeneizar, o tubo foi centrifugado por 5 minutos a 16000 xg e a fase aquosa, cerca de 350 µL, foi transferida para um novo tubo. A seguir, adicionou-se 1 mL de etanol absoluto (Merck), homogeneizou-se por inversão do tubo e incubou-se a -20°C por 30

minutos. Ao final da incubação, descartou-se o sobrenadante e o precipitado, contendo ácido nucléico, foi ressuspendido em 400 µL de tampão TE e tratado com RNase A (concentração final de 10 µg/mL) por 5 minutos, a 37°C. Após a incubação, adicionou-se 10 µL de uma solução de acetato de amônio a 4 M e 1 mL de etanol absoluto gelado. O tubo foi mantido a – 20°C por 30 minutos e então centrifugado (16000 xg, 5 minutos). O sobrenadante foi descartado e as paredes do tubo foram cuidadosamente lavadas com etanol 70% gelado. Finalmente, após secar, o precipitado de DNA genômico foi ressuspendido em 20-50 µL de TE.

3.2.5. Confirmação de deleção: PCR de confirmação

A confirmação do sucesso da deleção do gene desejado é feita através de duas reações de PCR onde se empregam oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do gene deletado e do gene marcador. Dessa forma, os resultados devem ser excludentes, ou seja, caso uma reação seja positiva, a outra necessariamente deverá ser negativa, caso contrário as cepas testadas são descartadas. As sequências empregadas para amplificação da sequência de SIT4 foram: 5'-TGCGGGTAATAAGTCTAGTCAAGTC-3' (região 5'-UTR do gene SIT4, denominado SIT4-A), 5'-GTAGTTTATATCGTCAGGAAAGCCA-3' (complementar a uma região da sequência codificante do gene SIT4, denominado SIT4-B) e 5'-CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT-3' (complementar a uma região da sequência codificante do gene marcador KanR, denominado KAN-B). Dessa forma, foram feitas duas reações de PCR empregando como pares de iniciadores SIT4-A/SIT4-B e SIT4-A/KAN-B. Seguem as reações:

	CONCENTRAÇÃO ESTOQUE	CONCENTRAÇÃO FINAL	REAÇÃO (50 µL)
Tampão fornecido com a Taq polimerase	10x	1x	5 µL
Cloreto de Magnésio	25 mM	1,5 mM	3 µL
dNTP	10 mM	0,2 mM	1 µL
SIT4-A	10 µM	0,2 µM	1 µL

<i>SIT4-B ou KAN-B</i>	10 µM	0,2 µM	1 µL
Taq polimerase	5 U/µL	0,05 U/µL	0,5 µL
H ₂ O milliQ			38 µL

Após o preparo do meio de reação, adiciona-se:

DNA genômico			0,5 µL
--------------	--	--	--------

Todos os reagentes, com exceção dos oligonucleotídeos iniciadores, foram adquiridos de Fermentas. A reação foi incubada em um termociclador modelo Mastercycle (Eppendorf), utilizando o seguinte programa:

PASSO	TEMPERATURA	TEMPO
1.	94°C	5 min
2.	94°C	1 min
3.	45°C	1 min
4.	72°C	2 min
5.	<i>Retornar passo 2 (10 ciclos)</i>	
6.	94°C	1 min
7.	52°C	1 min
8.	72°C	2 min
9.	<i>Retornar passo 6 (25 ciclos)</i>	
10.	72°C	10 min

O produto das reações de PCR foi analisado em gel de agarose 1% em TAE, misturando-se 2 µL de tampão de amostra de DNA a 10 µL do produto de PCR e aplicando-se 10 µL por poço do gel (FIGURA 10).

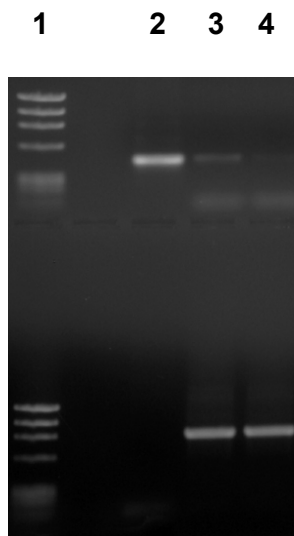


FIGURA 10. Confirmação da obtenção da cepa *BY4741 sit4Δ ERG3-TAP*. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1,0% em tampão TAE. Na parte superior, foram aplicados: 1- padrão de peso molecular (Fago λ -HindIII), 2 - produto da reação empregando os oligonucleotídeos iniciadores SIT4-A e SIT4-B para a cepa *ERG3-TAP*, 3 e 4 - produto da reação empregando os oligonucleotídeos iniciadores SIT4-A e SIT4-B para dois clones obtidos por transformação com o cassete de deleção SIT4-KAN. Na parte inferior, a mesma ordem de aplicação foi seguida, no entanto correram-se os produtos da reação empregando os oligonucleotídeos iniciadores SIT4-A e KAN-B.

3.3. ENSAIO LÍQUIDO DE RECUPERAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA

O nível de corpúsculos lipídicos foi determinado através do ensaio líquido de recuperação de fluorescência (FIGURA 11), método desenvolvido neste trabalho. Células foram crescidas conforme o desejado e a turbidez do meio foi medida. Em seguida, recolheu-se uma amostra da cultura e adicionou-se 1/9 do volume de formaldeído (concentração final aproximadamente 3,7% v/v, Merck). Incubou-se o tubo por 15 minutos a temperatura ambiente, ao final do que o tubo foi centrifugado a 3000 xg por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuscitado em 1 mL de água deionizada estéril. A centrifugação foi repetida e o precipitado de células foi mantido refrigerado até o uso quando foram ressuscitados em água deionizada estéril de maneira a se obter uma suspensão celular em torno de 5 DO. Preparou-se, então, o meio de leitura que consiste em uma solução de BODIPY 493/503 5 μ M (Molecular Probes) e iodeto de potássio 500 mM (Fluka). Distribuíram-se alíquotas de 200 μ L do meio de leitura a poços de uma microplaca de 96 poços fosca, com fundo transparente (Costar). Incubou-se a microplaca a 30°C ao abrigo da luz para estabilização do meio e, em seguida, a amostra de células

foi analisada 4 vezes, mediante sucessivas adições de alíquotas de 5 μL da suspensão celular a cada poço. Após cada adição, foi medida a fluorescência em excitação a 485 nm com emissão a 510 nm, *cutoff* de 495 nm, com o auxílio de um leitor de microplacas Spectramax5 (Molecular Devices). Também foi feita uma leitura de absorbância para cada poço a 600 nm. A qualidade dos dados obtidos foi avaliada através da análise da linearidade das medidas comparadas a densidade ótica do poço. A partir desta curva, obtém-se o índice de corpúsculos lipídicos (aqui denominado índice CL) que se trata tão somente da fluorescência relativa obtida por unidade de densidade ótica de uma cultura de leveduras. Em caso de R^2 menor que 0,9 para a curva de uma amostra, a medida foi descartada e repetiu-se nova medição.

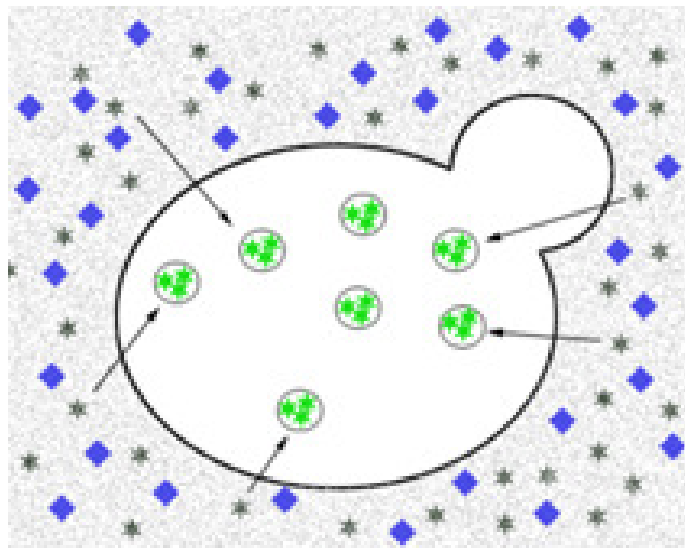


FIGURA 11. Representação esquemática do ensaio de recuperação de fluorescência. Baseando-se na alta especificidade da sonda fluorescente BODIPY 493/503 para corpúsculos lipídicos, desenvolveu-se um método fluorimétrico para a avaliação de corpúsculos lipídicos no interior de células de leveduras. Neste método, a fluorescência do BODIPY encontra-se suprimida por efeito de um *quencher* em solução. À medida que células são adicionadas a esta solução, a fluorescência é recuperada devido ao deslocamento passivo da sonda BODIPY da solução para os corpúsculos lipídicos, ambiente de exclusão do *quencher*.

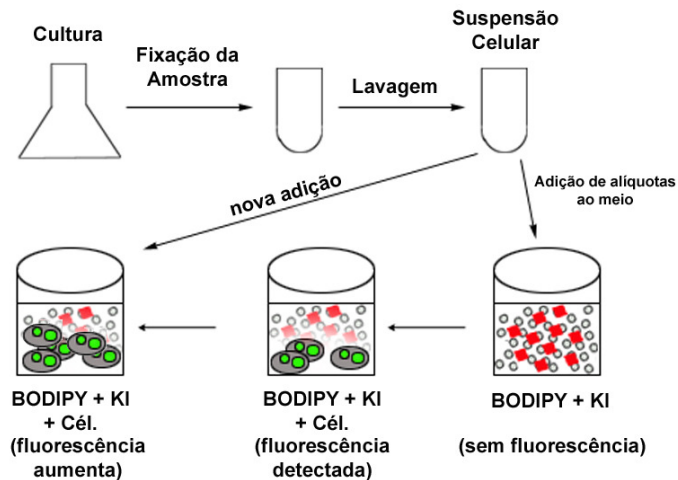


FIGURA 12. Ensaio Líquido de Recuperação de Fluorescência. Células são crescidas até o ponto desejado e fixadas. A suspensão celular obtida é adicionada sucessivamente a uma cubeta de fluorescência ou poço de uma microplaca de 96 poços. Inicialmente, o tampão de leitura não apresenta fluorescência apreciável, já que a sonda fluorescente, BODIPY, encontra-se sobre o efeito do *quencher* iodeto de potássio. À medida que células são adicionadas, a fluorescência é recuperada de forma linear em relação à quantidade de células no meio.

3.4. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Células foram fixadas adicionando a amostras de culturas 1/9 do volume de formaldeído (concentração final aproximadamente 3,7% v/v). Incubou-se o tubo por 15 minutos a temperatura ambiente, ao final do que o tubo foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspendido em 1 mL de água deionizada estéril. A centrifugação foi repetida e o precipitado de células foi mantido refrigerado até o uso quando foram ressuspendidos em água deionizada estéril de maneira a se obter uma suspensão celular em torno de 10 DO. As lâminas foram montadas aplicando 5 μ L da suspensão celular e 5 μ L de uma solução de BODIPY a 10 μ M em uma lâmina de vidro e, então, foram cobertas com uma lamínula de vidro previamente tratada com polilisina. A lâmina foi selada com esmalte e mantida ao abrigo da luz até a observação ao microscópio de fluorescência. Durante a observação foram retiradas fotos de 5-9 áreas distantes, cada área foi capturada com 3 tempos crescentes de exposição. As imagens tiveram a área total de fluorescência determinadas de forma automatizada com auxílio do

programa ImageJ. Em cada condição ou cepa foi analisado um número mínimo de 100 células.

3.5. SCREENING PARA IDENTIFICAÇÃO DE MUTANTES COM NÍVEIS ANORMAIS DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS

Pequenas adaptações foram necessárias para o emprego do ensaio líquido de recuperação de fluorescência no experimento de larga escala. Inicialmente, selecionaram-se as mutantes com as quais seriam trabalhadas (96 no total) e estas, juntamente com 14 clones de uma cepa selvagem (BY4147) foram distribuídas em duas placas de acordo com seu tempo de geração – uma placa com mutantes que apresentam crescimento normal e outra contendo mutantes com crescimento lento, de acordo com o banco de dados do genoma de *S. cerevisiae* (SGD, disponível em www.yeastgenome.org). Os mutantes escolhidos apresentam deleções simples para genes do metabolismo lipídico (31 mutantes) e genes de todas as proteína-fosfatases e suas subunidades quando não-essenciais (65 genes), de acordo com anotação do SGD em outubro de 2009.

As células foram mantidas em meio rico YPD sólido, em placas retangulares com área suficiente para 96 pontos de inoculação (Nunc). A partir destas placas de YPD sólido, foi feito um pré-inóculo (uma noite de crescimento) em microplacas contendo meio rico YPD líquido empregando-se um replicador de 96 pinos. Em seguida, novamente com o auxílio de um replicador, microplacas contendo meio rico YPD líquido foram inoculadas e incubadas em incubador próprio para microplacas com agitação e sob temperatura controlada de 30°C. Ao final de duas noites foi verificado que mesmo os mutantes de crescimento lento haviam atingido a fase estacionária (FIGURA 6). Com auxílio de micropipeta de multicanal, fixaram-se as culturas adicionando 23 µL de formaldeído (concentração final aproximadamente 3,7% v/v) e incubando-se por 15 minutos. As microplacas foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas uma vez com água deionizada estéril. Ao final do procedimento, as massas de células foram ressuspensas em 200 µL de água deionizada estéril e a partir destas microplacas foram determinados os índices de corpúsculos lipídicos dos

mutantes. Para o ensaio de fluorescência utilizou-se uma microplaca fosca com fundo transparente, permitindo a leitura da absorbância e fluorescência.

Após cada adição de células ao meio, foram feitas as leituras de absorbância e fluorescência. Trabalhou-se com o índice de corpúsculos lipídicos (fluorescência recuperada por unidade de concentração de célula da amostra). Como descrito anteriormente, a qualidade dos dados foi avaliada usando como o parâmetro R^2 – para ser considerado válido o resultado, este deveria ser maior que 0,9, indicando boa linearidade entre a concentração de células e fluorescência detectada. Os índices CL (4 experimentos no total) foram normalizados pela média dos índices PL de todos os mutantes para cada experimento. Para efeitos de comparações, 14 clones de uma cepa selvagem foram distribuídos aleatoriamente nas placas. Foi feito um teste-T entre os índices CL medidos para os mutantes contra os valores obtidos para os clones selvagens, assumindo-se que a significância estatística é menor que 0,05. Em seguida aplicou-se um corte arbitrário de $\pm 20\%$ em relação ao índice PL da cepa selvagem.

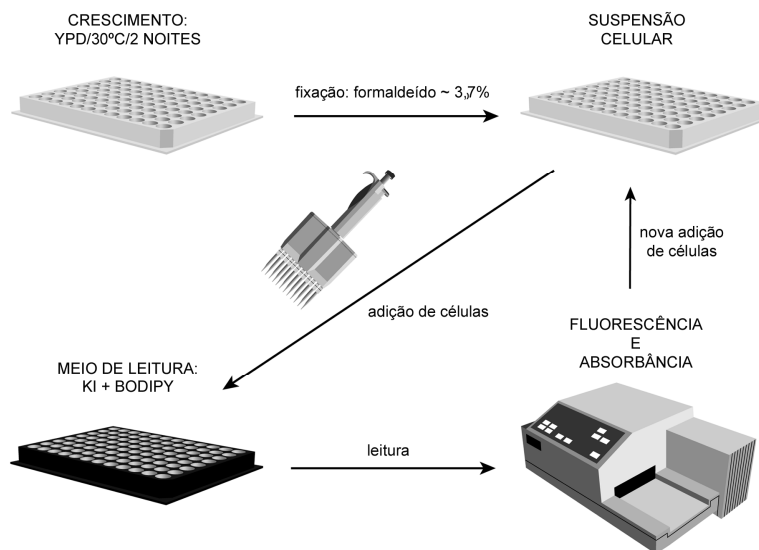


FIGURA 13. Ensaio Líquido de Recuperação de Fluorescência adaptado para experimento de larga escala. Adaptações na forma de crescimento e no material empregado permitiram o emprego do ensaio líquido de fluorescência em experimentos de larga escala. Para tanto, o cultivo foi feito em microplacas de 96 poços, onde foram fixadas, lavadas e ressuspensas. A partir da suspensão celular obtida ao final desse procedimento, sucessivas

adições de suspensão celular foram feitas a uma placa contendo o meio de leitura. A cada adição, os poços foram homogeneizados e tiveram suas fluorescência e absorbância medidas.

Foi feito um estudo preliminar dos resultados do *screening* empregando uma ferramenta de análise de redes biológica, no caso o aplicativo VISant (disponível livremente em www.visant.org.edu). Este aplicativo usa diversos bancos de dados experimentais e teóricos sendo capaz de compará-los e, inclusive, sugerir redes baseadas em ortólogos de outros organismos que não apenas a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Genes/proteínas identificados como possíveis integrantes de redes formadas pelos *hits* do *screening* foram submetidos à análise funcional GO (disponível no SGD, www.yeastgenome.org). O enriquecimento de classes foi testado estatisticamente através da análise de distribuição hipergeométrica.

3.6. TESTES DE SENSIBILIDADE A SORAPHEN A E ANFOTERICINA B

A sensibilidade a drogas foi testada de duas maneiras, em placas de meio sólido ou em meio líquido, em microplacas. No caso dos testes em meios sólidos, uma colônia de cada cepa a ser testada foi inoculada em 5 mL do meio correspondente e incubou-se por 1 noite sob agitação a 30°C. Foram medidas as absorbâncias destes pré-inóculos e em uma microplaca estéril foram realizadas 3 diluições seriais para cada cepa em uma microplaca estéril. Feito isso, esterilizou-se um carimbo replicador de 48 ou 96 pinos por flambagem e, tendo esfriado, inoculou-se as diluições nas placas. Os pontos de inóculo obtidos correspondem a aproximadamente 10^7 , 10^6 e 10^5 células (apresentados sempre da esquerda para direita nas figuras de resultados). As placas foram incubadas a 30°C por 2 ou 3 noites.

Para o ensaio líquido de sensibilidade a drogas, foram feitos pré-inóculos das cepas desejadas, conforme já descrito. Ao final da incubação, os pré-inóculos foram diluídos com meio fresco correspondente para 2×10^5 células/mL e 100 μ L foram adicionados a poços de uma microplaca de 96 poços. Cada poço havia sido previamente preenchido com 100 μ L de diluições seriais da droga. A placa foi incubada por 24 horas a 30°C, ao final do que o crescimento foi avaliado medindo-se a absorbância a 600 nm. O IC_{50} foi

definido como a concentração de droga que inibiu o crescimento das cepas em 50% quando comparado ao controle sem droga.

Foram utilizadas soluções estoques de soraphen (cedido gentilmente por Rolf Müller (Helmoltz-Zentrum für Infektionsforschung, Berlim, Alemanha) 0,1 mg/mL (em 10% de metanol) e Anfotericina B 1 mg/mL (aquosa).

3.7. EXTRATOS DE PROTEÍNAS TOTAIS E ELETROFORESE

Para o estudo do estado de fosforilação da quinase Snf1p/AMPK, muito sensível a vários tipos de estresse, o extrato de proteínas totais foi preparado utilizando protocolo adaptado de Yaffe e Schatz (Yaffe & Schatz, 1984). Culturas crescidas até o ponto desejado tiveram sua turbidez medida em espectrofotômetro. A um tubo de microcentrífuga (1,5 mL), foram adicionados 50 µL de solução de hidróxido de sódio a 1,85 M e 11 µL de 2-mercaptoetanol e homogeneizou-se. Em seguida, adicionou-se 900 µL da cultura, homogeneizou-se e incubou-se em banho de gelo por 10 minutos. Ao final da incubação adicionou-se 50 µL de uma solução de ácido tricloroacético a 50%, homogeneizou-se e repetiu-se a incubação. Feito isso, o tubo foi centrifugado a 12000xg por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi aspirado com auxílio de micropipeta e descartado. O precipitado foi lavado com acetona gelada e mantido a -20°C. Para a realização da SDS-PAGE, o precipitado foi ressuspendido em tampão de amostra Laemlli de maneira que se obtivesse uma suspensão equivalente a 10 DO. Alíquotas de 10 µL desta suspensão foram separadas por eletroforese em gel de 7,5% SDS-acrilamida, por cerca de 2 horas a 80 V usando uma cuba Mini-Protean II (BioRad).

Para a análise de níveis de proteínas marcadas com o epítipo TAP ou para imunoprecipitação, os extratos totais foram realizados empregando rompimento mecânico das células com auxílio de pérolas de vidro de 425-600 µm (Sigma-Aldrich). Células crescidas até o ponto desejado foram centrifugadas a 3000 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuspendido em volume igual de água deionizada estéril gelada e repetiu-se a centrifugação conforme anteriormente. Ao final disso, lavou-se o precipitado ressuspendendo-o em 1 mL de tampão de lise gelado, transferindo-o para um tubo de microcentrífuga e centrifugando rapidamente o

tubo por 30 segundos. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspendidas em 400 µL de tampão de lise gelado e transferidas para um tubo de ensaio de vidro, ao qual se adicionou pérolas de vidro até se atingir o menisco da suspensão. As células foram rompidas agitando-se vigorosamente o tubo de ensaio em um aparelho vortex por 5 vezes durante 30 segundos, intercalando as agitações com 30 segundos de incubação em banho de gelo. Ao final disso, o homogenato foi transferido novamente para um tubo de microcentrífuga e foi centrifugado a 3000 xg por 10 minutos a 4°C. As amostras de proteína assim preparadas tiveram a concentração determinada através do método de Lowry.

3.8. WESTERN BLOT

Proteínas separadas por eletroforese desnaturante em gel SDS-acrilamida foram eletricamente transferidas para uma membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore) por 30 minutos a 18 V em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol 10%) em uma cuba de transferência trans-blot semi-dry (BioRad). Ao final da transferência, a membrana foi bloqueada com uma solução de leite desnatado a 5% em TBS-T (Tris 0,24%, Tween-20 0,1%, NaCl 0,08%, pH 7,6) por 1 hora sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi submetida a 3 lavagens com TBS-T por 15 minutos cada sob agitação a temperatura ambiente, ao final das quais, a membrana foi incubada em 10 mL solução de anticorpo anti-fosfo-AMPK-T120 (Cell Signaling), anti-Snf1p (Santa Cruz), anti-TAP (Open Biosystems) ou anti-Pma1 (fornecido por Michel Ghislain, Universidade de Louvain-la neuve, Bélgica) por uma noite sob agitação em geladeira (4-8°C). No dia seguinte, a membrana foi submetida a 5 lavagens com 20 mL de TBS-T por 10 minutos cada, sob agitação a temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi incubada por 1 hora com uma solução diluída 5000 vezes em TBS-T de anticorpo secundário (de acordo com o anticorpo primário utilizado) conjugado a peroxidase de raiz forte. Repetiram-se as lavagens conforme anteriormente e revelou-se a membrana empregando-se o kit ECL Plus (GE Healthcare).

3.9. DOSAGEM DE ERGOSTEROL TOTAL

O método foi adaptado de Arthington-Skaggs *et al.*, 1999. As células foram crescidas até a saturação da cultura, coletadas por centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos em tubos cônicos do tipo Falcon e ressuspensas em água deionizada estéril gelada. Após repetir a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a massa de células ressuspensa na água residual. A suspensão foi transferida com uma micropipeta para tubos cônicos de microcentrífuga previamente pesados, os quais foram submetidos a rápida centrifugação (16000 xg, 10 segundos) e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado para se determinar o peso úmido do precipitado. Em seguida, a massa de células, com massa inferior a 1 grama, foi ressuspensa em 3 mL de uma solução hidroalcolica de hidróxido de potássio (KOH 25% e etanol 35%). O volume total foi transferido para tubo de vidro com tampa de rosca, agitado vigorosamente por 1 minuto e incubado a 85-90°C por 1 hora. Após o que, esperou-se que o tubo chegasse à temperatura ambiente e, então, adicionou-se 1 mL de água deionizada estéril e 2 mL de heptano (Sigma). Homogeneizou-se a mistura vigorosamente por 2 minutos e centrifugou-se a 3000 rpm por 5 min para favorecer a separação das fases. A fase orgânica, contendo os esteróis totais obtidos, foi cuidadosamente recolhida com auxílio de uma micropipeta e transferida para tubo cônico de microcentrífuga novo e mantido ao abrigo da luz. Foi feita uma diluição de 200 µL deste extrato em 800 µL de heptano e determinou-se a absorção da amostra nos comprimentos de 281 e 230 nm. Tanto o ergosterol quanto o 24(28)dehidroergosterol (24(28)DHE), um intermediário da via de síntese do ergosterol, absorvem no comprimento de 281 nm, porém apenas o 24(28)DHE apresenta um segundo pico de absorção a 230 nm. A quantidade de ergosterol pode ser estimada subtraindo-se a quantidade de 24(28)DHE, de acordo com a absorção em 230 nm, do total de ergosterol+24(28)DHE, de acordo com o pico de 281 nm. Assim, a porcentagem de ergosterol por massa úmida de material empregado na extração foi determinada de acordo com as fórmulas abaixo:

$$\%[\text{ergosterol}+24(28)\text{DHE}] = [(\text{Abs}_{281} / 290) \times 5] / \text{peso úmido} \quad (1)$$

$$\% 24(28)\text{DHE} = [(\text{Abs}_{230} / 518) \times 5] / \text{peso úmido} \quad (2)$$

$$\% \text{ergosterol} = \%[\text{ergosterol}+24(28)\text{DHE}] - \% 24(28)\text{DHE} \quad (3)$$

Onde, 5 é o fator de diluição do extrato de esteróis totais, 290 e 518 são referentes aos coeficientes de extinção molar determinados para os compostos e já convertidos para %/cm. Como controle negativo, juntamente com as amostras estudadas, preparou-se o extrato de esteróis totais de uma cepa *erg3Δ*, a qual não produz ergosterol, no entanto apresenta acúmulo do intermediário 24(28)DHE.

3.10. DOSAGEM ENZIMÁTICA DE TRIACILGLICEROL

Para a dosagem enzimática de lipídios neutros, primeiramente foi preparado um homogenato de células. Culturas foram crescidas em meio rico YPD líquido até o ponto desejado. As células foram recolhidas por centrifugação a 3000 xg por 5 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. O precipitado (equivalente a 15 D.O.s totais) foi ressuspenso no mesmo volume de água destilada estéril gelada e repetiu-se a centrifugação. Ao final, a massa de células foi transferida para um tubo de microcentrífuga e ressuspenso em tampão 300 µL de tampão contendo Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, e Triton-X 100 0,3% v/v. Foram adicionadas pérolas de vidro ao tubo e as células foram rompidas por agitação em homogeneizador por 5 ciclos de 30 segundos intercalados com incubações por 30 segundos em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se mais 300 µL do mesmo tampão.

Em seguida, foi realizada uma extração de lipídios neutros de acordo com o protocolo de Bligh & Dyer (1959) ajustado para 200 µL do homogenato. Brevemente, tubos foram homogeneizados por 5 minutos após adições sucessivas de 750 µL de uma mistura clorofórmio/metanol (1:2, Merck), 250 µL de clorofórmio e 200 µL de água destilada. Após a última homogeneização, os tubos foram centrifugados a 100 xg por 5 minutos e a fase orgânica foi coletada e seca sob vapor de nitrogênio, a temperatura ambiente. Os lipídios neutros foram ressuspenso em 150 µL de tampão de extração.

Uma vez preparados os extratos de lipídios, triacilgliceróis foram dosados empregando-se um kit clínico de dosagem de triacilgliceróis (Doles), no qual o triacilglicerol é primeiramente hidrolisado por uma lípase gerando ácidos graxos e glicerol, o qual é dosado mediante a ação da enzima glicerolquinase acoplada a reação da glicerol-fosfato oxidase. Nesta reação ocorre a produção de peróxido de hidrogênio o qual é dosado mediante a oxidação do substrato 4-aminopteridina pela ação da enzima peroxidase. O substrato oxidado apresenta coloração rosada e absorve no comprimento de onda de 510 nm. Como padrão utilizou-se uma solução de glicerol.

3.11. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Todo experimento, a não ser quando indicado o contrário, foi realizado ao menos 3 vezes de maneira independente. A significância de valores obtidos experimentalmente foi avaliada aplicando-se teste-T das condições experimentais contra os valores obtidos para controle, assumindo-se que a significância estatística é menor que 0,05. No caso das análises de redes, o enriquecimento de categorias genômicas foi testado mediante aplicação de um teste de distribuição hipergeométrica, assumindo-se que a significância estatística é menor que 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. ESTABELECIMENTO DE UM MÉTODO FLUORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS

Em estudos microscópicos de corpúsculos lipídicos por microscopia de fluorescência, o Vermelho do Nilo e o BODIPY® (4,4-difluoro-3a,4a,-diazas-indaceno) são empregados como sondas lipofílicas fluorescentes (Bozza *et al.*, 1996; DiDonato & Brasaemle, 2003; Fowler & Greenspan, 1985). Embora ambas as moléculas corem preferencialmente corpúsculos lipídicos, o último mostrou-se mais específico (Gocze & Freeman, 1994). Assim, desenhou-se um método fluorimétrico capaz de determinar os níveis de corpúsculos lipídicos empregando a sonda BODIPY 493/503. Neste método, a exemplo de outros ensaios de fluorescência reduzida (Liao *et al.*, 2005), a fluorescência do BODIPY encontra-se suprimida por efeito de um *quencher* em solução. À medida que células são adicionadas a esta solução, ocorre o deslocamento passivo da sonda BODIPY da solução para os corpúsculos lipídicos, ambiente de exclusão do *quencher*. Desse modo, a sonda volta a fluorescer, ou seja, a fluorescência é recuperada (FIGURA 11).

Para tanto, foi investigado um *quencher* que pudesse ser empregado neste método. Primeiramente, foram analisadas as propriedades fluorimétricas do BODIPY 493/503 em solução aquosa. A varredura do espectro de absorção mostra um pico máximo em 485 nm. Uma vez determinado o comprimento de onda de maior absorção, foi realizada a varredura do espectro de emissão, com excitação em 485 nm, evidenciando um pico em 510 nm (FIGURA 14A). Esses parâmetros estão de acordo com dados da literatura (Kaiser & London, 1998; Karolin *et al.*, 2002) e o manual fornecido pelo fabricante para moléculas derivadas do BODIPY. A FIGURA 14B, mostra que na faixa de concentração analisada a absorção comportou-se linearmente, ao passo que a fluorescência já se encontrava saturada.

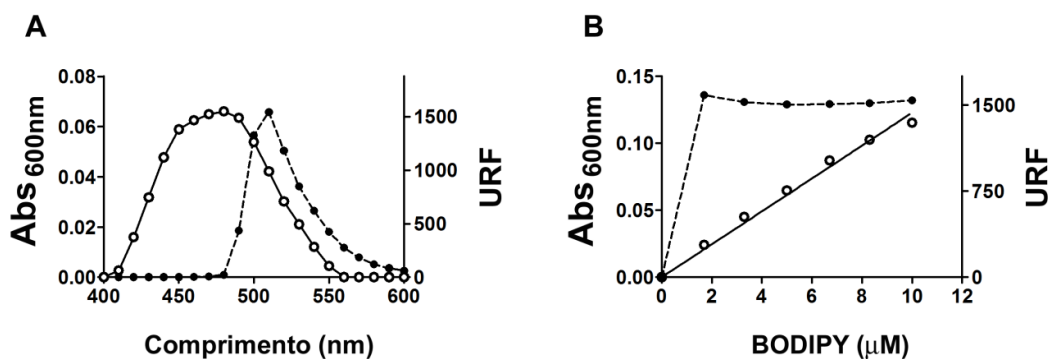


FIGURA 14. Espectros de absorção e emissão do BODIPY 493/503 e curva padrão de absorvância. Uma solução de BODIPY (0,5 μM), a 30°C, teve suas propriedades espectrofotométricas avaliadas. A. Espectro de absorção revelou um pico de absorção a 485 nm (O). Seu espectro de emissão de fluorescência (excitação 485 nm) também foi registrado revelando um pico máximo a 510 nm (●). B, A absorvância (O) e intensidade de fluorescência (●) de soluções com diferentes concentrações da sonda BODIPY 493/503.

Em seguida, três *quencher*s classicamente utilizados em estudos fluorimétricos (KI, acrilamida e triptofano) tiveram avaliadas suas capacidades de reduzir a fluorescência do BODIPY 493/503 sem interferir em suas propriedades fluorimétricas (FIGURA 15). Realizaram-se espectros de emissão de uma solução do fluoróforo na presença de concentrações crescentes dos *quencher*s. Conforme observado, nenhum *quencher* testado interferiu no comprimento máximo de emissão do BODIPY 493/503, 510 nm (FIGURA 15A-C). Curiosamente, enquanto KI e triptofano se comportaram da maneira esperada, diminuindo a intensidade de fluorescência na solução, a acrilamida se comportou de maneira oposta. Isso é melhor representado pelo gráfico de Stern-Volmer (Díaz-García & Badia-Laiño, 2005). Neste gráfico é mostrada a variação da relação F_0/F (onde, F_0 é a fluorescência medida na ausência do *quencher* e F é a fluorescência em determinada concentração de *quencher*) em função da concentração de *quencher*. Ao se adicionar concentrações crescentes de *quencher* a uma concentração fixa de fluoróforo, a relação F_0/F irá aumentar, já que a fluorescência final será menor que a fluorescência inicial. Em se tratando do fenômeno de *quenching* dinâmico, este aumento se dará de forma linear. De fato é o que se observa para KI e triptofano (FIGURA 15D,E), mas não para acrilamida (FIGURA 15F). Ainda, os gráficos de Stern-Volmer mostram que o KI é um *quencher* cerca de 3 vezes mais eficiente que o triptofano, já que as constantes de Stern-Volmer observadas foram 44 e 14,2,

respectivamente. Isto, aliado ao seu baixo custo, fez com que o KI fosse escolhido como o *quencher* empregado no ensaio em desenvolvimento.

Alguns fluoróforos, de acordo com a polaridade do meio em que se encontram, podem sofrer alterações em suas propriedades fluorimétricas. Esse é o caso do vermelho do Nilo que, mediante diminuição da polaridade no meio em que se encontra, apresenta alteração no pico de emissão de fluorescência, fenômeno conhecido como *blue-shift* (Jackson *et al.*, 2004; Petschnigg *et al.*, 2009). Dessa maneira, investigaram-se eventuais alterações nas propriedades do BODIPY 493/503 enquanto corando corpúsculos lipídicos. Pode-se constatar que a adição de células fixadas com formaldeído a uma solução de BODIPY 493/503 não altera os espectros de absorção e de emissão deste fluoróforo (FIGURA 16). Além disso, fica claro que, ao contrário do que é descrito para outras sondas fluorescentes, o sinal de fluorescência emitido pelo BODIPY é pouco suscetível à polaridade do meio em que se encontra, já que não são observadas diferenças na fluorescência emitida na ausência e presença de células.

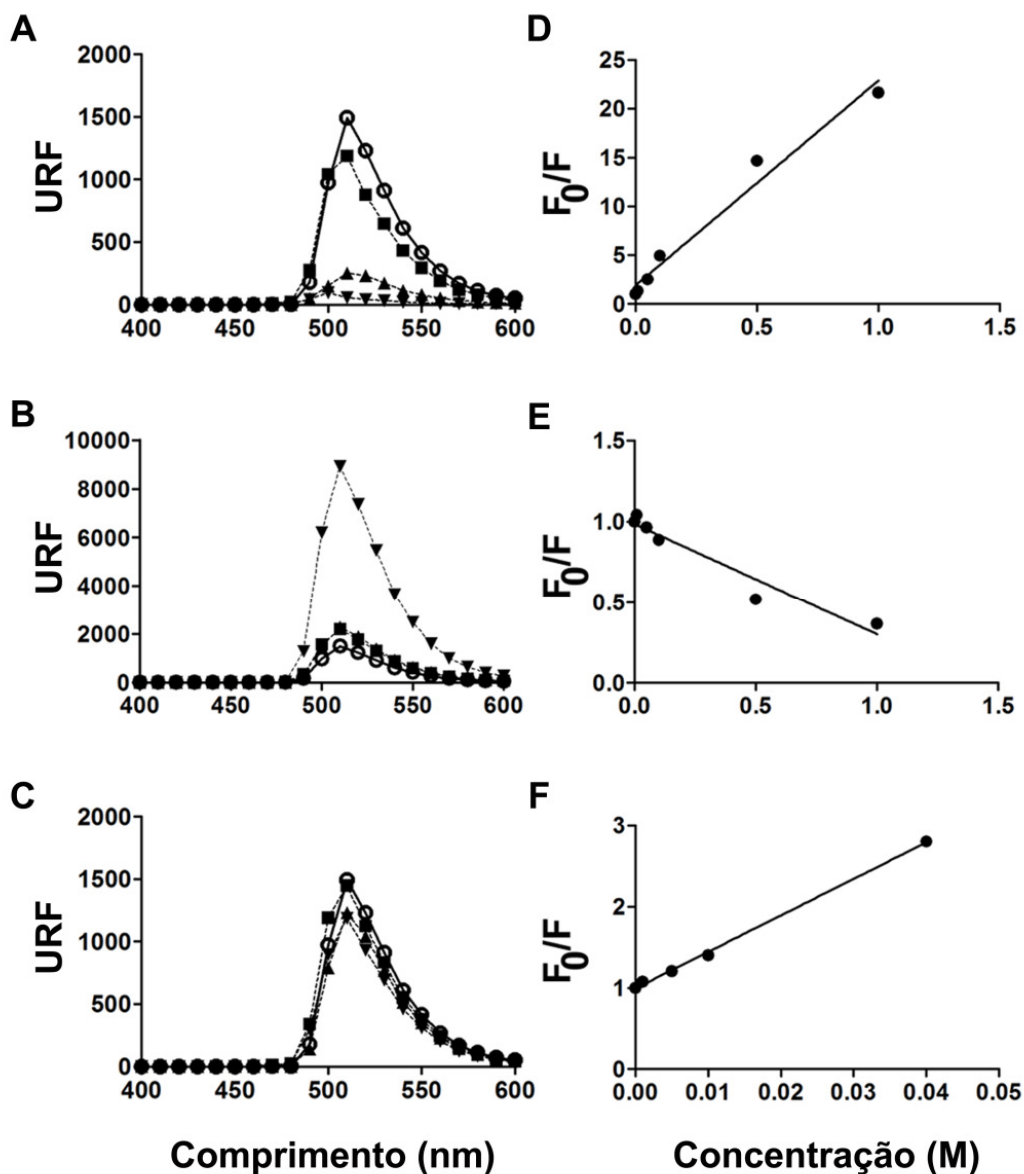


FIGURA 15. Teste de *quenchers* para o BODIPY. Foram pesquisadas as eficiências de *quenchers* classicamente empregados em estudos fluorimétricos. Uma solução de BODIPY (0,5 μM) na presença de diferentes concentrações de KI, Acrilamida ou Triptofano, a 30°C, teve seu espectro de emissão de fluorescência registrado (excitação a 485 nm). A análise pelo gráfico de Stern-Volmer mostra que o KI foi o mais eficiente dos *quenchers* testados. A, Espectros de emissão (excitação a 485 nm) de uma solução aquosa de BODIPY a 5 μM na presença de 0 (○), 0.01 M (■), 0.1 M (▲) e 1 M (▼) KI (A) ou acrilamida (B). C, Devido a sua baixa solubilidade nas condições testadas, triptofano foi utilizado em concentrações diferentes das previamente citadas, 0 (○), 0.005 M (■), 0.01 M (▲) e 0.02 M (▼). D,E,F, Gráficos de Stern-Volmer para concentrações crescentes de KI (D),acrilamida (E) e triptofano (F).

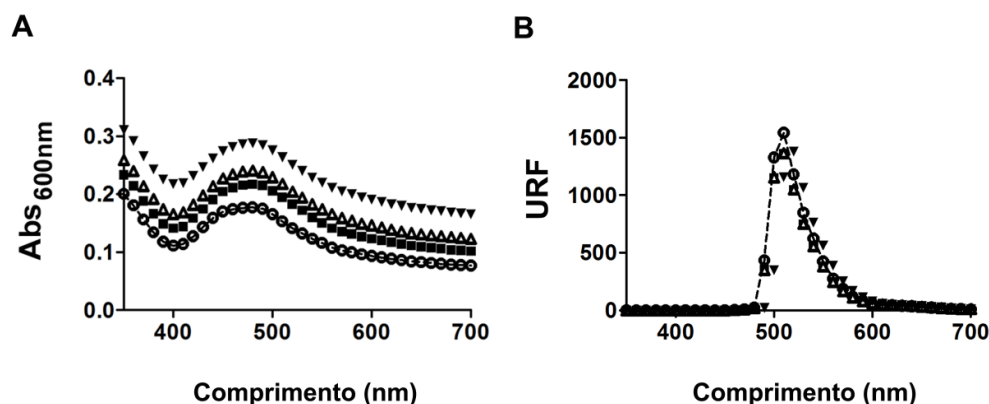


FIGURA 16. Adição de células fixadas não altera as propriedades fluorimétricas do BODIPY. Células de leveduras da fase estacionária foram fixadas, lavadas e adicionadas em diferentes concentrações finais a uma solução aquosa de BODIPY (0,5 μ M) a 30°C. As propriedades espectrofotométricas foram avaliadas (espectros de absorção e de emissão de fluorescência). A, Espectros de absorção de uma solução aquosa de BODIPY (5 μ M) após adição de células fixadas ((o) 0; (■) 0,025 DO; (Δ) 0,05 DO e (\blacktriangledown) 0,1 DO). B, As mesmas soluções tiveram o espectro de emissão de fluorescência registrado (excitação a 485 nm).

De posse desses dados, verificou-se a viabilidade do uso do BODIPY e do *quencher* KI no método proposto (FIGURA 17). Células fixadas com formaldeído foram adicionadas a uma solução de BODIPY 493/503 sob efeito de *quenching* pelo KI. Caso a mecânica do método estivesse correta, esperava-se que à medida que suspensão celular fosse adicionada ao meio, a sonda se deslocaria para o interior dos corpúsculos lipídicos, ambiente de exclusão do iodeto. Agora livre da ação do *quencher*, a sonda passaria a fluorescer, sendo o sinal detectado pelo fluorímetro. A fluorescência “recuperada” seria tão maior quanto maior a quantidade de células no meio. De fato foi o que ocorreu, conforme se pode observar na FIGURA 17A. Ao se adicionar células a uma solução de BODIPY+KI observou-se aumento na fluorescência registrada. Interessantemente, com o aumento da concentração de KI houve melhora na linearidade da curva, sendo a faixa ótima de concentração deste entre 0.25 e 1 M. Assim, decidiu-se trabalhar na concentração intermediária de 0.5 M de KI a partir deste experimento. Deve-se notar que como controle utilizou-se uma solução de BODIPY na ausência de KI, condição na qual não foi observada alteração na fluorescência registrada ao se adicionar células. Outro controle realizado foi uma microscopia de fluorescência na presença de 0.5 M de KI (FIGURA 17B) que forneceu

evidência de que a fluorescência registrada no experimento anterior não é artefato, já que não são observadas alterações no padrão de marcação na presença ou ausência do KI. Ainda, a análise das imagens geradas por microscopia revela que não ocorre diminuição da área média de fluorescência por célula, tampouco do número de corpúsculos lipídicos na presença de KI (FIGURA 17C). Para simplificação da exposição de dados, resolveu-se chamar o método como ensaio Líquido de Recuperação de Fluorescência (ensaio LRF).

Deve-se notar que a inclinação da reta obtida no gráfico (FIGURA 17A), deverá ser tão maior quanto maior for o conteúdo de corpúsculos lipídicos nas células adicionadas. Tal inclinação representa a relação $\Delta\text{URF}/\text{células}$, ou seja, a variação de fluorescência obtida por unidade de concentração de célula adicionada à solução. Dessa forma, para simplificação da exposição de resultados, tal inclinação será aqui mencionada como índice de corpúsculos lipídicos (índice CL) a partir deste experimento.

Tendo o método se mostrado viável, foi necessário avaliar a sua sensibilidade. Verificou-se, então, a capacidade de detectar variações fisiológicas nos níveis de corpúsculos lipídicos durante o crescimento. Ao longo do crescimento de uma cultura em batelada, como todo modelo microbiológico, as leveduras apresentam três fases bem marcadas, a saber: fase *lag*, quando ocorre a adaptação ao meio fresco, fase *log*, também conhecido como crescimento exponencial, e fase estacionária, quando a cultura atinge a saturação e o crescimento praticamente diminui sensivelmente (FIGURA 18A). Ao longo do crescimento, amostras de células foram retiradas e analisadas pelo ensaio LRF. Conforme é mostrado na FIGURA 18B, o índice de corpúsculos lipídicos ao longo do crescimento mostra três fases. Em um primeiro momento, que se estende da fase *lag* até metade da fase *log*, o índice CL diminui, o que significa que os lipídios neutros presentes nos corpúsculos estão sendo mobilizados. A partir desse ponto, o índice CL volta a subir até que atinge o equilíbrio em paralelo com a fase estacionária, indicando a re-síntese de lipídios neutros. Deve-se notar que o perfil da dinâmica de corpúsculos lipídicos ao longo do crescimento obtido com o ensaio LRF reproduz dados de naturezas microscópica (Kurat *et al.*, 2006) e bioquímica (Zanghellini *et al.*, 2008) previamente reportados na literatura. Como controle, acompanhou-se a

variação nos níveis de TAGs ao longo crescimento (FIGURA 19). A curva obtida apresenta alta correlação com os índices CL previamente medidos.

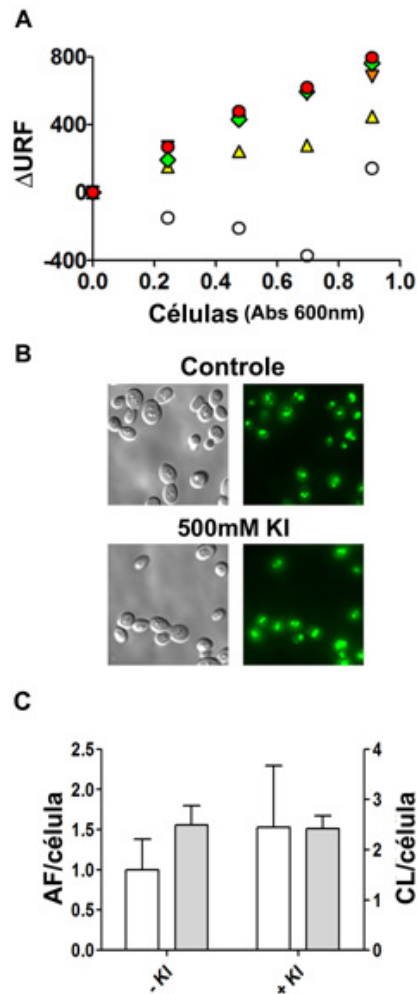


FIGURA 17. A adição de células ao meio é capaz de recuperar o sinal de fluorescência do BODIPY na presença de quencher. Foi verificado se o ensaio proposta seria viável, adicionando-se células fixadas com formaldeído e lavadas, a 200 μ l de uma solução de BODIPY (0,5 μ M) quencheada por diferentes concentrações de KI, a 30°C, distribuídas em poços de uma microplaca. As células foram adicionadas em alíquotas subseqüentes de 5 μ L em cada poço, ao que se seguiu a medição da intensidade de fluorescência (ex/em= 485/510 nm) e da absorbância (600nm) da suspensão resultante. **A.** Fluorescência recuperada por concentrações crescentes de células adicionadas ao meio com diferentes concentrações de KI (0 (O), 0.1 M (▲), 0.25 M (▼), 0.50 M (◆) ou 1 M (●)). Δ URF = diferença de fluorescência após adição de células. Dados referentes a um experimento representativo. Para confirmação de que a fluorescência recuperada era proveniente de corpúsculos lipídicos, células fixadas foram coradas com BODIPY (concentração final 0,5 μ M) na presença de KI e observadas ao microscópio de fluorescência. **B.** Microscopia de fluorescência (aumento de 100x) na ausência (painel superior) ou presença de 500 mM de KI (painel inferior). **C.** A área média de fluorescência por célula foi determinada (barras brancas, valores normalizados pelo valor obtido para o controle sem KI). Número médio de corpúsculos lipídicos por células foi determinado nas mesmas imagens (barras cinza). Coletaram-se dados para um mínimo de 50 células.

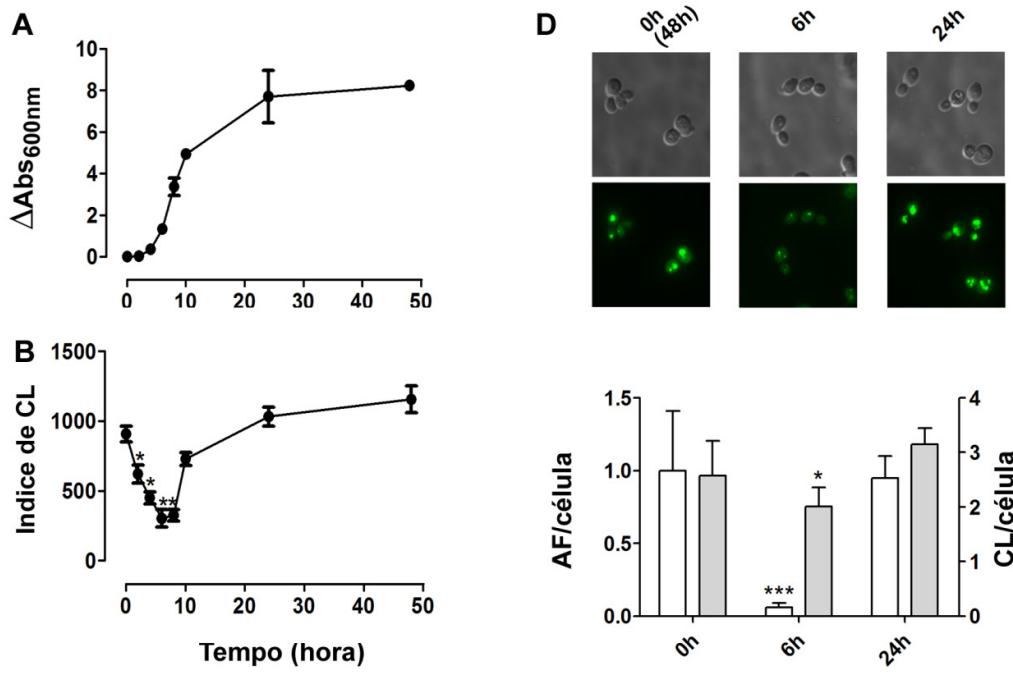


FIGURA 18. O ensaio líquido de recuperação de fluorescência é capaz de detectar a dinâmica do metabolismo de corpúsculos lipídicos. *A*, Células de uma cultura em fase estacionária foram inoculadas em meio rico YPD líquido e o crescimento celular foi acompanhado mediante leitura da absorbância ao longo de 24 horas ($n=3 \pm S.D.$). *B*, Alíquotas de células foram coletadas durante o crescimento e fixadas com formaldeído. O índice de corpúsculos lipídicos (fluorescência/DO na amostra) foi determinado empregando-se o ensaio de recuperação de fluorescência. *D*, Microscopia das mesmas amostras nos tempos indicados. A área média de fluorescência por célula foi determinada (barras brancas, valores normalizados pelo valor obtido para o controle sem KI). Número médio de corpúsculos lipídicos por células foi determinado nas mesmas imagens por (barras cinza). Coletaram-se dados para um mínimo de 50 células. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, comparado aos valores iniciais (tempo 0).

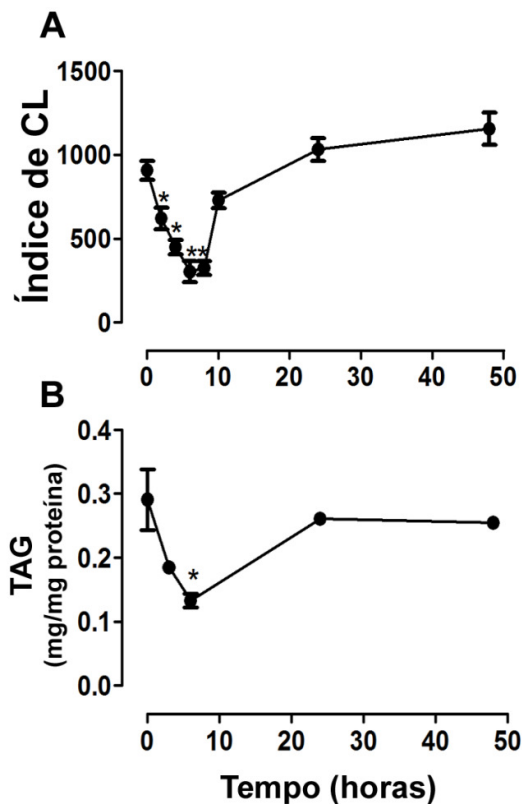


FIGURA 19. O ensaio LRF tem alta correlação com a variação de triacilgliceróis ao longo do crescimento. A, Células de uma cultura em fase estacionária foram inoculadas em meio rico YPD líquido e o crescimento celular foi acompanhado mediante leitura da absorbância ao longo de 24 horas ($n=3 \pm S.D.$). B, Alíquotas de células foram coletadas durante o crescimento e lipídios totais foram extraídos pelo método de Bligh & Dyer. Após secagem do extrato de lipídios sob atmosfera de nitrogênio, os lipídios foram ressuspensos em tampão contendo Tris e Triton X100. Os níveis de triacilgliceróis foram determinados enzimaticamente com kit clínico, baseado na hidrólise de TAG acoplada à dosagem do glicerol liberado. * $p<0,05$, em relação aos valores iniciais (tempo 0).

É importante comentar que as mesmas amostras foram observadas por microscopia de fluorescência. Conforme trabalhos prévios que estudaram corpúsculos lipídicos (Maya-Monteiro *et al.*, 2008), aqui utilizaram-se dois parâmetros para análise: a contagem de corpúsculos lipídicos e a área de fluorescência total medida por célula observada (FIGURA 18D). Os dados mostram que, após 6 horas, os corpúsculos reduziram tanto em área quanto em número, porém a diminuição do primeiro parâmetro é maior que a diminuição do último. No entanto, estas duas análises apresentam certas dificuldades. O parâmetro de comparação mais simples a ser considerado seria o número médio de corpúsculos lipídicos por célula, contudo a variabilidade populacional é muito grande e, devido às limitações dos microscópios de fluorescência mais corriqueiros, aumentos no número de corpúsculos lipídicos

dificultariam a contagem, já que estas estruturas acabariam se sobrepondo em planos diferentes de foco. Por outro lado, a determinação da área de fluorescência total por célula observada exige que se escolha entre a delimitação manual dos corpúsculos lipídicos nas imagens – o que aumenta de maneira considerável o tempo despendido (e insere-se o julgamento tendencioso do pesquisador) – ou a delimitação automática baseada em um *threshold* pré-determinado. Ainda assim, corpúsculos que tenham menor tamanho parecem captar menos sonda e torna-se mais difícil sua detecção em tempos equiparáveis aos controles. Uma alternativa seria a realização de imunofluorescência, marcando proteínas periféricas dos corpúsculos lipídicos, o que facilita tanto a contagem nominal das partículas como a determinação de área.

Parece intuitivo que o ensaio LRF apresente maior correlação com o parâmetro área de fluorescência total por célula. Tal fato foi observado em experimentos posteriores, também apresentados neste trabalho.

Uma questão levantada foi a influência da composição lipídica dos corpúsculos lipídicos nos resultados obtidos com o ensaio LRF, já que se pretendia comparar índices de CL entre cepas com mutações distintas. A maneira de verificar isso foi avaliar os corpúsculos lipídicos de duas mutantes com duplas deleções (FIGURA 20). A primeira mutante, a cepa *are1are2*, é incapaz de esterificar esteróis e, portanto, análises já mostraram que esta não apresenta ésteres de esteróis. Essa deficiência, no entanto, não impediu a formação de corpúsculos lipídicos, ainda que menores, já que a área de fluorescência total por célula foi reduzida. Isso se reflete em índice CL cerca de 10% menor em relação ao índice CL da cepa selvagem. A segunda mutante, a cepa *dga1lro1*, deletada para as duas enzimas responsáveis pela reação final da síntese de triacilgliceróis, apresenta níveis muito baixos deste lipídio (creditando-se à atividade DGAT residual proveniente de *Are2p*). Nas análises por microscopia de fluorescência, ainda que a marcação seja muito fraca, a superexposição das imagens revela a existência de corpúsculos lipídicos escassos. Como resultado, o índice CL medido é cerca de 35% menor em relação à cepa selvagem.

No que diz respeito ao ensaio LRF, este experimento mostrou que independente da proporção TAGs/EEs dos corpúsculos lipídicos, estes são

normalmente detectados. Além disso, é curioso o fato que, se consideramos que praticamente 30% do sinal no ensaio LRF é proveniente de marcação *background*, o índice CL terá grande correlação com a área de fluorescência total por célula avaliada por microscopia de fluorescência.

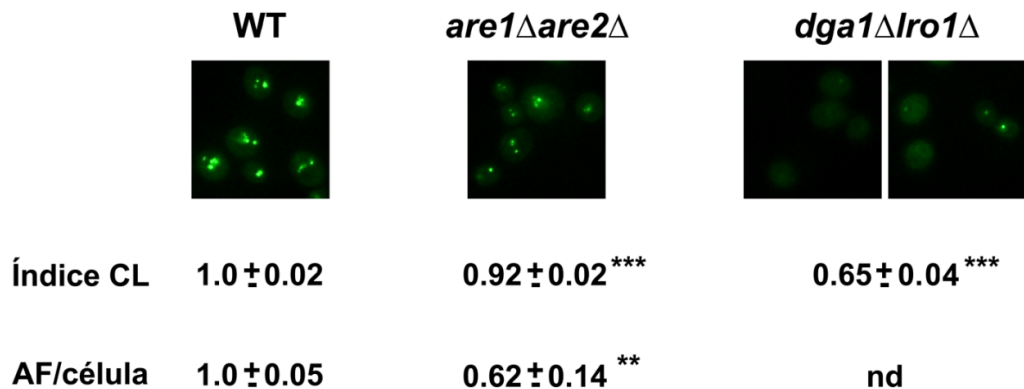


FIGURA 20 O ensaio líquido de recuperação de fluorescência é capaz de detectar a dinâmica do metabolismo de corpúsculos lipídicos. Células de uma cultura em fase estacionária foram fixadas com formaldeído e os corpúsculos lipídicos foram avaliados microscopicamente e fluorimetricamente, com o ensaio LRF. Células fixadas foram coradas com BODIPY (concentração final 0,5 μM) e observadas ao microscópio. Fotos foram retiradas com mesmo tempo de exposição. No caso da mutante *dga1lro1*, foram feitas fotos extras com o dobro de tempo de exposição. As imagens tiveram a área de fluorescência por célula determinada com o programa ImageJ. As mesmas amostras foram analisadas com o ensaio de LRF. **p<0,01, ***p<0,001, em relação aos valores da cepa selvagem. A análise das imagens da cepa *dga1lro1* no mesmo tempo de exposição que as outras cepas não foi capaz de detectar a fluorescência.

Pelos dados apresentados até aqui, o ensaio líquido de recuperação de fluorescência empregando a sonda BODIPY 493/503 mostrou-se viável, já que o fluoróforo não teve suas propriedades alteradas pelo *quencher* nem pelo ambiente hidrofóbico dos corpúsculos lipídicos. Além disso, o método não apenas é sensível o suficiente para acompanhar variações fisiológicas nos níveis de tais estruturas para uma cepa selvagem (variação de cerca de 70%) com ótima reprodutibilidade, mas também reproduziu dados obtidos com outros dois métodos (Kurat *et al.*, 2006; Zanghellini *et al.*, 2008).

4.2. SCREENING DE MUTANTES PARA NIVEIS ANORMAIS DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS

Uma vez estabelecido o ensaio líquido de recuperação de fluorescência, adaptações metodológicas no crescimento de leveduras em microplacas permitiram a realização de experimentos de larga escala. Assim, o novo método foi empregado em um *screening* com o intuito de identificar proteína-fosfatases envolvidas no metabolismo de corpúsculos lipídicos. A partir de uma biblioteca disponível comercialmente composta por cepas de *S. cerevisiae* com deleções simples para genes não-essenciais, foram coletadas 96 mutantes. Estas cepas mutantes foram subdivididas em dois grupos, um que funcionaria como referência e outro que seria o grupo de interesse. O primeiro, chamado de grupo de metabolismo lipídico e no qual FIGURAm 31 mutantes, é composto por cepas deletadas para genes que codificam enzimas associadas a corpúsculos lipídicos e/ou enzimas envolvidas no metabolismo de esterol, triacilgliceróis e ceramida (apêndice I) (Natter *et al.*, 2005). O segundo grupo, chamado de grupo de fosfatases, contém 65 cepas deletadas para todas as proteína-fosfatases e respectivas subunidades regulatórias conhecidas (apêndice II) de acordo com anotação na base de dados online do genoma de levedura. Além dos 96 mutantes, foram incluídos 14 clones independentes da respectiva cepa selvagem (BY4741).

Decidiu-se medir os corpúsculos lipídicos a fase estacionária de crescimento, quando foram observados maiores índices CL. No entanto, é importante ressaltar que algumas das mutantes estudadas apresentam crescimento mais lento em relação à cepa selvagem. Dessa forma, trabalhou-se com culturas após 48 horas de crescimento, quando todas as cepas já se encontravam em fase estacionária e, como demonstrado (FIGURA 18), após 24 horas de crescimento o índice CL sofre pouca variação.

As cepas tiveram seus índices CL medidos e os valores foram normalizados pela média obtida em cada experimento (apêndices I e II). Os valores obtidos de índices CL variaram entre 0,58 e 1,52. Mediante aplicação de um filtro arbitrário de $\pm 20\%$ em relação ao valor obtido para a cepa selvagem (índice CL = 0,9135), as mutantes foram classificadas como *hlc* (alto conteúdo lipídico) ou *llc* (baixo conteúdo lipídico). Os resultados obtidos foram

divididos em classes e as distribuições das freqüências de resultados dos grupos foram analisadas (FIGURA 21).

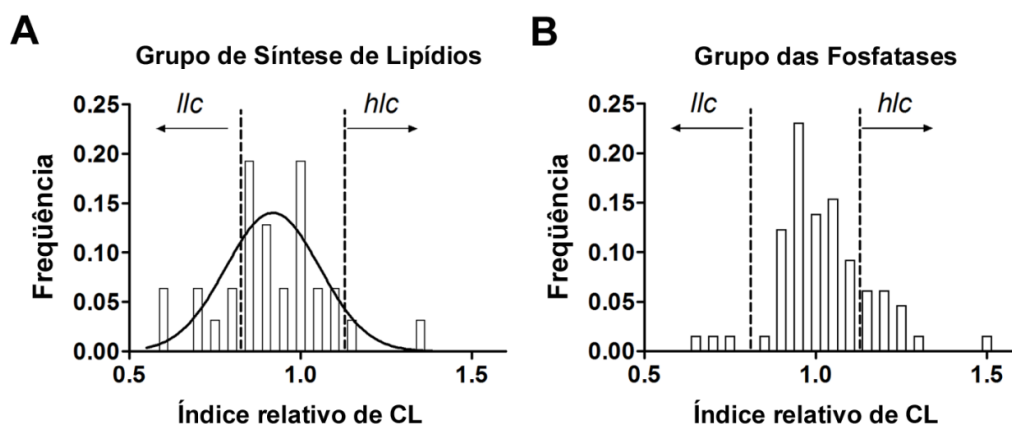


FIGURA 21. Análise estatística de um experimento de larga escala empregando o ensaio líquido de recuperação de fluorescência. Corpúsculos lipídicos foram quantificados pelo ensaio líquido de recuperação de fluorescência. As distribuições das freqüências de índice de corpúsculos lipídicos dos grupos de síntese de lipídio (A, n=31) e de proteína-fosfatases (B, n=65) estão demonstradas nos gráficos. Os dados foram coletados em 4 experimentos independentes como descrito na seção de materiais e métodos. Aplicou-se o teste de normalidade de D'Agostino & Pearson, assumindo-se $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. O grupo de síntese de lipídios apresentou uma distribuição normal dos resultados obtidos ($p = 0,281$), ao contrário do grupo de proteína-fosfatase ($p = 0,016$). Assumiu-se um corte arbitrário ($\pm 20\%$ em relação aos valores da cepa selvagem) indicado nos gráficos por linhas pontilhadas (chamou-se *l/c* – baixo conteúdo lipídico – e *h/c* – alto conteúdo lipídico, as cepas desviantes).

Como pode ser observado, os valores de índice CL do grupo de metabolismo lipídico distribuíram-se normalmente. De fato, o índice CL médio para este grupo não é estatisticamente diferente em relação ao índice médio apresentado pela cepa selvagem (índices médios foram 0,9539 e 0,9135, respectivamente, $p = 0,276$). O mesmo não foi observado para o grupo das fosfatases, que apresentou uma média significativamente maior que o índice médio da cepa selvagem (1,023, $p = 0,0164$) e uma super representação de cepas *h/c*, o que reflete em uma distribuição não-normal. É interessante notar que este resultado sugere que a perda aleatória de função de fosfatases mais provavelmente induzirá o superacúmulo de corpúsculos lipídicos.

Dentre as cepas com valores estatisticamente diferentes da cepa selvagem, foram identificadas 20 cepas com níveis anormais de corpúsculos lipídicos (apêndices I e II). Destas, 8 cepas *l/c* (sendo 5 do grupo de

metabolismo lipídico e 3 do grupo das fosfatases) e 12 cepas *hlc* (sendo 2 do grupo de metabolismo lipídico e 10 do grupo das fosfatases).

Os resultados obtidos a partir do grupo de metabolismo lipídico corroboram resultados prévios da literatura. Entre as cepas *llc* (*hmg2*, *dga1*, *erg4*, *erg5* e *are2*), duas são mutantes para genes diretamente relacionadas com a etapa final de síntese de lipídios neutros e, portanto, síntese de corpúsculos lipídicos: *DGA1*, que codifica a diacilglicerol aciltransferase, enzima responsável pela última reação na síntese de triacilglicerol (via acil-coa dependente); e *ARE2*, que codifica uma isoforma de acil-coa:esterol aciltransferase a qual contribui majoritariamente para a atividade de esterificação de esteróis. Perfis lipídicos reportados na literatura para tais mutantes mostram diminuição dos níveis destes lipídios neutros em relação a cepas selvagens (Sandager *et al.*, 2002), o que explica sua identificação como cepas *llc*. O mesmo pode ser dito sobre a mutante *hmg2*, deficiente na enzima HMG-CoA redutase, que cata Liza a etapa limitante na síntese de esteróis (Lorenz & Parks, 1990). No entanto as mutantes *erg4* e *erg5*, deficientes em enzimas da via de ergosterol, já haviam sido reportadas como cepas com número elevado de corpúsculos lipídicos (Fei *et al.*, 2008). Este dado, *a priori* discordante dos obtidos com o ensaio líquido de recuperação de fluorescência, foi investigado mais cuidadosamente. De fato, a análise microscópica de tais mutantes (FIGURA 22) confirma que realmente os números de corpúsculos lipídicos das cepas *erg4* e *erg5* são maiores em relação à cepa selvagem. É interessante ressaltar, porém, que esse acréscimo de corpúsculos lipídicos não é acompanhado por uma expansão na área média de fluorescência observada. Ou seja, os corpúsculos, embora numerosos, são menores, diminuindo a quantidade de sonda capturada no ensaio.

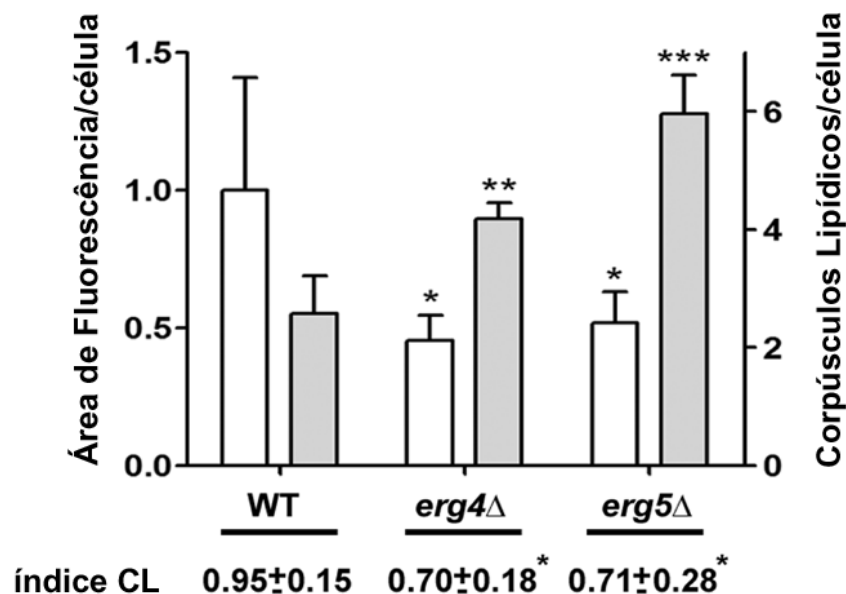


FIGURA 22. Níveis de corpúsculos lipídicos nas mutantes *erg4Δ* e *erg5Δ* determinado por microscopia de fluorescência. Células foram crescidas até a fase estacionária e fixadas. Foi realizada a microscopia destas cepas de acordo com o descrito na seção de materiais e métodos. A área média de fluorescência por célula foi determinada e expressa em pixels/célula (barras brancas). Número médio de corpúsculos lipídicos por células foi determinado nas mesmas imagens (barras cinza). Coletaram-se dados para um mínimo de 100 células. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; comparado à cepa selvagem (WT).

Ainda no grupo de metabolismo lipídico, duas cepas, *tgl3* e *slc1*, foram identificadas como mutantes *hlc*. O primeiro gene codifica uma triacilglicerol lipase localizada nos corpúsculos lipídicos cuja deleção tem como efeito o aumento nos níveis celulares de triacilglicerol (Athenstaedt & Daum, 2003). Ainda que se desconheça sua função exata na formação de corpúsculos lipídicos, a deleção de *Slc1p*, 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase, participante da síntese de ácido fosfatídico, também leva ao aumento de triacilglicerol celular (Athenstaedt & Daum, 1997).

A análise do grupo de metabolismo lipídico, grupo de referência, mostra que os resultados obtidos pelo *screening* são válidos. Sendo assim, seguiu-se a análise do grupo de interesse, no caso, o grupo das fosfatases. Entre 65 mutantes testados, foram identificadas 3 cepas *llc* (*reg1*, *sit4* e *sap190*) e 10 cepas *hlc*. Dentre estas, três mutantes deletadas para proteína-fosfatases do tipo 2C (*ptc1*, *ptc4*, *ptc7*), três mutantes deletadas para genes relacionados a proteína-fosfatases do tipo 1A (*ppz2*, *gac1*, *bni4*), duas mutantes relacionadas a proteína-fosfatases do tipo 2A (*pph21*, *sap185*), além de duas mutantes

relacionadas a proteína-fosfatases duais que apresentam atividade tirosina-fosfatase e ser/thr-fosfatase (*msg5* e *pps1*).

4.2.1. O PAPEL DA SER/THR PROTEÍNA-FOSFATASE SIT4 NO METABOLISMO LIPÍDICO

Escolheu-se estudar mais detalhadamente as mutantes para proteína-fosfatases identificadas como *llc*. Dos 3 mutantes *llc*, dois estão intimamente ligados - Sit4p e sua subunidade regulatória Sap190p. Em trabalho prévio, já havíamos demonstrado que a atividade de Sit4 é essencial para o redirecionamento do fluxo de carboidrato para gliconeogênese e armazenamento de glicogênio (Jablonka *et al.*, 2006) e parece ser o homólogo funcional a PP6 humana (Morales-Johansson *et al.*, 2009).

4.2.1.1. Sit4p participa da regulação do metabolismo de ácido graxo interferindo na atividade da proteína-quinase Snf1p/AMPK

O gene SIT4 codifica uma Ser/Thr proteína-fosfatase tendo sido primariamente identificada como uma fosfatase do tipo PP2A ativada por ceramida (Nickels & Broach, 1996). Contudo, ainda não foram identificados seus alvos. Sabe-se, porém, que Sit4p participa da via da quinase TOR (*target of rapamycin*), juntamente com outra proteína, a princípio de função inibitória, Tap42p (Beck & Hall, 1999), homóloga a proteína $\alpha 4$ de mamíferos. A via da quinase TOR é responsável pela resposta a flutuações de nutrientes no meio, sobretudo coordenando o crescimento celular em função da disponibilidade daqueles (Rohde *et al.*, 2008). Quando há disponibilidade de nutrientes no meio, a quinase TOR se encontra ativada e o complexo Sit4p-Tap42p está associado promovendo a tradução de proteínas. Conforme ocorre a queda de nutrientes no meio, TOR é inativada e o complexo Sit4p-Tap42p é dissociado (Kim & Sabatini, 2004). Além de Tap42p, Sit4p se associa a pelo menos outras 4 subunidades regulatórias que competem entre si pela ligação à subunidade catalítica, chamadas SAPs (*Sit4-associated proteins*) (Luke *et al.*, 1996), no entanto não é clara a participação destes complexos na via TOR.

Já o terceiro mutante *llc* é deletado para o gene *REG1*, que codifica uma subunidade regulatória da proteína-fosfatase tipo 1, Glc7p. Sabe-se que Reg1 direciona Glc7 para seus alvos (Frederick & Tatchell, 1996; Tu & Carlson, 1995), participando da regulação de diversos processos celulares como de-repressão por glicose e síntese de glicogênio. Reg1 desempenha um papel no metabolismo energético ao interagir com a quinase Snf1/AMPK, uma Ser/Thr proteína-quinase homóloga a AMPK (*AMP-activated kinase*) de mamíferos, responsável pela homeostase energética. Com a queda de glicose no meio, Snf1/AMPK é fosforilada por quinases, sendo ativada (Zhang *et al.*, 2010). Até onde se sabe, sua desfosforilação é promovida pela proteína fosfatase Glc7p, de maneira Reg1p dependente, já que uma cepa mutante *reg1* apresenta a quinase Snf1/AMPK hiperfosforilada (McCartney & Schmidt, 2001). Contudo, este mecanismo parece ser mais complexo, já que a interação Reg1p-Snf1p/AMPK é maior em condições de baixa-glicose, quando Snf1/AMPK se encontra mais ativa (Ludin *et al.*, 1998).

Assim, verificou-se em bancos de dados a existência de interações, físicas ou genéticas, entre os genes SIT4, SAP190 e REG1 (FIGURA 23)

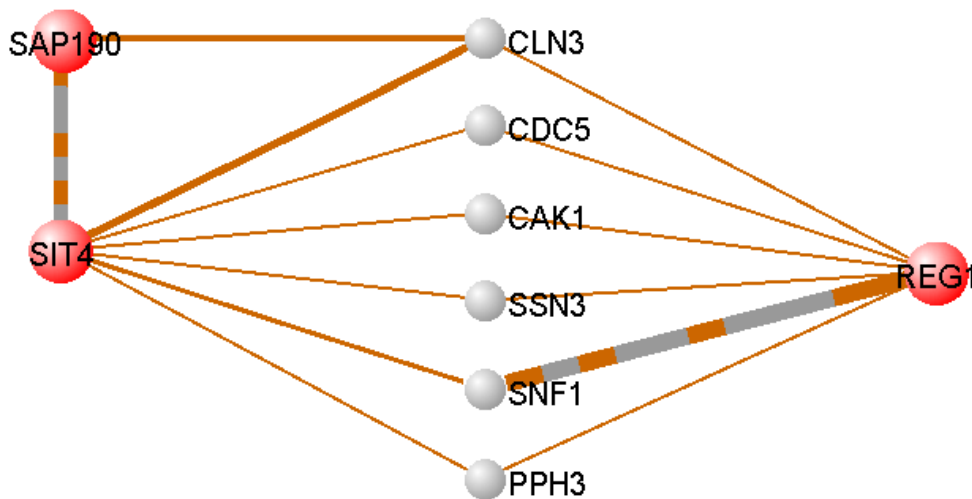


FIGURA 23. Mapa de interações entre os genes SIT4, SAP190 e REG1. Utilizando-se o aplicativo VisANT foi construído o mapa de interações entre os genes SIT4, SAP190 e REG1, com os menores caminhos possíveis. A espessura das conexões representa a consistência do dado, já que esta será tão maior quanto maior o número de evidências na literatura. Interações físicas e genéticas são indicadas em cinza e marrom, respectivamente. A princípio foram identificados 16 conectores dos quais foram selecionados apenas os relacionados a proteína-quinases ou proteína-fosfatases. Nenhum conector relacionado a metabolismo lipídico foi identificado.

Interessantemente, já existe relato na literatura da interação genética entre as proteínas Sit4p e Snf1p/AMPK no sistema de regulação transcricional do metabolismo de inositol (FIGURA 23, (Shirra *et al.*, 2005)). Dessa maneira, levantou-se a hipótese de que as participações de Sit4p (com sua subunidade regulatória Sap190) e Reg1p na regulação do metabolismo lipídico têm como ponto em comum a regulação da atividade da quinase Snf1p/AMPK. Para verificar a validade desta hipótese, estudou-se o estado de fosforilação de Snf1p/AMPK nas cepas *sit4* e *sap190*. A quinase Snf1p/AMPK encontra-se desfosforilada, e, portanto, com atividade reduzida, nas fases iniciais do crescimento exponencial. À medida que a cultura se aproxima da fase diáuxica – transição entre o crescimento exponencial e a fase estacionária – Snf1p/AMPK apresenta maiores níveis de fosforilação, tornando-se ativa (FIGURA 24A e E). O mesmo não ocorre nas cepas *sit4* e *sap190*, que apresentam Snf1p/AMPK constitutivamente fosforilada (FIGURA 24B e F, C e G), a exemplo do já reportado para a mutante *reg1*(Hess & Winston, 2005).

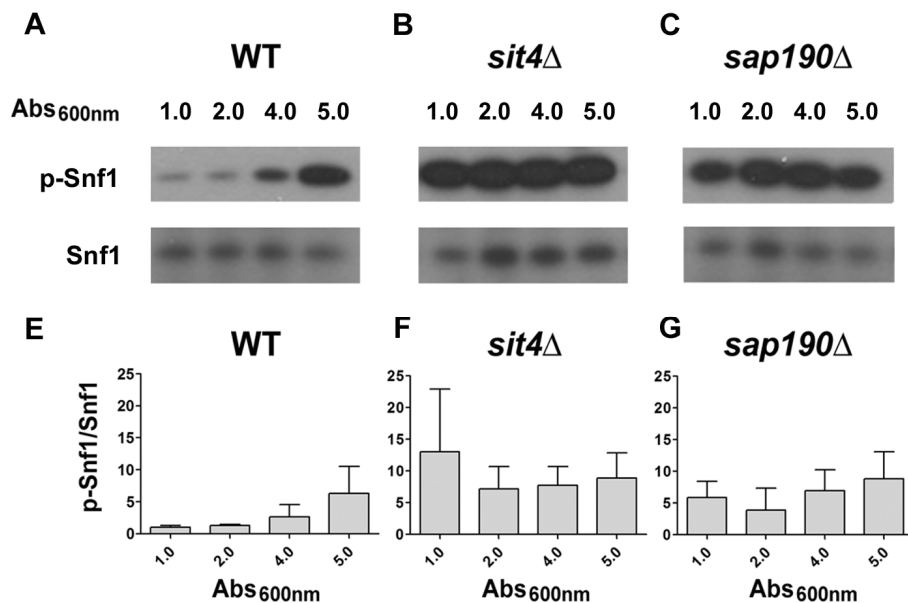


FIGURA 24. Níveis de fosforilação da proteína quinase Snf1 ao longo do crescimento. Culturas de cepas selvagem (WT), *sit4*Δ e *sap190*Δ foram crescidas em meio rico YPD líquido a 30°C sob agitação. Alíquotas de 0.9 mL de cultura foram coletadas ao longo do crescimento (Abs_{600nm} de 1, 2, 4 ou 5) e extratos totais de proteínas foram preparados empregando-se o método de extração rápida descrito na seção de materiais e métodos. A-C, A fosforilação de Snf1p/AMPK foi analisada por *western blot* empregando anticorpo anti-fosfo-AMPK (p-Snf1, parte superior da FIGURA). Como controle de aplicação, níveis totais de Snf1 foram revelados empregando-se anticorpo anti-Snf1 (Snf1, parte inferior da FIGURA). B, Barras representam a média com desvio padrão da análise de densitometria dos *western blots* (3 experimentos independentes).

Já que as cepas *llc* estudadas apresentam Snf1p/AMPK hiperativa, estudou-se em seguida se existe correlação entre a atividade de ACCase e nível de corpúsculos lipídicos. Na inviabilidade da construção de uma cepa deletada para ACCase, já que esta é uma enzima essencial (Hasslacher *et al.*, 1993), decidiu-se verificar se o oposto era verdadeiro, ou seja, se alterações na atividade de ACCase induziriam aumento nos níveis de corpúsculos lipídicos. Para tanto, avaliou-se uma cepa *snf1*, na qual, já demonstrado bioquimicamente, a ACCase encontra-se hiperativada devido à ausência de seu regulador negativo, Snf1p/AMPK (Woods *et al.*, 1994). Como demonstrado (FIGURA 25), a cepa *snf1*, em fase estacionária, apresentou índice de corpúsculos lipídicos estatisticamente maior que a cepa selvagem, no ensaio LRF. Esse fenótipo de acúmulo de lipídios foi corroborado por observações de outro grupo no decorrer da execução deste trabalho (Kohlwein & Petschnigg, 2007).

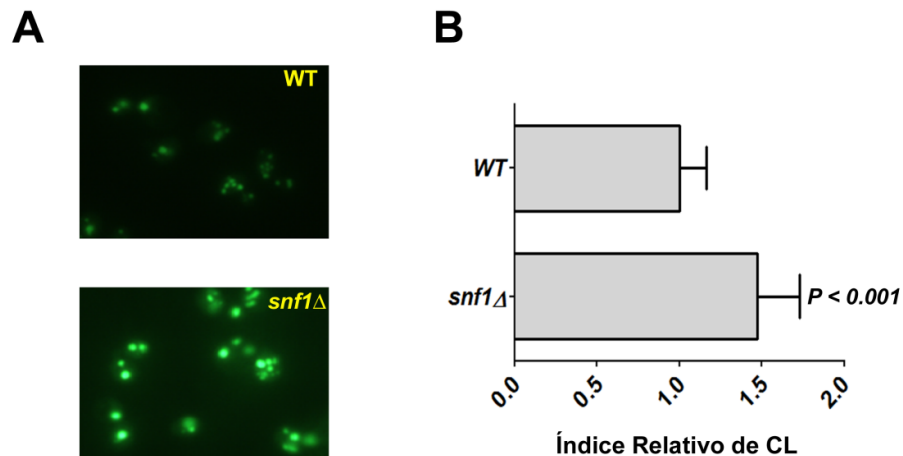


FIGURA 25. A deleção da proteína-quinase Snf1p/AMPK provoca aumento nos corpúsculos lipídicos. A, Células de uma cultura de fase estacionária da cepa *snf1* foram fixadas com formaldeído e analisadas por microscopia de fluorescência, conforme descrito na seção de materiais e métodos. B, Índice de corpúsculos lipídicos da cepa *snf1* crescida até a fase estacionária em meio rico YPD líquido, de acordo com o ensaio de recuperação de fluorescência (n=3, ± D.P.).

Finalmente, se fez necessário verificar se a hiperfosforilação de Snf1p/AMPK devido à deleção de Sit4p incorre em inibição da atividade de ACCase. Em caso positivo, espera-se que ocorra uma escassez de substrato, refletindo no nível de corpúsculos lipídicos ao longo de todo crescimento. É o

que de fato pode ser observado ao se estudar a dinâmica de corpúsculos lipídicos durante o crescimento da mutante *sit4* (FIGURA 26).

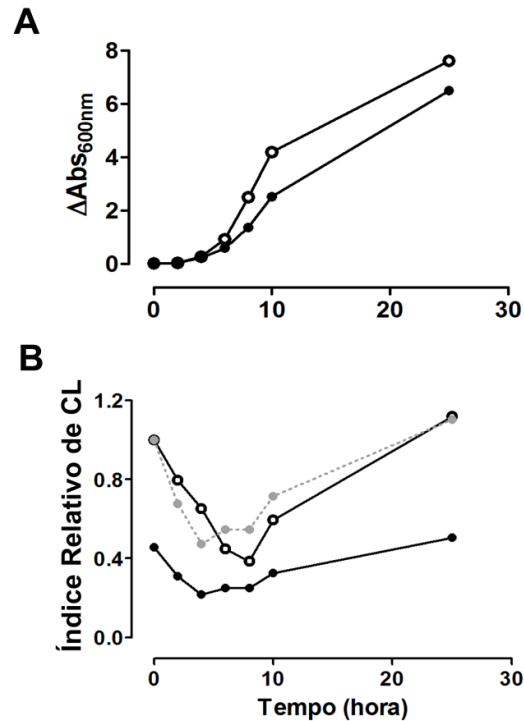


FIGURA 26. Níveis de corpúsculos lipídicos na cepa *sit4*Δ mantêm-se reduzidos ao longo de todo o crescimento. A. Células de uma cultura em fase estacionária (48 horas) (selvagem, O, e *sit4*Δ, ●) foram inoculadas em meio rico YPD líquido fresco. O crescimento celular foi acompanhado por medição de absorvância a 600nm ao longo de 25 horas. B. Níveis de corpúsculos lipídicos foram determinados pelo ensaio LRF durante o crescimento como descrito anteriormente. (selvagem, O, e *sit4*Δ, ●). O índice CL foi normalizado pelo valor da cepa selvagem na fase estacionária (linhas contínuas). Os valores do mutante *sit4* encontram-se também normalizados em relação ao seu próprio índice de corpúsculos lipídicos na fase estacionária (linha pontilhada). Dados representam a média de dois experimentos independentes.

Como se pode notar, ao analisar os índices de corpúsculos lipídicos da mutante normalizados pelo índice inicial de corpúsculos lipídicos da cepa selvagem, observa-se que durante todo o crescimento estes se mantêm baixos. No entanto, a cepa é capaz de responder aos estímulos de mobilização e ressíntese de corpúsculos lipídicos. Tal observação é, *per se*, evidência preliminar de que a proteína fosfatase Sit4p participa da regulação de ACCase, afetando a disponibilidade de ácidos graxos, blocos de construção de lipídios

mais complexos. Mais experimentos seriam necessários para verificar o envolvimento concomitante de Sit4p na regulação das enzimas diretamente responsáveis pela síntese (controlando a esterificação de ácidos graxos e esteróis) ou mobilização (controlando as hidrolases e lipases) dos lipídios neutros estocados nos corpúsculos lipídicos.

Como confirmação do exposto, foi avaliado o nível de atividade de ACCase nas mutantes *llc*. Utilizou-se como artifício a sensibilidade das cepas a um inibidor específico da ACCase. Sendo uma enzima essencial, a determinação da sensibilidade das cepas à droga soraphen A (Vahlensieck *et al.*, 1994), fornece informação rápida, ainda que com ressalvas, sobre a atividade da enzima. Testou-se a sensibilidade das mutantes *llc* além de cepas deletadas para outras subunidades regulatórias de Sit4p (*sap4*, *sap155*, *sap180*). Como controle, empregou-se a cepa *snf1*, sabidamente resistente ao soraphen A (Schneiter *et al.*, 1999; Shirra *et al.*, 2001).

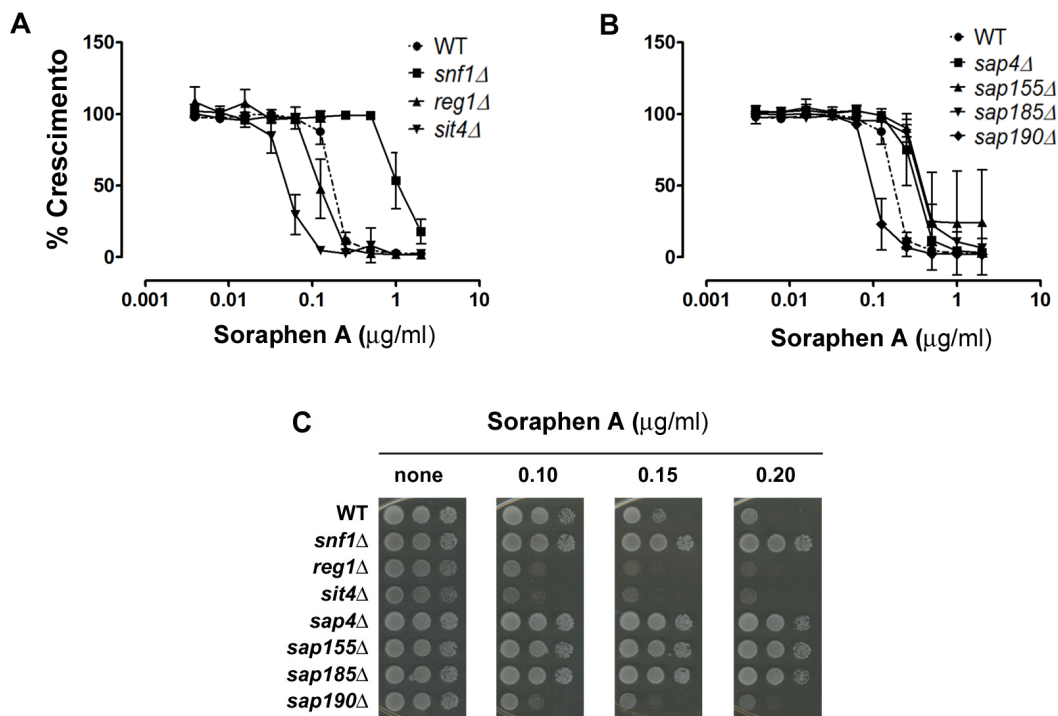


FIGURA 27. As cepas *llc* apresentam maior sensibilidade a soraphen A, um inibidor específico da enzima ACCase. A, Diluições seriadas de soraphen A foram usadas para as cepas indicadas ($n=3 \pm \text{D.P.}$). IC_{50} foram determinados (WT = 0,19, *snf1* = 0,95, *reg1* = 0,11, *sit4* = 0,05, *sap4* = 0,36, *sap155* = 0,38, *sap185* = 0,38 e *sap190* = 0,10 $\mu\text{g/ml}$). B, Para ensaio em meio sólido, diluições seriadas de suspensões celulares (10^7 , 10^6 e 10^5 células/mL, da esquerda para a direita) foram plaqueadas em placas contendo YPD sólido na presença de concentrações crescentes de soraphen A e incubadas por dois dias a 30°C .

Tanto no teste em meio líquido (FIGURA 27A-B) quanto no teste com diluição em meio sólido (FIGURA 27C), as cepas *llc* mostraram-se mais sensíveis ao soraphen A que a cepa selvagem. É interessante notar, porém, que as cepas deletadas para SAPs (com exceção de *sap190*), mostraram certa resistência. Embora a literatura sustente que a deleção de uma das SAPs favoreça a ligação das SAPs restantes à Sit4p, deslocando o equilíbrio normal destes complexos (Luke *et al.*, 1996), a resistência apresentada neste experimento por *sap4*, *sap155* e *sap180* não pode ser creditada a tal fato. Experimento que será apresentado em outra seção revelou que o gene marcador inserido no processo de construções das cepas mutantes confere alguma resistência ao soraphen A (porém, as resistências apresentadas pelas cepas *snf1*, como reportado na literatura, e *sap180* foram confirmadas em experimentos com maiores concentrações da droga).

4.2.1.2. O papel de Sit4p na síntese de esteróis

Uma vez que acetil-coa é a molécula precursora tanto para a síntese de ácidos graxos (e, em última análise, triacilgliceróis) como para a síntese de esteróis, questionou-se o efeito de perturbações da atividade de ACCase nos níveis de esteróis na mutante *sit4*. Assim, avaliou-se a sensibilidade da mutante ao antifúngico anfoterecina B (Carrillo-Munoz *et al.*, 2006). Este antibiótico, assim como outros polienos, atua formando poros na membrana plasmática ao se ligar a moléculas de ergosterol, esterol majoritário na composição lipídica de leveduras (Ratray *et al.*, 1975). Além disso, já foi demonstrada a correlação entre mudanças nos esteróis e sensibilidade a nistatina, outra droga classificada como polieno (Woods, 1971). Caso o acetil-coa em excesso escoasse pelo metabolismo de esteróis seriam esperados maiores níveis de ergosterol e, conseqüentemente, maior sensibilidade à droga. O que de fato foi observado conforme demonstrado na FIGURA 28.

Os polienos são alvo de grande interesse clínico, já que raramente são isoladas cepas de fungos patogênicos resistentes a estas drogas. Os perfis de resistências relatados são geralmente atribuídos a mutações nos genes *ERG3*

e *ERG11* (Carrillo-Munoz *et al.*, 2006). Inicialmente, investigou-se o nível de expressão da enzima codificada pelo gene *ERG3*, C-5 esterol desaturase, que

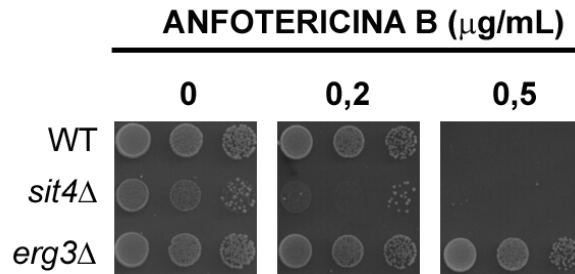


FIGURA 28. Cepa mutante *sit4* apresenta maior sensibilidade a anfotericina B. Diluições seriadas de suspensões celulares (10^7 , 10^6 e 10^5 células/mL, da esquerda para a direita) foram plaqueadas em placas contendo YPD sólido na presença de concentrações crescentes de anfoterecina B e incubadas por dois dias a 30°C.

cata Liza a introdução de uma ligação dupla no episterol, precursor na biossíntese do ergosterol. Mutantes deletados para o gene *ERG3* não apresentam ergosterol (Arthington *et al.*, 1991), o que resulta em resistência a anfotericina B (FIGURA 28, (Young *et al.*, 2003)). A queda na resistência a anfoterecina B na cepa *sit4* poderia ser reflexo de uma maior expressão da enzima C-5 esterol desaturase, o que não é o caso (FIGURA 29A).

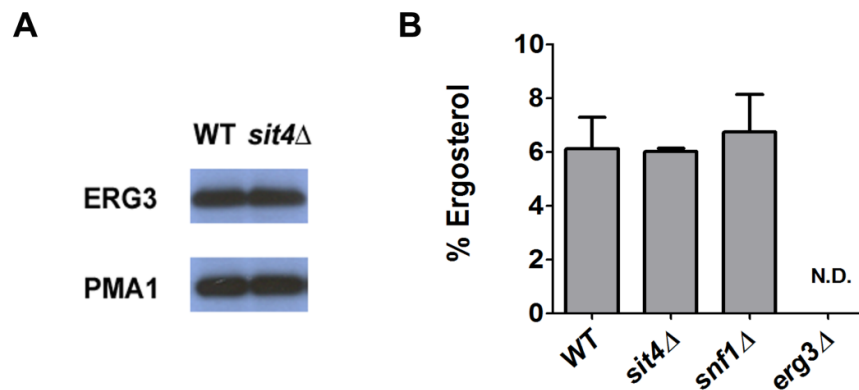


FIGURA 29. Biossíntese de ergosterol não é afetada pela deleção de Sit4p. A. Os níveis da proteína Erg3p na fase logarítmica da cultura foram avaliados nas cepas selvagem (WT) e *sit4*, onde a proteína estudada encontra-se marcada com o epítipo TAP. Extratos foram preparados, separados e transferidos conforme descrito na seção material e métodos. Como controle de aplicação de amostra, as membranas também foram reveladas com anticorpo anti-PMA1. B. Teor de ergosterol foi determinado por método espectrofotométrico nas cepas selvagem e mutantes. Valores, expressos em % de peso úmido de leveduras ($n = 3 \pm D.P.$). Como controle analisou também a cepa *erg3*, na qual ergosterol não é normalmente detectado.

O nível total de ergosterol foi medido na cepa *sit4* (que apresenta atividade ACCase mais baixa) e foi comparado à cepa selvagem e *snf1* (que apresenta atividade AACase mais alta), como controle do método, inclui-se na análise a cepa *erg3*, a qual não apresenta ergosterol detectável. Os resultados mostram que as mutantes estudadas não apresentam diferenças nos níveis de ergosterol (FIGURA 29B). Assim, embora seja observado um efeito biológico que também relacione a fosfatase Sit4p ao metabolismo de esteróis, este parece ser dar de modo indireto que não a via de síntese de esteróis em si. Estes dados sugerem que a sensibilidade a anfotericina B seja devido a um aumento de ergosterol na membrana plasmática que não se reflete no ergosterol total.

4.2.2. IDENTIFICAÇÃO DE REDES DE REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS

Como demonstrado, os mutantes classificados como *llc* no screening apresentam a proteína-quinase Snf1p/AMPK hiperativa o que reflete em uma atividade diminuída de ACCase e conseqüente aumento na sensibilidade a seu inibidor específico, a droga soraphen A. Dessa forma, também se avaliou a resistência ao soraphen A dos mutantes dos dois grupos – síntese de lipídios e proteína-fosfatases – empregados no *screening*, para verificar em quais destes o fenótipo observado pode ser correlacionado à regulação da atividade ACCase (FIGURA 30, TABELA 3).

De fato, parece haver uma correlação entre a resistência ao soraphen e o fenótipo observado para corpúsculos lipídicos, já que, de modo análogo ao já explicado para as mutantes *llc*, observou-se que mutantes *hlc* apresentam maior resistência para soraphen (TABELA 3). Com efeito, 13 mutantes apresentam resistências a soraphen A diferentes da cepa selvagem, sendo que em 11 desses mutantes demonstrou-se a correlação entre a sensibilidade e o fenótipo de corpúsculos lipídicos. Apenas deleções de Dga1p, que conferiu resistência ao soraphen A e diminuição no conteúdo de lipídios neutros, e a deleção de Slc1p, que conferiu sensibilidade ao soraphen A e aumento nos níveis de lipídios neutros, apresentaram discordância entre os fenótipos

analisados. Maiores estudos poderão revelar regulação indireta da ACCase pelos produtos dessas enzimas.

Soraphen A

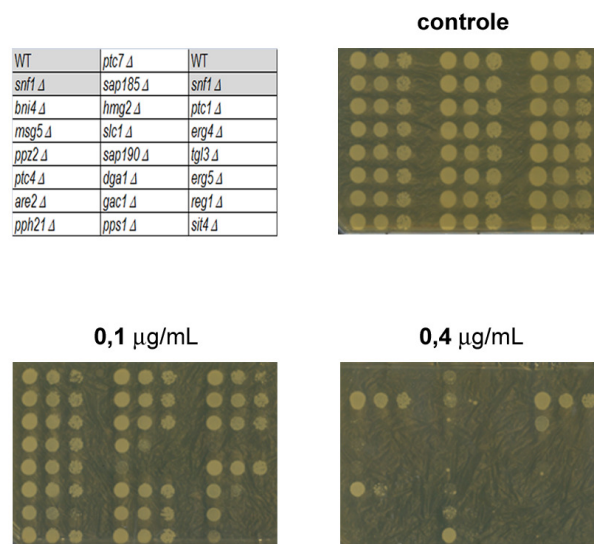


FIGURA 30. Perfil de resistência a soraphen A de mutante com níveis anormais de corpúsculos lipídicos. Diluições seriadas de suspensões celulares (10^7 , 10^6 e 10^5 células/mL, da esquerda para a direita) foram plaqueadas em placas contendo YPD sólido na presença de concentrações crescentes de soraphen A e incubadas por dois dias a 30°C.

Mutante	Resistência	Fenótipo
<i>sap190</i> Δ	-	<i>llc</i>
<i>erg4</i> Δ	-	<i>llc</i>
<i>erg5</i> Δ	-	<i>llc</i>
<i>reg1</i> Δ	-	<i>llc</i>
<i>sit4</i> Δ	-	<i>llc</i>
<i>dga1</i> Δ	+	<i>llc</i>
<i>ptc1</i> Δ	+	<i>hlc</i>
<i>ptc4</i> Δ	+	<i>hlc</i>
<i>ptc7</i> Δ	+	<i>hlc</i>
<i>sap180</i> Δ	+	<i>hlc</i>
<i>gac1</i> Δ	+	<i>hlc</i>
<i>pps1</i> Δ	+	<i>hlc</i>
<i>slc1</i> Δ	-	<i>hlc</i>

TABELA 3. Correlação entre fenótipo de corpúsculos lipídicos e resistência a soraphen A. Resultados qualitativos para resistência a soraphen A do experimento apresentado na FIGURA 30. Classificaram-se como cepas sensíveis (-), aquelas que sofreram redução do crescimento em presença de 0,1 µg/mL (concentração na qual a cepa selvagem cresce normalmente), e como cepas resistentes (+), aquelas que apresentaram algum crescimento em presença de 0,4 µg/mL. A cepa *snf1* foi incluída como controle. Fenótipos para corpúsculos

lipídicos conforme identificados no *screening* (*llc*, do inglês low lipid content, e *hlc*, do inglês high lipid content).

É interessante notar que diferentes subunidades regulatórias de uma mesma fosfatase apresentaram fenótipos opostos, pelo menos em dois casos – Sit4p (com as subunidades Sap190p e Sap185p) e Glc7p (com as subunidades Reg1p e Gac1p). No primeiro caso, a deleção de Sap180p, gerou um fenótipo identificado como *hlc* e, concomitantemente, resistência a soraphen, resultados opostos ao da deleção de Sap190p. Já no caso de Glc7p, a deleção de sua subunidade regulatória Gac1p gerou resultados opostos ao da deleção de Reg1p. Essa observação reforça a idéia de que existe um equilíbrio entre os pares formados por subunidades catalíticas e regulatórias que deve ser a base da regulação das vias de sinalizações que envolvam tais fosfatases. Essa hipótese, no entanto, ainda precisa ser demonstrada.

Em seguida, verificaram-se as interações físicas e genéticas entre os *hits* do *screening* que constem dos bancos de dados disponíveis (FIGURA 31). Nesta análise, foram também inseridos os genes/proteínas *SNF1* (por conta da relação entre seu estado de fosforilação e o fenótipo *llc*), *ACC1* (por conta da relação demonstrada entre fenótipo e resistência a soraphen) e *GLC7* (proteína-fosfatase essencial cujas subunidades, ao serem deletadas, alteram os níveis de corpúsculos lipídicos).

Conforme esperado, Snf1 é um nóculo central no mapa de interações gerado. Ptc1 também apresenta centralidade dentro do grupo de fosfatases estudadas já que apresenta o maior número de interações físicas com os membros desse grupo, ainda que não se possa aferir orientações às interações apresentadas. Chama atenção o fato que, embora outras duas proteína-fosfatases do tipo 2C também tenham sido identificadas como cepas com níveis anormais de corpúsculos lipídicos, apenas Ptc1p apresente interações no mapa. Essa família regula uma série de processos, em uma grande variedade de organismos, e, de uma forma geral, seus membros atuam como inibidores de sinais de estresse (Lammers & Lavi, 2007). Na levedura *S. cerevisiae* já foram identificados 7 membros, sendo Ptc1p um homólogo da Wip1p de mamíferos, proteína de propriedades oncogênicas já que reprime as atividades de p38, p53 e ATM (Lammers & Lavi, 2007). Interessantemente, apenas Ptc1p parece ter relação funcional com a via da quinase TOR.

PROTEÍNA-FOSFATASES

MET. LIPIDICO

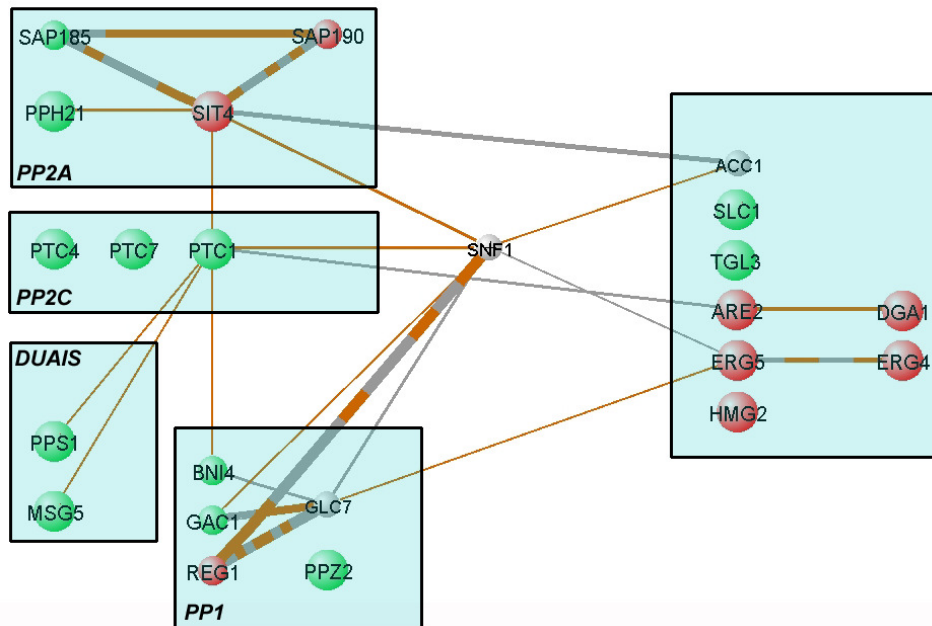


FIGURA 31. Mapa de interações diretas entre os genes identificados no screening para mutantes com níveis anormais de corpúsculos lipídicos. Utilizando-se o aplicativo VisANT foi construído o mapa de interações diretas entre os genes identificados no screening com prováveis participantes da regulação do metabolismo lipídico. Além disso, baseando-se nos dados até aqui apresentados, foram inseridos os genes *GLC7*, *SNF1* e *ACC1*, representados em cinza. Na FIGURA estão representadas as interações internas desde conjunto de nódulos. A espessura das conexões representa a consistência do dado, já que esta será tão maior quanto maior o número de evidências na literatura. Interações físicas e genéticas são indicadas em cinza e marrom, respectivamente. Os nódulos⁴ foram agrupados em meta-nódulos⁵ submetidos ao screening, de modo que as proteína-fosfatases foram agrupadas de acordo com sua classificação.

De acordo com a literatura, a deleção de *Ptc1p* afetaria o funcionamento da via TOR deslocando o equilíbrio da formação do complexo Tap42p-Sit4p para a forma associada (Gonzalez *et al.*, 2009). Curiosamente, deve ser mencionada a ausência de um centralizador no grupo de metabolismo lipídico que sirva como porta de entrada de uma sinalização dentre os *hits* obtidos no screening.

⁴ Termo comum à Teoria de Gráficos, utilizado para designar vértices ou pontos na representação gráfica de redes. Neste trabalho, o nódulo representa um gene ou uma proteína, de acordo com análise subjetiva das interações mostradas. (Junker & Schreiber, 2008).

⁵ Meta-nódulo: nódulos reunidos por alguma característica em comum. (Junker & Schreiber, 2008).

Obviamente, as proteína-fosfatases submetidas ao *screening* relatado neste trabalho não necessariamente afetam as vias de síntese de lipídios diretamente. Mutações que afetem o funcionamento dos peroxissomos, por exemplo, em última análise, alterarão os níveis de corpúsculos lipídicos. No entanto, a assunção do oposto, ou seja, as proteína-fosfatases estudadas afetarão os níveis de corpúsculos lipídicos mediante ação sobre enzimas envolvidas na biossíntese de lipídios, simplifica a análise dos resultados obtidos. Assim, foi feita uma análise modular, isto é, tomando-se os *hits* do *screening* em dois módulos – metabolismo lipídico e fosfatases – verificaram-se as interações físicas e genéticas entre estes de acordo com a literatura.

Primeiramente, foi realizada uma análise buscando-se nós capazes de estabelecer conexões entre os *hits* do *screening*. Para tanto, buscaram-se os caminhos⁶ mais curtos de distância 2 entre os *hits*. Essa análise retornou 277 novos nós, a listagem foi submetida à análise ontológica por função molecular e processo biológico (apêndices III e IV, respectivamente). Comparando-se às frequências encontradas no genoma, o grupo de genes analisados apresenta enriquecimento em categorias de função molecular como proteína-quinase, transdução de sinal e regulação de atividade enzimática (ocorrências 6,7; 3,6 e 2,9 vezes maiores, todas estatisticamente significantes, de acordo com teste de distribuição hipergeométrica). Ao passo que o mesmo não ocorreu com a função proteína-fosfatase que não mostrou enriquecimento, o que pode indicar que o *screening* foi capaz de excluir com eficiência proteína-fosfatases sem envolvimento significativo com o metabolismo de lipídios neutros. A análise ontológica por processos biológicos revela o enriquecimento das categorias sinalização, modificação de proteínas, metabolismo de lipídios, metabolismo de carboidratos, resposta a estresse e transcrição (ocorrências 3,2; 3,2; 3,0; 2,9; 2,0 e 1,8 vezes maiores, respectivamente, todas

⁶ Termo da Teoria de Gráficos, é usado para designar o conjunto de interações (representadas por linhas) que permitem a conexão de dois nós distintos (vértices) em uma representação gráfica de rede. O tamanho do caminho é chamado distância, que consiste no número de interações necessárias até se chegar de um nó ao outro. Assim, distância 2, significa que, partindo-se de um vértice, percorrendo duas interações, é possível atingir o vértice oposto. Necessariamente, portanto, haverá um terceiro nó participando do caminho, que aqui resolveu-se chamar de conector (Junker & Schreiber, 2008).

estatisticamente significantes de acordo com teste de distribuição hipergeométrica). Esses dados mostram coerência na rede de interações obtida.

Em seguida, procuraram-se os nódulos que necessariamente fizessem a conexão entre um nódulo do módulo de proteína-fosfatases e um nódulo do módulo de metabolismo lipídico (FIGURA 32). Desse modo, identificaram-se 135 nódulos, que para simplificação, serão chamados de conectores. De acordo com a anotação no banco de dados de *S. cerevisiae*, os conectores encontrados foram separados em meta-nódulos, por funções ou processos, em ordem prioritária: proteína-fosfatase, proteína-quinase, metabolismo lipídico, transcrição e tradução. Essa análise apontou 58 conectores de interesse no estudo de efetores da regulação do metabolismo lipídico (a listagem encontra-se no apêndice V).

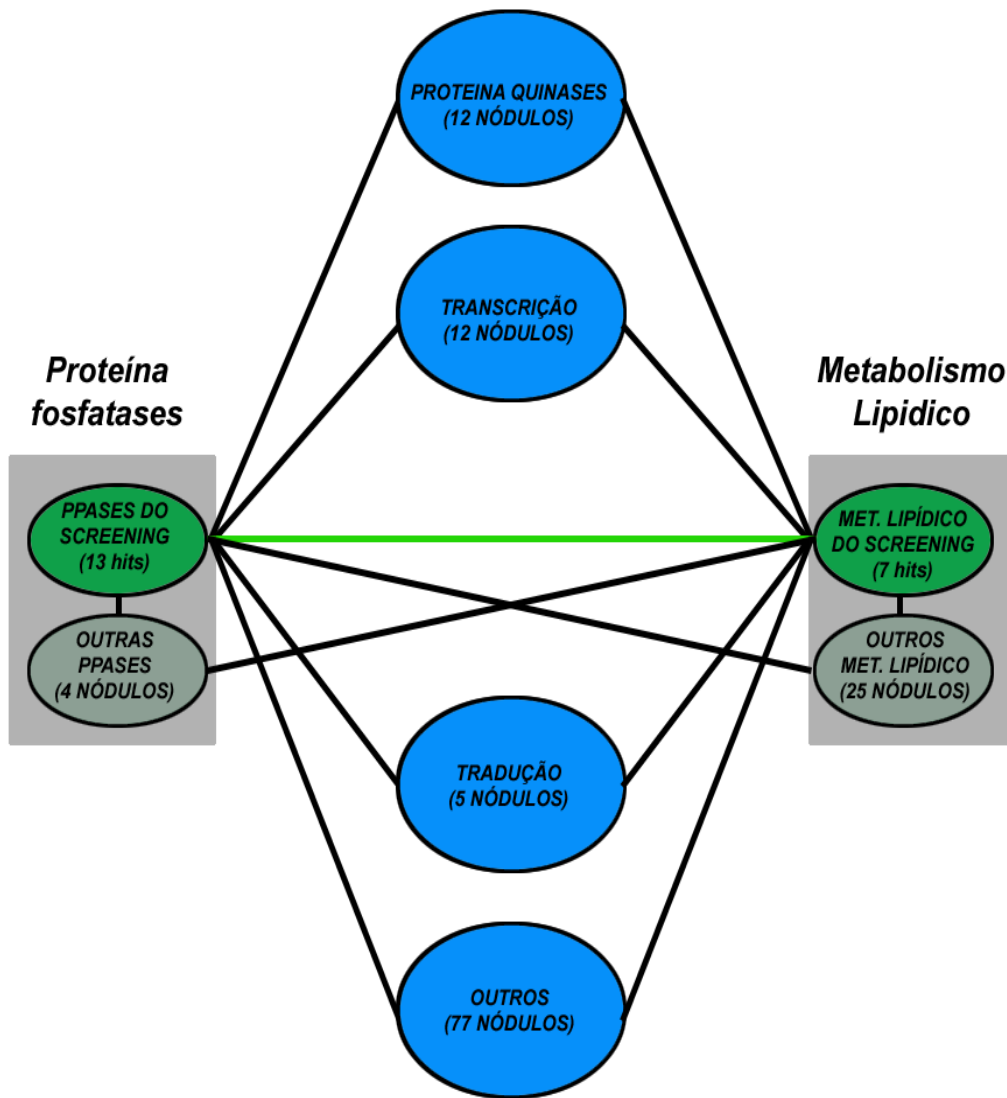


FIGURA 32. Análise de conectores entre os mutantes com níveis anormais de corpúsculos lipídicos. Utilizando-se o aplicativo VisANT foi construído o mapa de interações entre os *hits* do *screening* (representados por balões verdes) buscando-se os menores caminhos possíveis (caminhos de 2 passos). Os genes conectores obtidos foram agrupados de acordo com sua ontologia (GO) sendo representados em verde claro aqueles afins aos grupos do *screening* e em azul aqueles que fazem a ponte entre o grupo de proteína-fosfatases e metabolismo lipídico.

5. DISCUSSÃO

À medida que mais evidências ligam a desregulação do metabolismo de corpúsculos lipídicos a processos patológicos, como a resposta inflamatória (Bozza & Viola, 2010), resistência a insulina (Bostrom *et al.*, 2007) e até doenças neurodegenerativas (Cole *et al.*, 2002), além de seu conhecido papel no armazenamento de lipídios, aumenta-se o interesse por estas organelas no campo das ciências biológicas. No entanto, ainda há questões fundamentais a serem resolvidas em relação às vias de sinalização envolvidas na regulação corpúsculos lipídicos. De fato, os métodos empregados no estudo de lipídios não propiciaram muitos avanços; tais pesquisas ainda se baseiam em estudos microscópicos demorados ou em extrações de lipídios com solventes orgânicos, seguindo protocolos dos anos 50 (Bligh & Dyer, 1959), e posterior análise, geralmente utilizando-se a cromatografia em camada fina de alta eficiência, com intrincados sistemas de solventes cuja pureza pode ser determinante na execução da técnica (Connerth *et al.*, 2009). O emprego destas técnicas exige pesquisadores treinados já que as etapas envolvidas podem ser complicadas e trabalhosas. No presente trabalho desenvolveu-se um novo método fluorimétrico de rápida execução e baixo custo que, além de alta reprodutibilidade, foi capaz de evidenciar vias de regulação do metabolismo lipídico.

5.1. ESTABELECIMENTO DE UM MÉTODO FLUORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS

Na primeira parte deste trabalho, apresentou-se uma alternativa metodológica no estudo de corpúsculos lipídicos, reservatórios celulares de lipídios neutros, sem a necessidade de extrações. Utilizando-se uma sonda fluorescente específica para corpúsculos lipídicos, foi possível desenhar um ensaio que se mostrou sensível e reprodutível para o estudo de variações fisiológicas nos níveis de corpúsculos lipídicos. Além disso, pela simplicidade do método, é viável a sua aplicação a experimentos de larga escala, produzindo resultados bastante confiáveis. A sonda fluorescente BODIPY 493/503, que consiste em uma molécula derivada do fluoróforo BODIPY com

cinco substituições, devido à sua natureza lipofílica, acumula-se em corpúsculos lipídicos (Gocze & Freeman, 1994). Conforme demonstrado aqui, essa marcação se dá de forma passiva, já que foi possível a utilização de células fixadas. A escolha em se trabalhar com células fixadas foi bastante acertada já que, além de evitar respostas celulares que possam afetar os níveis de lipídios neutros, impede a expulsão da sonda por bombas de drogas (Sepp Kohlwein, comunicação pessoal), sistema de detoxificação bastante ativo em leveduras.

O BODIPY já vem sendo empregado em estudos de microscopia como alternativa ao vermelho do Nilo (DiDonato & Brasaemle, 2003; Fowler & Greenspan, 1985). É interessante observar, porém, que este último atua mais como uma sonda hidrofóbica, pois só fluoresce em ambientes hidrofóbicos de forma dependente à hidrofobicidade do meio em que se encontra, tendo sido demonstrado que cora tanto membranas como corpúsculos lipídicos (Jackson *et al.*, 2004; Petschnigg *et al.*, 2009). Por outro lado, o BODIPY apresenta maior especificidade para corpúsculos lipídicos, conforme revelado por citometria de fluxo (Gocze & Freeman, 1994). Ainda, o BODIPY parece ser menos sensível às condições do meio, como pH e polaridade (Karolin *et al.*, 2002), o que pode ser visto como uma vantagem ao se comparar a marcação de corpúsculos lipídicos em diferentes cepas mutantes, já que podem ser descartados artefatos devido a variações no perfil lipídico destas organelas.

Um método onde as células fossem adicionadas a uma solução de fluoróforo sem a necessidade de lavagem seria de grande interesse, pois permitiria fácil aplicação para sistemas de larga escala. Para atender este modelo fez-se necessário reduzir a fluorescência da sonda no meio aquoso de maneira que o sinal só voltasse aos níveis normais quando esta estivesse marcando as organelas desejadas (FIGURA 11). Dessa forma, o iodeto de potássio se revelou a melhor opção, primeiramente, pela alta eficiência com que reduziu a fluorescência do BODIPY apenas em meio aquoso, já que quando este se encontra no interior dos corpúsculos lipídicos o efeito foi anulado (FIGURAS 15 e 17). Embora não tenham sido realizados experimentos, pode-se aventar que por sua natureza iônica e, portanto, hidrofílica, é pouco provável que íons iodeto tenham grande penetração nos corpúsculos lipídicos, ambiente altamente hidrofóbico.

Uma vez que as condições ótimas foram determinadas, o ensaio apresentado neste trabalho permitiu o acompanhamento da dinâmica de corpúsculos lipídicos durante o crescimento de uma cultura (FIGURA 18), fornecendo resultados consistentes com os previamente publicados (Kurat *et al.*, 2006; Zanghellini *et al.*, 2008). Ainda que não compreendidos os mecanismos moleculares que regulam tal dinâmica, do ponto de vista fisiológico, sustenta-se que células estacionárias ao se encontrar em meio fresco mobilizam os estoques de lipídios neutros para síntese de fosfolipídios, já que para promoção do crescimento será necessária a proliferação de membranas. Isso é consistente com o fato de que em situação onde nutrientes sejam abundantes, os peroxissomos, organelas responsáveis pela beta-oxidação de ácidos graxos em leveduras, têm a sua biogênese reprimida. Por outro lado, uma vez que a concentração e qualidade dos nutrientes comecem a cair na cultura, as leveduras, como já é conhecido para o caso do glicogênio, retomam a estocagem de lipídios neutros, preparando-se para condições mais adversas. É interessante notar, que nesta dinâmica, mediante estudos de microscopia, o número de gotículas por célula não mostrou variação estatisticamente significativa, ao contrário da área total de fluorescência por célula, de onde inferiu-se que a área média das gotículas diminuíram (FIGURA 18). Assim, pode-se concluir que as medidas realizadas com o novo ensaio fluorimétrico correlacionam-se melhor com a área total de fluorescência por célula. Essa observação seria mais tarde confirmada quando analisaram-se as microscopias das cepas *erg4* e *erg5*, que, embora apresentem maior número de corpúsculos lipídicos, a área média de fluorescência por célula é menor que na cepa selvagem, explicando a obtenção de menores valores no ensaio fluorimétrico (FIGURA22).

Deve ser mencionado que, embora não seja o foco inicial do trabalho, os experimentos de validação do ensaio proposto, mostram uma íntima relação entre o tamanho dos corpúsculos lipídicos e o conteúdo de triacilglicerol medido (FIGURA 19). Por outro lado, os dados sugerem pouca influência dos níveis de ésteres de esteróis nos corpúsculos lipídicos, já que a cepa mutante *are1are2* apresenta pequena diminuição na área total de fluorescência por célula – efeito também observado nas medidas fluorimétricas (FIGURA 20). Dessa forma, pode-se sugerir que problemas na regulação do metabolismo de

triacilgliceróis irão refletir maiores variações nos níveis de corpúsculos lipídicos medidos.

A validação deste método em outros modelos, como células de mamíferos em cultura, a exemplo do trabalho aqui apresentado para leveduras, permitirá a identificação de mecanismos de regulação e pesquisa de moléculas experimentais que interfiram no acúmulo e mobilização de corpúsculos lipídicos.

5.2. APLICAÇÃO DO MÉTODO FLUORIMÉTRICO A EXPERIMENTOS DE LARGA ESCALA

Em um segundo momento, tendo o método se mostrado viável e sensível, foi avaliado o seu emprego em experimento de larga escala na busca de cepas com níveis anormais de corpúsculos lipídicos. Nesse caso, foram testados dois grupos de mutantes; um deles formado por cepas deletadas para enzimas do metabolismo lipídico, principalmente síntese de lipídios, e a maquinaria de síntese e mobilização de corpúsculos lipídicos. Este grupo foi tomado como grupo de referência e não apenas validou o *screening*, como confirmou observações prévias sobre o método desenvolvido, reforçando sua utilidade ainda que se compare cepas com composições lipídicas diferentes. Em um *screening* previamente publicado (Fei *et al.*, 2008), no qual a coleção de cepas deletadas foi analisada microscopicamente em sua totalidade para se quantificar corpúsculos lipídicos, quatro dos *hits* aqui obtidos foram identificados com fenótipos anormais. No caso, as mutantes *dga1*, identificada previamente como tendo menor número de corpúsculos lipídicos, e *tgl3*, *erg4* e *erg5*, identificadas com número elevado de corpúsculos lipídicos. Enquanto *dga1* e *tgl3* foram coerentemente identificadas no projeto desta tese como sendo cepas de menor e maior conteúdo de corpúsculos, respectivamente, as cepas *erg4* e *erg5* apresentaram menor conteúdo de corpúsculos, resultado, *a priori*, discordante da literatura. Como já mencionado, isso pode ser atribuído a corpúsculos lipídicos substancialmente menores – o que é refletido na diminuição da área total de fluorescência nos estudos de microscopia aqui apresentados (FIGURA 22) – resultando em menor captação de BODIPY,

portanto, fluorescendo menos. Dessa maneira justifica-se a identificação de *erg4* e *erg5* como cepas de menor conteúdo lipídico.

Em relação às demais mutantes de metabolismo lipídico que apresentaram níveis anormais de corpúsculos lipídicos, a literatura mostra que realmente estas apresentam alterações nos níveis de lipídios neutros (Sandager *et al.*, 2002; Lorenz & Parks, 1990; Athenstaedt & Daum, 2003; Athenstaedt & Daum, 1997).

5.3. IDENTIFICAÇÃO DE VIAS REGULADORAS DO METABOLISMO LIPÍDICO

Um segundo grupo submetido ao *screening* era constituído por deleções de proteína-fosfatases não essenciais e suas subunidades correlacionadas. O objetivo, neste caso, era a identificação de reguladores dos níveis de lipídios neutros. É interessante notar que em *screenings* previamente realizados, onde os parâmetros utilizados foram o número (Fei *et al.*, 2008) e morfologia de corpúsculos lipídicos (Szymanski *et al.*, 2007) não foram capazes de identificar proteína-fosfatases relevantes. Aqui, de 65 cepas deletadas para todas as proteína-fosfatases não-essenciais e suas subunidades, 10 apresentaram níveis elevados de corpúsculos lipídicos ao passo que somente 3 apresentaram níveis reduzidos. Este resultado poderia sugerir que é mais provável que a perda da função de proteína-fosfatases provoque alterações na área total de corpúsculos lipídicos, explicando o motivo destas não terem sido identificadas previamente. Além disso, com o emprego da droga soraphen A, inibidor de ACCase (Vahlensieck *et al.*, 1994), foi possível sugerir em quais destas mutantes o efeito se daria na disponibilidade de ácidos graxos, blocos de construção de lipídios (TABELA 3). De fato, 11 mutantes mostraram correlação entre o fenótipo de corpúsculos lipídicos e sensibilidade ao soraphen A. No caso das 10 cepas mutantes de proteína-fosfatases com níveis elevados de corpúsculos lipídicos, 6 (*ptc1*, *ptc4*, *ptc7*, *gac1*, *pps1*, *sap185*) apresentaram correlação entre o fenótipo de corpúsculos e resistência a soraphen A. É interessante comentar que o mapa de interações entre estes genes/proteínas (*PTC1*, *PTC4*, *PTC7*, *GAC1*, *PPS1*, *SAP185*, *SIT4*, *SAP190*, *REG1*) revela que todos, com exceção de *PTC4* e *PTC7*, são capazes de

interagir entre si, com *PTC1* ocupando um papel central (FIGURA 31). Outro fato interessante é que, além da interação genética entre Ptc1p e Snf1p/AMPK (Costanzo *et al.*, 2010; Fiedler *et al.*, 2009) demonstrada em experimento de larga-escala em *S. cerevisiae*, foi verificado em *Arabidopsis thaliana* que a ativação de Snf1p (homóloga a Snf1p de leveduras e AMPK de mamíferos) é regulada por PP2C. Isso somado a sua interação com a via da quinase TOR, reforça a importância desta última na regulação do metabolismo de lipídios neutros em *S. cerevisiae* (Gonzalez *et al.*, 2009).

Obviamente, maiores experimentos devem ser realizados para se descartar a possibilidade de que tais deleções alterem a permeabilidade das células a drogas. Esse pode ser o caso das mutantes *erg4* e *erg5*, já que em uma série de *screenings* empregando drogas é comum a identificação de mutantes ERGs (Sturley, 2000). De toda forma, 7 mutantes, apesar de terem níveis anormais de corpúsculos lipídicos, não apresentaram alterações na sensibilidade a soraphen (*bni4*, *msg5*, *ppz2*, *are2*, *pph2*, *hmg2*, *tgl3*). Além de indicar Are2p e Tgl3p como prováveis pontos de regulação, o enfoque nestes mutantes poderá revelar mecanismos de regulação direta da síntese ou hidrólise de lipídios neutros.

5.4. O PAPEL DA SERINA-TREONINA PROTEÍNA-FOSFATASE SIT4

Dentre o grupo de proteína-fosfatases, os mutantes classificados como *llc*, foram estudados com detalhamento. Primeiramente, verificou-se através do estudo de interações entre proteínas/genes que constam de bancos de dados se os efeitos das deleções de Sit4p, bem como sua subunidade Sap190p, e Reg1p estariam de alguma forma conectados. A análise do mapa de interações em comum entre Sit4p, uma serina/treonina proteína-fosfatase tipo PP2A, e Reg1p, subunidade regulatória da fosfatase do tipo I Glc7p, chama a atenção para a proteína-quinase Snf1p/AMPK. Snf1p/AMPK é conhecida uma reguladora do metabolismo de ácidos graxos já que, uma vez ativada, fosforila a enzima acetil-coa carboxilase, responsável pelo comprometimento de carbonos com a síntese de lipídios (Woods *et al.*, 1994). Apesar de até o momento serem conhecidas três proteína-quinases responsáveis pela fosforilação de Snf1p e sua conseqüente ativação (Sutherland *et al.*, 2003), o

controle da atividade de Snf1p/AMPK parece se dar principalmente através da desfosforilação (Tabba *et al.*, 2010). Tal evento, demonstrou-se, é levado a cabo pela proteína-fosfatase Glc7p e, de fato, é dependente da subunidade regulatória Reg1p (McCartney & Schmidt, 2001). Dessa forma, levantou-se a hipótese de que Sit4p, juntamente a Sap190p, participem da regulação de Snf1p/AMPK, afetando a atividade de acetil-coa carboxilase.

De fato, pesquisadores acreditam que a proteína-fosfatase Sit4p possa desfosforilar a enzima acetil-coa carboxilase (Tehlivets *et al.*, 2007), enzima chave na síntese de ácidos graxos, já que foi demonstrada a interação física entre essas proteínas em experimentos de larga escala (Ho *et al.*, 2002). Porém, até o presente momento, resultados experimentais mais cuidadosos não foram publicados. Os resultados aqui apresentados, embora não descartem a hipótese vigente da literatura, propõe um novo nível de regulação da atividade da enzima acetil-coa carboxilase, indiretamente através da atividade de Snf1p/AMPK.

Isso pode ser sugerido, pois, como demonstrado, ao se avaliar a dinâmica de corpúsculos lipídicos da cepa *sit4* mostrou-se que esta não apresenta maiores anomalias, sendo capaz de mobilizar as gotículas durante a fase *lag* e ressintetizá-las a partir da fase logarítmica média (FIGURA 26). No entanto, ao se tomar os valores iniciais da cepa selvagem para fins de comparação, verifica-se uma menor taxa de síntese, com níveis baixos ao longo de todo o crescimento. Embora sejam necessários maiores experimentos para se descartar defeitos na maquinaria de mobilização e síntese de corpúsculos lipídicos, o efeito da deleção de Sit4p pode ser creditado à reduzida disponibilidade de blocos de construção dos lipídios neutros, sobretudo triacilgliceróis. Isso foi confirmado, já que a deleção de Sit4p aumenta a sensibilidade à droga soraphen A, um inibidor específico de acetil-coa carboxilase, o que sugere uma menor atividade desta enzima na cepa *sit4* (FIGURA 27). Sabendo-se que a deleção da proteína Reg1p provoca um estado de hiperfosforilação da proteína-quinase Snf1p/AMPK, investigou-se o estado de fosforilação desta para as cepas *sit4* e *sap190*. Surpreendentemente, a deleção de Sit4p, ou sua subunidade Sap190p, conduz a aumento constitutivo da fosforilação de Snf1p/AMPK, tornando esta mais ativa (FIGURA 24).

Interessantemente, sobre o papel de Sap190p, há que se destacar o efeito contrário provocado pela deleção de outra subunidade regulatória, Sap185p (tendo sido classificada como uma cepa *hlc* no *screening* e apresentando maior resistência a soraphen A). Esses dados reforçam hipótese que as SAPs competem entre si pela ligação a subunidade catalítica Sit4p, existindo um equilíbrio entre os complexos formados, conforme já apresentado por outros grupos (Luke *et al.*, 1996). Dessa forma, acredita-se que a deleção de uma das SAPs irá favorecer a formação de outros complexos, verificando-se funções antagônicas entre estas (Jablonowski *et al.*, 2009). No entanto, até o momento, não havia sido apresentada uma relação antagônica entre Sap185p e Sap190p. Mais estudos são necessários para responder se os efeitos opostos nos níveis de corpúsculos lipídicos estão relacionados. O mesmo fenômeno foi observado para as deleções de Gac1p e Bni4p, ambas as subunidades regulatórias da proteína-fosfatase Glc7p, quando comparadas a deleção de Reg1p. Isso indica que o equilíbrio entre os complexos parece ser um tema recorrente na regulação da atividade de proteínas-fosfatases, conhecidas por sua promiscuidade de alvos.

Há que se comentar que a evidência de Sit4p no metabolismo lipídico, chama atenção para uma possível conexão – para a qual existem amplas evidências na literatura, porém ainda não bem compreendida – entre as vias das quinases TOR - sensível à disponibilidade de nitrogênio, na forma de aminoácidos, principalmente - e Snf1p/AMPK, via sensível à relação AMP/ATP e disponibilidade de carboidratos. Reforça-se, assim, o papel de Sit4p em orquestrar as vias sensíveis a nutrientes e crescimento celular.

Finalmente, também foi investigada a participação de Sit4p no metabolismo de esteróis, outro possível destino do acetil-coa gerado no metabolismo de carboidratos, já que a síntese de ácidos graxos está diminuída. Já foi previamente correlacionado o nível de ergosterol celular, espécie de maior representação nos esteróis totais de uma levedura, com a sensibilidade ao antimicótico anfotericina B (Woods, 1971). Ao se avaliar a sensibilidade da cepa *sit4* a esta droga, verificou-se que esta é de fato maior (FIGURA 28). No entanto, medidas de ergosterol total na célula não revelaram diferenças significativas quando comparadas a cepa selvagem (FIGURA 29). Pelo modo de ação da droga, que consiste em ligar-se a moléculas de esteróis da

membrana celular provocando poros, levanta-se a possibilidade de que, embora os níveis totais de ergosterol não se alterem, a maior parte deste esteja na forma livre, se inserindo na membrana plasmática. Isso é plausível já que há menor disponibilidade de ácidos graxos para a esterificação dos esteróis sintetizados e subsequente armazenamento em corpúsculos. Esse dado é de relevância clínica, pois eleva Sit4p a possível alvo no combate a infecções por leveduras resistentes a drogas. Estudos já estão em andamento para se verificar a validade desta hipótese.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos na primeira parte deste trabalho indicam que:

1. O ensaio de recuperação de fluorescência proposto não apenas é viável como é capaz de detectar flutuações fisiológicas ao longo do crescimento de uma cultura.
2. Os valores de fluorescência medidos correlacionam-se à área total de fluorescência observada por microscopia. Desse modo, pela forte influência dos níveis de triacilgliceróis na área dos corpúsculos lipídicos, o método, indiretamente, representará com maior correlação variações neste lipídio neutro especificamente.
3. De todo modo, a natureza dos lipídios compondo os corpúsculos não é impeditivo para aplicação do método (como é o caso de mutantes que não apresentam ésteres de esteróis).
4. Pelo acima exposto, o método pode ser promissora mente empregado em experimentos de larga escala e na comparação de mutantes distintos.

Uma vez estabelecido o ensaio de fluorescência, este foi aplicado em um *screening* genômico de proteína-fosfatases e suas subunidades regulatórias no intento de se identificar mutantes com níveis anormais de corpúsculos lipídicos. Dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. Sit4p, juntamente com sua subunidade regulatória Sap190p, é um regulador positivo do metabolismo lipídico de *S. cerevisiae*, atuando na inibição da quinase Snf1p/AMPK. Assim, indiretamente, Sit4p atua ativando a enzima chave do metabolismo de ácidos graxos, acetil-coa carboxilase.
2. A deleção de Sit4p provoca sensibilidade ao polieno anfotericina B e os dados sugerem que isso se deve a alteração da distribuição de esteróis nas membranas lipídicas.
3. Identificaram-se 6 proteína-fosfatases (Ptc1p, Ptc4p, Ptc7p, Pps1p, Sap185p, Gac1p) cujas deleções, a exemplo de Sit4p, também afetam a atividade de ACCase, porém de forma oposta. Estas proteína-fosfatases formam uma sub-rede e chama atenção para uma posição central de Ptc1p.

4. O estudo das redes de interações entre os mutantes identificados no *screening* para níveis anormais de corpúsculos lipídicos retornou 58 genes/proteínas candidatos a reguladores do metabolismo de lipídios neutros em *S. cerevisiae*.

Parte dos dados aqui apresentados foi publicada em trabalho anexado (anexo I). O ensaio líquido de recuperação de fluorescência aqui desenvolvido também constituirá capítulo de livro de protocolos científicos reunidos por membros do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O manuscrito deste capítulo encontra-se anexado (anexo II).

7. REFERÊNCIAS

- al-Feel W, Chirala SS, & Wakil SJ (1992). Cloning of the yeast FAS3 gene and primary structure of yeast acetyl-CoA carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4534-4538.
- Arthington BA, Bennett LG, Skatrud PL, Guynn CJ, Barbuch RJ, Ulbright CE, & Bard M (1991). Cloning, disruption and sequence of the gene encoding yeast C-5 sterol desaturase. *Gene* **102**, 39-44.
- Arthington-Skaggs BA, Jradi H, Desai T, & Morrison CJ (1999). Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* **37**, 3332-3337.
- Athanikar JN & Osborne TF (1998). Specificity in cholesterol regulation of gene expression by coevolution of sterol regulatory DNA element and its binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4935-4940.
- Athenstaedt K & Daum G (1997). Biosynthesis of phosphatidic acid in lipid particles and endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**, 7611-7616.
- Athenstaedt K & Daum G (2003). YMR313c/TGL3 encodes a novel triacylglycerol lipase located in lipid particles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**, 23317-23323.
- Athenstaedt K & Daum G (2005). Tgl4p and Tgl5p, two triacylglycerol lipases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* are localized to lipid particles. *J Biol Chem* **280**, 37301-37309.
- Barrett-Bee K & Dixon G (1995). Ergosterol biosynthesis inhibition: a target for antifungal agents. *Acta Biochim Pol* **42**, 465-479.
- Bartz R, Li WH, Venables B, Zehmer JK, Roth MR, Welti R, Anderson RG, Liu P, & Chapman KD (2007). Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J Lipid Res* **48**, 837-847.

- Basson ME, Moore RL, O'Rear J, & Rine J (1987). Identifying mutations in duplicated functions in *Saccharomyces cerevisiae*: recessive mutations in HMG-CoA reductase genes. *Genetics* **117**, 645-655.
- Beck T & Hall MN (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402**, 689-692.
- Bezaire V & Langin D (2009). Regulation of adipose tissue lipolysis revisited. *Proc Nutr Soc* **68**, 350-360.
- BLIGH EG & DYER WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911-917.
- Boone AN, Rodrigues B, & Brownsey RW (1999). Multiple-site phosphorylation of the 280 kDa isoform of acetyl-CoA carboxylase in rat cardiac myocytes: evidence that cAMP-dependent protein kinase mediates effects of beta-adrenergic stimulation. *Biochem J* **341 (Pt 2)**, 347-354.
- Bostrom P, Andersson L, Rutberg M, Perman J, Lidberg U, Johansson BR, Fernandez-Rodriguez J, Ericson J, Nilsson T, Boren J, & Olofsson SO (2007). SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat Cell Biol* **9**, 1286-1293.
- Bozza PT, Payne JL, Morham SG, Langenbach R, Smithies O, & Weller PF (1996). Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11091-11096.
- Bozza PT & Viola JP (2010). Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **82**, 243-250.
- Brody S, Oh C, Hoja U, & Schweizer E (1997). Mitochondrial acyl carrier protein is involved in lipoic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **408**, 217-220.
- Brown MS & Goldstein JL (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11041-11048.

- Carrillo-Munoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, & Quindos G (2006). Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter* **19**, 130-139.
- Chirala SS, Zhong Q, Huang W, & al-Feel W (1994). Analysis of FAS3/ACC regulatory region of *Saccharomyces cerevisiae*: identification of a functional UASINO and sequences responsible for fatty acid mediated repression. *Nucleic Acids Res* **22**, 412-418.
- Clausen MK, Christiansen K, Jensen PK, & Behnke O (1974). Isolation of lipid particles from baker's yeast. *FEBS Lett* **43**, 176-179.
- Cohen PT, Brewis ND, Hughes V & Mann DJ (1990). Protein serine/threonine phosphatases: an expanding family. *FEBS Lett* **268**, 355-359.
- Cohen PT (1997). Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* **22**, 245-251.
- Cole NB, Murphy DD, Grider T, Rueter S, Brasaemle D, & Nussbaum RL (2002). Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein. *J Biol Chem* **277**, 6344-6352.
- Connerth M, Grillitsch K, Kofeler H, & Daum G (2009). Analysis of lipid particles from yeast. *Methods Mol Biol* **579**, 359-374.
- Costanzo M, Baryshnikova A, Bellay J, Kim Y, Spear ED, Sevier CS, Ding H, Koh JL, Toufighi K, Mostafavi S, Prinz J, St Onge RP, VanderSluis B, Makhnevych T, Vizeacoumar FJ, Alizadeh S, Bahr S, Brost RL, Chen Y, Cokol M, Deshpande R, Li Z, Lin ZY, Liang W, Marback M, Paw J, San Luis BJ, Shuteriqi E, Tong AH, van DN, Wallace IM, Whitney JA, Weirauch MT, Zhong G, Zhu H, Houry WA, Brudno M, Ragibizadeh S, Papp B, Pal C, Roth FP, Giaever G, Nislow C, Troyanskaya OG, Bussey H, Bader GD, Gingras AC, Morris QD, Kim PM, Kaiser CA, Myers CL, Andrews BJ, & Boone C (2010). The genetic landscape of a cell. *Science* **327**, 425-431.
- Cusi K (2010). The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* **10**, 306-315.
- Dahlqvist A, Stahl U, Lenman M, Banas A, Lee M, Sandager L, Ronne H, & Szymne S (2000). Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6487-6492.

- Díaz-García ME & Badía-Laiño R (2005). Fluorescence. In: Townshend A, Worsfold P, Poole C, eds. *Encyclopedia of Analytical Science*. New York: Academic Press. pp 97–106.
- Dickinson J & Schweizer M (1999). *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae* (1^a ed.). CRC Press.
- DiDonato D & Brasaemle DL (2003). Fixation methods for the study of lipid droplets by immunofluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem* **51**, 773-780.
- Dimster-Denk D, Thorsness MK, & Rine J (1994). Feedback regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **5**, 655-665.
- Dimster-Denk D & Rine J (1996). Transcriptional regulation of a sterol-biosynthetic enzyme by sterol levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**, 3981-3989.
- Ducharme NA & Bickel PE (2008). Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology* **149**, 942-949.
- Duplus E, Glorian M, & Forest C (2000). Fatty acid regulation of gene transcription. *J Biol Chem* **275**, 30749-30752.
- Farese RV, Jr. & Walther TC (2009). Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* **139**, 855-860.
- Egan JJ, Greenberg AS, Chang MK, & Londos C (1990). Control of endogenous phosphorylation of the major cAMP-dependent protein kinase substrate in adipocytes by insulin and beta-adrenergic stimulation. *J Biol Chem* **265**, 18769-18775.
- Farese RV, Jr. & Walther TC (2009). Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* **139**, 855-860.
- Fei W, Shui G, Gaeta B, Du X, Kuerschner L, Li P, Brown AJ, Wenk MR, Parton RG, & Yang H (2008). Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast. *J Cell Biol* **180**, 473-482.

- Fei W, Wang H, Fu X, Bielby C, & Yang H (2009). Conditions of endoplasmic reticulum stress stimulate lipid droplet formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 424, 61-67.
- Ficarro SB, McClelland ML, Stukenberg PT, Burke DJ, Ross MM, Shabanowitz J, Hunt DF, & White FM (2002). Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* 20, 301-305.
- Fiedler D, Braberg H, Mehta M, Chechik G, Cagney G, Mukherjee P, Silva AC, Shales M, Collins SR, van WS, Kemmeren P, Holstege FC, Weissman JS, Keogh MC, Koller D, Shokat KM, & Krogan NJ (2009). Functional organization of the *S. cerevisiae* phosphorylation network. *Cell* 136, 952-963.
- Fowler SD & Greenspan P (1985). Application of Nile red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O. *J Histochem Cytochem* 33, 833-836.
- Frederick DL & Tatchell K (1996). The REG2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a type 1 protein phosphatase-binding protein that functions with Reg1p and the Snf1 protein kinase to regulate growth. *Mol Cell Biol* 16, 2922-2931.
- Fujimoto T, Ohsaki Y, Cheng J, Suzuki M, & Shinohara Y (2008). Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochem Cell Biol* 130, 263-279.
- Garbarino J & Sturley SL (2005). Homeostatic systems for sterols and other lipids. *Biochem Soc Trans* 33, 1182-1185.
- Gaussin V, Hue L, Stalmans W, & Bollen M (1996). Activation of hepatic acetyl-CoA carboxylase by glutamate and Mg²⁺ is mediated by protein phosphatase-2A. *Biochem J* 316 (Pt 1), 217-224.
- Gocze PM & Freeman DA (1994). Factors underlying the variability of lipid droplet fluorescence in MA-10 Leydig tumor cells. *Cytometry* 17, 151-158.
- Gonzalez A, Ruiz A, Casamayor A, & Arino J (2009). Normal function of the yeast TOR pathway requires the type 2C protein phosphatase Ptc1. *Mol Cell Biol* 29, 2876-2888.

- Goodman JM (2008). The gregarious lipid droplet. *J Biol Chem* 283, 28005-28009.
- Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, & Londos C (1991). Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem* **266**, 11341-11346.
- Hamilton JA & Small DM (1982). Solubilization and localization of cholesteryl oleate in egg phosphatidylcholine vesicles. A carbon 13 NMR study. *J Biol Chem* 257, 7318-7321.
- Hamilton JA (1989). Interactions of triglycerides with phospholipids: incorporation into the bilayer structure and formation of emulsions. *Biochemistry* 28, 2514-2520.
- Hampton RY & Bhakta H (1997). Ubiquitin-mediated regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12944-12948.
- Hampton RY & Rine J (1994). Regulated degradation of HMG-CoA reductase, an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum, in yeast. *J Cell Biol* **125**, 299-312.
- Hardie DG (1989). Regulation of fatty acid synthesis via phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase. *Prog Lipid Res* **28**, 117-146.
- Hardie DG (1992). Regulation of fatty acid and cholesterol metabolism by the AMP-activated protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1123**, 231-238
- Hasslacher M, Ivessa AS, Paltauf F, & Kohlwein SD (1993). Acetyl-CoA carboxylase from yeast is an essential enzyme and is regulated by factors that control phospholipid metabolism. *J Biol Chem* 268, 10946-10952.
- Henneberry AL & Sturley SL (2005). Sterol homeostasis in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Semin Cell Dev Biol* 16, 155-161.
- Hess D & Winston F (2005). Evidence that Spt10 and Spt21 of *Saccharomyces cerevisiae* play distinct roles in vivo and functionally interact with MCB-binding factor, SCB-binding factor and Snf1. *Genetics* **170**, 87-94.

- Hickenbottom SJ, Kimmel AR, Londos C, & Hurley JH (2004). Structure of a lipid droplet protein; the PAT family member TIP47. *Structure* **12**, 1199-1207.
- Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, Adams SL, Millar A, Taylor P, Bennett K, Boutilier K, Yang L, Wolting C, Donaldson I, Schandorff S, Shewnarane J, Vo M, Taggart J, Goudreault M, Muskat B, Alfarano C, Dewar D, Lin Z, Michalickova K, Willems AR, Sassi H, Nielsen PA, Rasmussen KJ, Andersen JR, Johansen LE, Hansen LH, Jespersen H, Podtelejnikov A, Nielsen E, Crawford J, Poulsen V, Sorensen BD, Matthiesen J, Hendrickson RC, Gleeson F, Pawson T, Moran MF, Durocher D, Mann M, Hogue CW, Figeys D, & Tyers M (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**, 180-183.
- Hoja U, Marthol S, Hofmann J, Stegner S, Schulz R, Meier S, Greiner E, & Schweizer E (2004). HFA1 encoding an organelle-specific acetyl-CoA carboxylase controls mitochondrial fatty acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**, 21779-21786.
- Hunter K & Rose AH (1972). Lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* as influenced by growth temperature. *Biochim Biophys Acta* **260**, 639-653.
- Ingebritsen, TS & Cohen, P (1983) The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrates specificities. *Eur J Biochem* **132**, 255-261.
- Jablonka W, Guzman S, Ramirez J, & Montero-Lomeli M (2006). Deviation of carbohydrate metabolism by the SIT4 phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1760**, 1281-1291.
- Jablonowski D, Taubert JE, Bar C, Stark MJ, & Schaffrath R (2009). Distinct subsets of Sit4 holophosphatases are required for inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by rapamycin and zymocin. *Eukaryot Cell* **8**, 1637-1647.
- Jackson KE, Klonis N, Ferguson DJ, Adisa A, Dogovski C, & Tilley L (2004). Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* **54**, 109-122.
- Jia Z (1997). Protein phosphatases: structures and implications. *Biochem Cell Biol* **75**, 17-26.

- Johnson LN & Barford D (1993). The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **22**, 199-232.
- Junker BH & Schreiber F (2008). Analysis of biological networks (1^a ed.). Wiley-Interscience.
- Kaiser RD & London E (1998). Determination of the depth of BODIPY probes in model membranes by parallax analysis of fluorescence quenching. *Biochim Biophys Acta* **1375**, 13-22.
- Karolin J, Johansson LBA, Strandberg L, & Ny T (2002). Fluorescence and Absorption Spectroscopic Properties of Dipyrrometheneboron Difluoride (BODIPY) Derivatives in Liquids, Lipid Membranes, and Proteins. *Journal of the American Chemical Society* **116**, 7801-7806.
- Kearsey SE (1993). Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* gene closely related to FAS3 (acetyl-CoA carboxylase). *DNA Seq* **4**, 69-70.
- Kim DH & Sabatini DM (2004). Raptor and mTOR: subunits of a nutrient-sensitive complex. *Curr Top Microbiol Immunol* **279**, 259-270.
- Koffel R, Tiwari R, Falquet L, & Schneiter R (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* YLL012/YEH1, YLR020/YEH2, and TGL1 genes encode a novel family of membrane-anchored lipases that are required for sterol ester hydrolysis. *Mol Cell Biol* **25**, 1655-1668.
- Kohlwein SD (2010). Triacylglycerol homeostasis: insights from yeast. *J Bio Chem* **285**, 15663-15667
- Kohlwein SD & Petschnigg J (2007). SLipid-induced cell dysfunction and cell death: lessons from yeast. *Curr Hypertens Rep* **9**, 455-461.
- Kurat CF, Natter K, Petschnigg J, Wolinski H, Scheuringer K, Scholz H, Zimmermann R, Leber R, Zechner R, & Kohlwein SD (2006). Obese yeast: triglyceride lipolysis is functionally conserved from mammals to yeast. *J Biol Chem* **281**, 491-500.
- Kurat CF, Wolinski H, Petschnigg J, Kaluarachchi S, Andrews B, Natter K, & Kohlwein SD (2009). Cdk1/Cdc28-dependent activation of the major

- triacylglycerol lipase Tgl4 in yeast links lipolysis to cell-cycle progression. *Mol Cell* **33**, 53-63.
- Kwast KE, Burke PV, & Poyton RO (1998). Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *J Exp Biol* **201**, 1177-1195.
- Lammers T & Lavi S (2007). Role of type 2C protein phosphatases in growth regulation and in cellular stress signaling. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **42**, 437-461.
- Laplante M & Sabatini DM (2009). An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr Biol* **19**, R1046-R1052.
- Leber R, Zinser E, Zellnig G, Paltauf F, & Daum G (1994). Characterization of lipid particles of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 1421-1428.
- Liao J, Sportsman R, Harris J, & Stahl A (2005). Real-time quantification of fatty acid uptake using a novel fluorescence assay. *J Lipid Res* **46**, 597-602.
- Loewen CJ, Gaspar ML, Jesch SA, Delon C, Ktistakis NT, Henry SA, & Levine TP (2004). Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid. *Science* **304**, 1644-1647.
- Londos C, Brasaemle DL, Gruia-Gray J, Servetnick DA, Schultz CJ, Levin DM, & Kimmel AR (1995). Perilipin: unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells. *Biochem Soc Trans* **23**, 611-615.
- Londos C, Sztalryd C, Tansey JT, & Kimmel AR (2005). Role of PAT proteins in lipid metabolism. *Biochimie* **87**, 45-49.
- Lorenz RT & Parks LW (1990). Effects of lovastatin (mevinolin) on sterol levels and on activity of azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 1660-1665.
- Ludin K, Jiang R, & Carlson M (1998). Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6245-6250.

- Luke MM, Della SF, Di Como CJ, Sugimoto H, Kobayashi R, & Arndt KT (1996). The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase. *Mol Cell Biol* **16**, 2744-2755.
- Lindsley JE & Rutter J (2004). Nutrient sensing and metabolic decisions. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **139**, 543-559.
- Lynen F (1980). On the structure of fatty acid synthetase of yeast. *Eur J Biochem* **112**, 431-442.
- Manlandro CM, Haydon DH, & Rosenwald AG (2005). Ability of Sit4p to promote K⁺ efflux via Nha1p is modulated by Sap155p and Sap185p. *Eukaryot Cell* **4**, 1041-1049.
- Matsushashi M, Matsushashi S, Numa S, & Lynen F (1964). [ON THE BIOSYNTHESIS OF FATTY ACIDS. IV. ACETYL-COA CARBOXYLASE FROM YEAST.]. *Biochem Z* **340**, 243-262.
- Mabrouk GM, Helmy IM, Thampy KG, & Wakil SJ (1990). Acute hormonal control of acetyl-CoA carboxylase. The roles of insulin, glucagon, and epinephrine. *J Biol Chem* **265**, 6330-6338.
- Maya-Monteiro CM, Almeida PE, D'Avila H, Martins AS, Rezende AP, Castro-Faria-Neto H, & Bozza PT (2008). Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. *J Biol Chem* **283**, 2203-2210.
- Mayer-Jaekel, RE & Hemming, BA (1994). Protein phosphatase 2A – a 'menage a trois'. *Trends Cell Biol*, **4**, 287-291.
- McCartney RR & Schmidt MC (2001). Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J Biol Chem* **276**, 36460-36466.
- McGookey DJ, Anderson RG (1983) Morphological characterization of the cholesteryl ester cycle in cultured mouse macrophage foam cells. *J Cell Biol* **97**, 1156–1168.
- Moorhead GB, Trinkle-Mulcahy L, & Ulke-Lemee A (2007). Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 234-244.

- Morales-Johansson H, Puria R, Brautigam DL, & Cardenas ME (2009). Human protein phosphatase PP6 regulatory subunits provide Sit4-dependent and rapamycin-sensitive sap function in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **4**, e6331.
- Mori M, Itabe H, Higashi Y, Fujimoto Y, Shiomi M, Yoshizumi M, Ouchi Y, & Takano T (2001). Foam cell formation containing lipid droplets enriched with free cholesterol by hyperlipidemic serum. *J Lipid Res* **42**, 1771-1781.
- Mullner H, Deutsch G, Leitner E, Ingolic E, & Daum G (2005). YEH2/YLR020c encodes a novel steryl ester hydrolase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**, 13321-13328.
- Munday MR (2002). Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans* **30**, 1059-1064.
- Munday MR, Campbell DG, Carling D, & Hardie DG (1988). Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. *Eur J Biochem* **175**, 331-338.
- Murphy DJ (2001). The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* **40**, 325-438.
- Murphy DJ & Vance J (1999). Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci* **24**, 109-115.
- Natter K, Leitner P, Faschinger A, Wolinski H, McCraith S, Fields S, & Kohlwein SD (2005). The spatial organization of lipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* derived from large scale green fluorescent protein tagging and high resolution microscopy. *Mol Cell Proteomics* **4**, 662-672.
- Nickels JT & Broach JR (1996). A ceramide-activated protein phosphatase mediates ceramide-induced G1 arrest of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **10**, 382-394.
- O'Hara L, Han GS, Peak-Chew S, Grimsey N, Carman GM, & Siniosoglou S (2006). Control of phospholipid synthesis by phosphorylation of the yeast lipin Pah1p/Smp2p Mg²⁺-dependent phosphatidate phosphatase. *J Biol Chem* **281**, 34537-34548.
- Oelkers P, Tinkelenberg A, Erdeniz N, Cromley D, Billheimer JT & Sturley SL (2000). A lecithin cholesterol acyltransferase-like gene mediates diacylglycerol esterification in yeast. *J Biol Chem* **275**, 15609-15612.

- Oelkers P, Cromley D, Padamsee M, Billheimer JT, & Sturley SL (2002). The DGA1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast. *J Biol Chem* **277**, 8877-8881.
- Parks LW, Smith SJ, & Crowley JH (1995). Biochemical and physiological effects of sterol alterations in yeast--a review. *Lipids* **30**, 227-230.
- Petschnigg J, Wolinski H, Kolb D, Zellnig G, Kurat CF, Natter K, & Kohlwein SD (2009). Good fat, essential cellular requirements for triacylglycerol synthesis to maintain membrane homeostasis in yeast. *J Biol Chem* **284**, 30981-30993.
- Prusty D, Park BH, Davis KE, & Farmer SR (2002). Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* **277**, 46226-46232.
- Ratray JB, Schibeci A, & Kidby DK (1975). Lipids of yeasts. *Bacteriol Rev* **39**, 197-231.
- Resh MD (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* **1451**, 1-16.
- Rohde JR, Bastidas R, Puria R, & Cardenas ME (2008). Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol* **11**, 153-160.
- Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assuncao-Miranda I, Barbosa-Lima G, Da Poian AT, Bozza PT, & Gamarnik AV (2009). Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog* **5**, e1000632.
- Sandager L, Gustavsson MH, Stahl U, Dahlqvist A, Wiberg E, Banas A, Lenman M, Ronne H, & Stymne S (2002). Storage lipid synthesis is non-essential in yeast. *J Biol Chem* **277**, 6478-6482.
- Schneider R, Guerra CE, Lampl M, Gogg G, Kohlwein SD, & Klein HL (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* hyperrecombination mutant hpr1Delta is synthetically lethal with two conditional alleles of the acetyl coenzyme A

- carboxylase gene and causes a defect in nuclear export of polyadenylated RNA. *Mol Cell Biol* **19**, 3415-3422.
- Schneiter R, Hitomi M, Ivessa AS, Fasch EV, Kohlwein SD, & Tartakoff AM (1996). A yeast acetyl coenzyme A carboxylase mutant links very-long-chain fatty acid synthesis to the structure and function of the nuclear membrane-pore complex. *Mol Cell Biol* **16**, 7161-7172.
- Shimano H (2001). Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res* **40**, 439-452.
- Shirra MK, Patton-Vogt J, Ulrich A, Liuta-Tehlivets O, Kohlwein SD, Henry SA, & Arndt KM (2001). Inhibition of acetyl coenzyme A carboxylase activity restores expression of the INO1 gene in a snf1 mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21**, 5710-5722.
- Shirra MK, Rogers SE, Alexander DE, & Arndt KM (2005). The Snf1 protein kinase and Sit4 protein phosphatase have opposing functions in regulating TATA-binding protein association with the *Saccharomyces cerevisiae* INO1 promoter. *Genetics* **169**, 1957-1972.
- Sim AT & Hardie DG (1988). The low activity of acetyl-CoA carboxylase in basal and glucagon-stimulated hepatocytes is due to phosphorylation by the AMP-activated protein kinase and not cyclic AMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett* **233**, 294-298.
- Soliman GA, Acosta-Jaquez HA, & Fingar DC (2010). mTORC1 Inhibition via Rapamycin Promotes Triacylglycerol Lipolysis and Release of Free Fatty Acids in 3T3-L1 Adipocytes. *Lipids*.
- Sturley SL (2000). Conservation of eukaryotic sterol homeostasis: new insights from studies in budding yeast. *Biochim Biophys Acta* **1529**, 155-163.
- Sutherland CM, Hawley SA, McCartney RR, Leech A, Stark MJ, Schmidt MC, & Hardie DG (2003). Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Curr Biol* **13**, 1299-1305.
- Szymanski KM, Binns D, Bartz R, Grishin NV, Li WP, Agarwal AK, Garg A, Anderson RG, & Goodman JM (2007). The lipodystrophy protein seipin is

- found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20890-20895.
- Tabba S, Mangat S, McCartney R, & Schmidt MC (2010). PP1 phosphatase-binding motif in Reg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is required for interaction with both the PP1 phosphatase Glc7 and the Snf1 protein kinase. *Cell Signal* 22, 1013-1021.
- Tehlivets O, Scheuringer K, & Kohlwein SD (2007). Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1771, 255-270.
- Tonks NK & Neel BG (2001). Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* 13, 182-195.
- Tonks NK (2006). Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 833-846.
- Tu J & Carlson M (1995). REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 14, 5939-5946.
- Unger RH & Zhou YT (2001). Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. *Diabetes* 50 Suppl 1, S118-S121.
- Vahlensieck HF, Pridzun L, Reichenbach H, & Hinnen A (1994). Identification of the yeast ACC1 gene product (acetyl-CoA carboxylase) as the target of the polyketide fungicide soraphen A. *Curr Genet* 25, 95-100.
- Vance DE & Vance JE (2006). *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes* (4^a ed.). Elsevier.
- Vik A & Rine J (2001). Upc2p and Ecm22p, dual regulators of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21, 6395-6405.
- Walther TC & Farese RV, Jr. (2009). The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* 1791, 459-466.
- Wan HC, Melo RC, Jin Z, Dvorak AM, Weller PF (2007) Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J* 21,167–178

- Weinberg JM (2006). Lipotoxicity. *Kidney Int* **70**, 1560-1566.
- Wendel AA, Lewin TM & Coleman RA (2009). Glycerol-3-phosphate acyltransferases: rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 501-506.
- Witters LA & Watts TD (1990). Yeast acetyl-CoA carboxylase: in vitro phosphorylation by mammalian and yeast protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun* **169**, 369-376.
- Woods A, Munday MR, Scott J, Yang X, Carlson M, & Carling D (1994). Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo. *J Biol Chem* **269**, 19509-19515.
- Woods RA (1971). Nystatin-resistant mutants of yeast: alterations in sterol content. *J Bacteriol* **108**, 69-73.
- Yaffe MP & Schatz G (1984). Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 4819-4823.
- Young LY, Hull CM, & Heitman J (2003). Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 2717-2724.
- Yu C, Kennedy NJ, Chang CC, & Rothblatt JA (1996). Molecular cloning and characterization of two isoforms of *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA:sterol acyltransferase. *J Biol Chem* **271**, 24157-24163.
- Zanghellini J, Natter K, Jungreuthmayer C, Thalhammer A, Kurat CF, Gogg-Fassolter G, Kohlwein SD, & von Grunberg HH (2008). Quantitative modeling of triacylglycerol homeostasis in yeast--metabolic requirement for lipolysis to promote membrane lipid synthesis and cellular growth. *FEBS J* **275**, 5552-5563.
- Zhang J, Vemuri G, & Nielsen J (2010). Systems biology of energy homeostasis in yeast. *Curr Opin Microbiol* **13**, 382-388.
- Zweytick D, Leitner E, Kohlwein SD, Yu C, Rothblatt J, & Daum G (2000). Contribution of Are1p and Are2p to steryl ester synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **267**, 1075-1082.

APÊNDICES

APÊNDICE I

MUTANTES DELETADOS PARA GENES DE SÍNTESE DE LIPÍDIOS SUBMETIDOS A SCREENING PELO MÉTODO DE RECUPERAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA

NOME	SISTEMÁTICO	PROCESSO BIOLÓGICO	MÉDIA	D.P.	P
HMG2	YLR450W	Síntese de Esteróis	0.58	0.19	<0.001
DGA1*	YOR245C	Síntese de Triacilgliceróis	0.59	0.16	<0.001
ERG4*	YGL012W	Síntese de Esteróis	0.70	0.18	0.003
ERG5*	YMR015C	Síntese de Esteróis	0.71	0.28	0.007
ARE2	YNR019W	Síntese de Ésteres de Esterol	0.76	0.21	0.023
LRO1	YNR008W	Síntese de Triacilgliceróis	0.81	0.09	0.069
DPP1	YDR284C	Síntese de Triacilgliceróis	0.81	0.19	0.095
LPP1	YDR503C	Síntese de Triacilgliceróis	0.84	0.12	0.152
ERG2	YMR202W	Síntese de Esteróis	0.84	0.06	0.164
GPT2	YKR067W	Síntese de Triacilgliceróis	0.85	0.06	0.178
CSG2	YBR036C	Síntese de Ceramida	0.85	0.26	0.233
TGL5	YOR081C	Lipase (TAG)	0.86	0.17	0.265
AYR1	YIL124W	Síntese de Triacilgliceróis	0.87	0.19	0.317
LAC1	YKL008C	Síntese de Ceramida	0.88	0.09	0.359
HMG1	YML075C	Síntese de Esteróis	0.88	0.15	0.380
SUR2	YDR297W	Síntese de Ceramida	0.91	0.01	0.048
ARE1	YCR048W	Síntese de Ésteres de Esterol	0.91	0.10	0.626
IPT1	YDR072C	Síntese de Ceramida	0.93	0.09	0.782
LAG1	YHL003C	Síntese de Ceramida	0.94	0.01	0.577
TGL1	YKL140W	Hidrolase (EE)	0.99	0.03	0.189
YEH2	YLR020C	Hidrolase (EE)	1.00	0.08	0.540
ERG24	YNL280C	Síntese de Esteróis	1.00	0.14	0.546
SCS7	YMR272C	Síntese de Ceramida	1.00	0.12	0.531
ERG6	YML008C	Síntese de Esteróis	1.01	0.20	0.507
SCT1	YBL011W	Síntese de Triacilgliceróis	1.01	0.10	0.450
SUR1	YPL057C	Síntese de Ceramida	1.03	0.04	0.332
YEH1	YLL012W	Hidrolase (EE)	1.05	0.03	0.002
TGL4	YKR089C	Lipase (TAG) and Hidrolase (EE)	1.09	0.14	0.095
ERG3	YLR056W	Síntese de Esteróis	1.10	0.27	0.107
SLC1	YDL052C	Síntese de Triacilgliceróis	1.17	0.05	0.022
TGL3*	YMR313C	Lipase (TAG)	1.37	0.17	<0.001

7 de 31 mutantes mostraram níveis anormais de gotículas lipídicas. Análise estatística foi realizada contra valores da cepa selvagem (fluorescência média = 0.95, D.P. = 0.15, n = 14). Foi aplicado um filtro arbitrário de $\pm 20\%$ em relação aos valor médio de fluorescência da cepa selvagem. Fenótipos ditos llc (do inglês low lipid content) e hlc (do inglês high lipid content) foram marcados como vermelho e verde, respectivamente. Descrições de genes estão de acordo com o banco de dados de *S. cerevisiae* (www.yeastgenome.org).

* cepas identificadas em screening previamente publicado

APÊNDICE II

MUTANTES DELETADOS PARA GENES DE SUBUNIDADES CATALÍTICAS E REGULATÓRIAS NÃO-ESSENCIAIS DE FOSFATASES SUBMETIDOS A SCREENING PELO MÉTODO DE RECUPERAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA

NOME	SISTEMÁTICO	PROCESSO BIOLÓGICO	MÉDIA	D.P.	P
SIT4	YDL047W	Fosfatase tipo 2A-like	0.63	0.09	<0.001
REG1	YDR028C	Subunidade regulatória da fosfatase tipo 1 Glc7p	0.68	0.16	0.002
SAP190	YKR028W	Subunidade regulatória da fosfatase Sit4p	0.73	0.07	0.007
SIS2	YKR072C	Subunidade regulatória da fosfatase tipo 1 Ppz1p	0.86	0.07	0.223
PIG2	YIL045W	Subunidade regulatória da fosfatase tipo 1 Glc7p	0.89	0.12	0.450
LTP1	YPR073C	Tirosina fosfatase	0.90	0.12	0.518
RTS1	YOR014W	Subunidade regulatória da fosfatase tipo 2A	0.91	0.07	0.598
YBR051W		ORF <i>dúbio</i> , parcialmente sobrepe REG2	0.92	0.29	0.809
PTC6	YCR079W	Fosfatase do tipo 2C	0.92	0.10	0.636
GIP2	YER054C	Subunidade regulatória da fosfatase tipo 1 Glc7p	0.92	0.11	0.646
YVH1	YIR026C	Tirosina fosfatase	0.92	0.13	0.653
CNA1	YLR433C	Subunidade de calcineurina, fosfatase tipo 2B	0.92	0.10	0.661
PTC3	YBL056W	Fosfatase do tipo 2C	0.93	0.17	0.725
PTC5	YOR090C	Fosfatase do tipo 2C	0.93	0.08	0.722
GLC8	YMR311C	Subunidade regulatória da fosfatase tipo 1 Glc7p	0.93	0.04	0.457
TIP41	YPR040W	Interage fisicamente com Tap42p, regula Sit4p	0.93	0.09	0.781
SIW14	YNL032W	Tirosina fosfatase	0.94	0.10	0.821
CNB1	YKL190W	Subunidade de calcineurina, fosfatase tipo 2B	0.94	0.08	0.897
RTS3	YGR161C	Subunidade regulatória da fosfatase tipo 2A	0.95	0.10	0.930
PSR2	YLR019W	Fosfatase envolvida em resposta geral a estresse	0.95	0.04	0.992
OCA2	YNL056W	Tirosina fosfatase	0.95	0.22	0.997
SDP1	YIL113W	MAP quinase fosfatase	0.96	0.17	0.971
YNL010W		Similar a serina fosfatase	0.96	0.08	0.948
PTP1	YDL230W	Tirosina fosfatase	0.96	0.09	0.932
SIP5	YMR140W	Interage com Reg1p/Glc7p	0.96	0.14	0.928
CMP2	YML057W	Subunidade de calcineurina, fosfatase tipo 2B	0.97	0.12	0.866
YGR203W		Similar a Cdc25p, Arr2p e Mih1p	0.97	0.14	0.814
PPH22	YDL188C	Fosfatase tipo 2A	0.99	0.14	0.636
PPT1	YGR123C	Ser/Thr fosfatase similar a PP5 humana	0.99	0.14	0.622
PPG1	YNR032W	Ser/Thr fosfatase	1.00	0.07	0.596
PTC2	YER089C	Fosfatase do tipo 2C	1.01	0.15	0.522
RRD2	YPL152W	Ativador da atividade tirosina fosfatase de PP2A	1.01	0.09	0.474
MIH1	YMR036C	Tirosina fosfatase	1.01	0.07	0.458
PIG1	YLR273C	Subunidade regulatória da fosfatase tipo 1 Glc7p	1.01	0.15	0.467
GIP1	YBR045C	Subunidade regulatória da fosfatase tipo 1 Glc7p	1.02	0.04	0.048
PHO13	YDL236W	Fosfatase alcalina com atividade proteína fosfatase	1.02	0.09	0.382
SAP4	YGL229C	Subunidade regulatória da fosfatase Sit4p	1.03	0.16	0.376
NBP2	YDR162C	Recrutamento da fosfatase Ptc1p para o complexo Pbs2-Hog1p	1.04	0.07	0.264

<i>PTP3</i>	YER075C	<i>Tirosina fosfatase</i>	1.05	0.17	0.267
<i>YER121W</i>		<i>Proteína putativa de função desconhecida</i>	1.05	0.07	0.249
<i>VHS3</i>	YOR054C	<i>Subunidade regulatória da fosfatase tipo 1 Ppz1p</i>	1.05	0.15	0.255
<i>NEM1</i>	YHR004C	<i>Provável subunidade catalítica do complexo Nem1p-Spo7p</i>	1.05	0.10	0.246
<i>PPZ1</i>	YML016C	<i>Fosfatase tipo 1</i>	1.05	0.16	0.221
<i>PSR1</i>	YLL010C	<i>Fosfatase envolvida em resposta geral a estresse</i>	1.05	0.11	0.210
<i>PSY4</i>	YBL046W	<i>Subunidade regulatória da fosfatase tipo 2A Pph3p</i>	1.06	0.19	0.200
<i>SAP155</i>	YFR040W	<i>Subunidade regulatória da fosfatase Sit4p</i>	1.06	0.14	0.179
<i>PPQ1</i>	YPL179W	<i>Ser/Thr fosfatase</i>	1.08	0.21	0.147
<i>PPH3</i>	YDR075W	<i>Fosfatase tipo 2A</i>	1.09	0.04	0.091
<i>PSY2</i>	YNL201C	<i>Subunidade regulatória da fosfatase tipo 2A Pph3p</i>	1.09	0.13	0.098
<i>REG2</i>	YBR050C	<i>Subunidade regulatória da fosfatase tipo 1 Glc7p</i>	1.09	0.05	0.086
<i>PTP2</i>	YOR208W	<i>Tirosina fosfatase</i>	1.12	0.22	0.057
<i>OCA1</i>	YNL099C	<i>Tirosina fosfatase</i>	1.12	0.25	0.058
<i>PAM1</i>	YDR251W	<i>Proteína de função desconhecida</i>	1.13	0.15	0.028
<i>PTC7</i>	YHR076W	<i>Fosfatase do tipo 2C</i>	1.14	0.22	0.028
<i>PPS1</i>	YBR276C	<i>Fosfatase com atividade para resíduos ser, thr e tyr</i>	1.15	0.10	0.017
<i>SAP185</i>	YJL098W	<i>Subunidade regulatória da fosfatase Sit4p</i>	1.16	0.18	0.015
<i>PPZ2</i>	YDR436W	<i>Fosfatase tipo 1</i>	1.18	0.12	0.007
<i>MSG5</i>	YNL053W	<i>Fosfatase dual</i>	1.18	0.21	0.009
<i>PTC4</i>	YBR125C	<i>Fosfatase do tipo 2C</i>	1.20	0.19	0.004
<i>SPO7</i>	YAL009W	<i>Subunidade regulatória do complexo Nem1p-Spo7p</i>	1.22	0.30	0.172
<i>PPH21</i>	YDL134C	<i>Fosfatase tipo 2A</i>	1.23	0.17	0.002
<i>GAC1</i>	YOR178C	<i>Subunidade regulatória da fosfatase tipo 1 Glc7p</i>	1.25	0.14	0.001
<i>BNI4</i>	YNL233W	<i>Subunidade regulatória da fosfatase tipo 1 Glc7p</i>	1.26	0.11	0.002
<i>PTC1</i>	YDL006W	<i>Fosfatase do tipo 2C</i>	1.28	0.26	<0.001
<i>TPD3</i>	YAL016W	<i>Subunidade regulatória da fosfatase tipo 2A</i>	1.52	0.39	0.127

13 de 65 mutantes mostraram níveis anormais de gotículas lipídicas. Análise estatística foi realizada contra valores da cepa selvagem (fluorescência média = 0.95, D.P. = 0.15, n = 14). Foi aplicado um filtro arbitrário de $\pm 20\%$ em relação aos valor médio de fluorescência da cepa selvagem. Fenótipos ditos *llc* (do inglês low lipid content) e *hlc* (do inglês high lipid content) foram marcados como vermelho e verde, respectivamente. Descrições de genes estão de acordo com o banco de dados de *S. cerevisiae* (www.yeastgenome.org).

APÊNDICE III

ANÁLISE ONTOLÓGICA POR FUNÇÃO MOLECULAR			
FUNÇÃO MOLECULAR	% NA AMOSTRA	% NO GENOMA	p
<i>PROTEÍNA-KINASE</i>	13,4	2	<0,001
<i>TRANSDUÇÃO DE SINAL</i>	2,5	0,7	0,002
<i>REGULADOR DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA</i>	9,7	3,3	<0,001
TRANSFERASE	30	11,4	<0,001
ATIVIDADE MOTORA	0,7	0,3	0,123
LIGAÇÃO A PROTEÍNA	15,5	9,7	<0,001
ISOMERASE	1,4	0,9	0,136
HIDROLASE	18,4	13,1	0,003
NUCLEOTIDILTRANSFERASE	2,2	1,7	0,143
REGULADOR DE TRANSCRIÇÃO	6,1	5	0,069
LIGAÇÃO A LIPÍDIOS	1,4	1,2	0,186
LIASE	1,4	1,3	0,199
<i>PROTEÍNA-FOSFATASE</i>	0,7	0,8	0,277
OUTROS	1,4		
NÃO ANOTADOS	0,4		

277 genes/proteínas que criam redes de interações interligando todos os hits do screening foram submetidos a análise ontológica por função molecular (www.yeastgenome.org). As frequências das categorias na amostra e no genoma da levedura *S. cerevisiae*, bem como a relação entre estas são mostradas. Em vermelho funções moleculares de especial interesse neste trabalho.

APÊNDICE IV

ANÁLISE ONTOLÓGICA POR PROCESSO BIOLÓGICO			
PROCESSO BIOLÓGICO	% NA AMOSTRA	% NO GENOMA	p
MODIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	27,8	8,7	<0,001
TRANSPORTE	24,9	16,3	<0,001
METABOLISMO DE RNA	22,7	18,6	0,012
CICLO CELULAR	22,4	8,3	<0,001
RESPOSTA A ESTRESSE	18,4	9,2	<0,001
TRANSCRIÇÃO	17,7	9,6	<0,001
METABOLISMO DE CARBOIDRATO	12,3	4,3	<0,001
ORGANIZAÇÃO DO CROMOSSOMO	12,3	6,2	<0,001
SINALIZAÇÃO	11,9	3,7	<0,001
TRANSPORTE POR VESÍCULAS	10,5	5,6	<0,001
METABOLISMO DE LIPÍDIOS	10,1	3,4	<0,001
ORGANIZAÇÃO DO CITOESQUELETO	9,7	3,5	<0,001
RESPOSTA A ESTÍMULO QUÍMICO	9,7	5	<0,001
METABOLISMO DE DNA	9,4	6,3	0,010
ORGANIZAÇÃO DA MEMBRANA CELULAR	8,3	4,4	0,001
BIOGÊNESE DE COMPLEXOS ENZIMÁTICOS	6,9	3,6	0,003
ORGANIZAÇÃO DE PAREDE CELULAR	6,1	2	<0,001
CITOCINESE	5,8	1,7	<0,001
MEIOSE	5,8	2,5	0,001
CONJUGAÇÃO	5,1	1,8	<0,001
SEGREGAÇÃO DE CROMOSSOMOS	4,7	2,3	0,006
TRADUÇÃO	4,7	11	<0,001
ENOVELAMENTO DE PROTEÍNA	4,3	1,4	<0,001
BROTAMENTO CELULAR	4,3	1,4	<0,001
METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS E DERIVADOS	4,3	4	0,115
ESPORULAÇÃO	4	2	0,012
HOMEOSTASE CELULAR	4	2,2	0,023
GERAÇÃO DE METABÓLITOS E ENERGIA	4	3	0,079
MORFOGÊNESE DE COMPONENTES CELULARES	2,9	0,8	0,002
ORGANIZAÇÃO DE VACÚOLOS	1,8	1	0,082
ORGANIZAÇÃO DO NÚCLEO	1,8	1	0,078
ORGANIZAÇÃO DE PEROXISSOMOS	1,8	1	0,075
ORGANIZAÇÃO DE VESÍCULAS	1,8	1,2	0,122
OUTROS	2,2		
NÃO ANOTADOS	0,4		

277 genes/proteínas que criam redes de interações interligando todos os hits do screening foram submetidos a análise ontológica por processo biológico (www.yeastgenome.org). As frequências das categorias na amostra e no genoma da levedura *S. cerevisiae*, bem como a relação entre estas são mostradas. Em vermelho processos biológicos de especial interesse neste trabalho.

APÊNDICE V

NOME	SISTEMÁTICO	NOME	SISTEMÁTICO
<i>PROTEÍNA-QUINASE (12)</i>		<i>OUTROS MET. LIPÍDICO (25)</i>	
<i>YCK1</i>	YHR135C	<i>PER1</i>	YCR044C
<i>PTK2</i>	YJR059W	<i>GUP1</i>	YGL084C
<i>KSS1</i>	YGR040W	<i>FEN1</i>	YCR034W
<i>SKM1</i>	YOL113W	<i>LCB1</i>	YMR296C
<i>SNF1</i>	YDR477W	<i>TSC3</i>	YBR058C-A
<i>FUS3</i>	YBL016W	<i>LAS21</i>	YJL062W
<i>STE20</i>	YHL007C	<i>OPI3</i>	YJR073C
<i>CLA4</i>	YNL298W	<i>SEC14</i>	YMR079W
<i>PHO80</i>	YOL001W	<i>APQ12</i>	YIL040W
<i>HAL5</i>	YJL165C	<i>OLE1</i>	YGL055W
<i>HRK1</i>	YOR267C	<i>DGK1</i>	YOR311C
<i>PCL1</i>	YNL289W	<i>GPI16</i>	YHR188C
		<i>FIG4</i>	YNL325C
		<i>FAT1</i>	YBR041W
		<i>ACC1</i>	YNR016C
		<i>PSD1</i>	YNL169C
		<i>TEP1</i>	YNL128W
		<i>IDP3</i>	YNL009W
		<i>ARV1</i>	YLR242C
		<i>CHO2</i>	YGR157W
		<i>CHO1</i>	YER026C
		<i>SAC1</i>	YKL212W
		<i>BRR6</i>	YGL247W
		<i>ISC1</i>	YER019W
		<i>BST1</i>	YFL025C
		<i>OUTRAS PTN-FOSFATASES (4)</i>	
		<i>BUD14</i>	YAR014C
		<i>RRD1</i>	YIL153W
		<i>SDS22</i>	YKL193C
		<i>DCR2</i>	YLR361C
<i>TRANSCRIÇÃO (12)</i>			
<i>RPO41</i>	YFL036W		
<i>TAF2</i>	YCR042C		
<i>GCN5</i>	YGR252W		
<i>PHO23</i>	YNL097C		
<i>INO2</i>	YDR123C		
<i>SWI3</i>	YJL176C		
<i>RTG3</i>	YBL103C		
<i>RPC40</i>	YPR110C		
<i>RGR1</i>	YLR071C		
<i>SIN3</i>	YOL004W		
<i>GAS1</i>	YMR307W		
<i>YCS4</i>	YLR272C		
<i>TRADUÇÃO (5)</i>			
<i>TEF4</i>	YKL081W		
<i>YEF3</i>	YLR249W		
<i>TEF2</i>	YBR118W		
<i>SSB1</i>	YDL229W		
<i>DED1</i>	YOR204W		

58 genes/proteínas que criam redes de interações necessariamente ligando um gene/proteína do grupo de proteína-fosfatases a um gene/proteína do grupo metabolismo lipídico (ver FIGURA 25).

ANEXO I

A New Fluorescence-Based Method Identifies Protein Phosphatases Regulating Lipid Droplet Metabolism

Bruno L. Bozaquel-Morais¹, Juliana B. Madeira¹, Clarissa M. Maya-Monteiro², Claudio A. Masuda¹, Mónica Montero-Lomeli^{1*}

¹Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, ²Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Manguinhos, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

In virtually every cell, neutral lipids are stored in cytoplasmic structures called lipid droplets (LDs) and also referred to as lipid bodies or lipid particles. We developed a rapid high-throughput assay based on the recovery of quenched BODIPY-fluorescence that allows to quantify lipid droplets. The method was validated by monitoring lipid droplet turnover during growth of a yeast culture and by screening a group of strains deleted in genes known to be involved in lipid metabolism. In both tests, the fluorimetric assay showed high sensitivity and good agreement with previously reported data using microscopy. We used this method for high-throughput identification of protein phosphatases involved in lipid droplet metabolism. From 65 yeast knockout strains encoding protein phosphatases and its regulatory subunits, 13 strains revealed to have abnormal levels of lipid droplets, 10 of them having high lipid droplet content. Strains deleted for type I protein phosphatases and related regulators (*ppz2*, *gac1*, *bni4*), type 2A phosphatase and its related regulator (*pph21* and *sap185*), type 2C protein phosphatases (*ptc1*, *ptc4*, *ptc7*) and dual phosphatases (*ppts1*, *msg5*) were catalogued as high-lipid droplet content strains. Only *reg1*, a targeting subunit of the type 1 phosphatase Glc7p, and members of the nutrient-sensitive TOR pathway (*sit4* and the regulatory subunit *sap190*) were catalogued as low-lipid droplet content strains, which were studied further. We show that Snf1, the homologue of the mammalian AMP-activated kinase, is constitutively phosphorylated (hyperactive) in *sit4* and *sap190* strains leading to a reduction of acetyl-CoA carboxylase activity. In conclusion, our fast and highly sensitive method permitted us to catalogue protein phosphatases involved in the regulation of LD metabolism and present evidence indicating that the TOR pathway and the SNF1/AMPK pathway are connected through the Sit4p-Sap190p pair in the control of lipid droplet biogenesis.

Citation: Bozaquel-Morais BL, Madeira JB, Maya-Monteiro CM, Masuda CA, Montero-Lomeli M (2010) A New Fluorescence-Based Method Identifies Protein Phosphatases Regulating Lipid Droplet Metabolism. PLoS ONE 5(10): e13692. doi:10.1371/journal.pone.0013692

Editor: Robert Alan Arkowitz, CNRS UMR6543, Université de Nice, Sophia Antipolis, France

Received: June 21, 2010; **Accepted:** October 6, 2010; **Published:** October 28, 2010

Copyright: © 2010 Bozaquel-Morais et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was supported by Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq, <http://www.cnpq.br>) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, <http://www.faperj.br>) awards to MML and CAM; a Fundação Universitária José Bonifácio/UFRJ (<http://www.ufrj.br/>) award to CAM; a PEW Charitable Trust (<http://www.pewtrusts.org/>) award to CAM. JM and BBM were the recipients of an undergraduate fellowship and a doctoral fellowship, respectively, from CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: montero@bioqmed.ufrj.br

Introduction

In virtually every cell, neutral lipids are stored in cytoplasmic structures called lipid droplets (LDs) (rev. [1]). In the budding yeast *S. cerevisiae*, these structures contain a neutral lipid core composed of triacylglycerols (TAGs) and sterol esters (SEs) in a 1:1 ratio [2]. This core is delimited by a phospholipid monolayer associated with a diversity of proteins, which have structural functions and also show enzymatic activity [3,4]. LDs are thought to originate in the endoplasmic reticulum [5,6]. It is thought that as TAG and SE are synthesized, they accumulate between the internal and external endoplasmic reticulum membrane leaflets until LDs bud from the endoplasmic reticulum [7]. This hypothesis is reinforced by the fact that the enzymes that contribute to the esterification of fatty acids (FAs) and sterols (STEs) e.g., diacylglycerol acyltransferases Dga1p [8] and Lro1p [9], and acyl-CoA:sterol acyltransferases, Are1p and Are2p are localized to the endoplasmic reticulum [10]. Among these enzymes, only Dga1p is found in LDs [11]. Regarding the utilization of stored lipids, five enzymes

responsible for the mobilization of stored lipids are localized to the LD. Three of these enzymes are TAG lipases – Tgl3p, Tgl4p and Tgl5p [12,13] – and two are SE hydrolases – Yeh1p and Tgl1p [14]. Remarkably, the major enzyme contributing to SE hydrolase activity (Yeh2p) is localized at the plasma membrane [15]. This raises the question of whether the LD is more than a mere neutral lipid deposit. In fact, equilibrium between mobilization and LD synthesis seems to be important in various aspects of metabolism, such as cell cycle progression, that requires lipolysis [16], membrane trafficking and “lipid buffering” to regulate levels of free FA [17]. Once synthesized, free FAs and free STEs would represent a lipotoxic threat [18] if not converted by esterification into more biologically inert lipids, such as TAG and SEs, and then stored in LDs. In yeast, deletion of the acyltransferases that esterify fatty acids into TAGs and SEs lead to high sensitivity to unsaturated fatty acids [19]. In mammals, LDs control the synthesis and secretion of inflammatory mediators [20] and are implicated in virus propagation [21]. Different stimuli and signaling pathways are involved in the biogenesis of LDs; for

example, in macrophages, leptin-induced LD formation is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) and the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways [22].

In yeast, LDs are quite dynamic organelles. It was observed that they are consumed as a response to a proliferative stimulus, such as the addition of rich medium to stationary cells. During the lag phase of growth [23], when nutrients are abundant, lipid mobilization provides construction blocks for the synthesis of more complex lipids such as phospholipids. When cells enter the exponential phase of growth, LDs are re-synthesized [23]. Nevertheless, little is known about the regulators and pathways driving these dynamics. It is known that Snf1, a homolog to mammalian AMP-activated kinase (AMPK), is a negative regulator of fatty acid synthesis and, once phosphorylated, mediates acetyl-CoA carboxylase phosphorylation and subsequent inhibition [24,25]. In order to determine the role of protein phosphorylation in the regulation of LD dynamics, we screened yeast mutant strains in which protein phosphatases (including catalytic and regulatory subunits) had been knocked out (no phosphatase has been reported to regulate lipid droplet metabolism). Since the techniques used in the study of lipids are laborious and require time-consuming microscopic analysis, our group developed a new fluorimetric method suitable for high-throughput experiments. Nile red is an excellent fluorescent probe for detection of intracellular lipid droplets by fluorescence microscopy and flow cytometry [26–28]. BODIPY® (4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indacene) has also been used in LD microscopic studies, and has previously been used for a screening of a yeast deletion mutant collection for LD abnormalities [29]. Although both molecules preferentially stain LDs, the latter seems to be more specific [26]. Based on BODIPY fluorescence, we were able to rapidly evaluate LD content without lipid extraction or microscopy analysis. Our results showed that this method is suitable for following LD dynamics during yeast culture growth and can be employed to screen a large number of mutants.

Using our new approach, we were able to identify 13 (out of 65) phosphatase knockout strains that presented abnormal LD levels. Among these, we further studied Sit4, a Ser/Thr protein phosphatase, as a positive regulator of LD metabolism. We propose that Sit4p, in association with its regulatory subunit Sap190p, regulates lipid metabolism by controlling the phosphorylation status of Snf1 kinase. In fact, the *snf1*-null strain showed increased LD levels, confirming unpublished data from Kohlwein and coworkers [30], while *sit4*- or *sap190*-null strains exhibited the opposite phenotype, which is consistent with the hyperphosphorylation of Snf1p observed in these strains.

Materials and Methods

Reagents

BODIPY® 493/503 (referred to here as BODIPY) was purchased from Invitrogen, prepared as a 10 mM stock solution in DMSO and kept at -70°C . Sorafenib A was a gift from Rolf Müller (Helmoltz-Zentrum für Infektionsforschung) and kept as a 0.1 mg/ml stock solution in 10% methanol. All other reagents were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Strains

Saccharomyces cerevisiae strain BY4741 (MAT α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0*) and BY4741- MAT α gene deletion library (Open Biosystems). BY4742 (MAT α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0*), *dga1bro1* (MAT α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 dga1::KanMX bro1::KanMX*) and *are1are2* (MAT α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0*) were kindly provided by Sepp D. Kohlwein (University of Graz, Austria).

are1::KanMX are2::KanMX) were kindly provided by Sepp D. Kohlwein (University of Graz, Austria).

Yeast growth and cell fixation

Saccharomyces cerevisiae strains were grown in YPD liquid-rich medium (1% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose) at 30°C . For determination of LD content, aliquots were withdrawn during growth and cells were immediately fixed by adding 1/9 volume of formaldehyde (final concentration 3.7% v/v). After incubation for 15 min at 25°C , cells were collected by centrifugation (3000 rpm, 5 min) and washed once with distilled water. Cells were resuspended in water and adjusted to 5 O.D.₆₀₀ nm/ml and kept at 4°C until use. For use in high-throughput screening selected strains from the BY4741- MAT α gene deletion library (Open Biosystems) were cultured overnight in YPD medium in 96-well plates. Afterwards they were transferred to fresh YPD medium with the aid of a 96-Pin Replicator and grown at 30°C with shaking. Growth was monitored during 48 hours to ensure that all deleted strains, even those that have a slow-growth phenotype, had attained the stationary phase. The OD₆₀₀ varied between 2.8–6.3. The mean growth was OD₆₀₀ = 4.2 ± 0.6 . Each sample was then fixed by the addition of 22 μl of formaldehyde, incubated for 15 min at 25°C and washed with distilled water. Fixed cells were harvested and resuspended in 200 μl of distilled water.

Liquid fluorescence recovery assay

LD content was determined by recovering the fluorescence of quenched BODIPY following the addition of fixed cells (Figure 1). For this purpose, 5 μl of a formaldehyde-fixed cell suspension was added to 200 μl of quenched reading buffer containing 5 μM BODIPY and 500 mM KI, all contained in a 96-well black-wall/clear-bottom plate (Costar). The settings for fluorescence were excitation 480 nm, emission 510 nm, cutoff filter at 495 nm, PMT automatic. Concomitant to each fluorescence reading, the quantity of cells was determined by measuring the absorbance at 600 nm. Each sample was read four times by adding subsequent 5- μl aliquots of a formaldehyde-fixed cell suspension to the same well. Reading blanks were acquired by incubating the reading buffer for 5 min at 30°C before the addition of cells. Data quality

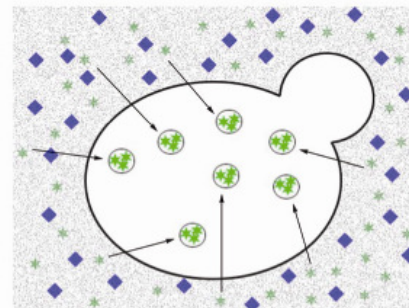


Figure 1. A schematic representation of the fluorescence recovery assay. Based on the high specificity of the fluorescent probe BODIPY 493/503 for lipid droplets, we designed a rapid fluorimetric method for the evaluation of lipid droplets inside yeast cells. With this method, BODIPY's fluorescence is quenched in solution and, when cells are added, fluorescence is recovered due to passive BODIPY dislocation from the medium to lipid droplets, from which the quencher is excluded.
doi:10.1371/journal.pone.0013692.g001

was analyzed by evaluating the linearity of measurements compared to cell number. From this curve, the relative fluorescence per number of cells was determined and denoted the lipid droplet index (LD index). If R-square <0.9, data were discarded (Figure S1 and Figure S2).

Statistical analysis of high-throughput experiments

In order to classify strains as high lipid droplet content (*hlc*) or low lipid droplet content (*llc*) with respect to wild-type, LD indexes were compared as follows. For each independent experiment, the LD index of each individual strain was normalized to the mean LD index of all samples contained in the same plate. Then, the mean LD index from four independent experiments was compared to the mean LD index of the wild-type (WT) strain ($n = 14$). The F-test was performed to determine whether the variability in the data collected for each deletion strain was similar to that observed for the wild-type strain; a homoscedastic or heteroscedastic t-test was employed accordingly. Strains with values statistically different ($p < 0.05$) were catalogued as *hlc* or *llc* strains when the normalized LD index was at least 20% higher or lower than that of the wild-type strain, respectively.

Quantification of lipid droplets by fluorescence microscopy

Aliquots of 5 μ l of cellular suspension (10 OD 600 nm) and 5 μ l of 10 μ M BODIPY were mounted onto a polylysine-treated glass slide. Microscopy was performed on Axio Observer.Z1 (Zeiss) or Olympus IX 81 using a 100x oil immersion objective. Images captured were analyzed using ImageJ software and total fluorescence was determined with the aid of the nucleus counter and cell counter function of the Wright Cell Imaging Facility (WCIF) plug-in collection. LDs were quantified in at least 50 cells.

Protein homogenate preparation and western blot

Total protein homogenates were prepared using the rapid procedure described by Yaffe and Schatz [31] with minor modifications. Briefly, 0.25 M NaOH and 1% β -mercaptoethanol (final concentration) were added to culture samples, which were then incubated at room temperature for 10 min, followed by the addition of trichloroacetic acid to a final concentration of 6%. Protein was collected by centrifugation and the pellets were stored at -80°C until use. For western blot analysis, pellets were resuspended directly in electrophoresis Laemmli sample buffer to provide a 10-OD suspension. Aliquots of 10 μ l of these extracts, containing 0.1-OD cells, were separated in 7.5% SDS-acrylamide gel using the Mini-Protean II (BioRad) and electrotransferred to Immobilon-P for 30 min at 18 V in 25 mM Tris, 192 mM glycine and 10% methanol, using a trans-blot semi-dry cell (BioRad). Membranes were treated with anti-phospho-AMPK α Thr172 (Cell Signaling) or anti-Snf1p (Santa Cruz) antibodies. Blots were detected using the chemiluminescence ECL Plus kit (GE Healthcare).

Measurement of triacylglycerol

Cultures were grown in YPD medium, harvested by centrifugation at 3000 rpm for 5 minutes at room temperature and washed with distilled water. An aliquot of 15 OD cells was resuspended in 300 μ l of extraction buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3% Triton X-100, pH 7.5) and lysed with glass beads vortexing for 5 cycles of 30 seconds at 4°C . Lysed cells were separated and the glass beads were washed with 300 μ l of extraction buffer. The total lysate was centrifuged at 3,000 rpm for ten minutes.

Neutral lipids were extracted from 200 μ l of the supernatant as described by Bligh & Dyer [32]. Briefly cells were incubated with shaking for 5 minutes after successive addition of 750 μ l chloroform/methanol (1:2), 250 μ l chloroform and 250 μ l distilled water. Tubes were centrifuged at 1,000 rpm for 5 minutes and the organic phase was dried under N_2 vapor at room temperature. Neutral lipids were resuspended in 150 μ l of extraction buffer. Triglycerides were measured with a clinical kit (Doles, Brazil) as indicated by the manufacturer. This kit is based on hydrolysis of triacylglycerol with lipase and further determination of glycerol.

Soraphen A susceptibility tests

Drug susceptibilities were measured by both broth microdilution and spot assays. MICs for the strains were determined using the broth microdilution method. Spot assays were carried out as in [33]. Briefly, yeast strains were grown in YPD to stationary phase and inoculated at serial dilutions of 10^7 , 10^6 and 10^5 cells/ml onto YPD plus 2% agar with increasing concentrations of soraphen A and then incubated for two days at 30°C , as previously described [34]. For microdilution tests, cells from stationary culture were diluted to 10^5 cells/ml in fresh YPD with increasing concentrations of soraphen A in a total volume of 200 μ l and then incubated in 96-well microtiter plates at 30°C . Growth was recorded after 24 h by measuring absorbance at 600 nm. The IC_{50} was defined as the drug concentration that inhibited growth by 50% compared to growth of the drug-free controls.

Results

Liquid fluorescence recovery assay (LFR assay)

LDs are often visualized by microscopy after staining with Nile red, osmium or BODIPY [35–37]. BODIPY has a lipophilic nature and exhibits high specificity for lipid droplets [26]; these qualities render the compound a good candidate to use as a probe for LDs in a fluorescent liquid high-throughput experiment. Based on fluorescence-quenched assays [38], we selected a hydrophilic quencher that would permit BODIPY to fluoresce only when localized inside LDs and not when present in solution (Figure 1). Three classical fluorescence quenchers (KI, acrylamide and tryptophan) were titrated against a 5 μ M BODIPY solution. The emission spectra (485 nm excitation) showed that only KI quenched the fluorescence efficiently (Figure 2A–C). From Stern-Volmer plots, where the quenching efficiency is related to the total quencher concentration [39] it can be observed that quenching increased linearly with increasing concentrations of KI and tryptophane (Figure 2D,E) but not acrylamide (Figure 2F). From these plots, a Stern-Volmer constant of 44 and 14.1 was calculated for KI and acrylamide, respectively. KI was selected as the quencher because a higher F_0/F ratio was reached with this compound as compared to tryptophan in the conditions tested.

When fixed-formaldehyde cells were added to a BODIPY-KI-quenched solution, fluorescence was recovered (Figure 3A). The best linearity between the number of cells and recovered fluorescence was obtained using KI in the quenching medium at a concentration ranging from 0.25 M to 1.0 M. For subsequent experiments, the reading solution contained 500 mM KI and 5 μ M BODIPY. To discard artifacts, we verified by microscopy that KI did not quench the fluorescence of LDs stained with BODIPY. The fluorescence area/cell and the number of LDs did not change significantly when 500 mM KI was added, suggesting that iodide is excluded from LDs (Figure 3B and C). This phenomenon allows researchers to measure the levels of lipid

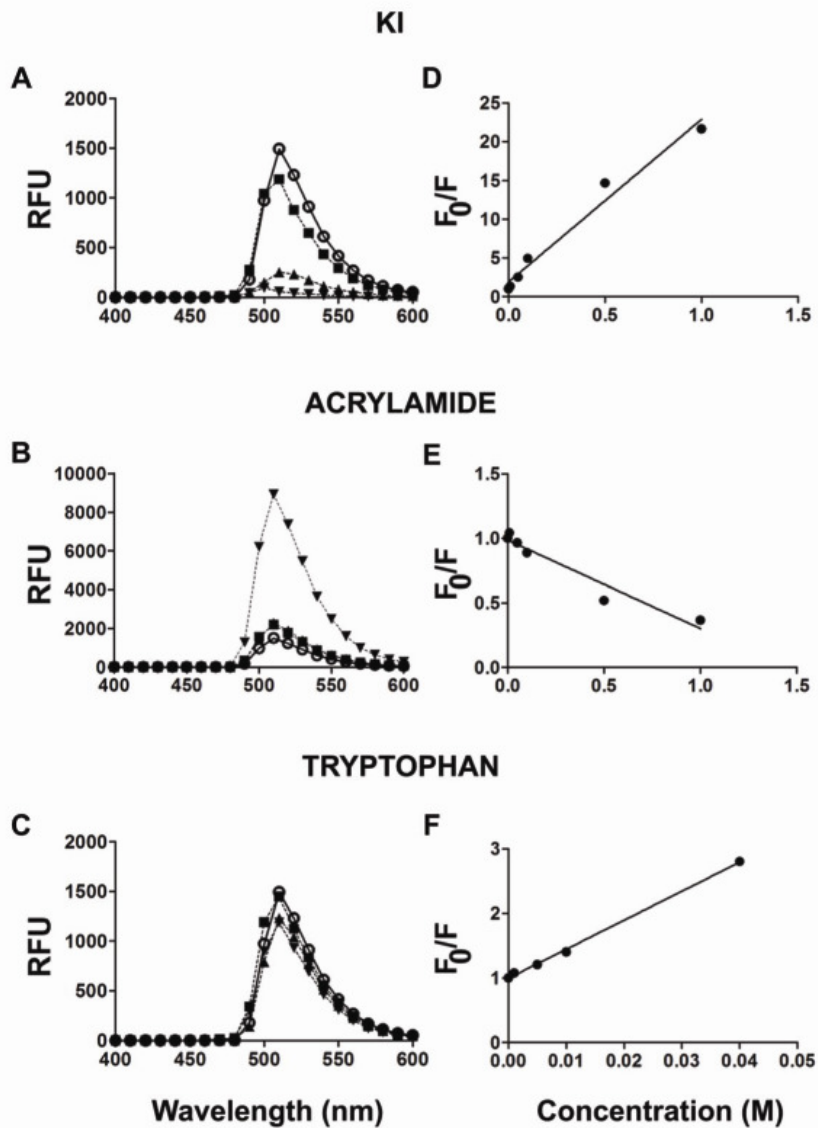


Figure 2. Quenchers of BODIPY fluorescence. *A and B*, Emission spectra (ex 485 nm) of a 5 μ M aqueous solution of BODIPY in the presence of KI (A), acrylamide (B) and tryptophane (C). The concentrations of KI and acrylamide were: none (\circ), 0.01 M (\blacksquare), 0.1 M (\blacktriangle) and 1 M (\blacktriangledown). Due to its reduced solubility in the conditions tested, tryptophan was used at concentrations of 0 (\circ), 0.005 M (\blacksquare), 0.01 M (\blacktriangle) and 0.02 M (\blacktriangledown). RFU = relative fluorescence unit. *D-F*, Stern-Volmer plots (indicate fluorescence quenching (F_0/F) as a function of quencher concentration [39]) for BODIPY with increasing concentrations of KI, tryptophan and acrylamide, respectively. F_0 (fluorescence in the absence of quencher) and F (fluorescence in the presence of quencher). doi:10.1371/journal.pone.0013692.g002

droplets within the cells in an easy and inexpensive manner (Figure 1). Some fluorophores exhibit a red-shift of the fluorescence spectra when in a non-polar environment, but the

absorbance and emission spectra of BODIPY were unaltered, showing maximum absorbance at 485 nm and maximum emission at 510 nm with excitation at 485 nm (Figure S3).

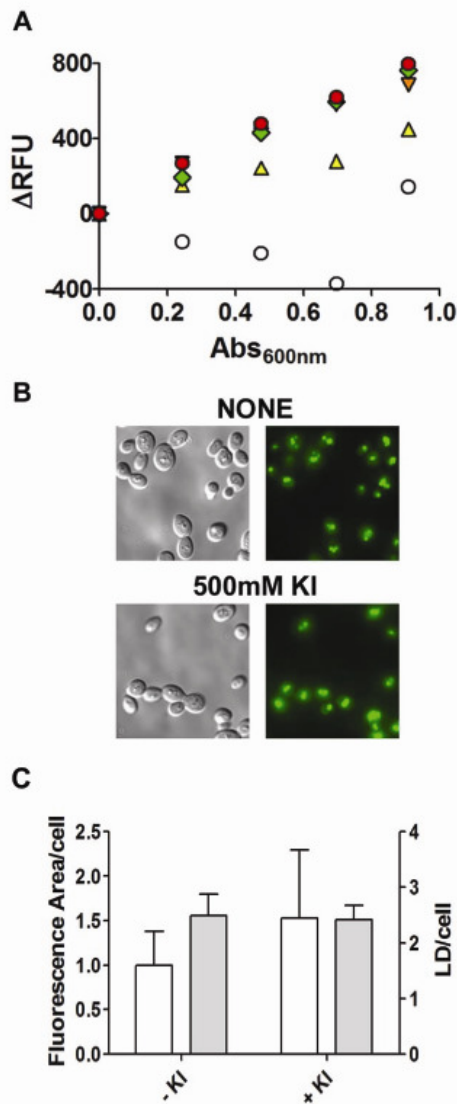


Figure 3. The BODIPY fluorescence signal quenched by iodide is recovered by the addition of cells to the medium. A. Increasing amounts of formaldehyde-fixed cells were added (subsequent 5 μ l additions) to a 96-well plate containing 200 μ l of 5 μ M BODIPY in the presence of none (\circ), 0.1 M (\blacktriangle , yellow), 0.25 M (\blacktriangledown , orange), 0.50 M (\blacklozenge , green) or 1 M (\bullet , red) KI. Fluorescence intensity (ex/em = 485/510 nm) and absorbance (600 nm) were recorded. A representative experiment is shown. B. Cells grown in YPD to stationary phase were formaldehyde-fixed, washed and resuspended to 10 DO 600 nm/ml. An aliquot of 5 μ l of cells was mixed with 5 μ l BODIPY solution (10 μ M) in the absence (upper panel) or presence of 500 mM KI (lower panel). Stained cells were analyzed by fluorescence microscopy (100x magnification). C. Microscopy images were analyzed. The total fluorescence area/cell was

determined and expressed in pixels/cell (white bars). LDs per cell were quantified using the same images (gray bars). Data are for at least 50 individual cells. No statistical difference was found between data collected from images stained with 5 μ M BODIPY with or without 500 mM KI.

doi:10.1371/journal.pone.0013692.g003

Sensitivity of the LFR assay

To assess whether our method was able to detect small fluctuations in LD levels, we quantified this parameter during yeast growth as LDs are actively metabolized during growth [23,40] (Figure 4A, B). Results obtained with the LFR assay (Figure 4B) were similar to those obtained by quantifying the TAG content (Figure 4C) or through microscopic analysis, from which we calculated the total fluorescence area/cell. Furthermore it did not reflect the number of LDs/cell that does not vary as much as the size of LDs along the growth curve (Figure 4D, E). The results were also in agreement with previous results obtained by microscopic analysis [23] and biochemical quantification of cellular TAG [40], which indicated that yeast cells consume LDs when diluted in fresh medium. After six hours, LDs are re-synthesized reaching highest levels at stationary phase [23,40]. This result demonstrates that our assay was able to detect small physiological lipid stores fluctuations during yeast growth without the need for time-consuming image analysis.

High-throughput experiment employing the LFR assay

We employed the LFR assay to study the involvement of protein phosphatases in LD metabolism. In this high-throughput experiment, we screened 96 null strains as well as the BY4741 WT strain (14 independent WT clones). We subdivided the strains in two groups. The first was a reference group, referred to as the lipid synthesis group. This reference group included 31 null strains for genes encoding LD-associated enzymes and/or enzymes involved in the metabolism of sterols, the metabolism of triglycerides and the biosynthesis of glycerolipids (Table 1) [41]. The second group, referred to as the phosphatase group, was composed of 65 null strains with all known non-essential protein phosphatases and non-essential phosphatase regulatory subunits (Table 2), according to the annotation in the Yeast Genome Database (www.yeastgenome.org, October 2009). As LD content varies substantially during growth (see Figure 4B) and not all strains have the same growth rate, we decided to assess LD content in strains grown to stationary phase, which was attained for all strains after 48 hours of seeding. A histogram of the distribution of the lipid indexes for all strains was analyzed and an index for cataloguing strains (as containing a higher LD index (*hlc*) or a lower LD index (*llc*)) was elaborated using an arbitrary cohort of $\pm 20\%$ in relation to the LD index of WT strains (Figure 5). When the mean LD index of the lipid synthesis group was compared to that of the WT strain, no significant difference was observed (means were 0.9539 and 0.9135, respectively $p = 0.276$). The same trend was not observed for the mean LD index of the protein phosphatase group, which was significantly higher than the WT sample (1.023, $p = 0.0164$) and included an over-representation of *hlc* strains. Interestingly, this result indicates that lipid accumulation is more likely provoked by the random loss of protein phosphatase function as opposed to the random loss of function among proteins involved in lipid metabolism. After analyzing the groups as a whole, individual strains were catalogued as having higher (*hlc*) or lower LD content (*llc*) (Tables 1 and 2).

Most of the results obtained in the lipid synthesis group corroborated results previously reported in the literature. Five strains were identified as *llc* strains (*hmg2*, *dga1*, *erg4*, *erg5*, *are2*) and

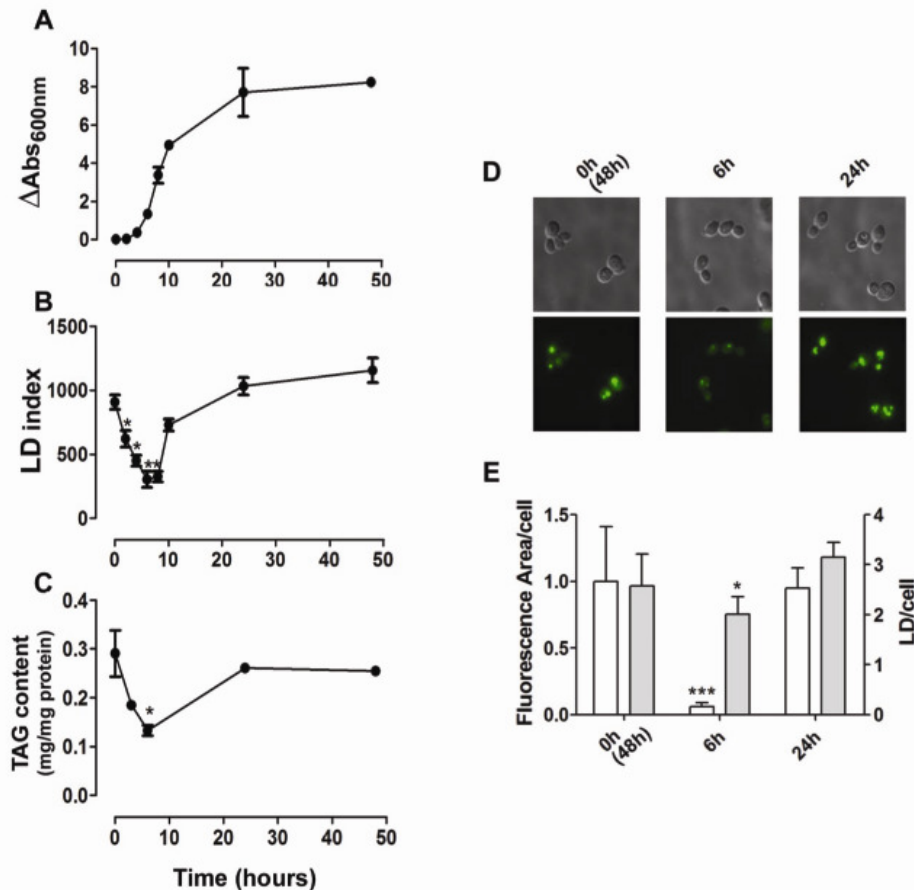


Figure 4. The liquid fluorescence recovery (LFR) assay can detect LD dynamics. A. Stationary yeast cells pre-grown for 48 hours, were inoculated into fresh YPD medium and cellular growth was recorded by measuring absorbance at 600 nm over the course of 48 hours ($n=3 \pm$ S.D.). B. Aliquots of cells were withdrawn during growth and fixed in formaldehyde. The LD index was determined (fluorescence/OD cells) using the LFR assay ($n=3 \pm$ S.D.). C. The triacylglycerol content was measured during growth. D and E. LD content was determined by fluorescence microscopy. Cells were grown for 0 (corresponding to 48 h pre-grown cells), 6 and 24 hours in YPD, incubated with BODIPY and photographed by fluorescence microscopy. The total fluorescence area/cell (white bars) were determined and expressed in pixels/cell (white bars). LDs per cell were quantified using the same images (gray bars). Data are for at least 50 individual cells. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, in comparison to WT values. doi:10.1371/journal.pone.0013692.g004

two were identified as *hlc* strains (*slc1* and *tgl3*). Interestingly, among the *lle* strains we identified were *dga1*, which encodes an enzyme responsible for the last step in TAG synthesis (acyl-CoA-dependent pathway); *hmg2*, which encodes HMG-CoA reductase, which catalyzes the rate-limiting step in ergosterol synthesis; and *are2*, which esterifies sterols. Deletion of Dga1p and Are2p would lead to diminished levels of TAG and sterol/steryl esters levels [42], respectively. In the *hlc* group, we identified *tgl3* which encodes a TAG lipase. Deletion of this enzyme increases TAG levels [12]. In the same group, we also identified *slc1*, which encodes a 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase involved in phosphatidic acid biosynthesis. The exact role of this protein in

LD formation has not been demonstrated, but its deletion led to higher TAG levels in cells [43]. Reinforcing our results, in a previously published screening, *dga1* and *tgl3* were identified as having diminished and increased number of LDs, respectively [44]. Although we classified the *erg4* and *erg5* mutants as *lle* strains, these strains have been reported to have more LDs than WT strains when analyzed by fluorescent microscopy [44]. Microscopic analysis confirmed that these strains have more LDs than WT strains but show diminished total fluorescence area (Figure S4), thus indicating a reduction in LD size. These results are interesting because they suggest that fluctuations measured by LFR assay are due to increased total fluorescence area. However the above

Table 1. Lipid synthesis null strains screened by LFR assay.

NAME	SYSTEMATIC	BIOLOGICAL PROCESS	MEAN	S.D.	P
HMG2 ⁵	YLR450W	STE synthesis	0.58	0.19	<0.001
DGA1 ^{1-*}	YOR245C	TAG synthesis	0.59	0.16	<0.001
ERG4 ^{4-*}	YGL012W	STE synthesis	0.70	0.18	0.003
ERGS ^{6-*}	YMR015C	STE synthesis	0.71	0.28	0.007
ARE2 ⁵	YNR019W	SE synthesis	0.76	0.21	0.023
LRO1	YNR008W	TAG synthesis	0.81	0.09	0.069
DPP1	YDR284C	TAG synthesis	0.81	0.19	0.095
LPP1	YDR503C	TAG synthesis	0.84	0.12	0.152
ERG2	YMR202W	STE synthesis	0.84	0.06	0.164
GPT2	YKR067W	TAG synthesis	0.85	0.06	0.178
CSG2	YBR036C	Ceramide synthesis	0.85	0.26	0.233
TGL5	YOR081C	TAG lipase	0.86	0.17	0.265
AYR1	YIL124W	TAG synthesis	0.87	0.19	0.317
LAC1	YKL008C	Ceramide synthesis	0.88	0.09	0.359
HMG1	YML075C	STE synthesis	0.88	0.15	0.380
SUR2	YDR297W	Ceramide synthesis	0.91	0.01	0.048
ARE1	YCR048W	SE synthesis	0.91	0.10	0.626
IPT1	YDR072C	Ceramide synthesis	0.93	0.09	0.782
LAG1	YHL003C	Ceramide synthesis	0.94	0.01	0.577
TGL1	YKL140W	SE hydrolase	0.99	0.03	0.189
YEH2	YLR020C	SE hydrolase	1.00	0.08	0.540
ERG24	YNL280C	STE synthesis	1.00	0.14	0.546
SCS7	YMR272C	Ceramide synthesis	1.00	0.12	0.531
ERG6	YML008C	STE synthesis	1.01	0.20	0.507
SCT1	YBL011W	TAG synthesis	1.01	0.10	0.450
SUR1	YPL057C	Ceramide synthesis	1.03	0.04	0.332
YEH1	YLL012W	SE hydrolase	1.05	0.03	0.002
TGL4	YKR089C	TAG lipase and SE hydrolase	1.09	0.14	0.095
ERG3	YLR056W	STE synthesis	1.10	0.27	0.107
SLC1 ^v	YDL052C	TAG synthesis	1.17	0.05	0.022
TGL3 ^{v-*}	YMR313C	TAG lipase	1.37	0.17	<0.001

7 out of 31 strains showed abnormal LP levels. Statistical analysis was performed against WT values (mean fluorescence = 0.95, S.D. = 0.15, n = 14). It was defined a cutoff using an arbitrary 20% difference between the mutant and WT relative fluorescence means. Phenotypes referred as *llc* (slow lipid content), and *hlc* (high lipid content) were marked in bold. Gene descriptions based in SGD (www.yeastgenome.org). *strains identified in a previously published screening for LPI[25]. doi:10.1371/journal.pone.0013692.t001

results do not show if differences assayed in the LFR assay are due to different levels of SE or TAG, or both. To test this we have compared the fluorescence lipid droplet index and fluorescence area/cell of *are1are2* and *dga1tro1* cells, lacking SE and TAG, respectively (Figure S5). The mean fluorescence area/cell was 40% lower in *are1are2* compared to WT while the LFR assay showed an 8% reduction. The *dga1tro1* presented a diffuse pattern without distinguishable LDs when stained with BODIPY using the same exposure times as WT being not valid to compare the fluorescence area/cell, however with longer exposure times it was possible to visualize a few LDs/cell. The LFR assay detected a

40% reduction in *dga1tro1* LD index. These results show that the LFR assay detects the total area/cell of lipid droplets composed of mainly TAG or SE and that it is more sensitive than fluorescence microscopy studies.

The Ser/Thr protein phosphatase Sit4p regulates Snf1 kinase phosphorylation in association with its regulatory subunit Sap190p. Among the protein phosphatase group, three strains were marked as *llc* (*sit4*, *sap190* and *reg1*). Two of these genes are related: *SIT4* encodes the catalytic subunit of a type 2A-like Ser-Thr phosphatase and *SAP190* encodes one of its regulatory subunits. *REG1* codes for a regulatory subunit of Glc7 phosphatase, an essential type-1 protein phosphatase. On the other hand, 10 strains were marked as *hlc*. Three of these were type 2C protein phosphatases (*ptc1*, *ptc4*, *ptc7*); three were related to type 1 protein phosphatases, a catalytic subunit (*pp2c2*) and Glc7 regulatory subunits (*gac1* and *bmi4*). Pph21p is a type 2A protein phosphatase and Sap185p is a regulatory subunit of Sit4p. Other null strains marked as *hlc* were *ppl1* and *msg5*. These results call for a new perspective on the topic at hand and indicate that an intricate regulation of protein phosphorylation is involved in the regulation of LD metabolism by protein phosphatases. Since previous screens have missed *sit4*, *sap190* and *reg1* as having less LDs we counted LDs and measured the fluorescent area/cell (Figure 6). Results show that both parameters are significantly lower compared to WT.

We further studied *llc* hits. Together with Tap42p, Sit4p is known for its participation in the TOR pathway, which senses nutrient availability and coordinates cell growth [45]. Sit4p was first identified as a type2A-related phosphatase activated by extracellular ceramide [46]. Sit4p is also regulated by four other subunits thought to act as targeting subunits: Sap4p, Sap155p, Sap185p and Sap190p. These proteins have different or overlapping roles in the regulation of the cell cycle [47] and in translation control [48]. Reg1p directs Glc7p to its targets, participating in the regulation of several processes such as glucose de-repression and glycogen synthesis [49,50]. Reg1p plays a role in energetic metabolism by interacting with Snf1 kinase, a Ser/Thr kinase homologue to mammalian AMPK responsible for maintaining energy homeostasis. Upon depletion of glucose in the medium, Snf1 is phosphorylated by upstream kinases (called Snf1-activating kinases, SAKs) and becomes active [51]. Its dephosphorylation is promoted by Glc7p phosphatase and is dependent on Reg1p, as the *reg1* strain displays hyperphosphorylated Snf1p [52]. However, this finding must be investigated further because greater Reg1p-Snf1p interaction is observed in low-glucose conditions when Snf1p is more active [53]. Snf1p kinase, in turn, phosphorylates a key enzyme in FA biosynthesis, acetyl-CoA carboxylase (Acc1), which inhibits the activity of Acc1. It has been shown that deletion of *SNF1* increases Acc1 activity as *snf1* strain is more resistant to sorafenin A which is a potent inhibitor of acetyl-CoA carboxylase – the more resistant a strain is, the greater is its level of acetyl-CoA carboxylase activity [24,25,54].

We further investigated whether diminished LD content in *sit4* strain was related to a lower rate of synthesis by following its metabolism in a growing culture (Figure 7). Results show that *sit4* strain was able to consume LDs after inoculating in fresh medium, during the lag phase of growth, after which the rate of synthesis of LDs was low compared to WT. This result points to a deficient regulation of acetyl-CoA carboxylase activity. In fact, when the phosphorylation state of Snf1p was analyzed during growth, we observed that Snf1p is constitutively phosphorylated in *sit4* strain, while it is dephosphorylated in the WT strain during the early lag phase. Furthermore, phosphorylation of Snf1p increases throughout culture growth and reaches a maximum during the late

Table 2. Phosphatase null strains screened by LFR assay.

NAME	SYSTEMATIC	DESCRIPTION	MEAN	S.D.	P
SIT4 ^Δ	YDL047W	Type 2A-related protein phosphatase	0.63	0.09	<0.001
REG1 ^Δ	YDR028C	Regulatory subunit of type 1 protein phosphatase Glc7p	0.68	0.16	0.002
SAP190 ^Δ	YKR028W	Regulatory subunit of Sit4 phosphatase	0.73	0.07	0.007
SIS2	YKR072C	Regulatory subunit of type 1 protein phosphatase Ppz1	0.86	0.07	0.223
PIG2	YIL045W	Subunit for the type-1 protein phosphatase Glc7p	0.89	0.12	0.450
LTP1	YPR073C	Protein tyrosine phosphatase	0.90	0.12	0.518
RTS1	YOR014W	Regulatory subunit of protein phosphatase 2A	0.91	0.07	0.598
YBR051W		Dubious ORF, partially overlaps REG2	0.92	0.29	0.809
PTC6	YCR079W	Type 2C protein phosphatase	0.92	0.10	0.636
GIP2	YER054C	Subunit for the type-1 protein phosphatase Glc7p	0.92	0.11	0.646
YVH1	YIR026C	Phosphotyrosine-specific protein phosphatase	0.92	0.13	0.653
CNA1	YLR433C	Subunit of calcineurin, a type 2B protein phosphatase	0.92	0.10	0.661
PTC3	YBL056W	Type 2C protein phosphatase	0.93	0.17	0.725
PTC5	YOR090C	Type 2C protein phosphatase	0.93	0.08	0.722
GLC8	YMR311C	Subunit for the type-1 protein phosphatase Glc7p	0.93	0.04	0.457
TIP41	YPR040W	Interacts physically and genetically with Tap42p, regulates Sit4	0.93	0.09	0.781
SNW14	YNL032W	Phosphotyrosine-specific protein phosphatase	0.94	0.10	0.821
CNB1	YKL190W	Subunit of calcineurin, a type 2B protein phosphatase	0.94	0.08	0.897
RTS3	YGR161C	Regulatory subunit of protein phosphatase 2A	0.95	0.10	0.930
PSR2	YLR019W	Protein phosphatase involved in the general stress response	0.95	0.04	0.992
OCA2	YNL056W	Putative protein tyrosine phosphatase	0.95	0.22	0.997
SDP1	YIL113W	MAP kinase phosphatase	0.96	0.17	0.971
YNL010W		Unknown function; similar to phosphoserine phosphatases	0.96	0.08	0.948
PTP1	YDL230W	Phosphotyrosine-specific protein phosphatase	0.96	0.09	0.932
SIP5	YMR140W	Unknown function; interacts with both the Reg1p/Glc7p	0.96	0.14	0.928
CMP2	YML057W	Subunit of calcineurin, a type 2B protein phosphatase	0.97	0.12	0.866
YGR203W		Phosphatase with sequence similarity to Cdc25p, Arr2p and Mih1p	0.97	0.14	0.814
PPH22	YDL188C	Type 2A protein phosphatase	0.99	0.14	0.636
PPT1	YGR123C	Ser/thr phosphatase with similarity to human phosphatase PP5	0.99	0.14	0.622
PPG1	YNR032W	Putative serine/threonine protein phosphatase	1.00	0.07	0.596
PTC2	YER089C	Type 2C protein phosphatase	1.01	0.15	0.522
RRD2	YPL152W	Activator of the phosphotyrosyl phosphatase activity of PP2A	1.01	0.09	0.474
MIH1	YMR036C	Protein tyrosine phosphatase	1.01	0.07	0.458
PIG1	YLR273C	Subunit for the type-1 protein phosphatase Glc7p	1.01	0.15	0.467
GIP1	YBR045C	Subunit for the type-1 protein phosphatase Glc7p	1.02	0.04	0.048
PHO13	YDL236W	Alkaline phosphatase, also has protein phosphatase activity	1.02	0.09	0.382
SAP4	YGL229C	Regulatory subunit of Sit4 phosphatase	1.03	0.16	0.376
NBP2	YDR162C	Recruitment of phosphatase Ptc1p to the Pbs2p-Hog1p complex	1.04	0.07	0.264
PTP3	YER075C	Phosphotyrosine-specific protein phosphatase	1.05	0.17	0.267
YER121W		Putative protein of unknown function	1.05	0.07	0.249
VHS3	YOR054C	Regulatory subunit of type 1 protein phosphatase Ppz1	1.05	0.15	0.255
NEM1	YHR004C	Probable catalytic subunit of Nem1p-Spo7p phosphatase	1.05	0.10	0.246
PPZ1	YML016C	Type 1 protein phosphatase	1.05	0.16	0.221
PSR1	YLL010C	Protein phosphatase involved in the general stress response	1.05	0.11	0.210
PSY4	YBL046W	Regulatory subunit of type 2A protein phosphatase Pph3	1.06	0.19	0.200
SAP155	YFR040W	Regulatory subunit of Sit4 phosphatase	1.06	0.14	0.179
PPQ1	YPL179W	Putative protein serine/threonine phosphatase	1.08	0.21	0.147
PPH3	YDR075W	Type 2A protein phosphatase	1.09	0.04	0.091
PSY2	YNL201C	Regulatory subunit of type 2A protein phosphatase Pph3	1.09	0.13	0.098
REG2	YBR050C	Regulatory subunit of type 1 protein phosphatase Glc7p	1.09	0.05	0.086

Table 2. cont.

NAME	SYSTEMATIC	DESCRIPTION	MEAN	S.D.	P
PTP2	YOR208W	Phosphotyrosine-specific protein phosphatase	1.12	0.22	0.057
OCA1	YNL099C	Putative protein tyrosine phosphatase	1.12	0.25	0.058
PAM1	YDR251W	Essential protein of unknown function	1.13	0.15	0.028
PTC7^Y	YHR076W	Type 2C protein phosphatase	1.14	0.22	0.028
PPS1^Y	YBR276C	Protein phosphatase with specificity for Ser, Thr and Tyr residues	1.15	0.10	0.017
SAP185^Y	YJL098W	Regulatory subunit of Sit4 phosphatase	1.16	0.18	0.015
PPZ2^Y	YDR436W	Type 1 protein phosphatase	1.18	0.12	0.007
MSG5^Y	YNL053W	Dual-specificity protein phosphatase	1.18	0.21	0.009
PTC4^Y	YBR125C	Type 2C protein phosphatase	1.20	0.19	0.004
SPO7	YAL009W	Regulatory subunit of Nem1p-Spo7p phosphatase	1.22	0.30	0.172
PPH21^Y	YDL134C	Type 2A protein phosphatase	1.23	0.17	0.002
GAC1^Y	YOR178C	Subunit for the type-1 protein phosphatase Glc7p	1.25	0.14	0.001
BNH4^Y	YNL233W	Subunit for the type-1 protein phosphatase Glc7p	1.26	0.11	0.002
PTC1^Y	YDL006W	Type 2C protein phosphatase	1.28	0.26	<0.001
TPD3	YAL016W	Regulatory subunit of protein phosphatase 2A	1.52	0.39	0.127

13 out of 65 strains showed abnormal LP levels. Statistical analysis was performed against WT values (mean fluorescence = 0.95, S.D. = 0.15, from 14 WT samples). It was defined a cutoff using an arbitrary 20% difference between the mutant and WT relative fluorescence means. Phenotypes referred as *llc* (low lipid content) and *hlc* (high lipid content) were marked in bold. Gene descriptions based in SGD (www.yeastgenome.org). doi:10.1371/journal.pone.0013692.t002

exponential phase, when the rate of lipid biosynthesis may have started to slow down (Figure 8). Interestingly Snf1p was also constitutively phosphorylated in *sap190* strain during all phases of culture growth. To further confirm that Snf1p is in its active state in *sit4* strain (thus inhibiting acetyl-CoA carboxylase activity), we screened the sensitivity of these null mutant strains to soraphen A (Figure 9). Results revealed that *sit4* strain is more sensitive to soraphen A. *reg1* strain has also been shown to be more sensitive to soraphen A, and it has been shown that in this strain, Snf1p is in its active state [55] and probably leads to an inhibition of acetyl-CoA carboxylase. The results observed were consistent with the classification of *sit4* and *reg1* as *llc* strains. As a control, we tested the sensitivity of the *snf1* strain. As expected, this resulted in greater resistance to soraphen A due to the activation of acetyl-CoA carboxylase activity [25,34]. Furthermore, we observed that the *snf1* strain presented an LD index that was higher than that of the wild-type (Figure 9D).

The results of testing the sensitivity of SAP proteins to soraphen A show that *sap190* strain leads to a probable inhibition of acetyl-CoA carboxylase activity, which reinforces its classification as an *llc* mutant. Interestingly, other Sap deletions led to an increase in soraphen A resistance, which is not correlated to an increase in lipid droplets. Such an effect can be explained because it is believed that Saps compete among themselves for Sit4p association and, thus, the deletion of one sap will increase the chances that Sit4 associates with the remaining Saps [47]. These results suggest that the Sit4p-Sap190p complex connects the TOR pathway to the SNF1/AMPK pathway to regulate lipid droplet metabolism (Figure 10).

Discussion

There is increasing interest in LD metabolism in the field of biological science as more evidences connect its deregulation to several pathological processes, such as the inflammatory response

[56], insulin resistance [57] and even neurodegenerative disorders [58], in addition to the known role of LD in lipid storage. However, there are still fundamental questions to be resolved regarding the signaling pathways involved in LD regulation. The methods employed in lipid studies have not facilitated great advances; such investigations still rely on time-consuming and expensive microscopic studies or on organic solvent extraction and subsequent analysis. Working with such techniques requires well-trained researchers because the steps involved can be tricky and laborious. We propose an alternative, sensitive method for the study of LD dynamics, which can be applied in high-throughput experiments to yield reliable results.

BODIPY 493/503 is a BODIPY fluorophore derivative that, due to its lipophilic nature, accumulates in LDs. It is often employed in microscopic studies of these organelles as an alternative to Nile red. In fact, Nile red acts more as a hydrophobic probe because it only fluoresces in hydrophobic environments in a manner that is proportional to the surrounding hydrophobicity; it has been shown that Nile red stains both membranes and LD [27,28]. On the other hand, BODIPY is more specific than Nile red for LDs, as revealed by flow cytometry experiments [26,29]. Furthermore, BODIPY seems to be less sensitive to environmental conditions, such as pH and polarity [59], which could be an advantage when comparing LD staining in different mutant strains. Once optimal conditions were determined, our assay was evaluated by following LD dynamics during culture growth. In this experiment (Figure 4) the size (total area/cell) and number of LDs was assayed by analyzing microscope images of cells stained with BODIPY and TAG levels were measured biochemically. Our fluorescence-based method provided results consistent with the TAG content and with the size of LDs. On the other hand, it did not correlate with the number of LDs which do not vary substantially along the growth curve, when compared to the size of LDs.

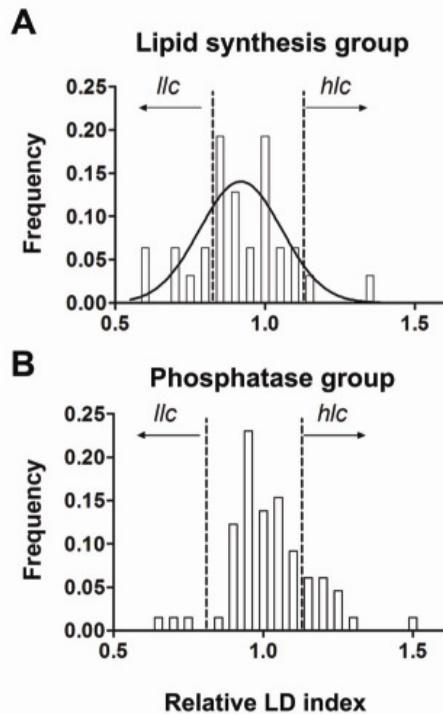


Figure 5. Statistical analysis of a high-throughput experiment employing the LFR assay. LDs were quantified by the LFR assay. The frequency distribution of the relative LD index of strains from the lipid synthesis group (A, $n=31$) and protein phosphatase group (B, $n=65$) was calculated. Data were collected from four independent experiments as described in the Materials and Methods section. The D'Agostino & Pearson normality test was employed at $P<0.05$. The lipid synthesis group was normally distributed ($p=0.281$), while the protein phosphatase group failed to pass the normality test ($p=0.016$). The arbitrary cohort ($\pm 20\%$ in relation to WT values) is indicated in the graphs by a dashed line (*l/c*, low lipid droplet content and *h/c*, high lipid droplet content). doi:10.1371/journal.pone.0013692.g005

Analysis of a reference group comprising strains in which the genes for lipid synthesis and LD dynamics have been knocked out not only validated the entire screening but also reinforced the reliability of our method. In a previous screening in which the entire deletion library was analyzed microscopically to quantify LDs [44], at least two of our hits (*aga1* and *igl3*) were identified as inducing abnormal phenotypes. However, *erg4* and *erg5* strains, which were identified as having increased LD number – phenotypes we confirmed microscopically – were identified in our screening as having lower fluorescence levels, which indicates lower lipid content. A plausible explanation is that, although they contain more LDs, these organelles are substantially smaller, which could, in turn, result in reduced BODIPY capture and thus less fluorescence. Interestingly, no relevant protein phosphatases were identified in the previously mentioned screening. In here, among 65 strains in which genes for protein phosphatases or related subunits were knocked out, 10 presented higher lipid

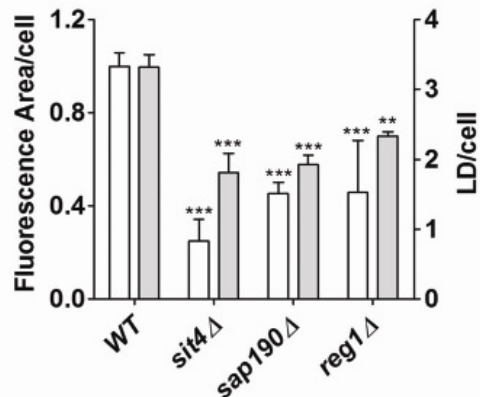


Figure 6. LDs size and content in *l/c* phosphatase mutants. The total area/cell and the number of LDs were analyzed from microscopic images of WT, *sit4*, *sap190*, *reg1* grown in YPD medium for 48 hours, as described. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, in comparison to WT values. doi:10.1371/journal.pone.0013692.g006

droplet content while only 3 (*reg1*, *sit4* and its regulatory subunit *sap190*) presented lower lipid droplet content. This result suggests that a loss of protein phosphatase function is more likely to result

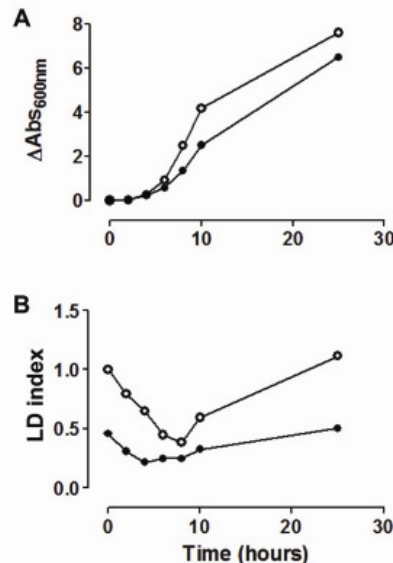


Figure 7. LD dynamics is impaired in the *sit4* strain. A. Stationary yeast cells (WT, \circ , and *sit4Δ*, \bullet) grown for 48 h in YPD were inoculated into fresh medium. Cellular growth was recorded by measuring absorbance at 600 nm over the course of 25 hours. B. Lipid droplet levels were determined by LFR assay during growth as described in Figure 4. LD index was normalized by stationary WT value. The mean of two independent experiments is shown. doi:10.1371/journal.pone.0013692.g007

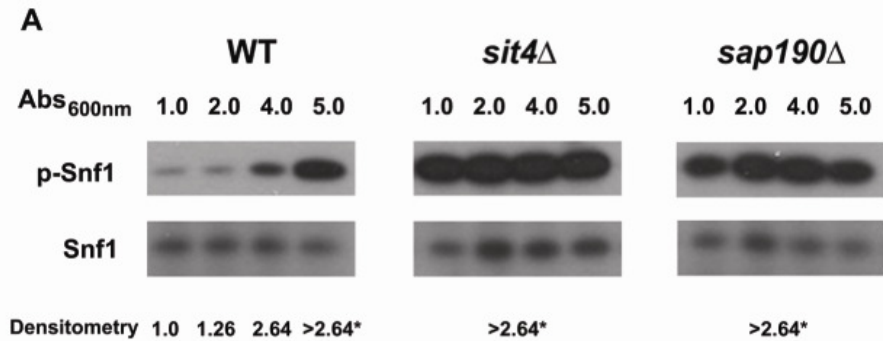


Figure 8. Snf1 kinase phosphorylation levels during growth. WT, *sit4* and *sap190* cells were grown in YPD at 30°C while shaking. Aliquots of the culture were harvested at different times during growth (OD 600 nm of 1, 2, 4 or 5), and protein was extracted using the rapid NaOH extraction method [31]. SDS-PAGE gels were loaded with 0.1 OD_{600 nm} cells per well. Snf1 phosphorylation was analyzed by western blot using anti-phospho AMPK α antibody (P-SNF1, upper panel). As a control for loading, total Snf1 was revealed with anti-SNF1 antibody (lower panel). For autoradiography the films were exposed for the minimum time necessary to detect the phosphorylation signal for WT grown to OD 1.0 which was used as reference. The numbers below the figure represent the densitometry analysis of the P-SNF1/SNF1 ratio (n=3). Signals were linear unless marked by*. doi:10.1371/journal.pone.0013692.g008

in fluctuations in LDs size as compared to the number of LDs. By analyzing the overall results our attention was drawn to the involvement of three subunits of Glc7 phosphatase. *gac1* and *bni4*

were identified as *hlc* while *reg1* as *llc*. Glc7p phosphatase interacts with different subunits each leading Glc7p to different substrates regulating several cellular processes as cell cycle, glycogen, sugar

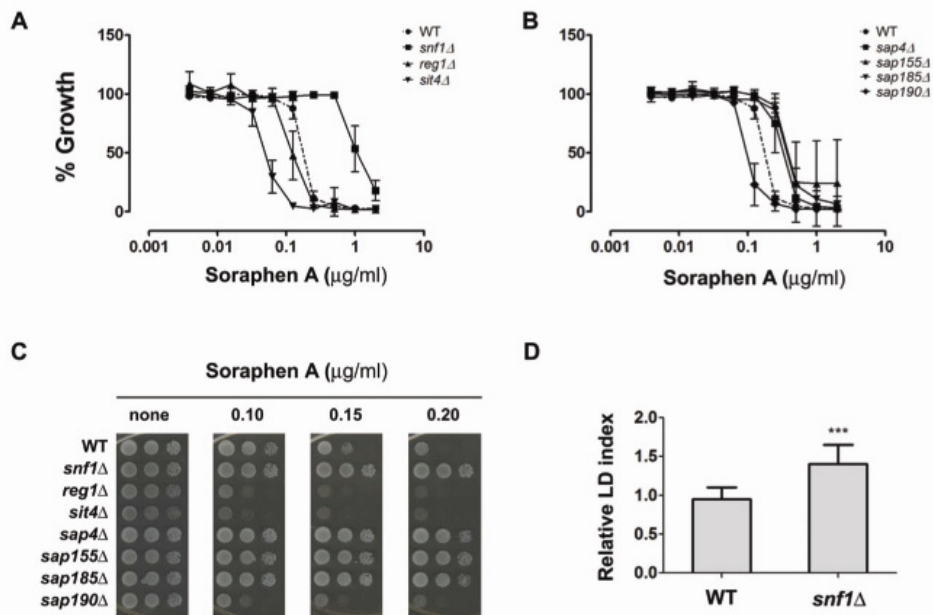


Figure 9. Soraphen A resistance profiles. Soraphen A resistance was determined by the microtiter assay and the spot assay. **A** and **B**. Serial dilutions of soraphen A were used for the indicated strains (n=3 \pm S.D.) IC₅₀ were estimated (wt = 0.19, *snf1* = 0.95, *reg1* = 0.11, *sit4* = 0.05, *sap4* = 0.36, *sap155* = 0.38, *sap185* = 0.38 and *sap190* = 0.1 μ g/ml). **C**. For the spot assay, serial dilutions (10⁷, 10⁶ and 10⁵ cells/mL, from left to right) of a cellular suspension were seeded onto plates containing YPD solid medium in the presence of increasing concentrations of soraphen A and incubated at 30°C for two days. **D**. Relative LD index of *snf1* cells from a stationary culture in YPD medium was determined by LFR assay, as described. (n=3, \pm S.D.) (***)p<0.001. doi:10.1371/journal.pone.0013692.g009

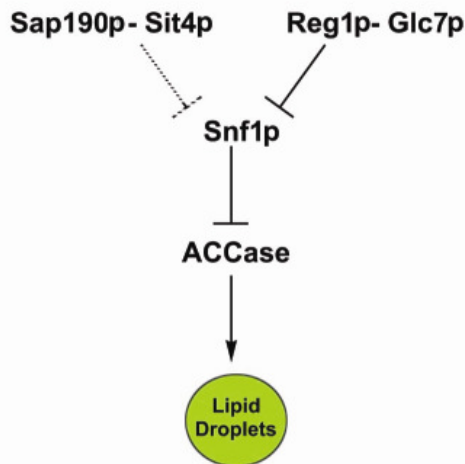


Figure 10. Sit4p orchestrates lipid metabolism in response to nutrients. Snf1 kinase, a central regulator of energetic homeostasis, when phosphorylated and active, inhibits acetyl CoA carboxylase activity impairing fatty acids synthesis diminishing LD levels. It is dephosphorylated by Reg1/Glc7 phosphatase as glucose levels in the medium increase [50]. Our results suggest that the Sap190-Sit4 pair also participates in Snf1 dephosphorylation and links the TOR pathway to the AMP/ATP-sensitive pathway, mediated by Snf1.
doi:10.1371/journal.pone.0013692.g010

and lipid metabolism [60,61]. Gac1p and Bni4p recruit Glc7p phosphatase to glycogen synthase Gsy2p [62] or the bud neck [63], respectively, and normally they may sequester some Glc7 phosphatase away from Snf1p. Their deletion might make more Glc7p available for Reg1p-Snf1p, thus increasing Snf1p dephosphorylation/inactivation, thereby increasing Acc1p activity and fatty acid synthesis. On the other hand interaction of Reg1p with Glc7p is necessary to dephosphorylate Snf1p. Its deletion leads to phosphorylation/activation of Snf1p, inhibiting the synthesis of LDs.

These three genes, *REG1*, *SIT4* and *SAP190*, have been identified in a previous screen as necessary for normal growth on oleic acid. The reason how the presence of Sap190p-Sit4p prevents oleate inhibition is not known [64]. Kohlwein et al [17] have shown that TAG synthesis plays an important role to buffer excess oleic acid, as strains lacking the acyltransferases Lro1p, Dga1p, Are1p, and Are2p are sensitive to this fatty acid. Together with our results, these observations suggest that *reg1*, *sit4* and *sap190* are necessary to induce synthesis of LDs in the presence of oleate, thus preventing its toxicity.

We further studied the role of Sit4p participation in lipid metabolism. The *sit4* strain LD dynamics showed a lower rate of LD synthesis after lag-phase, in comparison to WT (Figure 7). Although we cannot discard defects in LD synthesis or the degradation apparatus, the Sit4p deletion effect is likely due to the diminished availability of construction blocks such as FA. In fact, researchers believe that Sit4 phosphatase might dephosphorylate acetyl-CoA carboxylase, a key enzyme in fatty acid metabolism. However, experimental results have not been published [65–67]. Here, we showed that *sit4* deletion increases sensitivity to sorafenin A, an acetyl-CoA carboxylase inhibitor. The same is observed for the deletion of *sap190*, a regulatory subunit of *SIT4*. Moreover, it is

important to observe that *sap185* deletion induced a phenotype opposite to that elicited by *sap190* deletion; the *sap185* knockout strain was detected as a high lipid content strain during screening. Although SAPs compete for Sit4 binding [47] and have exhibited opposing functions [68], so far, no antagonistic relationship between Sap185p and Sap190p has been observed. More studies will be necessary to answer whether the opposing LD phenotypes resulting from these *SAP* genes deletions are related, indicating the existence of a novel antagonistic pair.

To explore a possible connection between TOR and Snf1 signaling pathways (because Snf1 takes part in nitrogen signaling and both are implicated in lifespan extension mechanisms), we investigated Snf1 phosphorylation status in the *sit4* strain. Surprisingly, the deletion of *sit4* (or its subunit *sap190*) leads to increased constitutive Snf1 phosphorylation, being more active. This finding would explain an increase in sorafenin A sensitivity due to a decrease in acetyl-CoA carboxylase activity. Although we cannot discard the hypothesis that Sit4 directly dephosphorylates acetyl-CoA carboxylase, we provide evidence that Sit4 participation in lipid metabolism occurs through the regulation of Snf1 phosphorylation status and links the TOR pathway to the AMP/ATP-sensitive pathway, which is regulated by Snf1/AMPK.

Supporting Information

Figure S1 Liquid fluorescence recovery assay (LFR assay). Schematic representation of the LFR assay, where cells are first fixed in 3.7% formaldehyde, washed and then added to BODIPY-quenched solution containing 5 μ M BODIPY plus 500 mM KI. Fluorescence is recovered and detected with a fluorimeter (ex/em = 485/510 nm).
Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013692.s001 (1.46 MB TIF)

Figure S2 High-throughput screening of a knockout collection. Individual strains are pre-grown to stationary phase at 30°C and fixed in formaldehyde (3.7%). Cells are washed and added to a 96-well black-wall/clear-bottom plate. Fluorescence (ex/em = 485/510 nm) and absorbance (600 nm) are recorded. Three more subsequent readings were performed after the addition of cells to the wells in order to determine the LD index.
Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013692.s002 (0.46 MB TIF)

Figure S3 Fluorescence properties of BODIPY are not altered in the presence of cells. An aqueous solution of BODIPY (5 μ M) was incubated in the presence of the indicated of none (O), 0.025 OD (square), 0.05 OD (Δ) and 0.1 OD (∇) of cells and the absorption spectra (upper panel) and emission (excitation at 485 nm) (lower panel) of BODIPY were recorded. Results are in agreement with information provided by the manufacturer (BODIPY Lipid Probes manual, available online at www.invitrogen.com), which states that BODIPY-derivative fluorescence parameters are insensitive to environmental conditions and not quenched by water.
Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013692.s003 (0.62 MB TIF)

Figure S4 LD content in *arg4* and *arg5* strains was determined by fluorescence microscopy. Cells were grown to stationary phase and incubated with BODIPY. The total fluorescence area/cell was determined and expressed in pixels/cell (white bars). LDs per cell were quantified using the same images (gray bars). Data provided are for at least 100 individual cells. LD index is indicated below the graph for each strain. *p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001, in comparison to WT values.
Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013692.s004 (1.59 MB TIF)

Figure S5 LD index correlates with either TAG or SE content. WT, *are1 Δ are2 Δ* and *dga1 Δ tro1 Δ* strains were grown to stationary phase and incubated with BODIPY. Images were captured for

17msec. A second capture (74msec) for *dga1Δ bro1Δ*, is also shown (last panel). At the bottom of the figure the LD index (LFR assay) ($n = 3$) and size (fluorescence area/cell LDs, microscopy images $n = 100$ cells) for each strain are shown. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, in comparison to WT values.
Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013692.s005 (2.78 MB TIF)

References

- Murphy DJ (2001) The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* 40: 325–438. S0163-7827(01)00013-3 [pii].
- Clausen MK, Christiansen K, Jensen PK, Behnke O (1974) Isolation of lipid particles from baker's yeast. *FEBS Lett* 43: 176–179. 0014-5793/74/80994-4 [pii].
- Leber R, Landl K, Zinser E, Ahorn H, Spok A, et al. (1998) Dual localization of squalene epoxidase, Erg1p, in yeast reflects a relationship between the endoplasmic reticulum and lipid particles. *Mol Biol Cell* 9: 375–386.
- Zinser E, Sperka-Gottlieb CD, Fasch EV, Kohlwein SD, Paltauf F, Daum G (1991) Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 173: 2026–2034.
- Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Barber T, Coxey RA, Takeda T, et al. (1995) Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res* 36: 1211–1226.
- Tsuchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T (2002) The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem* 277: 44507–44512. 10.1074/jbc.M207712200 [doi].M207712200 [pii].
- Murphy DJ, Vance J (1999) Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci* 24: 109–115. S0968-0004(98)01349-8 [pii].
- Oelkers P, Cromley D, Padamsee M, Billheimer JT, Sturley SL (2002) The DGA1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast. *J Biol Chem* 277: 8877–8881. 10.1074/jbc.M111646200 [doi].M111646200 [pii].
- Dahlqvist A, Stahl U, Lenman M, Banas A, Lee M, et al. (2000) Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6487–6492. 10.1073/pnas.120067297 [doi].120067297 [pii].
- Zweytick D, Leitner E, Kohlwein SD, Yu C, Rothblatt J, Daum G (2000) Contribution of Are1p and Are2p to steryl ester synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 267: 1075–1082. ejb1103 [pii].
- Soeger D, Daum G (2002) Synthesis of triacylglycerols by the acyl-coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase Dga1p in lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 184: 519–524.
- Athenstaedt K, Daum G (2003) YMR313c/TGL3 encodes a novel triacylglycerol lipase located in lipid particles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278: 23317–23323. 10.1074/jbc.M302577200 [doi].M302577200 [pii].
- Athenstaedt K, Daum G (2005) Tgl4p and Tgl5p, two triacylglycerol lipases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* are localized to lipid particles. *J Biol Chem* 280: 37301–37309. M507261200 [pii].10.1074/jbc.M507261200 [doi].
- Koffel R, Twari R, Falquet L, Schneider R (2005) The *Saccharomyces cerevisiae* YLL012/YEH1, YLR020/YEH2, and TGL1 genes encode a novel family of membrane-anchored lipases that are required for steryl ester hydrolysis. *Mol Cell Biol* 25: 1655–1668. 25/5/1655 [pii].10.1128/MCB.25.5.1655-1668.2005 [doi].
- Mullner H, Deutsch G, Leitner E, Ingolic E, Daum G (2005) YEH2/YLR020c encodes a novel steryl ester hydrolase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280: 13321–13328. M409914200 [pii].10.1074/jbc.M409914200 [doi].
- Kurat CF, Wolinski H, Petschnigg J, Kaluarachchi S, Andrews B, et al. (2009) Cdk1/Cdc28-dependent activation of the major triacylglycerol lipase Tgl4 in yeast links lipolysis to cell-cycle progression. *Mol Cell* 33: 53–63. S1097-2765(08)00887-3 [pii].10.1016/j.molcel.2008.12.019 [doi].
- Petschnigg J, Wolinski H, Kolb D, Zellnig G, Kurat CF, et al. (2009) Good fat, essential cellular requirements for triacylglycerol synthesis to maintain membrane homeostasis in yeast. *J Biol Chem* 284: 30981–30993. M109.024752 [pii].10.1074/jbc.M109.024752 [doi].
- Garbarino J, Sturley SL (2005) Homeostatic systems for sterols and other lipids. *Biochem Soc Trans* 33: 1182–1185. BST20051182 [pii].10.1042/BST20051182 [doi].
- Garbarino J, Padamsee M, Wilcox L, Oelkers PM, D'Ambrosio D, et al. (2009) Sterol and diacylglycerol acyltransferase deficiency triggers fatty acid-mediated cell death. *J Biol Chem* 284: 30994–31005. M109.050443 [pii].10.1074/jbc.M109.050443 [doi].
- Bozza PT, Viola JP (2010) Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82: 243–250. S0952-3278(10)00049-9 [pii].10.1016/j.plefa.2010.02.005 [doi].
- Sarasa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assunciao-Miranda I, Barbosa-Lima G, et al. (2009) Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog* 5: e1000632. 10.1371/journal.ppat.1000632 [doi].
- Maya-Monteiro CM, Almeida PE, D'Avila H, Martins AS, Rezende AP, et al. (2008) Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. *J Biol Chem* 283: 2203–2210. M706706200 [pii].10.1074/jbc.M706706200 [doi].
- Kurat CF, Natter K, Petschnigg J, Wolinski H, Scheuringer K, et al. (2006) Obese yeast: triglyceride lipolysis is functionally conserved from mammals to yeast. *J Biol Chem* 281: 491–500. M508414200 [pii].10.1074/jbc.M508414200 [doi].
- Woods A, Munday MR, Scott J, Yang X, Carlson M, et al. (1994) Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo. *J Biol Chem* 269: 19509–19515.
- Shirra MK, Patton-Vogt J, Ulrich A, Liuta-Tehlivets O, Kohlwein SD, et al. (2001) Inhibition of acetyl coenzyme A carboxylase activity restores expression of the *INO1* gene in a *snf7* mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21: 5710–5722.
- Goczze PM, Freeman DA (1994) Factors underlying the variability of lipid droplet fluorescence in MA-10 Leydig tumor cells. *Cytometry* 17: 151–158. 10.1002/cyto.990170207 [doi].
- Greenspan P, Fowler SD (1985) Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *J Lipid Res* 26: 781–789.
- Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD (1985) Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 100: 965–973.
- Szymanski KM, Binns D, Bartz R, Grishin NV, Li WP, Agarwal AK, et al. (2007) The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 20890–20895. 0704154104 [pii].10.1073/pnas.0704154104 [doi].
- Kohlwein SD, Petschnigg J (2007) Lipid-induced cell dysfunction and cell death: lessons from yeast. *Curr Hypertens Rep* 9: 455–461.
- Yaffe MP, Schatz G (1984) Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 4819–4823.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911–917.
- Montero-Lomeli M, Morais BL, Figueiredo DL, Neto DC, Martins JR, et al. (2002) The initiation factor eIF4A is involved in the response to lithium stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277: 21542–21548. 10.1074/jbc.M201977200 [doi].M201977200 [pii].
- Schneiter R, Guerra CE, Lampl M, Gogg G, Kohlwein SD, et al. (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* hyperrecombination mutant hpr1Δ is synthetically lethal with two conditional alleles of the acetyl coenzyme A carboxylase gene and causes a defect in nuclear export of polyadenylated RNA. *Mol Cell Biol* 19: 3415–3422.
- Bozza PT, Payne JL, Morham SG, Langenbach R, Smithies O, et al. (1996) Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11091–11096.
- DiDonato D, Brassacemle DL (2003) Fixation methods for the study of lipid droplets by immunofluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem* 51: 773–780.
- Fowler SD, Greenspan P (1985) Application of Nile red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O. *J Histochem Cytochem* 33: 833–836.
- Liao J, Sportsman R, Harris J, Stahl A (2005) Real-time quantification of fatty acid uptake using a novel fluorescence assay. *J Lipid Res* 46: 597–602. D400023-JLR200 [pii].10.1194/jlr.D400023-JLR200 [doi].
- Diaz-Garcia ME, Badia-Lafio R (2005) Fluorescence. In: Townshend A, Worsfold P, Poole C, eds. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. New York: Academic Press, pp 97–106. doi:10.1016/B012-369397-7/00161-8.
- Zanghellini J, Natter K, Jungreuthmayer C, Thalhammer A, Kurat CF, et al. (2008) Quantitative modeling of triacylglycerol homeostasis in yeast—metabolic requirement for lipolysis to promote membrane lipid synthesis and cellular growth. *FEBS J* 275: 5552–5563. EJB6681 [pii].10.1111/j.1742-4658.2008.06681.x [doi].
- Natter K, Leitner P, Faschinger A, Wolinski H, McGrath S, et al. (2005) The spatial organization of lipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* derived from large scale green fluorescent protein tagging and high resolution microscopy. *Mol Cell Proteomics* 4: 662–672. M400123-MCP200 [pii].10.1074/mcp.M400123-MCP200 [doi].
- Lorenz RT, Parks LW (1990) Effects of lovastatin (mevinolin) on sterol levels and on activity of azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 1660–1665.
- Athenstaedt K, Daum G (1997) Biosynthesis of phosphatidic acid in lipid particles and endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 179: 7611–7616.
- Fei W, Shui G, Gaeta B, Du X, Kuerschner L, Li P, Brown AJ, et al. (2008) Rdip, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid

- droplets in yeast. *J Cell Biol* 180: 473–482. jcb.200711136 [pii];10.1083/jcb.200711136 [doi].
45. Rohde JR, Bastidas R, Paria R, Cardenas ME (2008) Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol* 11: 153–160. S1369-5274(08)00024-6 [pii];10.1016/j.mib.2008.02.013 [doi].
 46. Nickels JT, Broach JR (1996) A ceramide-activated protein phosphatase mediates ceramide-induced G1 arrest of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 10: 382–394.
 47. Luke MM, Della SF, Di Como CJ, Sugimoto H, Kobayashi R, et al. (1996) The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase. *Mol Cell Biol* 16: 2744–2755.
 48. Rohde JR, Campbell S, Zurita-Martinez SA, Cutler NS, Ashe M, et al. (2004) TOR controls transcriptional and translational programs via Sap-Sit4 protein phosphatase signaling effectors. *Mol Cell Biol* 24: 8332–8341. 10.1128/MCB.24.19.8332-8341.2004 [doi];24/19/8332 [pii].
 49. Frederick DL, Tatchell K (1996) The REG2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a type 1 protein phosphatase-binding protein that functions with Reg1p and the Snf1 protein kinase to regulate growth. *Mol Cell Biol* 16: 2922–2931.
 50. Tu J, Carlson M (1995) REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 14: 5939–5946.
 51. Zhang J, Vemuri G, Nielsen J (2010) Systems biology of energy homeostasis in yeast. *Curr Opin Microbiol* 13: 382–388. S1369-5274(10)00056-1 [pii];10.1016/j.mib.2010.04.004 [doi].
 52. McCartney RR, Schmidt MC (2001) Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J Biol Chem* 276: 36460–36466. 10.1074/jbc.M104418200 [doi];M104418200 [pii].
 53. Ludin K, Jiang R, Carlson M (1998) Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6245–6250.
 54. Vahlensieck HF, Pridan L, Reichenbach H, Hinzen A (1994) Identification of the yeast ACC1 gene product (acetyl-CoA carboxylase) as the target of the polyketide fungicide soraphen A. *Curr Genet* 25: 95–100.
 55. Hess D, Winston F (2005) Evidence that Spt10 and Spt21 of *Saccharomyces cerevisiae* play distinct roles in vivo and functionally interact with MCB-binding factor, SCB-binding factor and Snf1. *Genetics* 170: 87–94. genetics.104.039214 [pii];10.1534/genetics.104.039214 [doi].
 56. Bozza PT, Melo RC, Bandeira-Melo C (2007) Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther* 113: 30–49. S0163-7258(06)00120-3 [pii];10.1016/j.pharmthera.2006.06.006 [doi].
 57. Bostrom P, Andersson I, Rutberg M, Perman J, Lidberg U, et al. (2007) SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat Cell Biol* 9: 1286–1293. ncb1648 [pii];10.1038/ncb1648 [doi].
 58. Cole NB, Murphy DD, Grider T, Ruetter S, Brassemle D, et al. (2002) Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein. *J Biol Chem* 277: 6344–6352. 10.1074/jbc.M108414200 [doi];M108414200 [pii].
 59. Karolin J, Johansson LBA, Strandberg L, Ny T (2002) Fluorescence and Absorption Spectroscopic Properties of Dipyrometheneboron Difluoride (BODIPY) Derivatives in Liquids, Lipid Membranes, and Proteins. *Journal of the American Chemical Society* 116: 7801–7806. doi: 10.1021/ja00096a042.
 60. Ceulemans H, Bollen M (2004) Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev* 84: 1–39. 10.1152/physrev.00013.2003 [doi];84/1/1 [pii].
 61. Logan MR, Nguyen T, Szapitel N, Knockleby J, Por H, et al. (2008) Genetic interaction network of the *Saccharomyces cerevisiae* type 1 phosphatase Gic7. *BMC Genomics* 9: 336. 1471-2164-9-336 [pii];10.1186/1471-2164-9-336 [doi].
 62. Wu X, Hart H, Cheng C, Roach PJ, Tatchell K (2001) Characterization of Gac1p, a regulatory subunit of protein phosphatase type 1 involved in glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* 265: 622–635.
 63. Kozubowski L, Panek H, Rosenthal A, Bloecher A, DeMarini DJ, et al. (2003) A Bni1-Glc7 phosphatase complex that recruits chitin synthase to the site of bud emergence. *Mol Biol Cell* 14: 26–39. 10.1091/mbc.E02-06-0373 [doi].
 64. Lockshon D, Surface LE, Kerr EO, Kaebertin M, Kennedy BK (2007) The sensitivity of yeast mutants to oleic acid implicates the peroxisome and other processes in membrane function. *Genetics* 175: 77–91. 10.1534/genetics.106.064428 [doi].
 65. Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, et al. (2002) Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415: 180–183. 10.1038/415180a [doi];415180a [pii].
 66. Gavin AC, Bosche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, et al. (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415: 141–147. 10.1038/415141a [doi];415141a [pii].
 67. Tehlivets O, Scheuringer K, Kohlwein SD (2007) Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1771: 255–270. S1388-1981(06)00199-5 [pii];10.1016/j.bbap.2006.07.004 [doi].
 68. Jablonowski D, Taubert JE, Bar C, Stark MJ, Schaffrath R (2009) Distinct subsets of Sit4 holophosphatases are required for inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by rapamycin and zymocin. *Eukaryot Cell* 8: 1637–1647. EC.00205-09 [pii];10.1128/EC.00205-09 [doi].

ANEXO II

**AVALIAÇÃO RELATIVA DO NÍVEL DE PARTÍCULAS LIPÍDICAS
ENSAIO DE RECUPERAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA**

Bruno L.B. Morais; Cláudio Akio Masuda; Mónica Montero-Lomeli

Laboratório de Biologia Molecular de Leveduras, Instituto de Bioquímica Médica,
Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Bruno L. B. Morais
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Bioquímica Médica
Centro de Ciências da Saude
Bloco D - Subsolo sala 11
Caixa postal 68041 CEP 21941-590
Rio de Janeiro, RJ, Brasil
bozaquel@bioqmed.ufrj.br

INTRODUÇÃO

Ácidos graxos e esteróis são importantes componentes lipídicos de toda célula, tanto do ponto de vista energético, quanto estrutural. Além disso, funcionam como sinalizadores intracelulares afetando a expressão de uma série de genes. Fica claro que um eventual aumento nos níveis destes lipídios representaria um evento tóxico para a célula. Uma maneira de driblar tal lipotoxicidade é a conversão em moléculas inertes,

no caso, lipídios neutros (Garbarino & Sturley, 2005), que uma vez sintetizados são armazenados em estruturas circulares citoplasmáticas delimitadas por monocamada fosfolipídica com um *core* composto por ésteres de esteróis e triacilgliceróis. Tais estruturas são mencionadas na literatura como corpúsculos lipídicos, gotículas lipídicas ou partículas lipídicas (denominação a qual será adotada ao longo desse texto). Sua biogênese ainda não foi satisfatoriamente entendida, no entanto é bem aceita a hipótese que credita ao retículo endoplásmico o papel de sítio de geração de partículas lipídicas (Murphy & Vance, 1999). Inicialmente, assumiu-se que as partículas lipídicas eram meros reservatórios de lipídios neutros, porém hoje já existem evidências de sua participação no metabolismo energético, no tráfego de membranas e em mecanismo de detoxificação de algumas drogas (Czabany *et col*, 2007). É crescente a atenção dada ao estudo de partículas lipídicas, tendo em vista seu envolvimento na patogênese de algumas doenças humanas como aterosclerose, obesidade e diabetes tipo II (Murphy & Vance, 1999). Aqui se descreve um método fluorimétrico rápido capaz de avaliar os níveis de partículas lipídicas de células fixadas em suspensão. A princípio, o método foi validado para o estudo de células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, porém adaptações permitem o estudo em outros modelos celulares.

Princípios: Em estudos microscópicos de partículas lipídicas, o vermelho do nilo e, mais recentemente, o BODIPY 493/509 (uma molécula derivada do fluoróforo BODIPY®) são empregados como sondas fluorescentes. Embora ambas as moléculas corem partículas lipídicas preferencialmente, o último parece ser mais eficiente (Gocze & Freeman, 1994). Valendo-se das características físico-químicas do BODIPY 493/509,

desenvolveu-se um método fluorimétrico que apresenta uma boa correlação com análises microscópicas.

Neste ensaio, o fluoróforo encontra-se em uma solução de iodeto de potássio, um supressor de fluorescência clássico, portanto não fluorescendo. Adicionando-se células ao meio, o bodipy em solução se desloca passivamente para as partículas lipídicas, não mais sofrendo ação do iodeto e, agora, fluorescendo. Assim, havendo bodipy em excesso, adições sucessivas de células causarão acréscimos na fluorescência lida. Conhecendo-se a quantidade de células adicionadas, é possível plotar a fluorescência lida contra a concentração de células no meio. Obtém-se, assim, uma curva cuja inclinação representará o nível médio de partículas lipídicas na amostra. Espera-se que quanto maior for o conteúdo de partículas lipídicas em determinada condição, maior será o aumento da fluorescência lida para uma mesma quantidade adicionada de células, e, conseqüentemente, a inclinação da curva obtida será maior.

Vantagens:

- Em relação ao custo, o equipamento utilizado é mais barato e não requer alta qualificação para sua operação, quando comparado à análise microscópica.
- A análise das imagens obtidas na microscopia é complexa e está sujeita a interferência do próprio pesquisador. O que não ocorre no método fluorimétrico.
- Ao se medir concentrações crescentes de amostra, têm-se diminuição do erro experimental.
- Alta reprodutibilidade e sensibilidade, detectando pequenas variações estatisticamente significantes.

- O método foi desenhado originalmente para microplacas, permitindo adaptações para experimentos de larga escala.

Desvantagens:

- A leitura, após a adição de células, deve ser feita o mais rápido possível para evitar a sedimentação.
- Ao contrário de análises microscópicas, os dados obtidos só revelam um aumento ou diminuição global de partículas lipídicas, ou seja, não se pode inferir se a alteração se deve a mudanças no número total ou no tamanho médio das partículas lipídicas.

EQUIPAMENTOS

- Fluorímetro com controle de temperatura (para cubetas ou microplacas)
- Cubetas ou microplacas próprias para a leitura de fluorescência.
- Vortex

SOLUÇÕES

- Solução de BODIPY 493/509 (2,5 mg/ml preparado em dimetilsulfóxido)
 - Solução de iodeto de potássio 0,5 M
 - Formaldeído 37% (concentração comercial).
- O formaldeído deve ser manuseado com luvas e em capelas com exaustão.*
- Meio de cultura rico YPD (2% peptona, 2% glicose, 1% extrato de levedura)

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1. Cresça uma cultura de levedura nas condições e até o ponto desejados.
2. Recolha entre 5 e 10×10^7 células e fixe adicionando $1/9$ do volume de formaldeído.
3. Homogenize e incube a temperatura ambiente por 15 minutos.
4. Centrifugue por 5 minutos a 3000 rpm. Descarte o sobrenadante e ressuspenda as células no mesmo volume de água destilada autoclavada.
5. Repita a centrifugação. Descarte o sobrenadante e ressuspenda a massa de células em 1 mL de água destilada autoclavada.
6. Prepare o meio de leitura: solução de KI 0,5 M e BODIPY (diluir 2000x). Mantenha ao abrigo da luz.
7. Em uma cubeta própria para fluorímetro, adicione 3 mL do meio de leitura. Espere estabilizar a temperatura. Leia a fluorescência (excitação em 485 nm e emissão em 510 nm).
8. Homogenize a suspensão celular e adicione 0,005 mL a cubeta. Homogenize a mistura da cubeta com o auxílio de uma pipeta e faça uma nova leitura.
9. Repita o passo 8 por cerca de 5 vezes.
10. Plote um gráfico da concentração de células contra a fluorescência medida. A inclinação do gráfico representará a quantidade de fluorescência recuperada por unidade de concentração de células.

GUIA DE SOLUÇÃO DE PROBLEMAS:

- O formaldeído comercial pode apresentar precipitação com o passar do tempo. Para evitar isso, normalmente os fabricantes adicionam metanol. Assim, o tempo de

fixação da células em formaldeído deve ser bem observado, caso contrário poderá ocorrer a dissolução das partículas lipídicas

- Deve-se levar em consideração que, neste método, dois fatores influenciarão no sinal de fluorescência recuperada. O primeiro é o nível de corpúsculos nas células estudadas, contribuindo positivamente à cada adição de células, enquanto o segundo é a turbidez do meio, contribuindo negativamente, já que a luz emitida sofrerá espalhamento antes de atingir o detector. Daí a importância de se controlar a turbidez do meio de leitura.
- A leitura da fluorescência deve ser feita o mais rápido possível após a adição de células e homogeneização do meio, a fim de se evitar sedimentação apreciável, que possa interferir na medida.
- É altamente recomendável controle da temperatura durante a leitura no fluorímetro, já que a intensidade da fluorescência sofre efeito desse fator.
- O meio de leitura deve ser preparado e imediatamente usado, para que se evite a oxidação do iodeto em solução e a degradação do fluoróforo.

BIBLIOGRAFIA

Czabany T, Athenstaedt K & Daum G. (2007) Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochim Biophys Acta*. 1771: 299-309.

Garbarino J & Sturley SL. (2005) Homoeostatic systems for sterols and other lipids. *Biochem Soc Trans*. 33: 1182-5.

Gocze PM & Freeman DA. (1994) Factors underlying the variability of lipid droplet fluorescence in MA-10 leydig tumor cells. *Cytometry*. 17: 151-8

Murphy DJ & Vance J. (1999) Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci*. 24: 109-15.

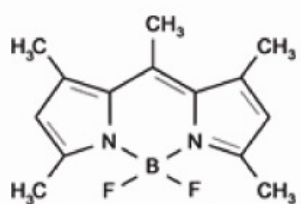


FIGURA 1: Fórmula estrutural do BODIPY 493/509

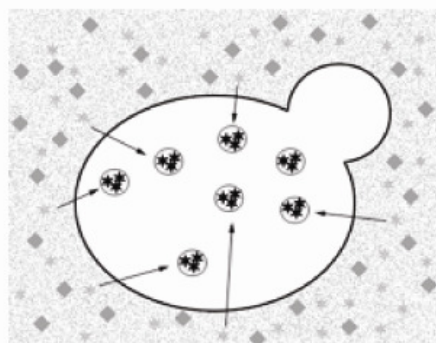


FIGURA 2: A sonda sofre efeito do supressor de fluorescência hidrofílico, fluorescendo apenas no interior das partículas lipídicas.

ANEXO III

CURRICULUM VITAE

Nome: Bruno Leonardo Bozaquel Moraes

Nascimento: 29/12/1980

Naturalidade: Rio de Janeiro

➤ **Formação Acadêmica**

- Técnico em Biotecnologia – Escola Técnica Federal de Química, janeiro de 1994 a dezembro de 1998.
- Bacharel em Biologia (Genética) - Faculdade de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, setembro de 1999 a março de 2004.
- Doutorado em Química Biológica no Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

➤ **Experiência Profissional**

- Monitor de Pesquisa Clínica da GlaxoSmithKline Brasil, em Porto Alegre, de outubro de 2002 a dezembro de 2004.

➤ **Orientação de Estudante**

1. Juliana Bernardo Madeira – iniciação científica, desde setembro/2007.

➤ **Comunicação em Congresso**

- 08 comunicações em congressos internacionais

➤ **Publicações**

Bozaquel-Morais B.L., Madeira, J.B., Maya-Monteiro, C.M., Masuda, C.A. & Montero-Lomeli, M.(2010) A new fluorescence-based method identifies protein phosphatases regulating lipid droplet metabolism. PLoS One. 28;5(10):e13692.

Montero-Lomelí, M., Galvão, D., Moraes, B.B. & Nardi, A.E. (2007) Erythrocyte phosphoglucomutase activity of bipolar I patients currently using lithium or carbamazepine. Braz J Med Biol Res. 40(1):19-25.

Montero-Lomeli M., Moraes, B.L., Figueiredo, D.L., Neto, D.C., Martins, J.R. & Masuda, C.A. (2002) The initiation factor eIF4A is involved in the response to lithium stress in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 14;277(24):21542-8.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)