UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

RAYNE STFHANY SILVA MAGALHÃES

ESTUDO DA PROTEÍNA SOD1 HUMANA COM MUTAÇÕES ASSOCIADAS À ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA FAMILIAL E SUA RELAÇÃO COM A DEFESA EM CÉLULAS SOB DIFERENTES TIPOS DE ESTRESSE OXIDATIVO

RIO DE JANEIRO

Outubro 2018

RAYNE STFHANY SILVA MAGALHÃES

ESTUDO DA PROTEÍNA SOD1 HUMANA COM MUTAÇÕES ASSOCIADAS À ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA FAMILIAL E SUA RELAÇÃO COM A DEFESA EM CÉLULAS SOB DIFERENTES TIPOS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, do Instituo de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para à obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Elis Cristina Araujo Eleutherio

RIO DE JANEIRO

2018

M188e

Magalhães, Rayne Stfhany Silva
ESTUDO DA PROTEÍNA SOD1 HUMANA COM MUTAÇÕES ASSOCIADAS À ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA FAMILIAL E SUA RELAÇÃO COM A DEFESA EM CÉLULAS SOB DIFERENTES TIPOS DE ESTRESSE OXIDATIVO / Rayne Stfhany Silva Magalhães. -- Rio de Janeiro, 2018.
149 f.

Orientadora: Elis Cristina Araujo Eleutherio.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, 2018.

1. SOD1. 2. Estresse oxidativo. 3. Neurodegeneração. 4. Esclerose lateral amiotrófica familial. I. Araujo Eleutherio, Elis Cristina , orient. II. Título.

Estudo da proteína SOD1 humana com mutações associadas à Esclerose Lateral Amiotrófica familial e sua relação com a defesa em células sob diferentes tipos de estresse oxidativo

Rayne Stfhany Silva Magalhães

Orientadora: Elis Cristina Araujo Eleutherio

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

Aprovada por:

_____

Presidente, Dra. Elis Cristina Araujo Eleutherio
Instituto de Química – UFRJ

_____

Dra. Luciana Ferreira Romão
Instituto de Ciências Biomédicas – UFRJ

_____

Dr. Fernando Lucas Palhano Soares
Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

_____

Dra. Luciana Pizzatti Barboza
Instituto de Química – UFRJ

_____

Dr. Marcos Dias Pereira
Instituto de Química - UFRJ

Rio de Janeiro

Outubro 2018

Dedico este meu trabalho aos meus dois melhores amigos,

meus pais Suselainy e Raimundo. Amo vocês.

"Viva como se fosse morrer amanhã.

Aprenda como se fosse viver para sempre"

Mahatma Gandhi

Agradecimentos

A Deus, por me agraciar com saúde, força para não desistir e por colocar pessoas maravilhosas ao meu lado, sempre me ajudando a seguir pelo caminho do sucesso.

Aos meus pais, pelo eterno apoio, por nunca desistirem de mim, dos meus sonhos, e sempre acreditarem no meu potencial. Por nunca me deixarem desistir dos meu objetivos, e por me ajudarem a concluir mais uma etapa de vida. Minha eterna gratidão à eles.

A minha orientadora Elis Eleutherio, pelos 6 anos de ensinamentos. Pelas horas analisando, discutindo resultados, para assim podermos montar trabalhos tão bonitos, nos quais aprendi bastante. Muito obrigada pela oportunidade, e por sempre tentar puxar o meu lado científico.

Ao professor Tiago Outeiro, que me orientou durante meu 1 ano de doutorado na Alemanha. Pela oportunidade de conhecer um laboratório totalmente diferente ao que estava acostumada. Também a todos os membros do seu grupo de pesquisa, pela paciência e por todos os ensinamentos passados.

Aos meus portugueses favoritos: Isabelinha, Sérgio, Ritinha, Belisa, Mariana, Raquel, Tomás por terem feito meu tempo na Alemanha inesquecível. Amigos que mesmo do outro lado do oceano, carrego (e carregarei) sempre no meu coração. Obrigada por tudo.

As minhas fofinhas Alinilda e Marinilda. As brasileiras que tive que ir para Alemanha para conhecer (ou conhecer melhor) e já me apegar. Obrigada pelos conselhos, pelas conversas, pela amizade. O que Alemanha une, nada separa (nem essa distância Rio, São Paulo).

As queridas Germaninha e Mariana, que estão comigo praticamente desde o início do meu tempo LIFE. Poderia escrever uma lista de motivos para agradecer a vocês duas, mas vou ser direta: obrigada pela amizade sincera.

Aos amigos do LIFE: Fernandinha (mesmo em tão pouco tempo, já grudei), Natalia (aquela famosa frase "te amo i hate you" haha), Vinissu (conselheiro), Mauro (melhores conselhos da vida), Diego (caronas musicais), Raquel (melhores churrascos de laje), Iguxo (the zoeira never ends), Daniel (a pessoa mais eclética do universo), e a todos que conheci nos meus 6 anos de laboratório, obrigada por serem os melhores amiguinhos de bancada do mundo. Do LIFE para a vida toda.

Aos meus ex-alunos de Iniciação científica Karina, Sarah e Pedro. Com vocês tive a chance de experimentar essa sensação boa de passar conhecimento para outras pessoas.

Ao meu químico favorito Yuri. O IQ não me deu apenas diplomas, títulos, conhecimento. Me deu um grande amigo. Obrigada por tudo, mein lieber Freund.

A CAPES pelo investimento no meu doutorado (tanto pelos 4 anos de curso, quanto pela oportunidade em desenvolver pesquisa na Alemanha).

Ao Instituto de Química da UFRJ, minha segunda casa há 10 anos. Por sempre me mostrar o quão linda a Química é.

RESUMO

Magalhães, Rayne Stfhany Silva. Estudo da proteína SOD1 humana com mutações associadas à Esclerose Lateral Amiotrófica familial e sua relação com a defesa em células sob diferentes tipos de estresse oxidativo. Rio de Janeiro, 2018. Tese de Doutorado – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A Esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda progressiva dos neurônios motores, o que leva a atrofia, rigidez e fraqueza muscular. É uma doença fatal e de rápido desenvolvimento, tendo uma expectativa de vida de aproximadamente 5 anos após o surgimento dos sintomas. 20 % dos casos da forma familial de ELA (ELAf) estão relacionados com mutações no gene *SOD1* que codifica a enzima antioxidante Cu/Zn Superóxido dismutase 1. Já foram identificadas mais de 100 mutações neste gene e relacionadas diretamente com a doença. Porém apesar de já serem mais de duas décadas estudando mutações em *SOD1*, ainda não se sabe ao certo a relação destas com o desenvolvimento de ELA. Portanto, o objetivo do trabalho foi identificar como a presença das mutações A4V, L38V, G93A e G93C em SOD1 podem influenciar na sua função antioxidante, assim como na formação de aglomerados. Primeiramente, usando células H4 (neuroglioma) transfectadas com SOD1 *wild-type* (WT) ou mutantes, acopladas ao sistema BiFC (do inglês *Bimolecular fluorescence complementation*), observamos que as mutações A4V, L38V, G93A e G93C formam aglomerados sob condições normais de crescimento, além de induzirem uma queda na localização nuclear de aproximadamente 50 %, quando comparadas a WT. Os resultados também mostraram que a presença das mutações aumentam o dano ao DNA, os níveis intracelulares de EROS (espécies reativas de oxigênio), assim como a carbonilação da proteína SOD1, indicando um dano ao sistema de proteção antioxidante. Apesar de ser um modelo mais próximo para o estudo da doença, células H4 possuem SOD1 endógena, o que pode influenciar nos resultados observados em células que expressam as mutantes na proteína. Além disto, células humanas crescem constantemente sob metabolismo oxidativo, de forma que não se pode estudar como as células humanas se comportam frente indução de estresse oxidativo. Para contornar este problema, o outro modelo experimental usado foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o qual é um modelo que vem sendo bastante empregado na literatura para o estudo de doenças humanas. Células de *S.cerevisiae* deletadas em *sod1* de levedura (Δ*sod1*), expressando SOD1 humana WT e as respectivas mutantes, em fase exponencial (28ºC,

sem nenhum tipo de estresse), foram tratadas com agente oxidante menadiona, a fim de induzir um estresse oxidativo. Neste modelo observamos que apesar da atividade enzimática nas cepas com a mutação A4V ser igual a atividade da SOD1 WT, esta mutação apresentou uma queda na proteção celular contra os danos oxidativos. Foi observado um aumento na peroxidação lipídica, nos níveis de proteína carbonilada total, e uma queda na viabilidade celular frente a diferentes concentrações de menadiona. Em contrapartida, a mutação G93A apresentou níveis de atividade enzimática inferiores aos níveis observados na WT e um aumento na oxidação intracelular pós estresse oxidativo, indicando que esta mutação apresenta uma deficiência no controle do equilíbrio redox intracelular. Sob estresse oxidativo, a mutação A4V apresentou uma maior propensão em formar aglomerados, quando comparados com a mutação G93A. Desta forma o presente trabalho mostra que o desenvolvimento da doença não está diretamente ligado a perda de atividade enzimática. Tem forte ligação com formação de aglomerados e a perda da capacidade de proteção antioxidante da célula, tanto num metabolismo respiratório, quanto num metabolismo oxidativo induzido por menadiona. Além disto, os resultados indicam que as mutações A4V e G93A são mais prejudiciais as células.

Palavras-chave: SOD1, Esclerose Lateral Amiotrófica familial, neurodegenração,neuroglioma, *Saccharomyces cerevisiae*, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Magalhães, Rayne Stfhany Silva. Study of the human SOD1 protein with mutations associated with familial Amyotrophic Lateral Sclerosis and its relation with the defense in cells under different types of oxidative stress. Rio de Janeiro, 2018. Tese de Doutorado – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by progressive loss of motor neurons, which leads to muscle atrophy, stiffness and weakness. It is a fatal and rapidly developing disease, with a life expectancy of approximately 5 years after the onset of symptoms. 20% of cases of the familial form of ALS (fALS) are related to mutations in the *SOD1* gene encoding the antioxidant enzyme Cu / Zn Superoxide dismutase 1. More than 100 mutations in this gene have been identified and are directly related to the disease. However, despite the fact that they have been studying mutations in *SOD1* for more than two decades, their relationship with the development of ALS is still uncertain. Therefore, the objective of this work was to identify how the presence of A4V, L38V, G93A and G93C mutations in *SOD1* may influence its antioxidant function, as well as the formation of agglomerates. First, using human H4 cells (neuroglioma) transfected with SOD1 wild-type (WT) or mutants, coupled to the Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) system, we observe that the mutations A4V, L38V, G93A and G93C form agglomerates under normal growth conditions , in addition to inducing a drop in nuclear localization of approximately 50% when compared to WT. The results also showed that the presence of mutations increased DNA damage, intracellular levels of reactive oxygen species (ROS), as well as carbonylation of SOD1 protein, indicating an impairment to the antioxidant protection system. Despite being a model closer to the study of the disease, H4 cells have endogenous SOD1, which may influence the results observed in cells expressing the mutants in the protein. In addition, human cells grow under oxidative metabolism, making it difficult to study how human cells behave under induction of oxidative stress. To overcome this problem, the other model used was the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which is a model that has been widely used in the literature for the study of human diseases. Cells of *S.cerevisiae* deleted in yeast *sod1* (Δ*sod1*), expressing human *SOD1* WT and the respective mutants, in exponential phase (28 ° C, without any type of stress), were treated with the oxidizing agent menadione, in order to induce an oxidative stress. In this model we observed that although the enzymatic activity in the strains with the A4V mutation was equal to the SOD1 WT activity, this mutation showed a decrease in the cellular protection against oxidative damage. An increase in lipid peroxidation, total carbonylated protein levels, and a

decrease in cell viability against different concentrations of menadione were observed. In contrast, the G93A mutation had levels of enzymatic activity lower than the levels observed in WT and an increase in intracellular oxidation after oxidative stress, indicating that this mutation has a deficiency in the control of intracellular redox balance. Under oxidative stress, the A4V mutation is more likely to form agglomerates when compared to the G93A mutation. Thus, the present work shows that the development of the disease is not directly related to loss of enzymatic activity. It has strong link with agglomerates formation and the impairment of the antioxidant protection, both in respiratory metabolism and in oxidative metabolism induced by menadione. In addition, the results indicate that A4V and G93A mutations are more damaging to cells.

Keywords: SOD1, familial Amyotrophic Lateral Sclerosis, neurodegeneration, human neuroglioma, *Saccharomyces cerevisiae*, oxidative stress.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Danos observados em células cerebrais ao longo do envelhecimento que podem levar ao início de neurodegeneração. 22

Figura 2. Estrutura química de riluzol (a) e edaravone (b) 28

Figura 3. Reação de dismutação de íons superóxidos pela enzima SOD1. 29

Figura 4. Estrutura cristalina de um monômero de hSOD1 representando os sítios de ligação a Cu(II) e Zn(II), e a ligação dissulfeto.. 31

Figura 5. Estrutura característica de um apodímero de hSOD1 e os respectivos sítios de mutação já identificados.. 34

Figura 6.Modelos usados para estudo de ELA. 39

Figura 7. Vantagens do uso de S.cerevisiae para o estudo de mecanismos moleculares relacionados à doenças neurodegenerativas 43

Figura 8. Representação esquemática do sistema BiFC. 45

Figura 9. Mapa do vetor empregado para clonagem de células H4 expressando hSOD1WT ou mutantes fusionadas ao fragmento VC da proteína vênus. 50

Figura 10. Mapa do vetor empregado para clonagem de células H4 expressando hSOD1WT ou mutantes fusionadas ao fragmento VN da proteína vênus.. 51

Figura 11. Mapa do vetor YEP351 empregado para clonagem de células de levedura Δsod1 expressando hSOD1WT ou mutantes.. 58

Figura 12. Exemplo de gráfico gerado com os dados obtidos para determinação de atividade enzimática de sod1.. 61

Figura 13. Figura representativa do mapa do plasmídeo pME2795+hSOD1-VC empregado na clonagem na cepa Δsod1 expressando hSOD1 WT ou mutantes fusionadas ao fragmento VC da proteína vênus.. 68

Figura 14.Figura representativa do mapa do plasmídeo pME2794+VN-hSOD1 empregado na clonagem na cepa Δsod1 expressando hSOD1 WT ou mutantes fusionadas ao fragmento VN da proteína vênus.. 68

Figura 15. Representação esquemática do sistema BiFC (adaptado de Brasil & Magalhães, 2017).. 70

Figura 16. Expressão de hSOD1-BiFC WT e mutantes em células H4.. 71

Figura 17. Visualização da formação de aglomerados e localização de hSOD1.. 73

Figura 18. Análise da natureza dos aglomerados de hSOD1-BiFC mutante.. 75

Figura 19. Colocalização de aglomerados de hSOD1-BiFC mutantes e JUNQ.. 78

Figura 20.Live-cell imaging de células expressando hSOD1-BiFC..... 80

Figura 21. Níveis de EROS em célulasH4..... 81

Figura 22. Representação esquemática de um cometa de DNA.. 82

Figura 23. Análise do dano ao DNA através do ensaio cometa.. 83

Figura 24. Dosagem dos níveis de hSOD1 carbonilada...... 85

Figura 25. Esquema de formação de NBT reduzido na presença de riboflavina. 91

Figura 26. Atividade hSOD1 após indução de estresse oxidativo...... 92

Figura 27. Esquema de formação de íons superóxido na presença de menadiona. 93

Figura 28. Quantificação da expressão de hSOD1 e mutantes.. 94

Figura 29. Dosagem de atividade hSOD1 por metodologia gel. 95

Figura 30. Determinação da tolerância das cepas expressando hSOD1 sob diferentes concentrações de menadiona.. 96

Figura 31. Dosagem do grau de peroxidação lipídica.. 98

Figura 32. Dosagem dos níveis de oxidação intracelular. 99

Figura 33. Dosagem dos níveis de proteína carbonilada total.. 100

Figura 34.Atividade SOD1 de cepas expressando sistema BiFC...... 102

Figura 35. Visualização da formação de aglomerados de hSOD1 sob efeito de estresse oxidativo..
..... 105

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1. Fatores ambientes que podem causar ELA. 26

Tabela 2. Principais genes relacionados com ELA. 27

Tabela 3. Isoformas de SOD componentes da família Superóxido dismutase. 30

Tabela 4 Células obtidas por transfecção de células H4 com plasmídeos VN-hSOD1 e hSOD1VC 50

Tabela 5.Células de S.cerevisiae obtidas por eletroporação 57

Tabela 6. Aminoácidos utilizados para a mistura Dropout 59

Tabela 7. Concentração de menadiona usada em cada experimento 59

Tabela 8. Tabela para determinação de atividade SOD1.. 60

Tabela 9. Cepas marcadas com proteína vênus 67

Lista de Siglas e Abreviações

AC – acetato

ANOVA - análise de variância

BIFC – do inglês, *Bimolecular Fluorescence Complementation* (Complementação de Fluorescência Bimolecular)

BSA – do inglês, *Bovine Serum Albumin* (Soro de albumina bovina)

DAPI – do inglês, *4',6-diamidino-2-phenylindole*

DCFH- do inglês, *2,7-dichlorofluorescin diacetate* (2,7- diclorofluoresceína diacetato)

DMEM – do inglês, *Dulbecco´s Modified Eagle Medium*

DNA – do inglês, *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

DNPH - 2, 4-Dinitrofenilhidrazina

DNP - 2,4-Dinitrofenilhidrazona

DPBS – do inglês, *Dulbecco´s Phosphate-buffered saline* (tampão fosfato salino)

DTT – Ditiotreitol

EDTA - do inglês, *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (ácido etilenodiamino tetraacético)

ELA- Esclerose Lateral Amiotrófica

EROs – Espécies Reativos de Oxigênio

FBS – do inglês, *Fetal Bovine Serum* (soro fetal bovino)

GFP - do inglês, *Green Fluorescence Protein* (proteína verde fluorescente)

HBS – do inglês, *HEPES Buffer Saline*

HEPES – do inglês, *organic chemical buffering agent*

his – histidina

JUNQ - do inglês, *Juxta Nuclear Quality Control*

leu - leucina

MDA - do inglês, *Malondialdehyde* **(**Dialdeído Malônico)

met - metionina

NBT – do inglês, *Nitro Blue Tetrazolium* (Azul de Nitro Tetrazólio)

OD – do inglês, *Optical Density*

PEG – polietilenoglicol

PFA – paraformaldeído

PSA – persulfato de amônio

PVDF – do inglês, *Polyvinylidene difluoride* (Fluoreto de polivinilideno)

RIPA - do inglês, *Radioimmunoprecipitation Assay*

RPM – Rotações por minuto

SC- do inglês, *Synthetic Complete Medium*

SD – do inglês, *Synthetic Dextrose Medium*

SDS – do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil sulfato de Sódio)

TBA – do inglês, *Thiobarbituric Acid*

TBARS - do inglês, *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)

TBS - do inglês, *Tris Buffered Saline*

TCA - do inglês, *Trichloroacetic Acid* (Ácido Tricloroacético)

TEMED - do inglês, *Tetramethylethylenediamine* (Tetrametil etileno-diamina

ura - uracila

VC - fragmento não fluorescente da proteína vênus fusionado a região carboxi-terminal

VHL – Von Hippel - Lindau

VN – fragmento não fluorescente da proteína venus fusionado a região amino-terminal

YFP – do inglês, *Yellow Fluorescence Protein*

YPD–do inglês, *Yeast Peptone Dextrose Medium*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21
1.1 ENVELHECIMENTO E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS 21
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO 22
1.3 ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA) 25
1.4 Cu/Zn SUPERÓXIDO DISMUTASE 28
1.5 hSOD1 E ELA 33
1.6 MODELOS DE ESTUDO DE ELA 37
1.6.1. Células de neuroglioma, H4 40
1.6.2 *Saccharomyces cerevisiae* 41
1.7 O SISTEMA FLUORESCENTE BiFC 44
2 OBJETIVOS 48
2.1. GERAL 48
2.2 ESPECÍFICOS 48
3 MATERIAL E MÉTODOS 49
3.1 EXPERIMENTOS COM CÉLULA ANIMAL 49
3.1.1 Meio de cultivo e transfecção 49
3.1.2 Localização e formação de aglomerados 51
3.1.3 Expressão de hSOD1 por Western Blotting 52
3.1.3.1 Extração e dosagem de proteína 52
3.1.3.2 Condições de eletroforese 52
3.1.3.3 Transferência das proteínas para membrana de PVDF e bloqueio dos sítios livres da membrana 52
3.1.3.4 Incubação com anticorpo primário e anticorpo secundário 53
3.1.3.5 Revelação da membrana e análise da imagem 53
3.1.4 Imunocitoquímica 53
3.1.5 Tempo de formação de aglomerados 54
3.1.6 Oxidação Intracelular 54
3.1.7 Ensaio Cometa 54
3.1.7.1 Preparo das amostras 54
3.1.7.2 Condições de eletroforese e tratamento com iodeto de propídio 55
3.1.7.3 Obtenção e análise dos dados 55
3.1.8 Determinação dos níveis de hSOD1 carbonilada 55
3.1.8.1 Tratamento com solução de DNPH 55

3.1.8.2 Incubação com anticorpo primário e anticorpo secundário 56
3.1.8.3 Revelação da membrana e análise da imagem 56
3.2 EXPERIMENTOS COM *Saccharomyces cerevisiae* 56
3.2.1 Obtenção das cepas de estudo 56
3.2.2 Condições de estoque e meio de cultivo 58
3.2.3 Condições de estresse oxidativo 59
3.2.4 Determinação de atividade hSOD1 59
3.2.4.1 Preparo do extrato celular 59
3.2.4.2 Dosagem de concentração de proteína pelo método de Stickland 60
3.2.4.3 Cinética da atividade de hSOD1 60
3.2.4.4 Atividade hSOD1 por zimograma 61
3.2.5 Viabilidade celular 62
3.2.6 Peroxidação lipídica 62
3.2.7 Oxidação intracelular 63
3.2.7.1 Tratamento com 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCFH) 63
3.2.7.2 Preparo da amostra e análise dos dados 63
3.2.8 Expressão de hSOD1 por Western Blotting 64
3.2.8.1 Gel de resolução 64
3.2.8.2 Gel de empilhamento 64
3.2.8.3 Condições de eletroforese 64
3.2.8.4 Transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose e bloqueio dos sítios livres da membrana 64
3.2.8.5 Incubação com anticorpo primário 65
3.2.8.6 Incubação com anticorpo secundário 65
3.2.8.7 Revelação da membrana e análise da imagem 65
3.2.9 Formação de aglomerados de hSOD1 66
3.2.9.1 Obtenção das cepas marcadas com o sistema BiFC 66
3.2.9.2 Condições de estoque e meio de cultivo 66
3.2.9.3 Microscopia de Fluorescência 66
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA 69
Parte I: ESTUDOS COM CÉLULAS DE NEUROGLIOMA 70
4. RESULTADOS 70
4.1 INFLUÊNCIA DAS MUTANTES A4V, L38V, G93A E G93C NA FORMAÇÃO DE AGLOMERADOS E LOCALIZAÇÃO DE hSOD1 70
4.2 CARACTERIZAÇÃO E LOCALIZAÇÃO DOS AGLOMERADOS DE hSOD1 MUTANTES 74

4.3 CINÉTICA DE FORMAÇÃO DE AGLOEMRADOS DE hSOD1 MUTANTES 78
4.4 INFLUÊNCIA DAS MUTAÇÕES NO EQUILÍBRIO REDOX 80
4.5 hSOD1 E PROTEÇÃO CONTRA DANO AO DNA 81
4.6 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE hSOD1 CARBONILADA 84
5. DISCUSSÃO 86
PARTE II: ESTUDOS COM CÉLULAS DE *Saccharomyces crevisiae* 91
6. RESULTADOS 91
6.1 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE hSOD1 EM CEPAS MUTANTES 91
6.2 TOLERÂNCIA A ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR TRATAMENTO COM MENADIONA 95
6.3 DOSAGEM DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA 97
6.4 AVALIAÇÃO DO EQUÍLIBRIO REDOX 99
6.5 ANALISE DOS NÍVEIS DE CARBONILAÇÃO PROTEICA 99
6.6 ESTUDO DA FORMAÇÃO DE AGLOMERADOS FRENTE ESTRESSE OXIDATIVO .. 101
7. DISCUSSÃO 106
PARTE III: CONSIDERAÇÕES FINAIS 113
8. CONCLUSÃO 116
9. REFERÊNCIAS 118
ANEXOS 125

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENVELHECIMENTO E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

Com o aumento da expectativa de vida, tem-se falado muito sobre envelhecimento celular e problemas que este processo traz para o organismo. De acordo com uma estimativa feita em 2015 pelas Nações Unidas, o número de pessoas com mais de 60 anos irá aumentar nos próximos 35 anos, podendo atingir 2.1 bilhões de pessoas (WYSS-CORAY, 2016).

Envelhecimento é um processo caracterizado pela perda progressiva da integridade das funções normais do organismo, levando a danos irreversíveis, e aumento de vulnerabilidade à morte. Estudos aprofundados nos danos observados em células envelhecidas indicam que este processo pode estar relacionado à mudanças epigenéticas, assim como um aumento no nível de estresse oxidativo. Estes processos, podendo ser em conjunto ou separados, levam a um declínio no maquinário de proteção celular, induzindo um aumento nos danos ao DNA, surgimento de mutações e ativação de processos relacionados à morte celular (GUILLAUMET-ADKINS et al., 2017).

Algumas doenças estão diretamente relacionadas com o envelhecimento celular, dentre elas as doenças neurodegenerativas. Neurodegeneração está relacionada à perda progressiva dos neurônios, responsáveis pelas funções do sistema nervoso. Como consequência, tem-se a perda das funções motoras, fisiológicas e a capacidade cognitiva. Pesquisas atuais estimam que doenças neurodegenerativas afetam aproximadamente 40 milhões de pessoas no mundo todo, e devido a sua complexidade ainda não existem tratamentos que curem ou previnam seus sintomas (WOOD; WINSLOW; STRASSER, 2015). Existem vários exemplos de doenças neurodegenerativas, tais como Alzheimer, Parkinson, Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica, as quais são diferenciadas principalmente pela área do cérebro afetada em cada doença (CASTILLO et al., 2013).

Neurodegeneração é um processo complexo, de forma que ainda não se determinou as mudanças no metabolismo, genéticas ou bases moleculares que levam a essa neurodegeneração. Acredita-se que o surgimento de agregados proteicos, placas amilóides, já identificados em tecidos cerebrais de pacientes com doença neurodegenerativa sejam a base para o desenvolvimento da neurodegeneração. Porém o que leva a esse acúmulo anormal é o que tem sido foco dos estudos atuais (WYSS-CORAY, 2016).

Acredita-se que o processo de neurodegeneração seja uma consequência do conjunto de fatores ambientais, predisposição genética, e danos observados durante o envelhecimento celular, que podem ser relacionados com o aumento do estresse oxidativo observado em células envelhecidas (figura 1). Tais danos podem aumentar os níveis de proteínas lisossomais e enzimas, além de já se ter detectado em neurônios envelhecidos um acúmulo anormal de lisossomos e autofagossomos (MENZIES; FLEMING; RUBINSZTEIN, 2015; NIXON et al., 2005; NIXON; CATALDO; MATHEWS, 2000). Além disso, o aumento do estresse oxidativo induz o desenovelamento de proteínas, o que pode engatilhar o processo de formação de agregados e fibras, além de causar danos irreparáveis ao DNA.

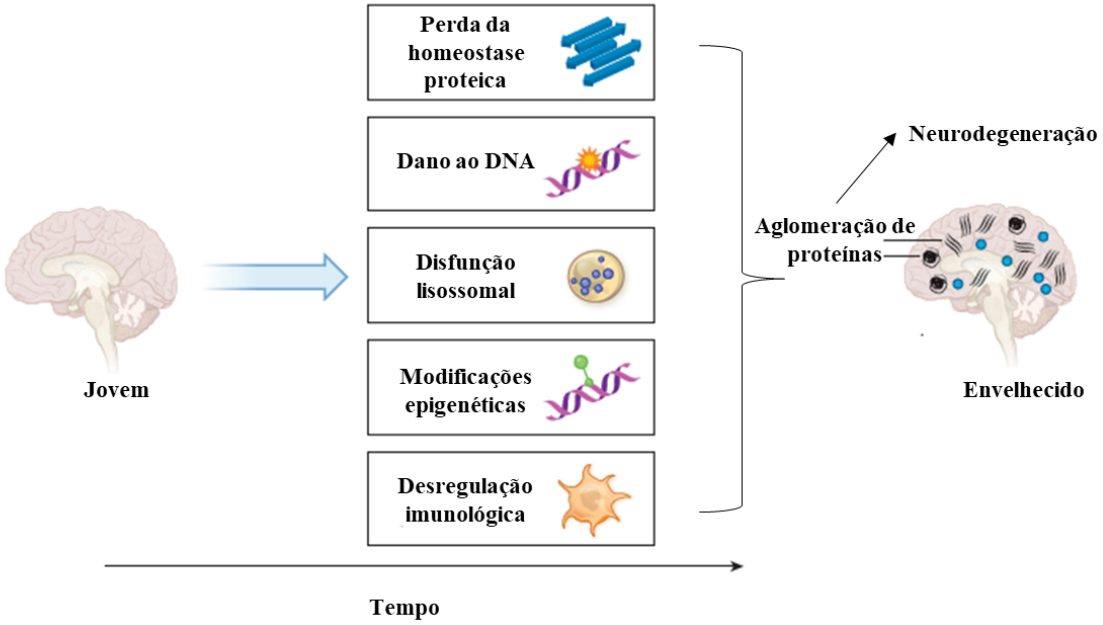


Figura 1. Danos observados em células cerebrais ao longo do envelhecimento que podem levar ao início de neurodegeneração. Adaptado de WYSS-CORAY, 2016

Com base nisto, é importante entender os mecanismos por trás do envelhecimento celular e que já foram identificados em doenças neurodegenerativas a fim de se desenvolver tratamentos que possam retardar ou até prevenir tais problemas.

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO

Existem diversas teorias que tentam explicar os danos causados pelo envelhecimento celular. Dentre elas a mais conhecida, assim como a mais estudada, é a teoria dos radicais livres, criada por Denham Harman, a qual postula que o acúmulo de radicais livres produzidos pelo metabolismo energético respiratório na mitocôndria causam danos ao DNA nuclear, DNA

mitocondrial, assim como na estrutura da membrana celular (GUILLAUMET-ADKINS et al., 2017). Esse acúmulo de radicais livres também pode ser denominado como estresse oxidativo. Essa teoria é fundamentada em resultados de análises de tecidos envelhecidos nos quais foi detectado um aumento de concentração de espécies reativas de oxigênio (EROS) (GUILLAUMET-ADKINS et al., 2017).

Estresse oxidativo ocorre quando o equilíbrio entre EROS e o sistema de defesa antioxidante é afetado, de forma a se terem um aumento exacerbado nas concentrações intracelulares de EROS. O sistema antioxidante tem como objetivo regular a concentração de EROS que podem ser eventualmente geradas durante processos oxidativos na célula, mantendo os níveis dessas espécies numa homeostase fisiológica. Níveis baixos de EROS interferem na proliferação celular, assim como na ativação das defesas antioxidantes. Já níveis altos de EROS permitem com que essas espécies reativas interajam com estruturas moleculares tais como DNA, proteínas, lipídios, e carboidratos, alterando suas estruturas, funções, e consequentemente, caminhos metabólicos essenciais para o funcionamento correto celular (ELEUTHERIO et al., 2017; GUILLAUMET-ADKINS et al., 2017).

EROS são moléculas que possuem um átomo de oxigênio, ou equivalentes a ele, e são espécies mais reativas do que outras moléculas, tais como O_2. Essa reatividade se dá devido à presença de um ou mais elétrons desemparelhados na estrutura de EROS. Ânion superóxido (O^-_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($^{\cdot}OH$) e oxigênio singleto ($^1O_2$) são as quatro espécies geradas durante processos oxidativos na célula. Através de reações dessas espécies, outros radicais podem ser gerados tais como hidroperóxido lipídico (ROOH), radical peroxil lipídico (ROO) e radical alcoxi lipídico (RO), os quais são relacionados com a oxidação dos lipídios presentes na membrana (KURUTAS, 2015).

EROS são principalmente geradas na mitocôndria, onde os íons superóxido são gerados a partir do escape de elétrons dos complexos I e II da cadeia transportadora de elétrons. Outras fontes endógenas de EROS incluem NADPH oxidase, citocromo c oxidase e xantina oxidase. Radicais hidroxila podem ser gerados a partir da reação de H_2O_2 com Fe^{2+} ou a partir da reação de Fe^{3+} com ânions superóxido, reações conhecidas como reação de Fenton e reação de Haber-Weiss, respectivamente. Radiação (UV, raio-X, raios gama), assim como poluentes atmosféricos e químicos são exemplos de fontes externas de EROS (TRACHOOTHAM et al., 2008).

Dentre os radicais livres formados, acredita-se que os íons superóxido são os precursores dos demais, o qual é formado a partir da redução de moléculas de oxigênio por um único elétron. Por mais que seja considerado um radical pouco reativo, ele é o catalisador chave das reações de Fenton, uma vez que pode regenerar o ferro reduzido, permitindo que a reação continue gerando radicais hidroxila. Outro exemplo de EROS pouco reativo é o peróxido de hidrogênio. Por não possuir carga, pode difundir livremente pela membrana. Por conta disto, é considerado uma espécie perigosa para a célula pois pode se deslocar até o núcleo, e danificar o DNA, além de ser um precursor de radicais hidroxila (CHUNG, 2017; NEWSHOLME et al., 2012).

Células são compostas por variados mecanismo antioxidantes a fim de prevenir ou reduzir os danos em moléculas que são suscetíveis a oxidação (DASURI; ZHANG; KELLER, 2013). Mamíferos desenvolveram sistemas antioxidantes complexos, os quais podem ser enzimáticos ou não enzimáticos. Dentre os agentes antioxidante enzimáticos estão glutationa peroxidase, catalase e superóxido dismutase (PARAKH et al., 2013). Vitamina E e C, glutationa, ácido lipóico, melatonina são compostos não enzimáticos que também exercem papel de proteção contra estresse oxidativo nas células de mamíferos (KURUTAS, 2015).

O elevado consumo de O_2 (devido à uma taxa metabólica alta), assim como alta concentração de ácidos graxos insaturados oxidáveis e presença de metais como ferro e cobre, fazem com que o cérebro seja um dos órgãos mais suscetíveis a sofrer danos oxidativos devido à alta geração de EROS (PARAKH et al., 2013). Uma das consequências desse aumento no estresse oxidativo é a degeneração dos neurônios, o que já foi relacionado com algumas doenças, dentre elas doenças neurodegenerativas (GUILLAUMET-ADKINS et al., 2017). Já foi demonstrado que estresse oxidativo em neurônios induz o desenovelamento de proteínas, dentre elas SOD1, um dos agentes antioxidantes das células humanas, o que pode gerar aglomerados diretamente relacionados com a neurodegeneração observada em algumas doenças, dentre elas esclerose lateral amiotrófica (ELA) (SACCON et al., 2013). Estudos mostraram que algumas disfunções celulares observadas em ELA estão diretamente ligadas com o aumento do estresse oxidativo, agregação proteica, aumento da peroxidação lipídica, esterificação de colesterol, disfunção mitocondrial, autofagia, dentre outros (PARAKH; ATKIN, 2016). Acreditasse que mutações em genes relacionados as defesas antioxidantes possam fazer parte do mecanismo tóxico observado em células de organismos com ELA.

1.3 ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA)

Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA ou ALS, do inglês *Amyotrophic Lateral Sclerosis*) é uma doença neurodegenerativa que ataca principalmente o sistema motor como neurônios motores, córtex motor, tronco cerebral e medula espinhal, resultando em uma fraqueza muscular progressiva (CASTILLO et al., 2013; HENRIQUES et al., 2014; VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017). Também conhecida como doença de Charcot, por ter sido primeiramente descrita em 1870 pelo neurobiólogo Jean-Martin Charcot, ou como doença de Lou Gehrig, em homenagem ao jogador de baseball americano Lou Gehrig, que desenvolveu a doença nos anos de 1930 (BONAFEDE; MARIOTTI, 2017; PARAKH et al., 2013).

Por ser uma doença que ataca principalmente os neurônios motores superiores e inferiores, tem como principais sintomas a fraqueza muscular acompanhada por hiper-reflexia, perda de massa muscular e o surgimento de fasciculações. Estes sintomas acometem 2 a cada 3 pacientes com a doença. Os núcleos bulbares também podem ser afetados, 1 a cada 3 pacientes, o que leva a problemas relacionados ao tronco cerebral, tais como problemas nos movimentos da face, na mastigação, e dificuldades na deglutição. Dificuldades na fala, mudanças comportamentais e disfunções executoras podem ser detectados em 50 % dos casos, quando a degeneração se estende ao lobo frontotemporal. Aproximadamente 10 % dos indivíduos também podem desenvolver demência (VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017).

É uma doença mais comum no continente europeu, tendo uma taxa de incidência de 2-3 indivíduos/100.000 e uma prevalência de 6-7/100.00, enquanto que no ocidente a taxa de incidência é de 1-2 indivíduos/100.000 e uma prevalência de 4-8/100.000. O risco de se desenvolver a doença é de 1 em cada 400 pessoas (BONAFEDE; MARIOTTI, 2017; VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017). Pacientes diagnosticados com ELA possuem uma expectativa de vida baixa, tendo uma faixa de sobrevivência entre 2-5 anos após o surgimento dos sintomas. Em alguns casos, essa expectativa aumenta para aproximadamente uma década. Em geral, a causa principal do óbito é uma falha nos músculos do sistema respiratório (BONAFEDE; MARIOTTI, 2017).

Dentre os casos da doença, ELA pode ser dividida em duas formas: forma esporádica (ELAs), que acomete 90-95 % dos casos, e a forma hereditária (familial – ELAf), que acomete 5-10 % (ONESTO et al., 2011). Apesar desta divisão, ambos os casos possuem sintomas

semelhantes e são clinicamente/patologicamente indistinguíveis (PARAKH et al., 2013). O que pode ser diferenciado entre elas é a idade do surgimento dos sintomas. Por ser uma doença diretamente relacionada com o envelhecimento celular e suas consequências para o organismo, os primeiros sintomas geralmente surgem em idades mais avançadas. Na forma familial podem surgir na faixa dos 50 anos, e possui a mesma incidência entre homens e mulheres. Nos casos esporádicos os sintomas surgem na faixa dos 60, e possui uma maior incidência em indivíduos do sexo masculino. Apesar disto, estudos já mostraram que o desenvolvimento de ELA pode ser iniciada em indivíduos mais jovens , em alguns casos da forma familial (BONAFEDE; MARIOTTI, 2017).

Apesar do grande número de trabalhos publicados sobre ELA, ainda não se sabe quais fatores levam ao desenvolvimento da doença. Estudos em tecidos de pacientes com ELA mostram que existem mecanismos biológicos que são afetados ou engatilhados durante o desenvolvimento da doença, tais como aumento do estresse oxidativo, surgimento de processos de inflamação, apoptose, disfunção mitocondrial e proteassomal, dentre outros fatores (BROWNE; ABBOTT, 2016). Estudos mais recentes acreditam que alguns fatores externos possam ajudar a desenvolver a doença em indivíduos que já possuam a predisposição, servindo como um iniciador (BONAFEDE; MARIOTTI, 2017). A tabela 1 mostra alguns fatores ambientais que já foram relacionados com ELA.

Tabela 1. Fatores ambientes que podem causar ELA. Adaptado de(ZAREI et al., 2015)

Causa	Justificativa
Fumo	Indução de inflamação, estresse oxidativo, e neurotoxidez pelos metais presentes em cigarros
Exposição Química	Exposição à pesticidas, fertilizantes, herbicidas, inseticidas e a formaldeído, e a metais pesados, como chumbo
Radiação e Campo Eletromagnético	Aumento da oxidação intracelular, do estresse oxidativo e diminuição das defesas antioxidantes

Acredita-se que a principal causa do desenvolvimento de ELA seja a formação de agregados já identificados em pacientes com a doença (assim como em outras doenças neurodegenerativas). Agregados são principalmente formados por proteínas desenoveladas, que interagem entre si, formando oligômeros, e o acúmulo destes, leva à formação de fibras insolúveis, que acumulam, formando aglomerados com propriedades tóxicas para a célula

(VERMA, 2016). Aglomerados identificados em tecidos de pacientes com ELA são constituídos principalmente por chaperonas, proteínas mitocondriais, ubiquitinas, neurofilamentos (BONAFEDE; MARIOTTI, 2017; FARRAWELL et al., 2015). Em geral, a agregação de proteínas está diretamente relacionada com a presença de mutações nos genes, que aumentam a suscetibilidade destas proteínas desenovelarem, e formarem agregados. Já foram identificadas mutações em 20 genes relacionados a 80 % dos casos de ELA familial (tabela 2)(PARAKH; ATKIN, 2016). Mutações no gene C9orf72 já foram identificadas na forma esporádica da doença (TALBOT, 2011). Dentre os genes já identificados, 40 % dos casos de ELAf estão relacionados com mutações no gene C9orf72 e 20 % com mutações no gene *SOD1* (ZUFIRÍA et al., 2016).

Alguns estudos mostram que pessoas que apresentam mutações em alguns genes relacionados a ELAf, quando expostos a alguns fatores ambientais tais como fumo, exposição a metais pesados, solventes, são mais suscetíveis a desencadear mecanismos que podem levar a neurodegeneração (BONAFEDE; MARIOTTI, 2017).

Tabela 2. Principais genes relacionados com ELA. Adaptado de AJROUD-DRISS; SIDDIQUE, 2015

Gene	Função	Nome
SOD1	Metabolismo de Superóxido	Superóxido dismutase
TARDBP	Metabolismo de RNA	Do inglês *transactive response DNA binding protein*
FUS	Metabolismo de RNA	Do inglês *RNA-binding protein FUS/TLS*
OPTN	Variadas, dentre elas trafego vesicular e na membrana	Do inglês *optineurin 1*
VCP	Tráfego de proteína ubiquitinada. Maturação do Autofagossomo	Do inglês *valosin-containing protein*
SQSTM1	Degradação proteica	Do inglês *sequestosome-1*
UBQLN2	Degradação proteica	Do inglês *ubiquilin-2*
C9ORF72	Desconhecida	Do inglês *chromosome 9 open reading frame 72*
PFN1	Polimerização de actina	Do inglês *profilin I*

Estudos de tecidos de pacientes com ELA revelaram que esta doença afeta variados mecanismos celulares, dificultando o desenvolvimento de tratamentos eficazes para combater ou prevenir esta doença. Apesar disto, já foram produzidos dois medicamentos para o

tratamento de ELA. Riluzol (2-amino-6-trifluorometoxinezotiasol, figura 2a), foi o primeiro a ser desenvolvido, porém seu uso aumenta a expectativa de vida do paciente em apenas 3-5 meses (VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017). Ele foi desenvolvido a partir do conhecimento do acúmulo tóxico de glutamato, levando a uma morte neuronal. Riluzol bloqueia os canais de transporte de sódio, inibindo a liberação de glutamato nos terminais pré-sinápticos (BONAFEDE; MARIOTTI, 2017). Apesar disto, o seu uso tem sido bastante questionado uma vez que além de não ser eficiente na cura da doença, possui um alto custo de produção (em torno de 10.000 dólares / ano nos EUA) (MILLER; MITCHELL; MOORE, 2012).

Recentemente (2015 no Japão e 2017 nos EUA) foi aprovado o uso de uma nova droga para o tratamento de ELA, edaravone (figura 2b). Edaravone (3-metil-1-fenil-2-pirazolina-5-one) é um derivado de 2-pirazolina-5-one, que funciona como um "capturador" de radicais livres tais como radical hidroxila e superóxido. Devido a seu papel antioxidante, tem sido usado como forma de diminuir os danos causados pelo aumento do estresse oxidativo nas células de pacientes com ELA, e assim retardar a progressão da doença. Porém, assim como riluzol, o aumento da expectativa de vida é de meses (SAWADA, 2017; WATANABE et al., 2018).

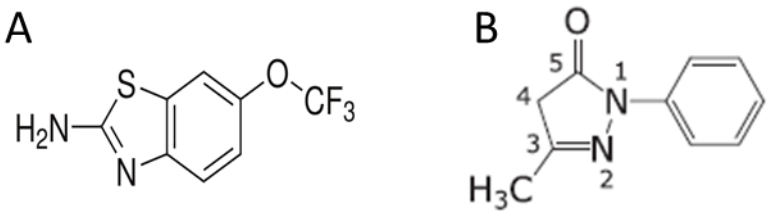


Figura 2. Estrutura química de riluzol (a) e edaravone (b)

Desta maneira, estudos com foco metabólico têm sido cada vez mais desenvolvidos com o intuito de entender melhor os mecanismos por trás da neurodegeneração, e assim desenvolver tratamentos que possam prevenir ou curar pacientes com ELA.

1.4 Cu/Zn SUPERÓXIDO DISMUTASE

Cu/Zn superóxido dismutase, Cu/ZnSOd1 ou SOD1, é a principal enzima do sistema antioxidante. Faz parte da família das superóxido dismutase, as quais são encontradas em variados organismos dentre eles, humanos e de levedura (tabela 3). Em células de mamíferos

além de SOD1 são encontradas as isoformas MnSOD (SOD2) e Cu/ZnSOD (SOD3), diferenciadas pela localização celular, onde SOD1 é majoritariamente encontrada no citoplasma, enquanto SOD2 localizada na matrix mitocondrial e SOD3 no espaço extracelular (HALLIWELL, 2006). As três isoformas, assim como todas as demais superóxidos dismutase, têm como função a dismutação dos radicas superóxidos em uma reação de duas etapas, gerando oxigênio e peróxido de hidrogênio (figura 3). Por sua vez, o peróxido é reduzido a água e oxigênio pela ação de outras enzimas tais como peroxidases ou catalases, ou por meios não enzimáticos, como por exemplo ação do sistema de glutationa (BONAFEDE; MARIOTTI, 2017). hSOD1 foi inicialmente descrita como uma enzima antioxidante em 1967, é altamente conservada, expressa constantemente e representa 1-2 % da proteína total solúvel do sistema nervoso central (BASTOW; GOURLAY; TUITE, 2011; BUNTON-STASYSHYN et al., 2015; CHUNG, 2017). hSOD1 é principalmente encontrada no cérebro e na medula espinhal, regiões que são altamente suscetíveis a danos oxidativos, visto que produzem grande quantidade de radicais superóxido durante a respiração celular (GALALELDEEN et al., 2009).

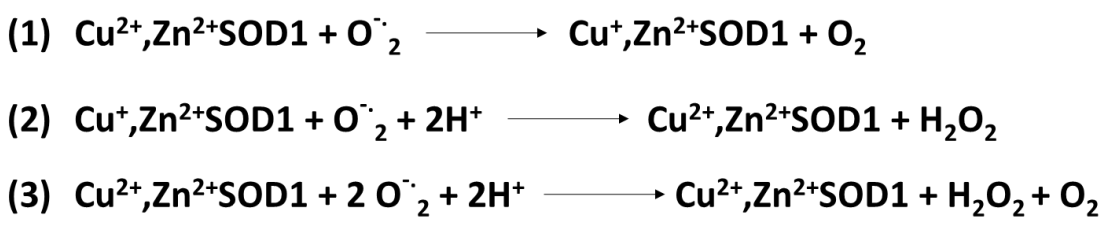


Figura 3. Reação de dismutação de íons superóxidos pela enzima SOD1. Reação (1): O Cu(II) da estrutura de hSOD1 é reduzido a Cu(I), de forma que o íon superóxido é oxidado a oxigênio. Reação (2) o Cu(I) é oxidado a Cu(II), regenerando a carga de Cu na proteína SOD1 da reação 1, e outro íon superóxido é reduzido a peróxido de hidrogênio. Reação (3): reação global de dismutação de íons superóxido.

Além do seu papel na dismutação de radical superóxido no citoplasma, estudos atuais têm mostrado sua presença no núcleo, tendo como papel regulador da expressão de genes relacionados na proteção antioxidante, principalmente genes do mecanismo de reparo de DNA (TSANG et al., 2014). Além disto, em células de levedura, Sod1p (Sod1 de levedura) tem sido relacionada como regulador da repressão catabólica, justificando, de certa forma, porque é tão expressa e apenas em torno de 5 % usada como função enzimática(BUNTON-STASYSHYN et al., 2015; SACCON et al., 2013).

Tabela 3. Isoformas de SOD componentes da família Superóxido dismutase. Adaptado de (CHUNG, 2017)

Isoforma	Cofator	Estrutura da proteína	Localização celular
FeSOD	Fe^{2+}	Homodímero	Procariotos, cloroplastos em plantas
NiSOD	Ni^{2+}	Homoexamero	Cianobactérias, actinomicetos
Cu/ZnSOD	**Cu^{2+} para atividade catalíticaa Zn^{2+} para estabilidade enzimática**	Monômero/dímero	Periplasmo em bactérias Gram-negativas
		Homodímero	**Citoplasma, núcleo, espaço intermembrana em eucariotos, cloroplastos, perixossomo em plantas**
		Glicoproteína homotetramérica	Fluido extracelular de eucaritos superiores
MnSOD	Mn^{2+}	Homotetrâmero	Matrix mitocondrial em eucariotos
		Homodímero	Bactérias aeróbicas, citoplasmas de alguns fungos

SOD1 é encontrada na forma de homodímero, de aproximadamente 32 kDa, onde cada monômero é constituído por 153 aminoácidos (15.8 kDa), e o gene é localizado no cromossomo 21 (locus 21q22). Cada subunidade é coordenada aos íons Cu^{2+} e Zn^{2+} relacionados com atividade enzimática de SOD1 e estabilidade estrutural, respectivamente. Os monômeros de SOD1 são ligados através de uma ligação dissulfeto estável (figura 4) (BONAFEDE; MARIOTTI, 2017). A dimerização de SOD1 é estabilizada por interações hidrofóbicas na interface dimérica entre os fragmentos complementares de cada monômero (RODRIGUEZ et al., 2002).

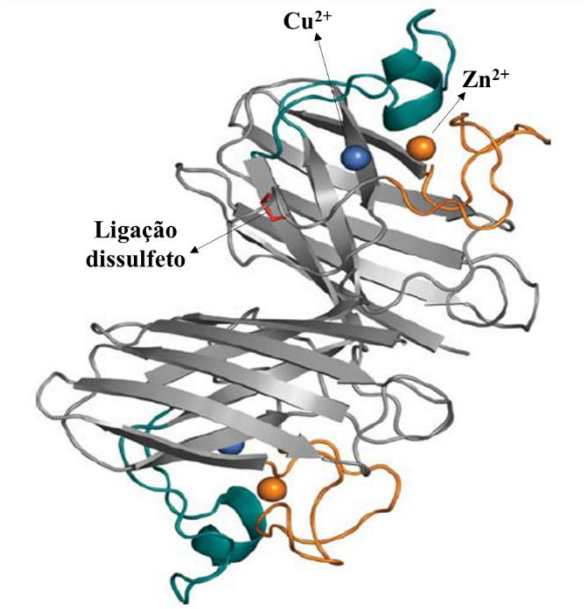


Figura 4. Estrutura cristalina de um monômero de hSOD1 representando os sítios de ligação a Cu(II) e Zn(II), e a ligação dissulfeto. Imagem representativa de um monômero de hSOD1 onde em azul está representado o sítio de ligação ao cátion Cu^{2+}, em amarelo sítio de ligação ao cátion Zn^{2+} e em vermelho sítio da ligação dissulfeto. Adaptado de VALENTINE; DOUCETTE; ZITTIN POTTER, 2005.

SOD1 é umas das enzimas homodiméricas mais termoestáveis conhecidas em organismos mesófilos, e isto está diretamente relacionado com a ligação dissulfeto entre as cisteínas 57 e 146 (Cys57 e Cys146) localizadas na interface dimérica. Essa ligação já mostrou conferir estabilidade da proteína em condições desnaturantes, e sua atividade enzimática é mantida mesmo em soluções contendo 4 % de SDS ou 10 M de uréia (ARNESANO et al., 2004; PARAKH et al., 2013). Além dessa ligação dissulfeto, SOD1 contém dois resíduos de cisteína, Cys6 e Cys11, que aumentam sua estabilidade contra o desenovelamento causado por tratamento a altas temperaturas (TIWARI; HAYWARD, 2003). Estudos feitos com SOD1 na presença de agentes redutores mostraram que a proteína sem ligação ao metal consegue formar o dímero, devido a presença da ligação dissulfeto, porém este não se mantem estável por muito tempo. O mesmo estudo mostrou que adição de íons Zn^{2+} favorece a formação do dímero, ajudando na estabilização do equilíbrio dímero/monômero. Zn^{2+}, mesmo em condições nas quais a ligação dissulfeto se encontrava reduzida, conseguiu manter estável a conformação correta do monômero de SOD1, e assim formar o dímero (ARNESANO et al., 2004).

Zn(II) também exerce papel na atividade enzimática de SOD1, uma vez que sua ligação estabiliza seu sítio catalítico. Estudos têm mostrado que a ausência de ligação a Zn^{2+} além de desestabilizar o dímero, a ligação entre o Cu(II) e a proteína é afetada, reduzindo a atividade enzimática, além de aumentar sua propensão a desenovelar (TRUMBULL; BECKMAN, 2009).

Essa estabilização entre Cu^{2+} e Zn^{2+} está relacionada com o padrão de ligação de hidrogênio que estabiliza a estrutura próxima aos sítios de ligação aos metais. Além de possuir uma ponte de imidazol, os íons Cu^{2+} e Zn^{2+} são ligados por uma ponte de hidrogênio secundária, a qual estabiliza a interação dos íons a estrutura de SOD1. Se ocorre perda da ligação do Zn^{2+}, esta ponte de hidrogênio é quebrada, e a ligação de Cu^{2+} a proteína é desestabilizada (VALENTINE; DOUCETTE; ZITTIN POTTER, 2005). A atividade catalítica de SOD1 está diretamente relacionada a ligação do íon Cu^{2+} ao sítio catalítico da proteína. Esta ligação ocorre através de uma chaperona hCCS, que forma um complexo com a estrutura de SOD1 e é essencial para a finalização na etapa de maturação da proteína. hCCS tem afinidade por íon Zn^{2+}, de forma que estudos mostram que tanto a perda de ligação do Zn^{2+} a SOD1 assim como a ausência desta chaperona inibem a atividade enzimática (WRIGHT; ANTONYUK; HASNAIN, 2016).

Assim como ligação aos íons Cu^{2+} e Zn^{2+}, existem outras modificações pós traducionais que podem ser observadas na estrutura de hSOD1 e que exercem outros papéis importantes para esta proteína. Por exemplo, fosforilação dos resíduos serina 60 e 99 já foram relacionadas com a localização nuclear de SOD1, influenciando na ativação de mecanismos antioxidantes sob indução de estresse oxidativo (TSANG et al., 2014). Fosforilação no resíduo treonina 2 mostrou auxiliar na termoestabilidade de hSOD1, mantendo o equilíbrio monômero/dímero estável mesmo em condições desfavoráveis (FAY et al., 2016). Porém, algumas modificações pós traducionais já foram identificadas como prejudiciais para a estrutura de SOD1, de forma que sua atuação pode alterar propriedades químicas, localização celular e aumentar sua suscetibilidade de formar agregados tóxicos à célula (ARNESANO et al., 2004). Por exemplo, glutationilação na cisteína 111 como consequência do estresse oxidativo, desestabiliza a estrutura dimérica de SOD1, aumentando a concentração de monômeros, o que já foi relacionado como etapa inicial de formação de agregados de SOD1 encontrados em tecidos de pacientes com ELA (FAY et al., 2016; WILCOX et al., 2009).

Polimorfismos genéticos e expressão anormal de SOD1 estão altamente relacionados com algumas doenças humanas, como doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, diabetes, disfunções pulmonares, progeroides, entre outras(CHUNG, 2017). Já foi identificado que SOD1 é altamente expressa em tecidos de câncer de mama, e tem se tentado relacionar esse aumento de expressão com a proliferação dos tumores (PAPA et al., 2014). Estudos usando camundongos como modelo para síndrome de down demonstraram um aumento exacerbado no estresse oxidativo nos tecidos obtidos, o qual pode estar relacionado com o aumento da

expressão de hSOD1 observado (aproximadamente 3 vezes mais do que em condições normais) (CAMPOS; CASADO, 2015; COWLEY et al., 2017).

1.5 hSOD1 E ELA

Aproximadamente 20 % dos casos de ELA familial são relacionados com mutações pontuais no gene *SOD1*(BONAFEDE; MARIOTTI, 2017). Os estudos com mutações em SOD1 relacionadas a ELAf foram iniciados em 1993, quando a primeira mutação, G93A, foi identificada por Rose e colaboradores(ROSEN et al., 1993). Desde então pelo menos 170 diferentes mutações foram identificadas, e caracterizadas por terem efeito na estrutura, atividade ou estabilidade do estado nativo do homodímero de hSOD1 WT (*wilt type*). Essas mutações em geral são resultado de substituições de um único aminoácido ao longo dos 153 resíduos do polipeptídio de hSOD1, mas em alguns casos resultando de inserções, deleções ou truncamento no lado C-terminal da cadeia polipeptídica (SHAW; VALENTINE, 2007). A deleção do gene *SOD1* em camundongos não se mostrou letal, porém houve uma redução na expectativa de vida, aumento nos níveis de mutagênese observados principalmente no fígado, e uma maior incidência para o desenvolvimento de câncer (CHUNG, 2017). Porém, a presença das mutações G93A e G85R em camundongos modelo para estudo de ELA levou a uma alteração na morfologia, transporte e função mitocondrial, o que pode levar a uma falha energética e indução ao estresse oxidativo, fatores observados em tecidos de pacientes de ELAf (VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017).

Apesar de serem mais de 30 anos estudando mutações em hSOD1, ainda não foram identificados os mecanismos pelos quais a presença destas levam a uma morte neuronal. Acredita-se que cada mutação possa estar envolvida de forma diferente, interferindo na estabilidade do estado nativo de hSOD1 ; danificando a ligação aos íons Cu^{2+} e Zn^{2+}ou podem reduzir a carga negativa de sua estrutura (SHAW; VALENTINE, 2007). Todas estas modificações na estrutura podem levar a uma desestabilização do equilíbrio monômero/dímero, formando produtos tóxicos à célula.

As mutações identificadas podem estar localizadas próximas à interface dimérica, aos sítios de ligação ao metal ou nas folhas β (figura 5), o que pode vir a influenciar no papel de cada uma na toxidez da doença (BROOM et al., 2016).

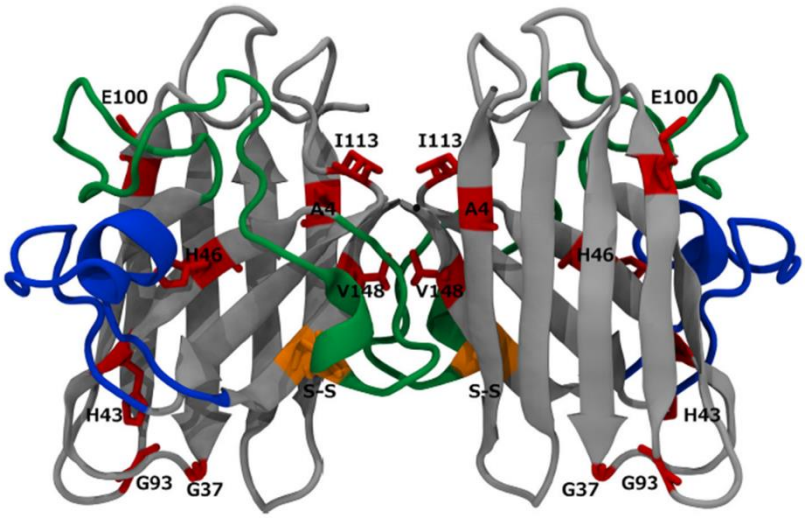


Figura 5. Estrutura característica de um apodímero de hSOD1 e os respectivos sítios de mutação já identificados. Adaptado de (BROOM et al., 2016).

Baseadas principalmente na localização das mutações, existem algumas teorias que tentam explicar como estas mutações em hSOD1 podem levar a neurodegeneração. Antigamente se acreditava que as mutações de certa forma aboliam a atividade enzimática de hSOD1, de forma que frente ao estresse oxidativo não haveria a proteção antioxidante por parte desta enzima, e assim ocorreria o início da morte celular como consequência dos danos oxidativos observados (SACCON et al., 2013). Porém estudos usando modelos de camundongos superexpressando hSOD1-WT na presença de hSOD1 endógena mostrou características de paralisia; em contrapartida, camundongos *knockout* não apresentaram nenhuma característica de ELAf, indicando que a doença não tem relação com perda de função, mas sim com um ganho tóxico. Além disso, em modelos de camundongos expressando hSOD1 mutante foram observados o acúmulo de aglomerados no mesmo tempo que o surgimento de sintomas de paralisia nos animais, sugerindo que a presença destas mutações levam a aglomeração tóxica de hSOD1 (CHUNG, 2017; GALALELDEEN et al., 2009).

Desta maneira, os estudos passaram a ser focados na formação de aglomerados proteicos devido a presença de mutação em hSOD1. A presença de aglomerados de hSOD1 em neurônios de animais modelo, assim como no corno ventral da medula espinhal de pacientes com ELA reforçam a relação entre mutantes de hSOD1 e formação de aglomerados (FAY et al., 2016; KIM et al., 2014). Este processo está diretamente ligado com a estabilidade do dímero de hSOD1, uma vez que estudos têm mostrado que o acúmulo desordenado de monômeros de hSOD1 pode funcionar como um intermediário das etapas de formação de trímeros (os quais já foram identificados podendo ser tão tóxicos quanto os aglomerados (PROCTOR et al., 2016) e

posteriormente, formação de aglomerados. Estudos usando anticorpos específicos para monômeros de hSOD1 confirmaram a sua presença nos aglomerados (FAY et al., 2016; GALALELDEEN et al., 2009). Já foi demonstrado que algumas mutações em hSOD1 desestabilizam o seu estado nativo assim como desestabilizam o homodímero formado, levando a uma reação de agregação dos monômeros acumulados (BASTOW; GOURLAY; TUITE, 2011; SHAW; VALENTINE, 2007).

Acredita-se que a principal causa da formação de aglomerados de hSOD1 seja a perturbação da estrutura quaternária pela redução da ligação dissulfeto (ARNESANO et al., 2004). Já foi demonstrado que mutações características de ELAf em hSOD1 aumentam a suscetibilidade de redução da ligação dissulfeto, desestabilizando sua estrutura dimérica(TIWARI; HAYWARD, 2003). Uma vez que essa ligação é adjacente a interface dimérica, a monomerização de hSOD1 pela presença de mutantes pode aumentar a exposição dos resíduos de cisteína. O grupo tiol presente nestes resíduos é altamente suscetível a modificações oxidativas, que podem contribuir com a formação de agregados. Experimentos envolvendo resíduos de cisteína expostos já mostraram que estes, uma vez modificados pelo aumento do estresse oxidativo, levam a formação de ligações multiméricas, o que pode contribuir com a aglomeração de hSOD1 (ARNESANO et al., 2004).

O dímero de hSOD1 é altamente estável na forma WT, porém já foi demonstrado que mutações em hSOD1 diminuem sua termoestabilidade, favorecendo a formação de monômeros mais estáveis. Já foi comprovado que este aumento na estabilidade monomérica está relacionado com a presença destas mutações e a mudança conformacional que elas promovem, o que leva a exposição de resíduos hidrofóbicos e de cisteínas, dentre elas os resíduos Cys6 e Cys11. Estes resíduos formam uma ligação dissulfeto covalente entre si, promovendo a formação de oligômeros estáveis, que podem vir a formar agregados tóxicos à célula (KIM et al., 2014). Essa desestabilização estrutural relacionada a várias mutações em hSOD1 de certa forma pode sugerir porque mutações em diferentes aminoácidos distribuídas ao longo dos 153 componentes de hSOD1 possuem um fenótipo tão similar entre si, porém distintos do fenótipo observado em hSOD1 WT (RODRIGUEZ et al., 2002).

Estudos recentes têm tentado fazer uma ligação entre a estabilidade das ligações de hidrogênio e o tempo de expectativa de vida de pacientes com mutações em hSOD1 características de ELAf. Simulações de dinâmica molecular têm mostrado que algumas mutações em hSOD1 que possuem as ligações de hidrogênio comprometidas apresentam uma

estrutura mais flexível que a observada em WT, o que pode ajudar a formação de aglomerados. Estes estudos têm sido feitos em mutações que não possuem a ligação dissulfeto prejudicada, assim como as ligações aos metais modificadas em relação a WT, porém com tempo de desenvolvimento da doença rápido (ALEMASOV et al., 2017, 2018).

Estudos estruturais e histológicos dos aglomerados detectados em cérebros e medula de camundongos hSOD1 mutante identificaram estruturas complexas de alto peso molecular, que se acumulam a medida que há progressão da doença. Os estudos mostraram a presença de estruturas fibrilares de tamanho intermediário (aproximadamente 15 nm de diâmetro), esféricas e amorfas. Também foi demonstrado que alguns aglomerados detectados exibem inclusões positivas no teste da tioflavina S, sugerindo uma estrutura β-amilóide (SHAW; VALENTINE, 2007; TIWARI; HAYWARD, 2003). Estudos *in vitro* com agregados de hSOD1 obtidos a partir do cérebro de camundongos hSOD1 mutantes são resistentes a detergentes além de possuírem proteínas de hSOD1 sem ligação a metal, sugerindo que a inibição de ligação aos íons Cu^{2+} e Zn^{2+} faz com que a hSOD1 adquira propriedades tóxicas. Também foi demonstrado que fibras amilóides de hSOD1 em condições desnaturantes induzem a expressão de citosinas em células mononucleares, causando inflamação, característica já detectada em doenças neurodegenerativas (CHAN et al., 2013).

Além de se entender o mecanismo por trás da formação dos aglomerados de hSOD1 mutante e sua estrutura, é interessante compreender como sua presença nos neurônios modificam o funcionamento do metabolismo, levando à degeneração. Existem várias hipóteses a respeito disto, como a formação de ligações anormais dos aglomerados com os reguladores de apoptose, inibição do proteassomo, perturbações nas funções mitocondriais e na homeostase de Ca^{2+}, aumento tóxico do acúmulo de glutamato, dentre outras (SHAW; VALENTINE, 2007). Além disso, é importante entender como cada mutação influencia na toxidez, principalmente porque estudos na literatura têm demonstrado que diferentes mutações podem se comportar de formas diferentes.

Dentre as mutações já identificadas, os estudos têm se focado em mutações nas posições A4 e G93. Geralmente mutações na região A4 (A4V, A4T e A4S) são caracterizadas por progressão rápida da doença. Dentre elas a mutação A4V (GCC → GTC, no exon 1) é a mais comum, e mais estudada, principalmente por apresentar uma expectativa de vida em torno de 1.5 anos, e é responsável por 50 % dos casos de ELAf identificados na América do Norte. Mutações na região A4 ficam localizadas na primeira fita β que faz parte da interface dimérica,

de forma que mutações nesta região podem levar a uma desestabilização do dímero uma vez que elas internalizam esta fita no núcleo hidrofóbico do monômero de hSOD1 (GALALELDEEN et al., 2009; SAEED et al., 2009).

Devido à sua localização na interface dimérica, A4V é uma mutação relacionada com a desestabilização do dímero hSOD1, tendo uma propensão a formar monômeros estáveis. Apesar de apresentar coordenação aos metais Zn e Cu, além de manter atividade enzimática semelhante a WT, a presença desta mutação diminui a temperatura de fusão de hSOD1, mostrando que mesmo que a mutação mantenha algumas interações estruturais semelhantes a WT, ela diminui a termoestabilidade da proteína (RODRIGUEZ et al., 2002). Esta baixa termoestabilidade pode estar relacionada com uma provável redução na ligação dissulfeto na estrutura de hSOD1 A4V. A adição de uma ligação dissulfeto na estrutura da mutante aboliu totalmente a formação de aglomerados que é sempre observada nesta mutação (GALALELDEEN et al., 2009). Além disto, recentemente foi demonstrado que a introdução de um sítio de fosforilação mimética do resíduo treonina2 (sítio relacionado com o equilíbrio monômero/dímero) em mutantes A4V também diminuiu a formação de aglomerados nesta mutante, sugerindo que a toxidez relacionada a esta mutação se deve a desestabilização do dímero de hSOD1, levando a um acúmulo dos monômeros (FAY et al., 2016).

Existem 6 mutações na região G93 já identificadas (G93A, G93C, G93D, G93R, G93S e G93V), onde G93A é a mais estudada. Assim como a mutação A4V, pacientes com esta mutação apresentam curta expectativa de vida, em torno de 3 anos. A posição G93 é localizada no loop V curto que conecta duas fitas β antiparalelas. Mutações nesta posição são relacionadas com a desestabilização do barril β, interferindo no empacotamento dos resíduos que formam o pool apolar encontrado na região terminal do barril β (GALALELDEEN et al., 2009). Estudos usando métodos de RMN identificaram que os loops III e V em hSOD1-G93A apresentaram maior mobilidade que o observado em hSOD1-WT. Acredita-se que isso leva a uma maior mobilidade da estrutura β barril, aumentando a probabilidade de se iniciar um mecanismo de fibrilogênese através de interações SOD1-SOD1 não nativos, tóxicos à célula (GALALELDEEN et al., 2009).

1.6 MODELOS DE ESTUDO DE ELA

Entender quais mecanismos celulares são afetados, e assim como ocorre o progresso de doenças é de suma importância para o desenvolvimento de tratamentos que possam prevenir,

retardar o progresso ou até mesmo curar. Para isto, diferentes modelos celulares são empregados, nos quais tenta-se mimetizar as condições reais da doença, como por exemplo, expressão de genes mutantes já caracterizados em ELA, a fim de verificar como a presença destas mutações podem estar modificando mecanismos celulares essenciais para a proliferação celular. Ou deleção de genes importantes para defesa antioxidante que possam estar envolvidos na neurodegeneração. A figura 6 exemplifica alguns dos modelos que têm sido mais usados no estudo de ELA nos últimos anos.

Assim como qualquer modelo experimental, cada um dos exemplos apresentam vantagens e desvantagens. Por exemplo, o uso de células tronco pluripotentes tem se mostrado bastante promissor para o estudo mais aprofundado de ELA. Estas células podem ser geradas introduzindo genes pluripotentes em células derivadas de pacientes com a doença. Assim são geradas células troncos pluripotentes com características de ELA, e que podem ser diferenciadas em neurônios motores para poder estudar tipos celulares específicos. Isto faz com que sua principal vantagem frente aos demais modelos seja a perda da necessidade da superexpressão de genes que contenham mutações patogênicas de ELA, além de possuir mutações em genes que possam ser específicos do paciente, de forma que facilita o entendimento das modificações no contexto mais próximo ao observado (VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017). Alguns estudos de mutações em genes ligados a ELA já foram publicados usando como modelo experimental células tronco pluripotentes, dentre eles, estudos com a mutação A4V em hSOD1. Estes estudos mostraram como esta mutação pode interferir no funcionamento dos canais de potássio, e de certa forma estar relacionada com hiperexcitabilidade observada em células com esta mutação(WAINGER et al., 2014). Como pode ser observado na figura 6, uma das maiores desvantagens é o alto custo do uso deste modelo.

	Levedura	*Caenorhabditis elegans*	Drosófila	Peixe-zebra	Ratos, Camundongos	Derivados de iPSC, neurônios
Ciclo de vida	Rápido	Rápido	Rápido	Intermediário	Lento	N/A
Expectativa de vida	Curto	Curto	Curto	Longo	Longo	N/A
% genes com homólogos humanos	30 %	35 %	75 %	> 90 %	100 %	100 %
Conservação de proteínas	26 %	35 %	40 %	75 %	85 %	100 %
***Screening* genético**	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Futuro próximo
***Screening* de compostos**	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Custo	Baixo	Baixo	Baixo	Intermediário	Alto	Alto
Publicações em ELA	84	77	184	62	>4500	153

Figura 6.Modelos usados para estudo de ELA. Vantagens e limitações de alguns modelos usados para o estudo de ELA. N/A: não aplicável. Adaptado de (VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017)

Outros modelo usado é a *Drosofila melanogaster*, drosófila ou, popularmente conhecida como mosca da fruta. Possuí 75 % dos genes com um homólogo funcional humano, fazendo com que seja um modelo bastante interessante para estudar ELA. Existem modelos de drosófila que superexpressam genes WT ou mutantes relacionados com ELA, dentre eles *SOD1*. Usando estes modelos de drosófila expressando hSOD1 mutantes já foi comprovando como a presença destas mutações induz uma toxidez celular. Porém, por possuir uma expectativa de vida baixa, isto acaba limitando o tempo de experimento, não podendo simular uma condição de envelhecimento celular, por exemplo, importante no entendimento de ELA. Assim como drosófila, o uso de *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) como modelo de estudo tem como desvantagem a baixa expectativa de vida. Porém, por ser facilmente manipulada geneticamente, também tem sido usada como modelo de estudo de ELA (VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017).

Outro modelo que tem ajudado a obter resultados interessantes é o de peixe zebra. É um modelo que pode ser usado principalmente para *screening* de compostos candidatos para

desenvolvimento de terapias contra ELA. Além disto, usando este modelo foi demonstrado um possível ganho de função em hSOD1 mutantes (VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017).

No trabalho aqui apresentado foram usados dois modelos celulares diferentes: células de neuroglioma (H4) e da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, como é mostrado a seguir.

1.6.1. Células de neuroglioma, H4

Células de neuroglioma, H4, têm sido bastante usadas nos estudos de variados tipos de doenças, dentre elas doenças neurodegenerativas. Fazem parte do grupo das linhagens consideradas "linhagens celulares imortalizadas" (que não são mais células primárias). Possuem como vantagens rápida proliferação, fácil manutenção em laboratório e permite estudo em larga escala (LÁZARO; PAVLOU; OUTEIRO, 2017), além de facilitarem o estudo de *screening* da ação de compostos que possam ser usados no tratamento de doenças neurodegenerativas. Estudos com esta linhagem são de suma importância, e já foram usadas para entender melhor, por exemplo, o efeito de mutações características de doença de Parkinson na formação de aglomerados de α–sinucleína (LÁZARO et al., 2016), assim como estudos envolvendo danos neuronais, apoptose, e consequências do aumento da concentração intracelular de EROS, levando a um estresse oxidativo (CHENG et al., 2018).

Apesar de ser um modelo humano, portanto os resultados obtidos são mais próximos dos que seriam observados se os experimentos fossem feitos com tecidos de pacientes com ELA, assim como qualquer modelo, o uso de células H4 apresenta algumas desvantagens. Para o estudo de ELA e mutações na proteína hSOD1, as principais limitações do modelo são:

- Presença de SOD1 endógena. Por ser m modelo de célula animal, não é de fácil manipulação genética, de forma que a obtenção de células H4 que não expressem SOD1 endógena teria que ser feita através de métodos complexos (tais como uso de RNA de interferência ou metodologia CRISPR). Desta forma, em todos os resultados obtidos com células H4, a presença de SOD1 endógena deve ser levada em consideração, uma vez que a mesma pode influenciar nas respostas apresentadas.

- O meio de cultivo de célula animal não é seletivo, de forma que não se consegue trabalhar apenas com as células que foram transfectadas com plasmídeos que expressem as mutações de interesse.

1.6.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Um modelo celular que tem sido amplamente utilizado no estudo de doenças humanas é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Este organismo eucarioto, unicelular tem sido usado há mais de 100 anos como modelo para o melhor entendimento das bases metabólicas, principalmente por apresentar alguns mecanismos bioquímicos conservados semelhantes aos observados em células de eucariotos superiores (OCAMPO; BARRIENTOS, 2011; SIGGERS; LESSER, 2008). Além de ser um organismo não patológico, de fácil manipulação genética, e ter condições de crescimento mimetizáveis em laboratório, em 1988 foi publicado um artigo no qual se mostrava que a expressão heteróloga de proteínas humanas em levedura poderia ser uma ferramenta de grande importância no estudo das funções de proteínas humanas (SIGGERS; LESSER, 2008).

Uma das principais características de células de levedura que fazem com que este modelo seja de grande interesse é o seu crescimento celular, que pode ser tanto fermentativo, quanto respiratório. Células de *S.cerevisiae* crescendo em meio rico em glicose, estão sob o efeito da repressão catabólica, a qual não permite a expressão de algumas proteínas relacionadas com a respiração, de forma que as células crescem sob metabolismo fermentativo, mesmo na presença de moléculas de O_2. O crescimento fermentativo é de grande interesse pelo fato de que nesta fase do crescimento celular, células de levedura não estão sob efeito de nenhum tipo de estresse, inclusive estresse oxidativo. Tratamentos com H_2O_2 e menadiona (agentes oxidantes), por exemplo, são usados para induzir estresse oxidativo, e bastante úteis para o melhor entendimento dos mecanismos celulares de proteção antioxidante. Entretanto, quando a glicose no meio se torna escassa, a repressão catabólica é cessada, e as proteínas relacionadas a respiração celular expressas, de forma que o metabolismo passa a ser respiratório. Desta maneira, mecanismos por trás das respiração celular podem ser estudados com células de levedura que não estão mais sob efeito da repressão catabólica, ou que foram cultivadas em meio não repressor, como por exemplo, meios ricos em glicerol (ELEUTHERIO et al., 2017).

Desde que todo seu genoma foi sequenciado, vários genes de levedura identificados já foram validados com sucesso em modelos superiores, além de 30 % dos genes possuírem um homólogo humano (VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017). Além disto,

células de *S.cerevisiae* possuem vários mecanismos de repostas contra estresse (estresse oxidativo, por exemplo) ou de controle de qualidade de proteínas desenoveladas semelhantes aos existentes em eucariotos superiores, o que enfatiza seu uso como modelo para estudo de parâmetros do metabolismo humano (BASTOW; GOURLAY; TUITE, 2011). O uso de levedura tem fornecido informações importantes nos mecanismos básicos celulares referentes ao desenovelamento proteico (DUENNWALD, 2013).

S.cerevisiae vem sendo usada para o estudo de diversas doenças humanas, dentre elas doenças neurodegenerativas, uma vez que se sabe que 25 % dos genes humanos relacionados à neurodegeneração possuem homólogos em levedura (ELEUTHERIO et al., 2017). Na literatura existem vários trabalhos usando levedura *S.cerevisiae* como modelo para o entendimento das bases moleculares por trás de doenças como Parkinson (LÁZARO et al., 2014), Alzheimer (FRANÇA; LIMA; ELEUTHERIO, 2017) e ELA (BRASIL et al., 2013).

Assim como citado anteriormente, o usa da levedura tem contribuído para o melhor entendimento dos mecanismos por trás da patologia de ELA. Por exemplo, ensaios de crescimento celular já identificaram algumas proteínas relacionadas à doença que causam defeito no crescimento celular, servindo como um *screening* de fenótipo (VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017). Além disso, através da manipulação genética de células de levedura, pode-se identificar mecanismos importantes relacionados com o maquinário do enovelamento proteico, resposta ao estresse oxidativo gerado durante a progressão de ELA, e entender o que mutações em determinados genes causam no metabolismo, que tem como consequência o início da degeneração celular observada na doença (BASTOW; GOURLAY; TUITE, 2011).

A figura 7 apresenta as principais vantagens do uso de *S.cerevisiae* como modelo de estudo de doenças humanas.

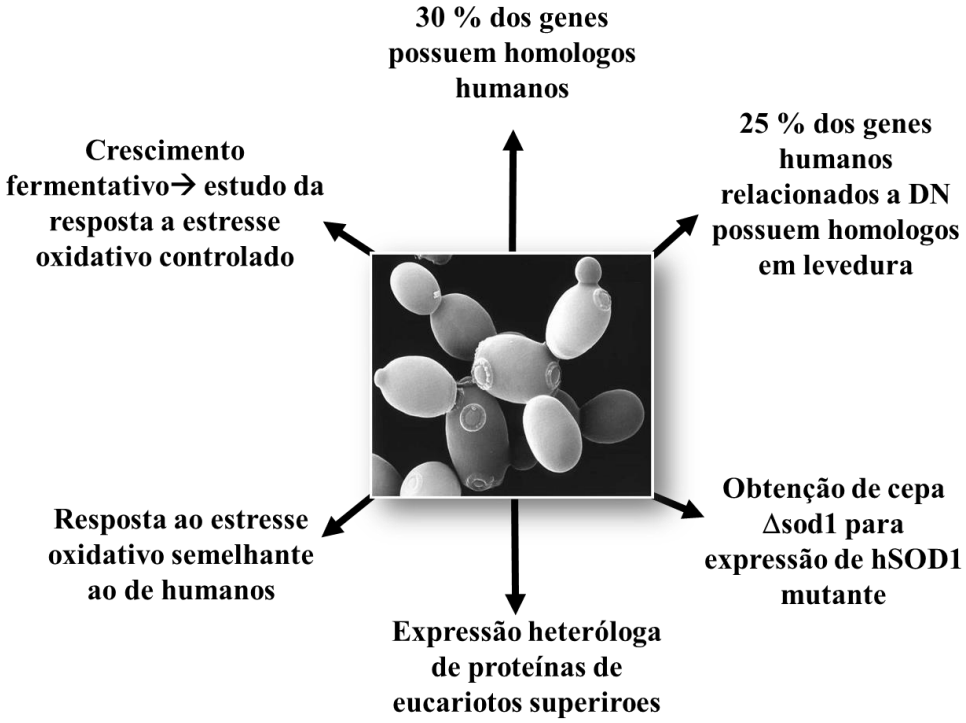


Figura 7. Vantagens do uso de *S.cerevisiae* para o estudo de mecanismos moleculares relacionados à doenças neurodegenerativas

Apesar de apresentar inúmeras vantagens, assim como qualquer modelo, o uso de *S.cerevisiae* também apresenta desvantagens, principalmente sua baixa percentagem e genes homólogos a humanos, e sua baixa conservação proteica (quando comparados com outros modelos, figura 6). Desta forma, geralmente experimentos com levedura são usados para gerar hipóteses que possam ajudar a focar estudos em certos pontos mais interessantes, e seus resultados serem validados por outros modelos, tais como drosófila, ou modelo de célula animal (VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017).

-Importância do uso de levedura para o estudo de ELA e mutações na proteína hSOD1

Uma das vantagens de se trabalhar com células de *S.cerevisiae* é a fácil obtenção de cepas deficientes em SOD1 endógena (Δ*sod1*) e expressão de SOD1 humana WT e mutantes, de forma que os resultados obtidos a partir de experimentos feitos com estas cepas são diretamente consequência da expressão de SOD1 humana.

Além disto, células de levedura cultivadas em meio rico em glicose possuem um crescimento tanto fermentativo, quanto respiratório, como explicado anteriormente. Sabendo desta capacidade de crescimento por duas vias metabólicas, é possível estudar como as

mutações em hSOD1 podem influenciar no papel antioxidante desta proteína frente um estresse oxidativo induzido, como por exemplo, pelo tratamento com agentes oxidantes, tais como menadiona.

Além do que, meio de cultivo de células de levedura é seletivo, de forma que se consegue selecionar apenas as células Δsod1 que estejam expressando a proteína hSOD1 WT e mutantes. Desta forma, se garante que os resultados obtidos são diretamente relacionados com a hSOD1, sem sofrer interferência de Sod1p endógena, além de poder se fazer ensaios de viabilidade, por exemplo, com as mesmas cepas.

1.7 O SISTEMA FLUORESCENTE BiFC

O entendimento dos processos celulares é de suma importância no desenvolvimento de tratamentos contra variadas doenças, dentre elas as doenças neurodegenerativas. Dentro de tais processos, estudar a fundo as funções, interações e a estrutura de determinadas proteínas pode levar a respostas sobre o mecanismo pelo qual ocorre a formação de aglomerados proteicos, por exemplo, tão presentes nas doenças neurodegenerativas. Para visualização das interações proteicas e formação de aglomerados um sistema que tem crescido no interesse de variados grupos de pesquisa é o BiFC.

O ensaio BiFC (do inglês *Bimolecular fluorescence complementation*) consiste na reconstituição de uma proteína fluorescente quando dois fragmentos não fluorescentes complementares reagem entre si através da interação de duas proteínas (figura 8) (OHASHI; MIZUNO, 2014). Foi desenvolvida em 1994, quando foi demonstrado *in vitro* a eficiência da proteína GFP no ensaio de complementação, no qual duas proteínas antiparalelas zippers leucina de *Escherichia coli* fusionadas a dois fragmentos não fluorescentes de GFP, interagiram e emitiram fluorescência(KODAMA; HU, 2012).

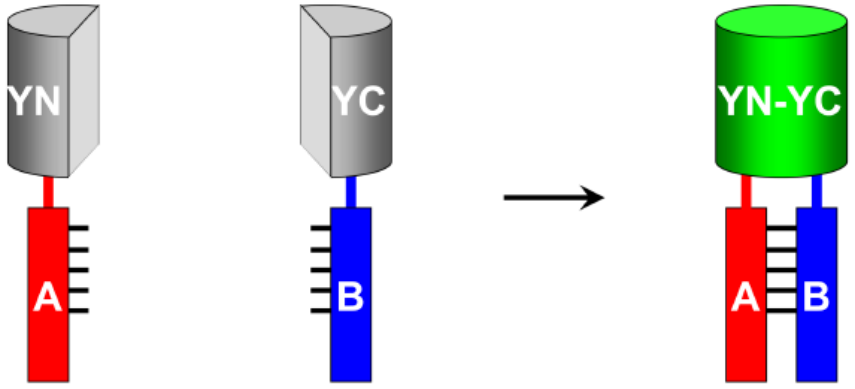


Figura 8. Representação esquemática do sistema BiFC. A proteína A (vermelho) está fusionada a um fragmento N-terminal não fluorescente (YN) de uma proteína fluorescente Y. A proteína B (Azul) está fusionada a um fragmento C-terminal não fluorescente (YC) da mesma proteína Y fluorescente. Quando a proteína A interage com a proteína B, os fragmentos YN e YC interagem, regenerando a proteína fluorescente YN-YC(Verde), que passa a emitir fluorescência. Adaptado de (KERPPOLA, 2008)

A geração dos fragmentos complementares requer estudos aprofundados sobre a proteína fluorescente que será usada, para não comprometer os sítios de formação do fluoróforo, e por sua vez a emissão de fluorescência. Cada fragmento da proteína fluorescente tem que possuir o lado amino-terminal (YN) e o lado carboxi-terminal (YC) livres, de forma que quando estes interajam, haja a regeneração da proteína fluorescente. A estrutura de proteínas fluorescentes basicamente consiste de 11 fitas β antiparalelas formando um barril β, contendo uma α hélice dentro e várias estruturas helicoidais. O fluoróforo localizado na α hélice é quimicamente formado por 3 resíduos (Ser65, Tyr66, Gly67) ((KODAMA; HU, 2012). É de grande importância garantir que a regeneração da fluorescência seja devido a interação entre as duas proteínas que estão ligadas covalentemente aos fragmentos não fluorescentes, de maneira que o ensaio meça a interação entre as proteínas alvos (HU; CHINENOV; KERPPOLA, 2002).

Após a regeneração da estrutura da proteína fluorescente, o fluoróforo deve ser formado, através de uma reação de ciclização autocatalítica, que é ativada pelo enovelamento da proteína fluorescente (HU; CHINENOV; KERPPOLA, 2002). Este processo também é conhecido como maturação e consiste de duas etapas: enovelamento e formação do fluoróforo. Uma vez que os dois fragmentos da proteína interagem, a proteína ativa o processo de enovelamento na sua conformação nativa, de forma que um tripeptídio interno cicliza e é oxidado. Ao mesmo tempo, a medida que a conformação nativa é reestruturada, o fluoróforo maturado é internalizado na região barril β, resultando na recuperação da sua estrutura e pronta para ser oxidada e emitir fluorescência (NAGAI et al., 2002; TSIEN, 1998).

Acredita-se que qualquer proteína fluorescente possa ser usada para geração dos fragmentos não fluorescentes usados no ensaio. Desde o desenvolvimento desta técnica com GFP, várias outras proteínas já foram usadas no sistema BiFC, principalmente para aprimorar o ensaio. Alguns problemas no ensaio foram surgindo, à medida que este foi sendo mais usado, dentre eles o processo lento de maturação, *background* muito evidente, e associação dos dois fragmentos complementares independente da interação entre as proteínas, levando a uma fluorescência falsa-positiva (KODAMA; HU, 2012; NAGAI et al., 2002). A fim de se contornar estes problemas, mutações têm sido implementadas, gerando proteínas fluorescentes mais eficientes para seu uso no BiFC, dentre elas a proteína vênus.

A proteína vênus é uma proteína da família YFP, foi inicialmente modificada em 2002. Possui 5 mutações em sua estrutura, onde a mutação F46L foi introduzida para acelerar a etapa de oxidação do fluoróforo a 37 ºC, e as demais mutações (F64L/M153/V163A/S175G) aprimoram o processo de enovelamento da proteína (NAGAI et al., 2002). É bastante resistente à soluções ácidas e básicas, assim como mantem sua função em diferentes faixas de temperatura, além de ter o menor *background* entre as proteínas usadas no BiFC (KODAMA; HU, 2012). Por conta de suas vantagens, tem sido a proteína mais usada em trabalhos científicos envolvendo o sistema.

Assim como qualquer técnica, o sistema BiFC possuí vantagens tais como (HU; CHINENOV; KERPPOLA, 2002; KERPPOLA, 2006):

- Visualização direta das interações entre as proteínas;

- Já que as células podem ser analisadas *in vivo*, não precisam ser tratadas com substâncias para fixá-las (como paraformaldeído), ou para lise celular;

- Ao usar proteínas fluorescentes estáveis a diversas condições de cultivo, como a proteína vênus, as interações podem ser visualizadas no meio biológico normal, de forma que a expressão das proteínas fusionadas ao BiFC podem ser comparadas com as proteínas endógenas;

- Os dados obtidos pelo sistema BiFC não requerem processamentos complexos para suas análises.

Porém, o ensaio possui várias desvantagens que devem ser consideradas ao se escolher o sistema BiFC como fonte de estudo, por exemplo (KERPPOLA, 2006; KODAMA; HU, 2012):

- Recentemente foi demonstrado que em alguns sistemas BiFC o processo de regeneração da proteína fluorescente é irreversível. Esta característica acaba limitando o uso do sistema para o estudo de interações fracas entre proteínas, e diminuindo seu uso para estudo de interações dinâmicas;

- O tempo de maturação do fluoróforo pode interferir na detecção em tempo real de interações que sejam formadas rapidamente;

- Os fragmentos da proteína fluorescente possuem uma grande afinidade um pelo outro, de forma que podem ocorrer interações entre eles independente da interação entre as proteínas às quais estão fusionadas.

Apesar das desvantagens apresentadas, o uso do BiFC em variados modelos celulares tais como célula humana, planta, levedura (por exemplo *Candida albicans* e *S.cerevisiae*) (HU; CHINENOV; KERPPOLA, 2002; SUBOTIĆ et al., 2017; SUNG; HUH, 2007) tem fornecido informações importantes sobre proteínas. Visualização de agregados proteicos, estudo aprofundado do enovelamento e topologia proteica, mudanças conformacionais, e ainda a interação de complexos multiproteicos (BiFC com mais de uma proteína fluorescente), tem sido informações obtidas com mais rapidez e mais precisão com o auxílio do sistema BiFC.

2 OBJETIVOS

2.1. GERAL

Investigar os mecanismos moleculares envolvidos na ELAf ligada a mutações em SOD1, especificamente A4V, L38V, G93A e G93C, usando células de neuroglioma e de *Saccharomyces cerevisiae* como modelos de estudo.

2.2 ESPECÍFICOS

1) Analisar e quantificar a formação de aglomerados em células de neuroglioma expressando hSOD1 mutante fusionadas à proteína fluorescente Vênus (sistema BiFC), através de microscopia de fluorescência.

2) Determinar a localização de hSOD1 mutante em células de neuroglioma, através do sistema BiFC e microscopia de fluorescência.

3) Avaliar o efeito das mutações na manutenção do equilíbrio redox intracelular e na proteção contra danos ao DNA, em células de neuroglioma.

4) Determinar a atividade enzimática de SOD1 humana mutante sob indução de estresse oxidativo em células de *S.cerevisiae* que não expressam Sod1p de levedura.

5) Verificar a tolerância a estresse oxidativo de células de *S.cerevisiae* expressando hSOD1 mutantes.

6) Avaliar o efeito das mutações na manutenção do equilíbrio redox intracelular e na proteção contra danos, em células de *S.cerevisiae* sob estresse oxidativo.

7) Analisar a formação de aglomerados em mutantes hSOD1 fusionadas ao sistema BiFC em células de *S.cerevisiae* sob estresse oxidativo

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EXPERIMENTOS COM CÉLULA ANIMAL

3.1.1 Meio de cultivo e transfecção

Células H4 (neuroglioma) eram mantidas em incubadora a 37ºC / 5 % de CO_2 e cultivadas em meio DEMEM (*Dulbecco´s Modified Eagle Medium*), suplementado com soro bovino fetal 10 % e penicilina estreptomicina 1 %. As células eram cultivadas em placas de 12 poços, em uma concentração de 75.000 células/mL de meio/poço.

As células eram transfectadas pelo método de Fosfato de Cálcio. Antes de iniciar o protocolo de transfecção, a confluência das células era verificada em microscópio, e 1 mL de meio inicial substituído por 500 μL de meio fresco. Após aproximadamente 2 horas na incubadora a 37ºC/ 5 % de CO_2, eram adicionados a cada poço uma mistura contendo 36 μL de tampão HBS (HEPES *Buffer Saline*- para aproximadamente 100 mL de tampão, adição de 0.5 g de HEPE (*organic chemical buffering agent*); 0.8 g NaCl; 0.1 g glicose; 0.37 g KCl; 1 mL de Na_2HPO_4); 2.1 μL de $CaCl_2$ 2.5 M e 8 μg de DNA plasmideal total (4 μg de DNA plasmideal VN e 4μg de DNA plasmideal VC). Após adição da mistura, a placa era deixada na incubadora a 37ºC/ 5 % de CO_2, por aproximadamente 48 horas. Para confirmar que a transfecção tinha sido realizada com sucesso, após 24 e 48 horas, as células eram verificadas em microscópio de fluorescência, observando a quantidade de células fluorescentes.

Para cada transfecção eram obtidas 5 células H4 diferentes, listadas na tabela 4. Os plasmídeos usados para transfecção foram obtidos no laboratório (figuras 9 e 10).

Tabela 4 Células obtidas por transfecção de células H4 com plasmídeos VN-hSOD1 e hSOD1VC

Célula	Descrição
WT	Células H4 transfectadas com plasmídeo VN-hSOD1WT e plasmídeo hSOD1WT-VC
A4V	Células H4 transfectadas com plasmídeo VN-hSOD1A4V e plasmídeo hSOD1A4V-VC
L38V	Células H4 transfectadas com plasmídeo VN-hSOD1L38V e plasmídeo hSOD1L38V-VC
G93A	Células H4 transfectadas com plasmídeo VN-hSOD1G93A e plasmídeo hSOD1G93A-VC
G93C	Células H4 transfectadas com plasmídeo VN-hSOD1G93C e plasmídeo hSOD1G93C-VC

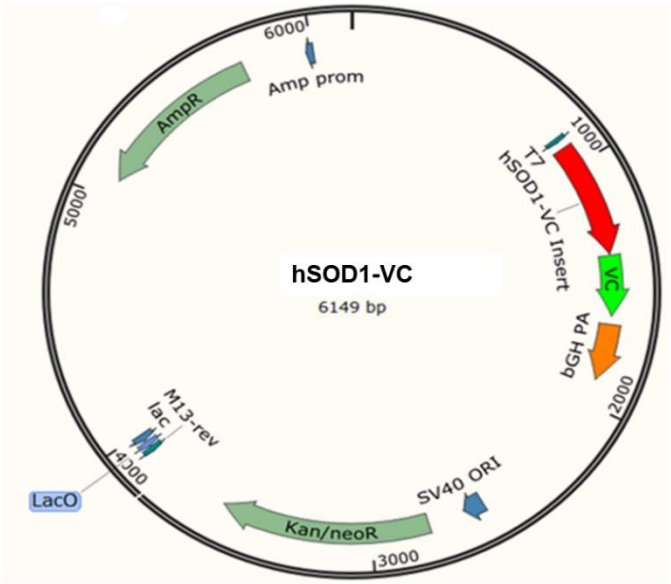


Figura 9. Mapa do vetor empregado para clonagem de células H4 expressando hSOD1WT ou mutantes fusionadas ao fragmento VC da proteína vênus. Plasmídeo com a sequência de SOD1 humana WT ou mutante e com a sequência do fragmento C-terminal da proteína vênus(BRASIL et al., 2018)**.**

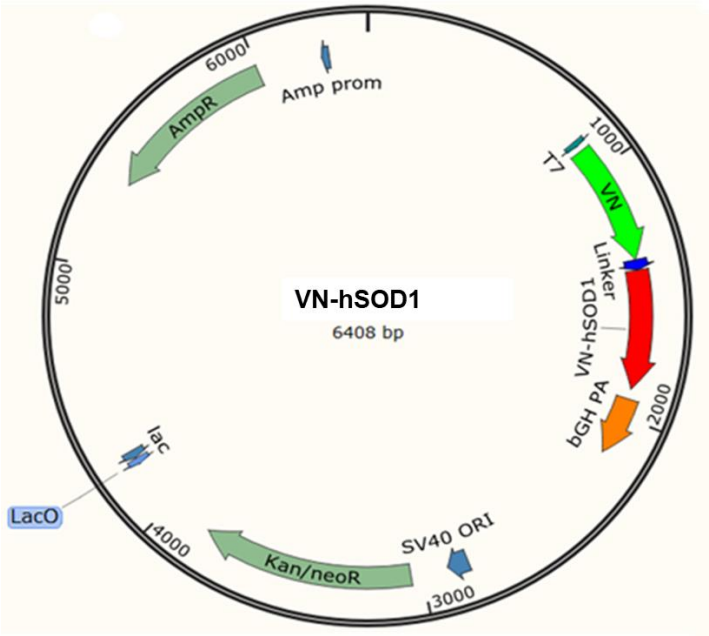


Figura 10. Mapa do vetor empregado para clonagem de células H4 expressando hSOD1WT ou mutantes fusionadas ao fragmento VN da proteína vênus. Plasmídeo com a sequência de SOD1 humana WT ou mutante e com a sequência do fragmento N-terminal da proteína vênus(BRASIL et al., 2018)**.**

Para visualização do compartimento JUNQ, as células eram transfectadas com os plasmídeos anteriormente citados e com 4 μg de DNA plasmideal VHL-mCherry. Para melhorar a visualização da proteína VHL-mCherry no JUNQ, após 48 h de transfecção, as células eram incubadas com inibidor de proteassomo MG132 10 μM por 7 horas, em meio fresco.

3.1.2 Localização e formação de aglomerados

Após 48 horas de transfecção, as células eram lavadas com tampão DPBS (Dulbecco´s tampão fosfato salino), e fixadas com 400 μL de solução 4 % (v/v) de PFA (paraformaldeído), por 20 minutos a temperatura ambiente. As células eram então lavadas três vezes com DPBS e incubadas com solução de Hoechst - pH 7.4, 25 mg/mL- (33258, Life Technologies-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), por aproximadamente 10 minutos. As células eram então lavadas novamente com DPBS, e deixadas em água para visualização em microscópio. As imagens foram obtidas com microscópio Leica DMI 6000B (Leica, Alemanha), com objetiva de 40 x.

Para quantificação da intensidade fluorescente no núcleo e no citoplasma, as imagens obtidas foram analisadas no software Image J (http://rsweb.nih.gov/ij/). Para cada imagem,

núcleo e citoplasma eram selecionados e as respectivas intensidades medidas. Em cada unicata, eram analisadas 50 células diferentes.

Para determinação do perfil de formação de aglomerados, em cada unicata foram analisadas 50 células diferentes, e o número de células com aglomerados foram divididas em três grupos: células sem aglomerados; células com menos de 5 aglomerados; células com número de aglomerados entre 5 e 10.

3.1.3 Expressão de hSOD1 por Western Blotting

3.1.3.1 Extração e dosagem de proteína

Após 48 horas de transfecção, as células eram lavadas com DPBS e tratadas com tampão de lise RIPA (*radioimmunoprecipitation assay*- 50 mM Tris pH 8.0, 0.15 M NaCl, 0.1 % (m/v) SDS, 1.0 % NP40 (v/v), 0.5 % (m/v) Na-deoxicolato), acrescido com 2 mM EDTA e coquetel de inibidor de protease (um tablete/10 mL- Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), por 10 minutos/ 4ºC. O lisado era então transferido para eppendorf e mantido em gelo por aproximadamente 1 hora. O sobrenadante era então recolhido por centrifugação em centrífuga *full speed*, 4ºC, 10 minutos, e estocado a -20 ºC. A concentração de proteína por extrato era determinada pelo método de Bradford (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA).

3.1.3.2 Condições de eletroforese

30 μg de proteína eram tratadas com tampão de proteína (125 mM de 1M Tris HCl pH 6.8, 4.0 % (m/v) SDS, 0.5 % (m/v) azul de bromofenol, 4 mM EDTA, 20 % (v/v) glicerol, 10 % (v/v) β-mercaptoeanol), por 5 minutos a 95 ºC, com agitação. A amostra era então aplicada em gel SDS-poliacrilamida 15 % (m/v) (SDS-PAGE), por aproximadamente 80 minutos, sob voltagem constante de 120 V, submerso em tampão de corrida SDS Tris-Glicina 0.5 % (m/v) (250 mM Tris, 200 mM Glicina, 1 % (m/v) SDS, pH 8.3).

3.1.3.3 Transferência das proteínas para membrana de PVDF e bloqueio dos sítios livres da membrana

Após o término da separação da amostra, a transferência para membrana de PVDF era feita usando o sistema TransBlot Turbo Transfer System (Biorad, Hercules, CA, USA), com corrente constante de 0.3 A, por 30 minutos. A membrana era então mantida em solução

bloqueadora de BSA (*bovine serum albumine*) 4 % (m/v) em TBS-Tween (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05 % (v/v) Tween, pH 7.5) por aproximadamente 60 minutos.

3.1.3.4 Incubação com anticorpo primário e anticorpo secundário

A solução bloqueadora era então substituída por uma nova solução contendo anticorpo anti-hSOD1 1:2000 (sc-8637 Santa Cruz Biotechnology, INC) e anti-γ-tubulina 1:5000 (T5326, produzido por Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) em BSA/TBS-Tween 4 % (v/v). A membrana era mantida a 4 ºC, sob agitação leve, *overnight*.

A membrana era então lavada 3 vezes com solução TBS-Tween, e incubada por 1 hora com solução BSA/TBS-Tween 4 % (v/v) contendo anti-mouse IgG e anti-goat IgG conjugado com peroxidase (GE Healthcare, Bucks, UK) numa proporção de 1:6000.

3.1.3.5 Revelação da membrana e análise da imagem

A membrana era primeiramente lavada 3 vezes com solução de TBS-Tween. Para detecção das bandas na membrana, uma mistura composta com reagente luminol e solução de peróxido (Millipore, Billerica, MA, USA), era adicionado à membrana 1 minuto antes desta ser analisada por Fusion FX (Vilber Lourmat, Collégien, France). A intensidade de cada banda detectada foi determinada usando software Image J (NIH, Bethesda, MD, USA), e normalizada usando como padrão a banda referente a γ-tubulina.

3.1.4 Imunocitoquímica

Após 48 horas de transfecção, as células eram lavadas com tampão DPBS, e fixadas com 400 μL de solução 4 % (v/v) de PFA, por 20 minutos a temperatura ambiente. As células eram então lavadas três vezes com DPBS e incubadas por 15 min a temperatura ambiente com tampão Triton/PBS. Após bloqueio com tampão PBS-BSA 3 % (m/v) por 1 hora, a temperatura ambiente, as células eram encubadas por 2 horas com anticorpo primário anti-G3BP 1:200 (BD Transduction Laboratories, gentilmente cedido pelo professor Flaviano Giorgini, da Universidade de Leicester), diluído em solução de bloqueio. As células eram então lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com anticorpo secundário (mouse, 555, Life Technologies), 1:1000 em solução de bloqueio por 1 hora a temperatura ambiente. Pra visualização do núcleo, o mesmo foi marcado com solução de DAPI. As imagens foram obtidas com microscópio Leica DMI 6000B (Leica, Alemanha), com objetiva de 63 x.

3.1.5 Tempo de formação de aglomerados

Após 24 horas de transfecção, as células eram transferidas para microscópio Olympus (Olympus IX81-ZDC, Alemanha) acoplado à unidade incubadora programada para ficar a 37 ºC / 5 % CO_2. As imagens das células vivas eram obtidas a cada 30 minutos, por 20 h *overnight*.

3.1.6 Oxidação Intracelular

As células H4 eram plaqueadas em placa de 48 poços, e transfectadas como mencionado anteriormente. Após 48 horas de transfecção, eram lavadas com DPBS e encubadas com a sonda DCFH 25 μM, a 37 ºC por 30 min. Após o período de incubação, as células eram lavadas com DPBS e a intensidade de fluorescência medida usando leitor de microplaca Infinite M2000 PRO, Tecan (λ de excitação: 485 nm; λ de emissão: 535 nm). Após a medição de 3 valores basais, as células foram tratadas com 5 % (v/v) H_2O_2, e os valores de intensidade de fluorescência determinados após 30 minutos.

3.1.7 Ensaio Cometa

A determinação dos níveis de dano ao DNA foi feita pelo método alcalino, adaptado de Olive e Banáth (OLIVE; BANÁTH, 2006).

3.1.7.1 Preparo das amostras

48 horas após transfecção, as células eram coletadas (por centrifugação a 1100 rpm/ 5 min, pós tratamento com tripsina e DMEM fresco), e ressuspensas em mesmo volume de DPBS. O total de células era então contado, acompanhado de diluição em volume certo de PBS a fim de se ter aproximadamente 8.0 x 10^4 células / mL. Esse volume era adicionado a 1.2 mL de agarose 1 %. O volume total (agarose + amostra) era adicionado, gota a gota, às lâminas já totalmente secas (estas lâminas eram previamente tratadas com 1.0 % (m/v) agarose de baixo ponto de fusão (PeqLab), e deixadas na bancada até secagem total da agarose). Após a total solidificação da agarose, as lâminas eram submergidas em tampão alcalino de lise (1.2 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA, 0.1 % (m/v) de sarcosinato de sódio, 0.26 M NaOH, pH > 13) e armazenadas overnight, a 4 ºC.

3.1.7.2 Condições de eletroforese e tratamento com iodeto de propídio

As lâminas eram então lavadas, 3 ciclos de 20 minutos com solução alcalina (0.03 M NaOH, 2 mM Na_2EDTA, pH 12.3). Para eletroforese, a mesma solução alcalina era usada como tampão condutor, em cuba de eletroforese, onde as lâminas eram submergidas por 30 minutos em voltagem constante de 17 V (0.6V/cm).

As lâminas eram então submergidas em água destilada, para neutralização, e tratadas com 100 μL de solução 2.5 μg/mL iodeto de propídio a temperatura ambiente, em ambiente escuro. Após 20 minutos, as lâminas eram lavadas com água destilada, e armazenadas, em água, a 4 ºC, para serem analisadas.

3.1.7.3 Obtenção e análise dos dados

As lâminas eram analisadas por microscopia de fluorescência (microscópio Leica DMI 6000B, Leica, Alemanha), e eram fotografados 50 cometas / lâmina / unicata. Os cometas obtidos eram analisados usando software CometScore (TriTek Corp), e o momento de cauda (relação entre o tamanho da cauda e da cabeça do cometa) era determinado para cada cometa fotografado.

3.1.8 Determinação dos níveis de hSOD1 carbonilada

As etapas de preparo de amostra, condições de eletroforese e transferência para membrana de PVDF eram feitas de acordo como mencionado anteriormente (seções 3.1.3.1, 3.1.3.2 e 3.1.3.3, respectivamente).

3.1.8.1 Tratamento com solução de DNPH

Após transferência, a membrana era tratada com 15 mL de solução de DNPH (dinitrofenilhidrazina) 2 mM em HCl 2 M, por 15 minutos, temperatura ambiente, e leve agitação. Após a incubação com DNPH, a membrana era então lavada uma vez com solução de HCl 5 N, por 5 minutos, seguida de 2 lavagens com tampão Tris-HCl 2 M 30 % Glicerol, por 15 minutos / temperatura ambiente / leve agitação.

3.1.8.2 Incubação com anticorpo primário e anticorpo secundário

A membrana era incubada com solução bloqueadora (BSA/TBS-Tween 4 % (v/v)), temperatura ambiente, leve agitação por aproximadamente 4 horas. A solução era substituída por nova solução bloqueadora contendo anti-hSOD1 1:2000 e anti-DNP 1:2000, e a membrana era deixada *overnight*, com leve agitação, a 4ºC.

A membrana era então lavada 3 vezes com solução TBS-Tween, e incubada por 1 hora com solução BSA/TBS-Tween 4 % (v/v) contendo anti-goat IR dye (verde) e anti-rabbit IR dye (vermelho), numa proporção de 1:6000, por duas horas, temperatura ambiente, leve agitação, num ambiente escuro.

3.1.8.3 Revelação da membrana e análise da imagem

A membrana foi previamente lavada 3 vezes com solução de TBS-Tween, e uma vez com solução de TBS. A membrana era totalmente seca, e analisada em Odyssey CLX- Imaging System (LI-COR), o qual fornecia imagens com fluorescência da membrana. As imagens obtidas eram analisadas por software Image J (NIH, Bethesda, MD, USA).

3.2 EXPERIMENTOS COM *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.1 Obtenção das cepas de estudo

Para geração das cepas de *S.cerevisiae* Δ*sod1* (deletada em Sod1p de levedura) que expressam o gene humano *SOD1* (hSOD1), foi usada a metodologia de transformação por eletroporação.

Células Δ*sod1* eram cultivadas em 3.0 mL de meio YPD 2.0 % (2.0 % (m/v) glicose, 2.0 % (m/v) peptona, 1.0 % (m/v) extrato de levedo), a 28ºC, 160 rpm, *overnight*. A partir do mesmo cultivo, eram adicionados a 100 mL de meio YPD 2 % fresco o volume equivalente para obter uma OD_{600nm} inicial de 0.1 / mL. O novo cultivo era mantido a 28ºC / 160 rpm até atingir uma OD_{600nm} entre 0.7-1.5. O volume total de meio de cultivo era centrifugado a 5000 rpm/ 5 minutos, e o pellet ressuspenso em 25 mL de tampão LiAc/DTT/TE (0.1 M acetato de lítio, 10 mM ditiotreitol, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), por 1 hora, temperatura ambiente, com agitação manual esporadicamente. O volume total era centrifugado a 3000 rpm/ 5 minutos, e o pellet lavado duas vezes com 25 mL de água milli-Q gelada. A terceira lavagem era feita com 10 mL de solução 1 M sorbitol. O pellet então era ressuspenso em 100 μL de 1 M sorbitol.

Para cada transformação foram usados 40 μL da suspensão de células em sorbitol e 4 μL de plasmídeo. A mistura era então deixada em gelo, por 5 minutos. O volume total (células + plasmídeo) era transferido para cubeta de eletroporação de 0.2 mm, e com uso de um eletroporador (Gene Pulser Xcell – Bio-RAD), um pulso de 1.5 kV / 25 uF/200 ohm era aplicado por aproximadamente 30 segundos. Imediatamente após o término do pulso magnético, eram adicionados à cubeta 1.0 mL de meio YPD 2 % gelado, e incubados a 28ºC / 160 rpm. Após duas horas, o pellet era coletado por centrifugação a 13000 rpm / 5 minutos, o pellet ressuspenso em 100 μL de água destilada, e o volume total plaqueado em meio SD 2 % sólido sem adição de leucina (meio mínimo seletivo; 2 % (m/v) glicose, 2 % (m/v) ágar, 0.67 % (m/v) base nitrogenada sem aminoácidos, 0.01 % (m/v) de histidina, metionina e uracila). As placas eram deixadas a 28 ºC, até o surgimento de colônias (aproximadamente 72 horas).

As cepas geradas são citadas na tabela 5 e o mapa do plasmídeo usado é indicado na figura 11.

Tabela 5.Células de *S.cerevisiae* obtidas por eletroporação

Célula	Genótipo	Fenótipo	Fonte
BY4741	*MATα; his3; leu2; met15; ura3*	Cepa controle, sem nenhum gene deletado	Euroscarf, Alemanha
Δ*sod1*	Isogênica a BY4741 exceto *sod1::kanMX4*	Deficiente em Sod1p de levedura	Euroscarf, Alemanha
Δ*sod1*hSOD1WT (WT)	Isogênica a Δ*sod1* com YEP351-hSOD1WT	Sem expressão de Sod1p de levedura e expressão de SOD1WT humana	Este trabalho
Δ*sod1*hSOD1A4V (A4V)	Isogênica a Δ*sod1* com YEP351-hSOD1A4V	Sem expressão de Sod1p de levedura e expressão de SOD1A4V humana	Este trabalho
Δ*sod1*hSOD1G93A (G93A)	Isogênica a Δ*sod1* com YEP351-hSOD1G93A	Sem expressão de Sod1p de levedura e expressão de SOD1G93A humana	Este trabalho

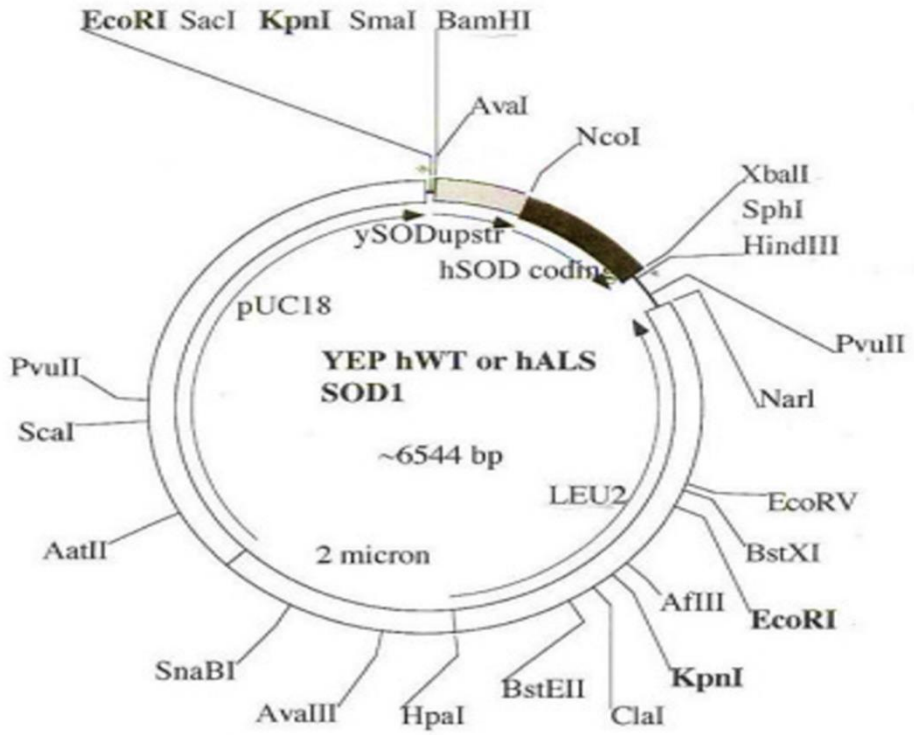


Figura 11. Mapa do vetor YEP351 empregado para clonagem de células de levedura Δsod1 expressando hSOD1WT ou mutantes. Plasmídeo com a sequência de SOD1 humana WT ou mutantes, tendo como promotor SOD1 de levedura, e marcador nutricional leucina. Em preto, sequência de hSOD1 WT ou mutante; em cinza sequência do promotor Sod1p de levedura(BRASIL et al., 2013).

3.2.2 Condições de estoque e meio de cultivo

As cepas listadas na tabela 5 foram estocadas a 4ºC (repique estoque), em meio SD 2 % sólido, sem adição de leucina. Para os experimentos, o repique fresco era feito a partir do repique estoque, e mantido em estufa a 28 ºC, por uma semana.

As células eram cultivadas em meio sintético SC 2 % sem adição de leucina (meio dropout: 2 % (m/v) glicose, 0.67 % (m/v) base nitrogenada sem aminoácidos, 0.2 % (m/v) mistura dropout – tabela 6), 28ºC e 160 rpm.

A avaliação da massa celular foi determinada através de medida de absorvância a 570 nm de uma suspensão de células convertida em massa de célula (mg de peso seco/ mL). O fator de conversão em peso seco foi calculado a partir de filtração de um volume adequado da suspensão de células em filtro Millipore (0.45 μm), que, posteriormente, foi posto em luz infravermelha até atingir o peso constante.

Tabela 6. Aminoácidos utilizados para a mistura Dropout

Adenina	Lisina
Alanina	Metionina
Arginina	Fenilalanina
Asparagina	Treonina
Ácido Aspártico	Triptofano
Ácido Glutâmico	Tirosina
Ácido p-aminobenzoico	Valina
Histidina	Uracila

3.2.3 Condições de estresse oxidativo

As células eram cultivadas em meio SC 2 % sem leucina, a 28ºC /160 rpm até metade da primeira fase exponencial (concentração celular na faixa de 0.8-1.0 mg/mL, peso-seco) e submetidas a tratamento com menadiona (sal de menadiona bissulfito- SIGMA) por 1 hora / 28ºC /160 rpm. A concentração de menadiona usada em cada experimento é listado a seguir:

Tabela 7. Concentração de menadiona usada em cada experimento

Experimento	Concentração de Menadiona (mM)
Atividade enzimática e microscopia	1.0
Viabilidade	60, 80, 100 e 1 M
Peroxidação lipídica e proteína carbonilada	80

3.2.4 Determinação de atividade hSOD1

3.2.4.1 Preparo do extrato celular

50 mg de células eram coletadas por centrifugação (5000 rpm/ 5 minutos) e lavadas duas vezes com água destilada. O pellet era então ressuspenso em 3.0 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7.8, e centrifugado a 5000 rpm/ 5 min. Ao pellet, eram adicionados 500 μL

do mesmo tampão fosfato, e o volume total transferido para tubo de parede grossa contendo 1.5 g de pérolas de vidro (diâmetro entre 450-600μm). A lise celular era feita seguindo três ciclos de agitação em vórtex (velocidade máxima) por 1 minuto, intercalando com banho de gelo, por 1 minuto. O extrato era então coletado e transferido para eppendorf. As pérolas eram lavadas com 500 μL de tampão fosfato, e o sobrenadante transferido para mesmo eppendorf. O sobrenadante final era recolhido por centrifugação a 13000 rpm/ 5 minutos, e mantido em gelo.

3.2.4.2 Dosagem de concentração de proteína pelo método de Stickland

A dosagem de proteína foi feita seguindo o método de Stickland (STICKLAND, 1951). Em tubo falcon de 15 mL foram adicionados 0.1 mL de extrato, 4.9 mL de água destilada, 0.9 mL de NaOH 20 % (m/v) e 0.15 mL de $CuSO_4$ 25 % (m/v). Os tubos foram centrifugados a 4000 rpm / 4 minutos, e o sobrenadante lido em espectrofotômetro UV/Vis, a 550 nm. Como padrão para determinação do fator de conversão, usou-se uma solução padrão de albumina extraída do fígado de boi. A concentração de proteína foi determinada pela relação matemática:

$$\textit{Concentração de proteína (mg/mL)} = (Abs_{550\ nm} \textit{ X fator de conversão}) /0.1$$

3.2.4.3 Cinética da atividade de hSOD1

Em placa de 96 poços, eram adicionados, por poço, nesta ordem, 180 μL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7.8, 13 μL de 0.1 M EDTA, extrato proteico (variação de 0 a 100 μg de proteína, para cada poço), 7 μL de 1.5 mM NBT (tetrazólio nitroblue- preparado no dia e armazenado no gelo) e 4 μL de 0.12 mM riboflavina. A placa era então lida em espectrofluorímetro (ponto zero, T_0), em comprimento de onda igual a 560 nm, seguida de exposição à luz. Após 12 minutos de exposição, a placa era novamente lida em espectrofluorímetro, 560 nm (ponto 12 minutos, T_{12}).

Os dados obtidos eram organizados em uma planilha do programa Excel, tabela 8, e um gráfico entre massa de proteína e N(%) montado (figura 12).

Tabela 8. Tabela para determinação de atividade SOD1. Onde R (%) é a porcentagem de NBT reduzido durante a reação e N (%) é a porcentagem de NBT que não foi reduzido durante a reação.

Massa de proteína (10 a 100 μg)	**T_0 (um valor por massa de proteína)**	**T_{12} (um valor por massa de proteína)**	**ΔT (T_{12}-T_0)**	**R (($\Delta T/T_{12(0\ mg)}$)*100 %)**	**N (100- R) %**

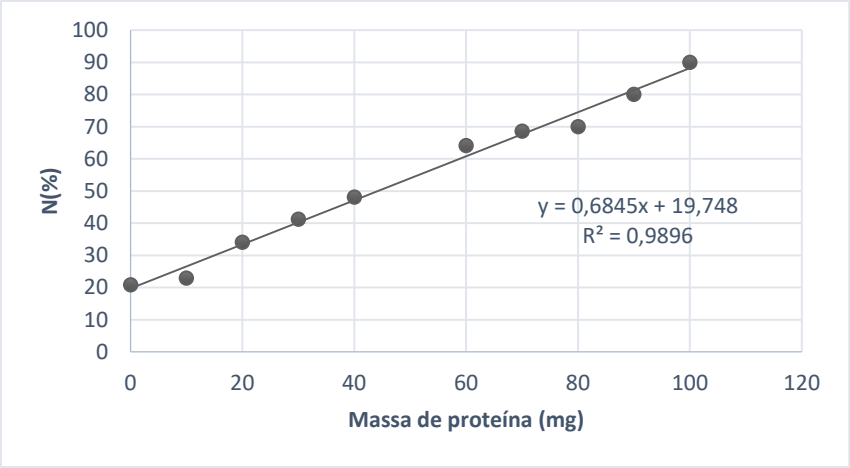


Figura 12. Exemplo de gráfico gerado com os dados obtidos para determinação de atividade enzimática de sod1. Gráfico relaciona a quantidade de NBT que não foi reduzido (N (%)) com a quantidade de proteína empregada no ensaio.

A partir da equação da reta obtida, o valor de X é calculado, admitindo quanto de massa de proteína é necessária para reduzir 50 % de NBT. Uma vez determinado o valor de X, a atividade enzimática de SOD1 é determinada como o valor de 1/X, sendo mU/mg de proteína. 1 U equivale a quantidade de proteína capaz de reduzir 50 % de NBT

3.2.4.4 Atividade hSOD1 por zimograma

a) Gel de Resolução e de empilhamento

A mistura para o gel de resolução 7.5% nativo, foi preparada misturando-se em um recipiente 3 mL de solução estoque de acrilamida-bisacrilamida 30%, 2.25 mL de tampão Tris/HCl 2M pH 8.9, 6.6 mL de H_2O, 12 μL de TEMED e 120 μL de PSA 10%. A mistura foi suavemente agitada e então aproximadamente 10 mL foram adicionados entre as placas de vidro do sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN Tetra Cell, da BioRad, e deixado polimerizar em temperatura ambiente. O gel de empilhamento foi preparado misturando-se em um recipiente 0.534 mL de solução estoque de acrilamida-bisacrilamida 30%, 0.5 mL de tampão Tris/HCl 1M pH 6.8, 2.92 mL de água destilada, 4 μL de TEMED e 40 μL de PSA 40 %. Imediatamente após a adição da mistura, o pente para a criação de poços foi colocado, e o sistema deixado em repouso por aproximadamente 1h a temperatura ambiente. Ao final da polimerização, o gel foi armazenado na geladeira, envolto em plástico filme, com uma pequena camada de água para evitar o ressecamento.

b) Condições de Eletroforese, Revelação e Quantificação da Atividade

Para a realização da eletroforese, o gel foi submerso em tampão de corrida (25 mM Tris/HCl, 192 mM Glicina, pH 8.3). Foram preparados 80 µL de amostra, contendo 240 µg de proteína, 20 µL de tampão de amostra (125 mM Tris/HCl 1M pH 6.8, 80% glicerol, 0.02% azul de bromofenol) e volume de água suficiente para completar 80 µL. Foi aplicado no gel 30 µL de amostra. A eletroforese foi feita a temperatura ambiente, 300 mV, 30 mA por gel, durante 30 minutos.

Após a eletroforese, o gel foi imerso em uma solução contendo 2.5 mM NBT e 36 mM de tampão KPi (36 mM de K_2HPO_4, 36 mM de KH_2PO_4, pH 7.8) por 20 minutos; após, o gel foi imerso em uma solução contendo 86 µM de riboflavina e 2 mM de KCN (para inibir a atividade SOD1) por 15 minutos, e exposto à luz (BRASIL et al., 2013). Após a reação com a riboflavina, o gel de poliacrilamida foi digitalizado no fotodocumentador EC3 Imaging System da UVP Biomaging Systems, e as bandas de SOD1 foram analisadas levando-se em consideração a densidade por área com o uso do software UVP Vision Works LS 6.2.

3.2.5 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi analisada por plaqueamento em meio sólido SC 2% sem leucina antes e após indução ao estresse oxidativo. Uma massa de 40 µg de células foi transferida para eppendorf com 1.0 mL de água destilada. Diluições sucessivas foram feitas, sendo a primeira de cem vezes e a segunda de onze vezes, a fim de que o último eppendorf com 1.0 mL de água estéril, tivesse concentração de 0.04 µg/mL. O plaqueamento foi feito em triplicata e as placas foram incubadas a 28ºC, sendo o número de colônias determinado após 72 h. A porcentagem de sobrevivência foi calculada a partir da relação entre a quantidade de colônias formada após e antes do estresse.

3.2.6 Peroxidação lipídica

50 mg de células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com água destilada. O pellet era ressuspenso em 500 µL de TCA 10% (m/v) (ácido tricloro-acético), e transferido para tubo de parede grossa contendo 1.5 g de pérolas de vidro (diâmetro entre 450-600µm).As células foram rompidas seguindo seis ciclos de agitação em vórtex (velocidade máxima) por 20

segundos, intercalando com banho de gelo, por 20 segundos. O sobrenadante era transferido para eppendorf, as pérolas de vidro lavadas com 500 μL de TCA 10 % (m/v), e o sobrenadante transferido para o mesmo eppendorf. O extrato final era obtido por meio de centrifugação a 4000 rpm/ 5 minutos, recolhendo o sobrenadante e mantendo em gelo.

O nível de peroxidação lipídica foi determinado pelo método TBARS (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991). Em eppendorf eram adicionados, nesta ordem, 300μL de extrato, 100 μL de EDTA 0.1 M e 600 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1.0 % (m/v) em NaOH 0.05 M. Imediatamente após adição de TBA, a mistura reacional era incubada a 100ºC. Após 15 minutos, a reação era interrompida resfriando o eppendorf em gelo. A absorvância era determinada por leitura de absorvência em espectrofotômetro, em um comprimento de onda igual a 532 nm. Os resultados são expressos em picomoles de malonaldialdeído (MDA), por miligrama de célula (pmoles MDA/mg cel). A concentração de MDA formado é determinada pela relação matemática a seguir:

$$Concentração\ de\ MDA\ formado = \frac{[(Abs532\ X\ 11.5nmolesMDA)\ X\ 1000]}{[(Abs570\ X\ 0.4\ X\ 100)\ X\ 4.9\ X\ 0.3]}$$

3.2.7 Oxidação intracelular

3.2.7.1 Tratamento com 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCFH)

O volume de meio de cultivo equivalente a 50 mg de células (peso seco) era tratado com solução de DCFH 5.0 mM. O volume de solução adicionado era o suficiente para se ter no volume final o equivalente a 10 μM de DCFH. O meio de cultivo era então mantido a 28ºC, 160 rpm por 30 minutos. O meio era centrifugado a 5000 rpm/ 5 minutos, e o pellet coletado.

3.2.7.2 Preparo da amostra e análise dos dados

O pellet recolhido era então lavado duas vezes com água destilada fria. O mesmo era ressuspenso em 500 μL de água destilada fria, e transferido para tubo contendo 1.5 g de pérolas de vidro (diâmetro entre 450-600μm). As células eram rompidas seguindo três ciclos de agitação em vórtex (velocidade máxima) por 1 minuto, intercalando com banho de gelo, por 1 minuto. O extrato era então coletado e transferido para eppendorf. As pérolas eram lavadas com 400 μL de água destilada fria, e o sobrenadante transferido para mesmo eppendorf. O sobrenadante final era recolhido por centrifugação a 13000 rpm/ 5 minutos, e mantido em gelo.

500 μL do sobrenadante final eram recolhidos e diluídos em 2.5 mL de água destilada fria. Em placa de 96 poços preta, eram adicionados 200 μL da diluição, por poço. A leitura era feita em espectrofluorímetro, (comprimento de onda de excitação 504 nm e comprimento de onda de emissão 524 nm), e o nível de oxidação intracelular era dada como uma razão entre a fluorescência adquirida do extrato de células estressadas e a fluorescência adquirida do extrato de células controle.

3.2.8 Expressão de hSOD1 por Western Blotting

3.2.8.1 Gel de resolução

A mistura para o gel de resolução contendo 15 % de acrilamida era preparada misturando em tubo falcon 2.3 mL de água, 5.0 mL de solução estoque de acrilamida-bisacrilamida 30 % (m/v), 2.5 mL de tampão TrisHCl 1.5 M pH 8.8, 0.1 mL de SDS 10 % (m/v), 0.01 mL de TEMED e 0.1 mL de PSA 10 % (m/v). A mistura era suavemente agitada e então 6 mL eram adicionados entre as placas de vidro do sistema de eletroforese vertical 10X10 cm da BioAgency. A solução era então recoberta com uma camada de etanol 70 % e deixada em repouso, a temperatura ambiente, até total polimerização do gel.

3.2.8.2 Gel de empilhamento

Após polimerização, o etanol era drenado e sob o gel era adicionada a solução de gel de empilhamento 5 % de acrilamida, composta por 2.1 mL de água, 0.5 mL acrilamida-bisacrilamida 30 % (m/v), 0.38 mL de tampão TrisHCl 1.0 M pH 6.8, 0.03 mL de SDS 10 % (m/v), 0.003 mL de TEMED e 0.03 mL de PSA 10 % (m/v). A adição era feita até atingir o topo das placas de vidro. Imediatamente após a adição, o pente era colocado e o sistema deixado em repouso até polimerização, a temperatura ambiente. Ao final da polimerização, o pente era retirado.

3.2.8.3 Condições de eletroforese

As condições de eletroforese seguidas foram citadas no item 3.1.3.2.

3.2.8.4 Transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose e bloqueio dos sítios livres da membrana

Após o termino da eletroforese, o gel e membrana de nitrocelulose (Molecular Probes) eram incubados por aproximadamente 5 minutos em tampão de transferência gelado (0.25 M

Tris, 0.192 M glicina, 20 % Metanol pH8.3). As proteínas eram transferidas do gel para membrana com auxílio do tampão de transferência e do sistema de suporte contendo adaptador para blotting, onde o gel e membrana eram montados entre dois papéis de filtros e duas esponjas. Ao fim da montagem do sistema, eram colocados em cuba de eletroforese preenchida com tampão de transferência e deixados por 2 horas, 200 mA e 2 V. Após o término de transferência, a membrana era então mantida em solução bloqueadora de BSA 3 % (m/v) em TBS-Tween *overnight*.

3.2.8.5 Incubação com anticorpo primário

A solução de bloqueio era substituída por uma nova solução de BSA 3 % (m/v) em TBS-Tween contendo anti-hSOD1 1:500 (HPA001401- Sigma Aldrich) e anti-βtubulina 1:1000. A membrana era então incubada por aproximadamente 18 horas, temperatura ambiente, e agitação leve. Ao fim da incubação, a membrana era lavada 3 vezes com 10 mL de solução bloqueadora, durante 5 minutos, com leve agitação, em cada lavagem.

3.2.8.6 Incubação com anticorpo secundário

A membrana era lavada 3 vezes (5 minutos cada, acompanhada de leve agitação) com 10 mL de tampão Tris.Cl 50 mM pH 7.5, 150 mM de NaCl. Ao fim da última lavagem, a membrana era rinsada duas vezes com tampão de bloqueio. Sobre a membrana eram adicionados 10 mL de solução bloqueadora BSA 3 % (m/v) em TBS-Tween contendo anticorpo secundário (anti-rabbit e anti-mouse) conjugado com peroxidase na proporção 1:5000. A membrana era então incubada a temperatura ambiente, leve agitação. Após 2 horas, a membrana era lavada 3 vezes com 10 mL de solução bloqueadora, e 3 vezes com 10 mL de tampão Tris.Cl 50 mM pH 7.5, 150 mM NaCl.

3.2.8.7 Revelação da membrana e análise da imagem

Para detecção das bandas na membrana, uma mistura composta com reagente luminol e solução de peróxido (ECL Western Blotting Substrate, Promega), era adicionado a membrana 1 minuto antes desta ser analisada em fotodocumentador (Fusion Solo 6S Edge V0.70, Vilber Lourmat, France). A intensidade de cada banda detectada foi determinada usando software Image J (NIH, Bethesda, MD, USA), e normalizada usando como padrão a banda referente a β-tubulina.

3.2.9 Formação de aglomerados de hSOD1

3.2.9.1 Obtenção das cepas marcadas com o sistema BiFC

Para geração das cepas de *S.cerevisiae* Δ*sod1* que expressam hSOD1 fusionado a proteína fluorescente vênus, foi usada a metodologia de transformação por choque térmico.

Células Δ*sod1* eram cultivadas em 10 mL de meio YPD 2.0 % a 28ºC, 160 rpm, até atingir fase estacionária de crescimento. Eram coletados 200 μL de meio de cultivo em eppendorf, e o pellet recolhido através de centrifugação por 5 segundos em centrífuga de bancada. Eram adicionados ao pellet, na seguinte ordem, 10 μL de DTT 1 M, 5 μL de esperma de salmão (previamente tratado a 100ºC/ 5 minutos), 2 μL de plasmídeo VN, 2 μL de plasmídeo VC e 81 μL de tampão LiAOc PEG. O eppendorf era então incubado em banho a 45ºC. Passados 1 hora, o volume total era plaqueado em meio sólido SC 2% seletivo, sem leucina e sem uracila.

As cepas geradas são citadas na tabela 9 e os plasmídeos usados são representados nas figuras 13 e 14.

3.2.9.2 Condições de estoque e meio de cultivo

As cepas listadas na tabela 9 foram estocadas a 4ºC (repique estoque), em meio SD 2 % sólido, sem adição de leucina e uracila. Para os experimentos, o repique fresco era feito a partir do repique estoque, e mantido em estufa a 28 ºC, por uma semana.

As células eram cultivadas em meio sintético SC 2 % sem adição de leucina e uracila (meio dropout: 2 % (m/v) glicose, 0.67 % (m/v) base nitrogenada sem aminoácidos, 0.2 % (m/v) mistura dropout – tabela 6), 28ºC e 160 rpm, até fase exponencial e submetidas a condição de estresse oxidativo por tratamento com 1 mM de menadiona por 1 h / 28ºC / 160 rpm.

3.2.9.3 Microscopia de Fluorescência

Aproximadamente 2 mL do meio de cultivo eram coletados, centrifugados a 5000 rpm/ 5 minutos e o pellet recolhido. Ao pellet eram adicionados aproximadamente 200 μL de água. Para o preparo da lâmina, eram adicionados 2 μL de solução de n-propilgalacto e 2 μL da suspensão celular na lâmina, e coberto por uma lamínula. As imagens foram obtidas em microscópio Olympus IX73 (câmera DP73), com objetiva de 100 x com óleo de imersão.

Tabela 9. Cepas marcadas com proteína vênus

Célula	Genótipo	Fenótipo	Fonte
BY4741	*MATα; his3; leu2; met15; ura3*	Cepa controle, sem nenhum gene deletado	Euroscarf, Alemanha
Δ*sod1*	Isogênica a BY4741 exceto *sod1::kanMX4*	Deficiente em Sod1p de levedura	Euroscarf, Alemanha
Δ*sod1*hSOD1WT-BiFC	Isogênica a Δ*sod1* com pME2795 + hSOD1WT-VC e pME2794 + VN-hSOD1WT	Sem expressão de Sod1p de levedura e expressão de VN-hSOD1WT e hSOD1WT-VC	Este trabalho
Δ*sod1h*SOD1A4V-BiFC	Isogênica a Δ*sod1* com pME2795 + hSOD1A4V-VC e pME2794 + VN-hSOD1A4V	Sem expressão de Sod1p de levedura e expressão de VN-hSOD1A4V e hSOD1A4V-VC	Este trabalho
Δ*sod1*hSOD1G93A-BiFC	Isogênica a Δ*sod1* com pME2795 + hSOD1G93A-VC e pME2794 + VN-hSOD1G93A	Sem expressão de Sod1p de levedura e expressão de VN-hSOD1G93A e hSOD1G93A-VC	Este trabalho

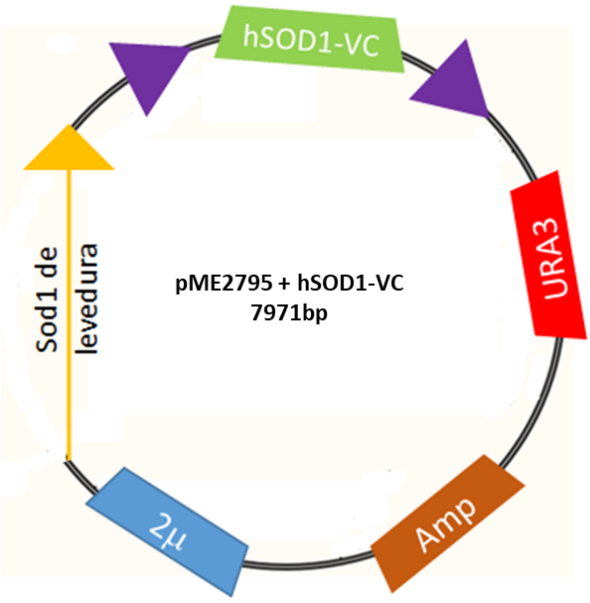


Figura 13. Figura representativa do mapa do plasmídeo pME2795+hSOD1-VC empregado na clonagem na cepa Δ*sod1* expressando hSOD1 WT ou mutantes fusionadas ao fragmento VC da proteína vênus. Plasmídeo com a sequência de SOD1 humana WT ou mutantes fusionada ao fragmento C-terminal da proteína vênus, tendo como promotor Sod1p de levedura e marcador nutricional uracila.

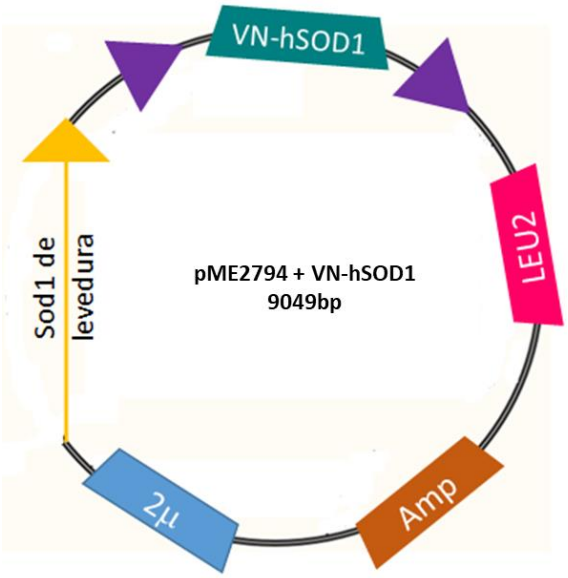


Figura 14.Figura representativa do mapa do plasmídeo pME2794+VN-hSOD1 empregado na clonagem na cepa Δ*sod1* expressando hSOD1 WT ou mutantes fusionadas ao fragmento VN da proteína vênus. Plasmídeo com a sequência de SOD1 humana WT ou mutantes fusionada ao fragmento N-terminal da proteína vênus, tendo como promotor Sod1p de levedura e marcador nutricional leucina.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados usando software GraphPad Prism 5, e representados como média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Diferenças estatísticas de hSOD1 WT em células de neuroglioma foram calculadas usando One way e Two way ANOVA, com correção de Bonferroni. Diferenças estatísticas de Δ*sod1*hSOD1WT foram calculadas usando T Student. Valores foram considerados estatisticamente diferentes de hSOD1 WT para *$p<0.05$, **$p<0.01$ e ***$p<0.001$. Diferenças estatísticas de Δ*sod1* foram calculadas com T Student, sendo $^{a}p<0.05$, $^{b}p<0.01$ e $^{c}p<0.001$, para representar valores estatisticamente diferentes

Parte I: ESTUDOS COM CÉLULAS DE NEUROGLIOMA

4. RESULTADOS

4.1 INFLUÊNCIA DAS MUTANTES A4V, L38V, G93A E G93C NA FORMAÇÃO DE AGLOMERADOS E LOCALIZAÇÃO DE hSOD1

Uma das principais características das doenças neurodegenerativas é a formação de aglomerados, o que acredita-se ser a causa dos problemas apresentados nestas doenças(VERMA, 2016). Sabendo disto, o primeiro passo foi averiguar se as mutações A4V, L38V, G93A e G93C formam aglomerados. Para isto, foi usado o sistema fluorescente BiFC lançando mão de que SOD1 forma homodímero de forma espontânea(BUNTON-STASYSHYN et al., 2015). Como demonstrado na figura 15, o sistema trabalhado consistia de monômeros de hSOD1 WT ou mutantes acoplados a fragmentos complementares da proteína vênus, N-terminal (VN) e C-terminal (VC), de forma que quando ambos os monômeros reagiam para formar o dímero de hSOD1, os fragmentos complementares interagiam, regeneravam o fluoróforo, tendo como resultado a emissão de fluorescência.

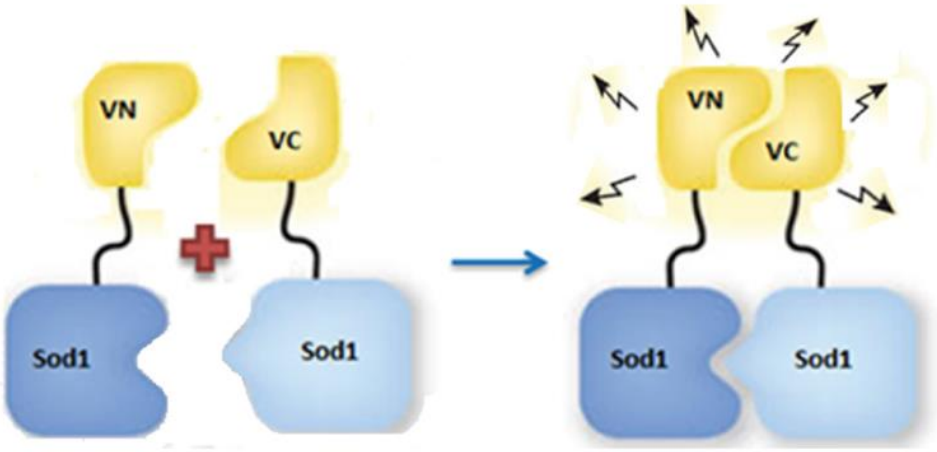


Figura 15. Representação esquemática do sistema BiFC (adaptado de Brasil & Magalhães, 2017). Na célula, foram expressos dois plasmídeos: um com a sequência VN-hSOD1 e outro com a sequência hSOD1-VC, de forma que dentro do modelo celular havia a expressão de monômeros de SOD1 fusionados a um fragmento N-terminal (VN) e C-terminal(VC) da proteína vênus. Após formação do dímero, os fragmentos interagem, regeneram a proteína fluorescente, e emitem fluorescência.

Primeiramente foi determinado o tempo de incubação das células H4 pós transfecção para que se tivesse o máximo de células transfectadas e com fluorescência. Foi escolhido o

tempo de 48 horas visto que 24 horas após transfecção o número de células fluorescentes era inferior a 20 % do total. Com uma incubação de 48 h, esse número aumentou para aproximadamente 60 % (dados não mostrados). Deixar as células por mais tempo acabaria gerando um estresse no meio, devido a diminuição dos nutrientes, interferindo nos resultados observados. Portanto todos os experimentos foram feitos após 48 h de transfecção.

Uma das formas de controle em experimentos que usam o sistema BiFC é, além do uso de células não marcadas com proteínas fluorescentes (controle negativo), a análise da expressão da proteína acoplada aos fragmentos VN e VC (KERPPOLA, 2006). A figura 16 mostra o nível de expressão de todas as células estudadas. Como observado, além de confirmar a presença de hSOD1 fusionada aos fragmentos VN e VC, os níveis de expressão de A4V, L38V e G93C foram iguais aos de WT. G93A apresentou uma expressão menor que as demais, sugerindo que esta mutação pode ser a mais instável.

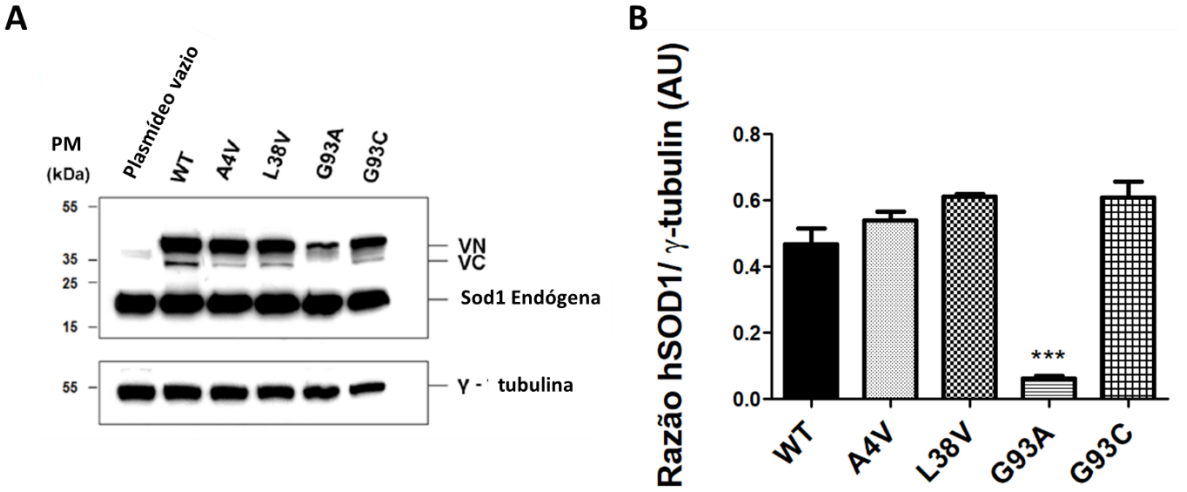
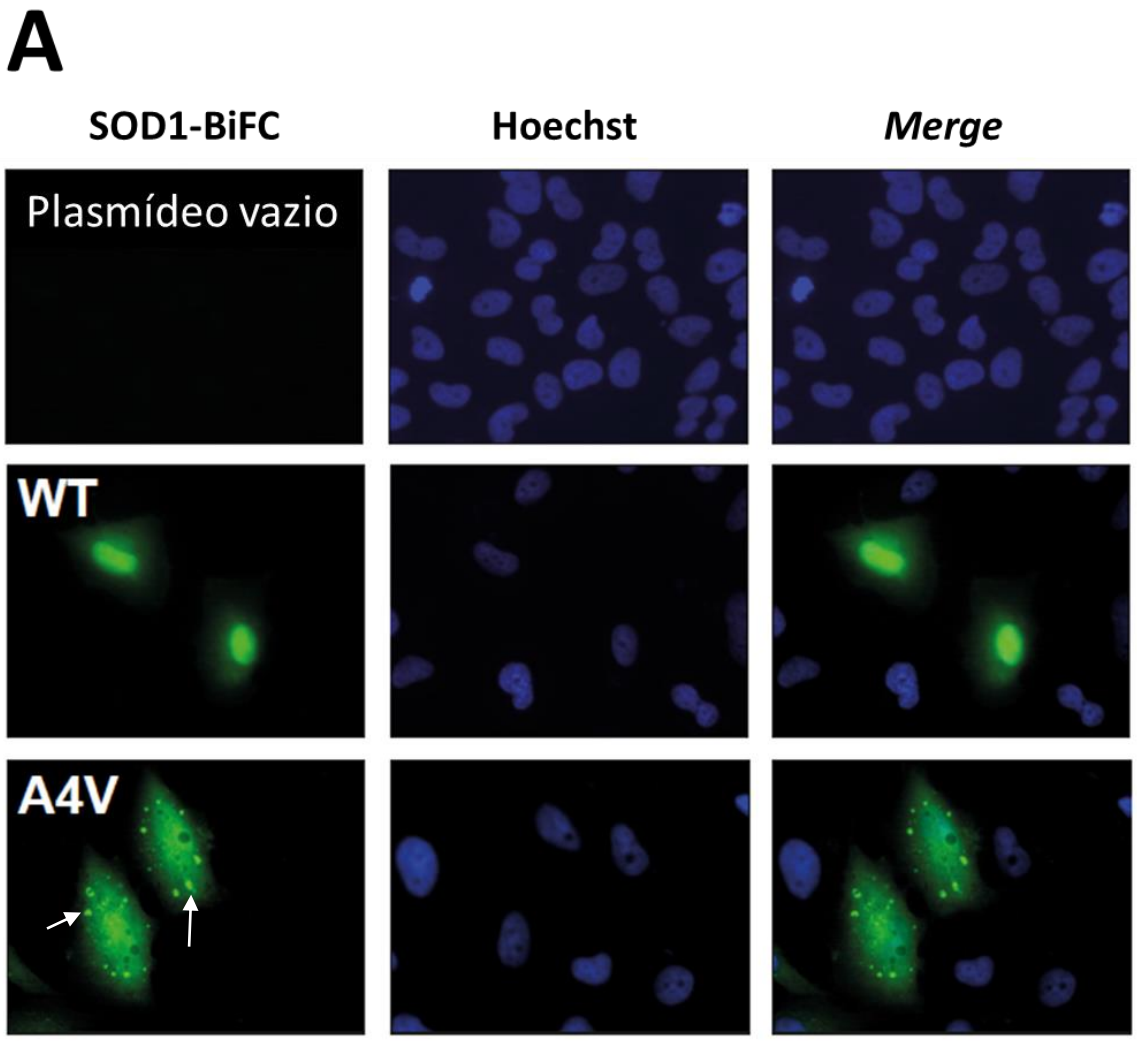


Figura 16. Expressão de hSOD1-BiFC WT e mutantes em células H4. (a) Imunoblot representativo para confirmação da expressão de hSOD1-VN e hSOD1-VC.**(b)** Quantificação do imunoblot. Usando o software Image J foram determinadas as intensidades de cada banda, e os valores normalizados comparando a intensidade das bandas hSOD1-VN + hSOD1-VC com a intensidade da banda do controlo endógeno γ-tubulina. Dados são expressos como a média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Análise estatística foi feita usando o método One-way ANOVA, com correção de Bonferroni, onde *** $p<0.001$ representa valor estatisticamente diferente.

A figura 17 mostra as imagens obtidas por microscopia, assim como a quantificação de aglomerados e localização de hSOD1. Como esperado, células WT formam apenas dímeros. Em todas as mutantes observamos a formação de aglomerados, os quais apresentaram diferentes tamanhos e formatos (figura 17a). A mutação A4V mostrou uma maior propensão para aglomerar, na qual aproximadamente 80 % das células transfectadas apresentaram pequenos

aglomerados distribuídos no citoplasma (figura 17b). Nenhum aglomerado foi encontrado no núcleo, indicando que estes uma vez formados no citoplasma, não migram para outras localizações celulares.

As imagens também mostraram a localização de hSOD1. hSOD1 é localizada majoritariamente no citoplasma, para exercer seu papel como enzima catalizadora da dismutação de íons superóxido, porém pode ser observada em outras regiões, dentre elas, o núcleo, como a figura 17a mostra.



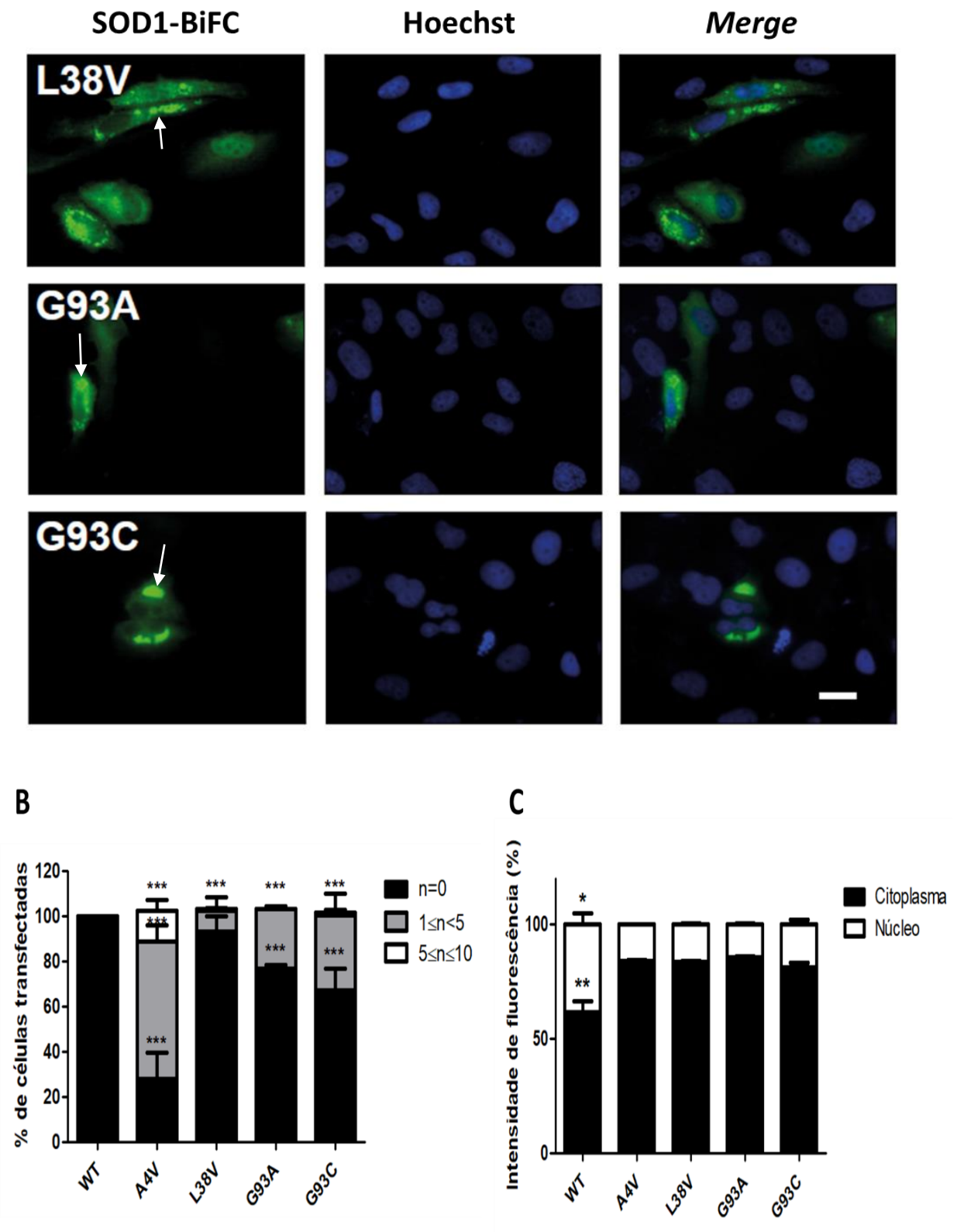


Figura 17. Visualização da formação de aglomerados e localização de hSOD1. (a) Imagens representativas de células H4 expressando hSOD1-BiFC WT e mutantes. As células transfectadas com plasmídeos VN-hSOD1 e hSOD1-VC WT ou mutantes foram analisadas por microscopia de fluorescência. Hoechst foi usado como marcador de núcleo. Barra de escala 10 µm. Setas indicam os exemplos de aglomerados. **(b)** Quantificação do número de aglomerados por célula. 50 células foram analisadas por condição e classificadas em 3 grupos diferentes: células com n=o; células com 1≤n<5; células com 5≤n≤10, onde n representa o número de aglomerados

observados. Dados representam a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. Para análise estatística foi usado One-way ANOVA com correção de Bonferroni, comparando os valores de células WT e mutantes. *** p <0.001 representa valores estatisticamente diferentes. **(c)** Quantificação da localização celular de hSOD1. A intensidade de fluorescência de BiFC foi quantificada usando software ImageJ. Para cada condição, 50 células foram analisadas. Dados representam a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. Para análise estatística foi usado One-way ANOVA com correção de Bonferroni, comparando os valores de células WT e mutantes. * p <0.05 e ** p<0.01 representam valores estatisticamente diferentes.

A presença das mutações diminui a localização nuclear de hSOD1 em 50 % (figura 17c). Estudos mais recentes tem tentado relacionar a importância da presença de SOD1 no núcleo, podendo exercer um papel de fator de transcrição de mecanismos de proteção antioxidante (TSANG et al., 2014).

4.2 CARACTERIZAÇÃO E LOCALIZAÇÃO DOS AGLOMERADOS DE hSOD1 MUTANTES

Uma vez verificada a formação dos aglomerados em células hSOD1 mutantes, o próximo passo foi fazer uma caracterização dos mesmos, a fim de identificar se os aglomerados observados estavam localizados em grânulos de estresse (do inglês *stress granules*, SG). Para isto, células transfectadas foram incubadas com anti-G3BP (marcador de SG já usado na literatura), e feita imunocitoquímica. Como podemos observar na figura 18, nenhum dos aglomerados formados colocalizou com G3BP, indicando que os aglomerados não podem ser classificados como grânulos de estresse.

Na figura 17 podemos observar que alguns aglomerados ficam próximos ao núcleo. A fim de verificar a localização dos aglomerados, as células H4 foram transfectadas com a proteína VHL (von Hippel-Lindau) acoplada a proteína fluorescente mCherry (vermelho). VHL é uma proteína heteróloga que desenovela e forma agregados solúveis os quais são marcados e direcionados ao compartimento JUNQ, onde colocalizam o maquinário de controle de qualidade (WEISBERG et al., 2012). Para melhorar a visualização dos aglomerados no JUNQ, as células foram incubadas com MG132, um inibidor de proteassomo. Como demonstrado na figura 19, em todas as situações os aglomerados colocalizaram com a proteína VHL, indicando que estes uma vez formados são direcionados para o JUNQ.

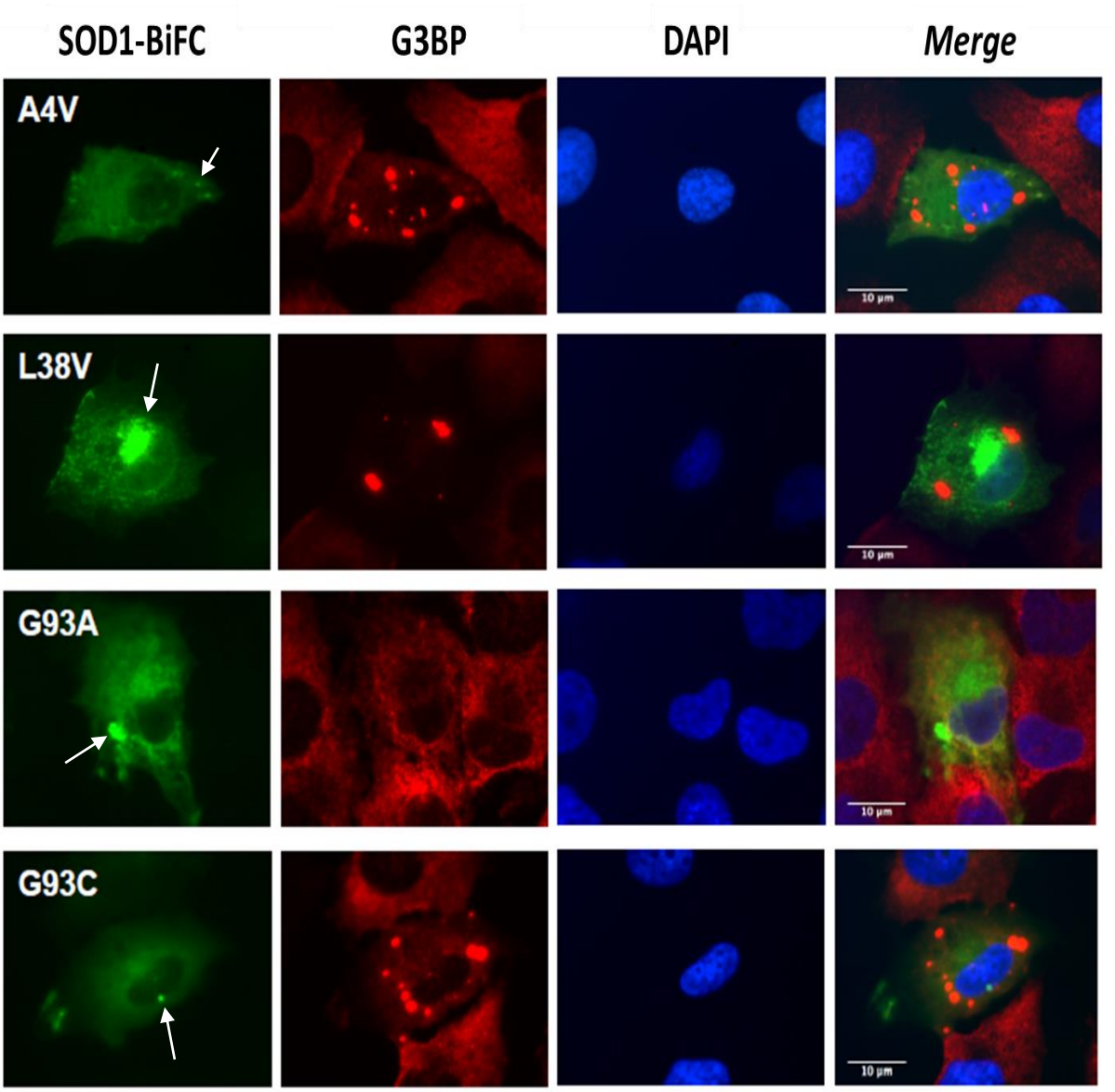
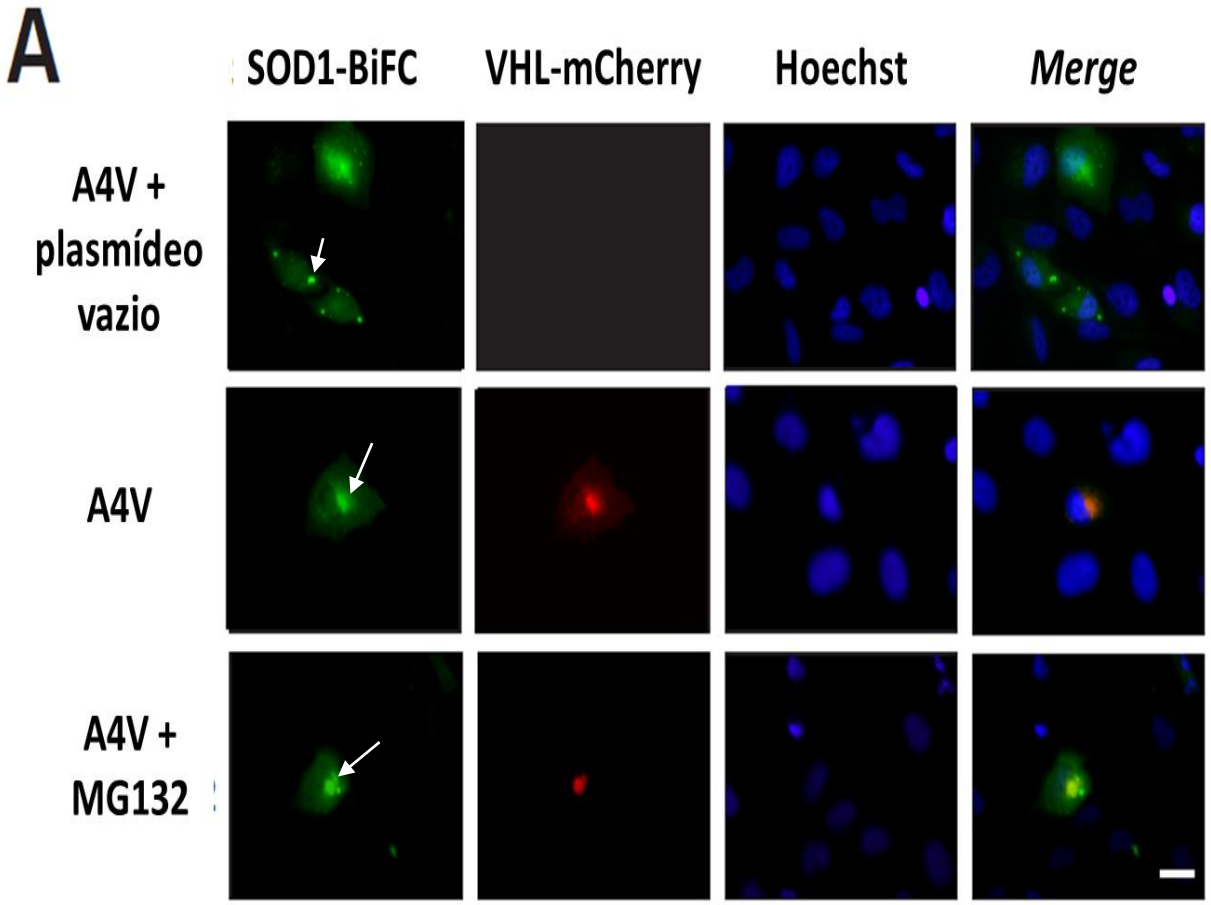
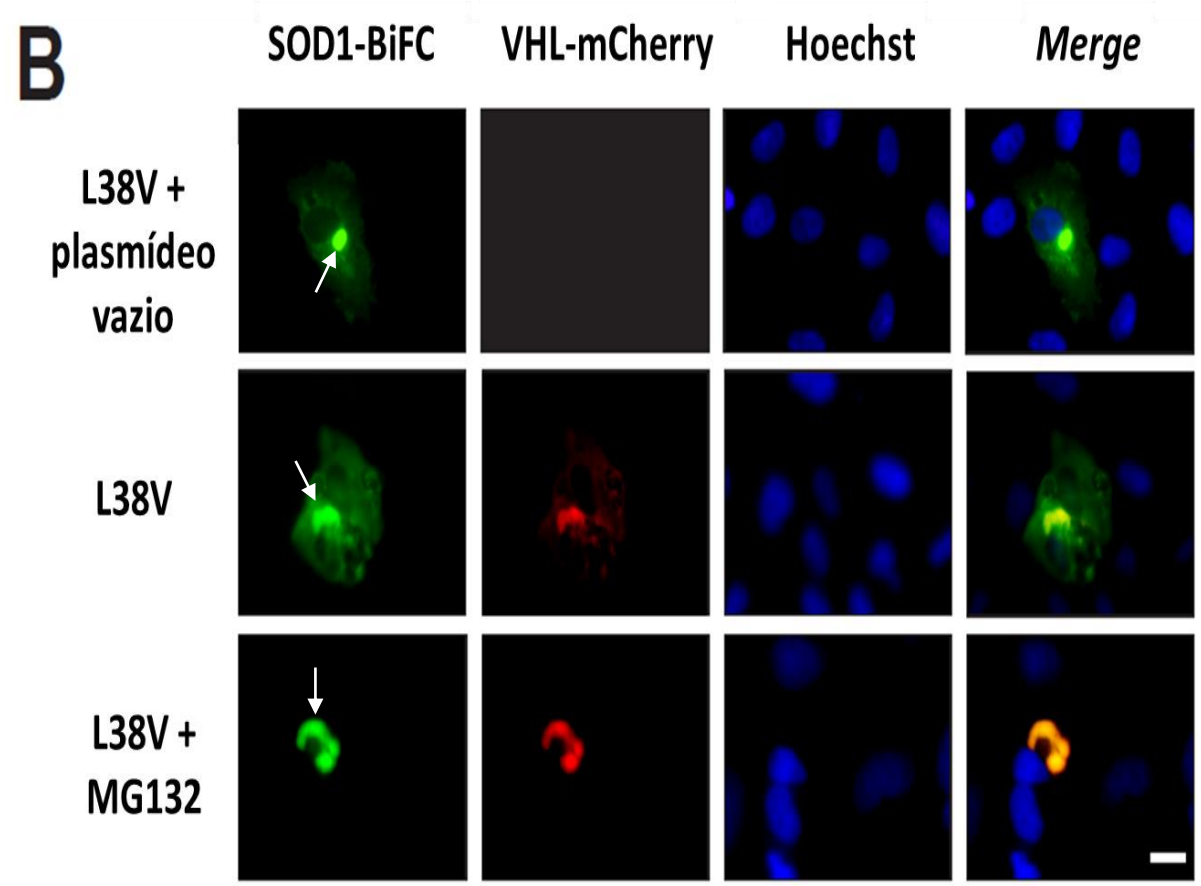
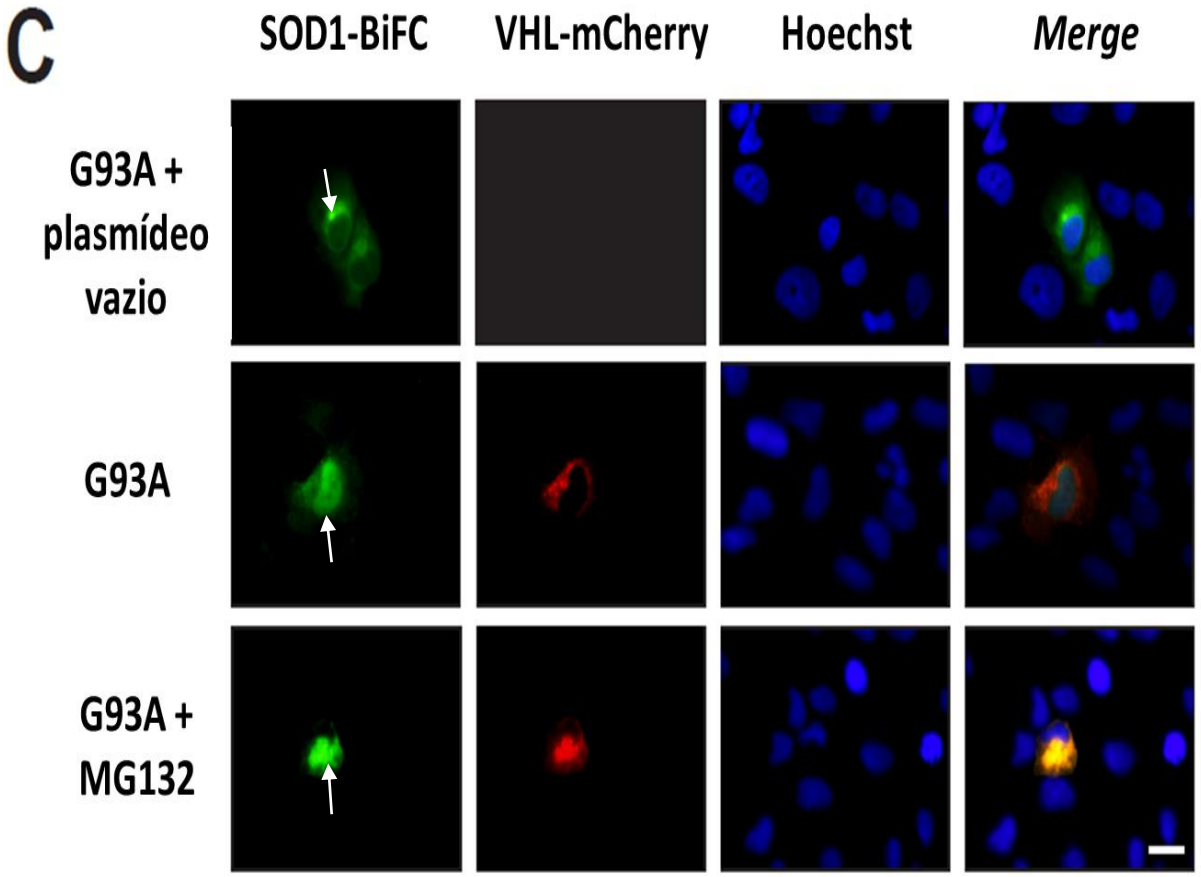


Figura 18. Análise da natureza dos aglomerados de hSOD1-BiFC mutante. Imagens representativas de células transfectadas com hSOD1-BiFC mutantes. Células hSOD1-BiFC (verde) foram marcadas com anti-G3BP (vermelho), a fim de visualizar grânulos de estresse. Para visualização do núcleo, células foram marcadas com DAPI (azul). Nenhum dos aglomerados colocalizou com G3BP. Barra de escala 10 µm. Setas indicam exemplos de aglomerados nas células.


A
SOD1-BiFC
VHL-mCherry
Hoechst
Merge
A4V + plasmídeo vazio
A4V
A4V + MG132


B
SOD1-BiFC
VHL-mCherry
Hoechst
Merge
L38V + plasmídeo vazio
L38V
L38V + MG132


C
SOD1-BiFC
VHL-mCherry
Hoechst
Merge
G93A + plasmídeo vazio
G93A
G93A + MG132

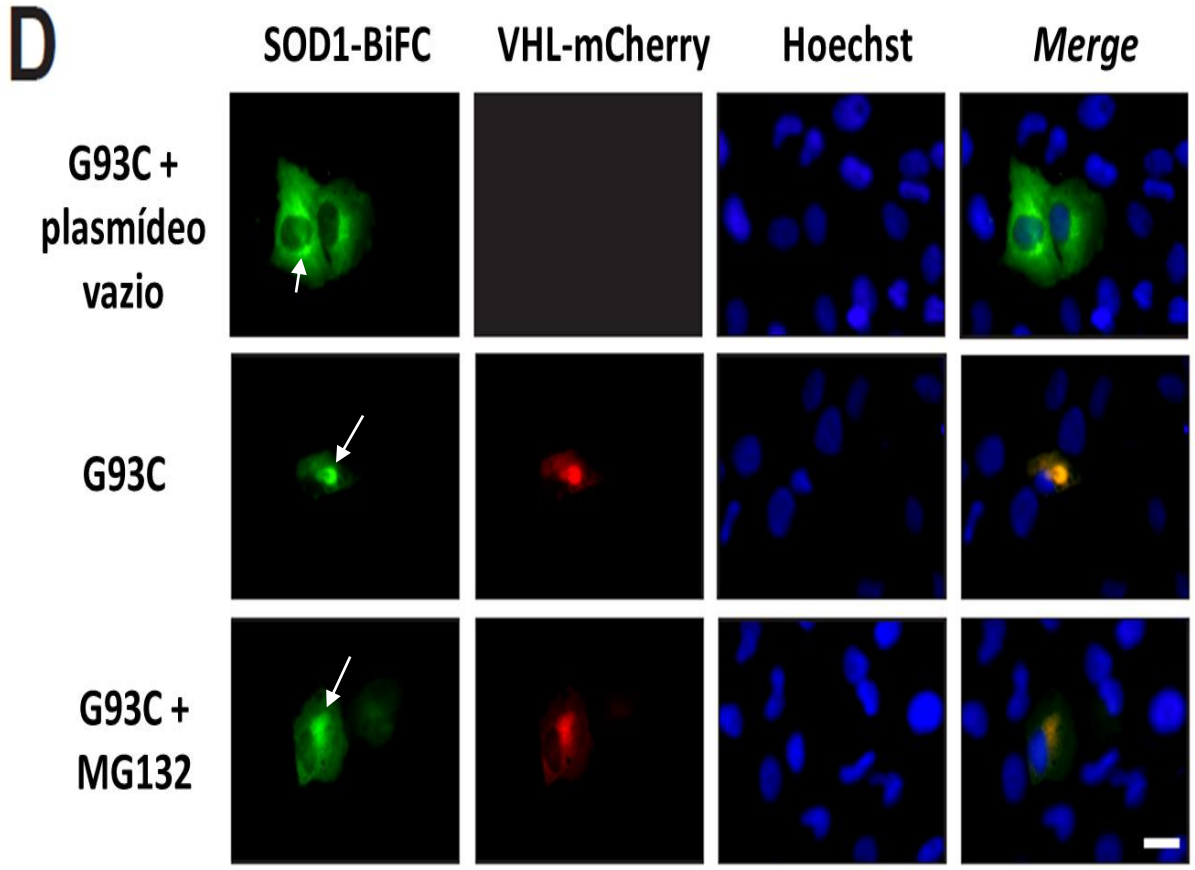
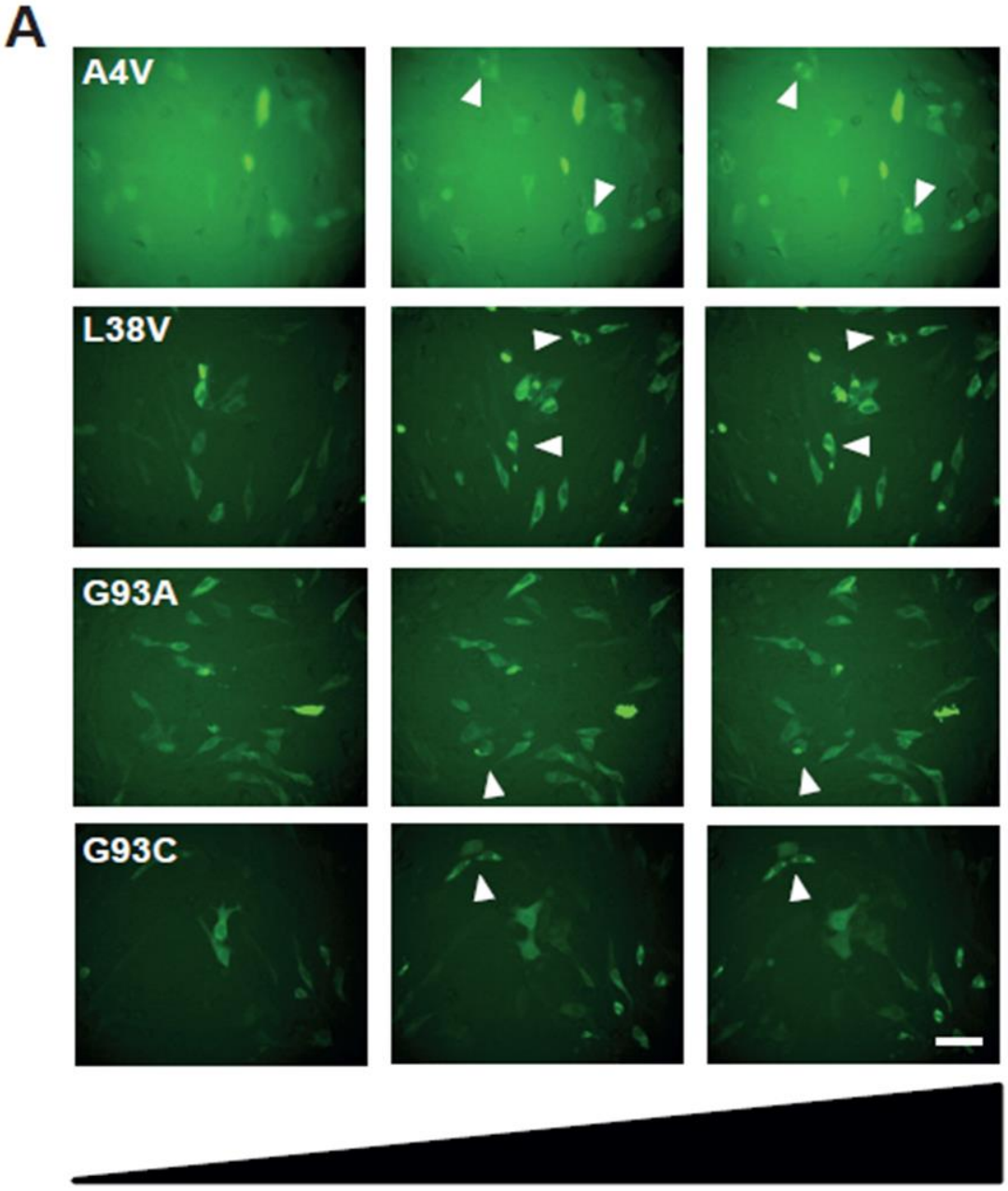


Figura 19. Colocalização de aglomerados de hSOD1-BiFC mutantes e JUNQ.Células H4 foram transfectadas com plasmídeo vazio como controle. Aglomerados foram visualizados pela expressão de hSOD1-BiFC (verde). JUNQ foi observada pela expressão de VHL-mCheyrry (vermelho) e nucleo marcado por Hoechst (azul).Para uma melhor visualização, as células foram tratadas com MG132, a fim de inibir o proteassomo. Imagens representativas das mutantes A4V **(a)**, L38V **(b)**, G93A **(c)** e G93C **(d)** mostram os aglomerados colocalizando com JUNQ. Barra de escala 20 μm. Setas indicam exemplos de aglomerados nas células.

4.3 CINÉTICA DE FORMAÇÃO DE AGLOEMRADOS DE hSOD1 MUTANTES

Além de verificar a localização, o estudo da dinâmica de formação dos aglomerados também foi feito, como mostra a figura 20. As imagens foram obtidas durante 20 horas após transfecção. O tempo de surgimento do primeiro aglomerado foi gravado e comparado com as demais mutantes estudadas. Pelos resultados, é verificado que A4V e G93A formam aglomerados 3 horas antes que L38V e G93C, mantendo-se estáveis por mais 5 horas. Este resultado sugere uma dinâmica de agregação diferente entre A4V/G93A e L38V/G93C. Além de indicar que as mutações A4V e G93A possuem o mesmo tempo e propensão de formação de aglomerados.


A
A4V
L38V
G93A
G93C
Tempo até o surgimento de aglomerados

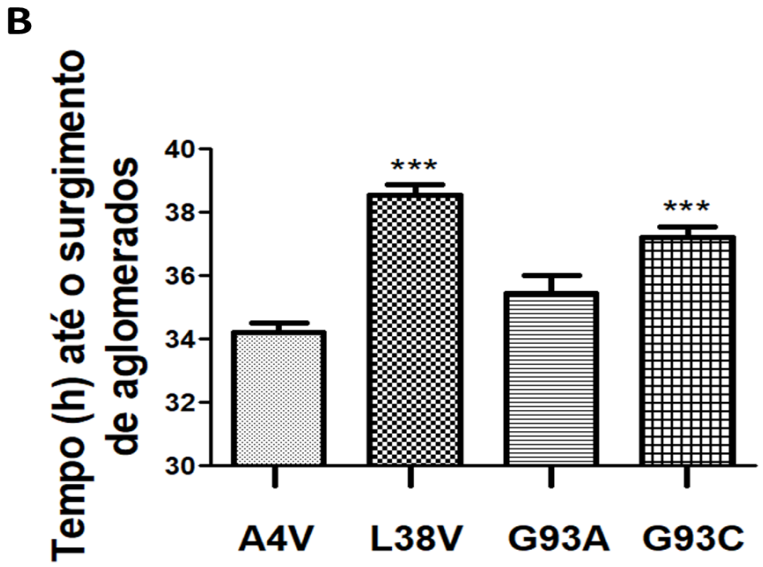


Figura 20.*Live-cell imaging* de células expressando hSOD1-BiFC. (**a)** Imagens representativas do período de formação de aglomerados em células expressando hSOD1-BiFC. *Live-cell imaging* foi iniciado 24 h após transfecção e as imagens obtidas a cada 30 min durante 20 horas. As setas indicam o aglomerado observado durante o experimento. Barra de escala 40 μm. **(b)** Análise cronológica e comparativa da dinâmica de formação de aglomerados. O gráfico é expresso como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Análise estatística foi feita usando One-way ANOVA, com correção de Bonferroni, onde *** $p<0.001$ representa valores estatisticamente diferentes, comparando A4V com L38V, G93A e com G93C.

4.4 INFLUÊNCIA DAS MUTAÇÕES NO EQUILÍBRIO REDOX

Uma das maneiras de verificar se hSOD1 mantem sua função enzimática mesmo na presença de mutações é dosando os níveis intracelulares de EROS. Para isto, foi usada a sonda 2,7-diclorofluorosceína diacetato (composto não fluorescente), a qual ao passar pela membrana celular, é desacetilada, formando 2,7-diclorofluoresceína não fluorescente. Este composto reage com EROS intracelulares, passando a emitir fluorescência. Quanto maior a fluorescência detectada, maior a concentração de EROS (LEBEL; ISCHIROPOULOS; BONDY, 1992).

A figura 21 mostra os níveis de oxidação intracelular antes e após tratamento com solução de peroxido de hidrogênio 5 % (usado para induzir estresse oxidativo). Antes da indução de estresse, os níveis de EROS foram todos iguais, inclusive entre as células mutantes, WT e plasmídeo vazio. O tratamento com H_2O_2 fez com que pudesse ser observada uma diferença nos níveis de EROS entre as células WT e as demais. Apesar de todas as células apresentarem um aumento na concentração de EROS, o nível detectado nas células WT foi inferior, sugerindo primeiramente que a presença do sistema BiFC ligado a hSOD1 não interfere na função antioxidante da enzima. Além disto, os resultados sugerem que a superexpressão de hSOD1 WT aumenta a proteção antioxidante, uma vez que os valores de EROS nas células que

expressam hSOD1-BiFC além de endógena foram inferiores que nas células que só expressam hSOD1 endógena. Todas as mutações apresentaram um nível alto de EROS, indicando que a presença das mesmas afetam a função antioxidante da enzima. Estes resultados indicam que mutações interferem na resposta frente um estresse oxidativo.

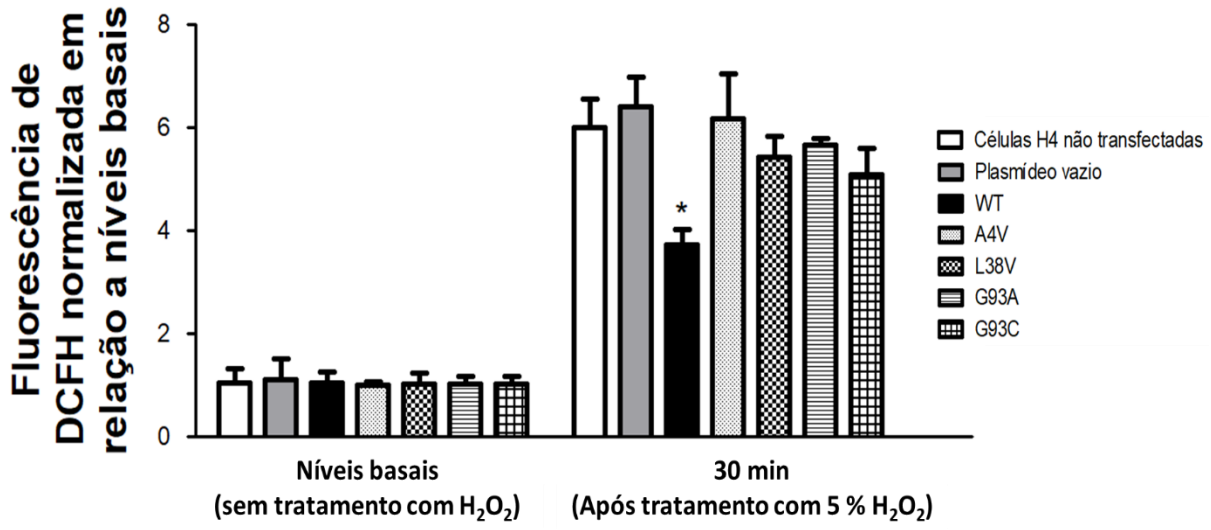


Figura 21. Níveis de EROS em célulasH4. Os níveis de EROS foram detectados em células H4 transfectadas com hSOD1-BiFC WT e mutantes usando a sonda DCFH. Após o tratamento com H_2O_2 5 % por 30 minutos, foi observado um aumento nos níveis de EROS, sendo maior nas células mutantes e que não expressavam hSOD1 WT. Células que expressam hSOD1-BiFC WT apresentaram o menor nível de EROS pós tratamento, indicando que a superexpressão de hSOD1 WT aumenta a proteção antioxidante das células. Os dados apresentados representam a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. Análise estatística foi feita usando Two-way ANOVA, com correção de Bonferroni, tendo níveis de significância de *$p<0.05$, comparando WT com mutantes.

4.5 hSOD1 E PROTEÇÃO CONTRA DANO AO DNA

A fim de verificar se mutações em SOD1 podem contribuir para um aumento no dano ao DNA, foi feito o ensaio cometa, o qual considera danos a fita dupla e simples do DNA. Este ensaio analisa as imagens dos cometas de DNA gerados, e como medida de dano ao DNA faz uma relação entre o tamanho da cauda do cometa (o menor tamanho detectável de DNA migratório) e a fração total de DNA intacto ("cabeça") (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995). Esta relação é denominada momento de cauda (figura 22). Quanto maior o momento de cauda, maior o dano ao DNA.

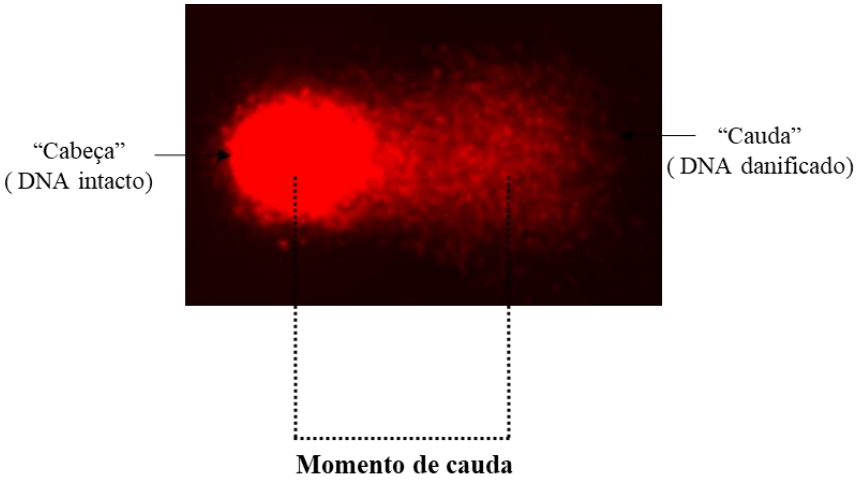


Figura 22. Representação esquemática de um cometa de DNA. Análise de dano ao DNA através do ensaio cometa. A cauda do cometa representa do DNA danificado, enquanto que a cabeça representa o DNA intacto. A relação entre os tamanhos da cauda e cabeça é denominado momento de cauda, e indica o quão danificado se encontra o DNA na condição estudada.

A superexpressão de hSOD1 WT diminuiu o dano ao DNA, uma vez que o momento de cauda desta foi inferior que o observado nas células controle (células transfectadas com plasmídeo vazio) (figura 23b). Já a presença das mutações A4V, L38V e G93C não protegeram o DNA, apresentando um momento de cauda 5 vezes maior do que células WT. Este resultado indica que estas mutações não protegem as células contra danos ao DNA, porém como apresentaram níveis semelhantes ao observado em células controle, não induzem um aumento de dano ao DNA. Em contrapartida, o momento de cauda da mutante G93A foi aproximadamente 5 vezes maior do que das demais mutantes, indicando que esta mutação de certa forma induz um aumento no dano ao DNA.

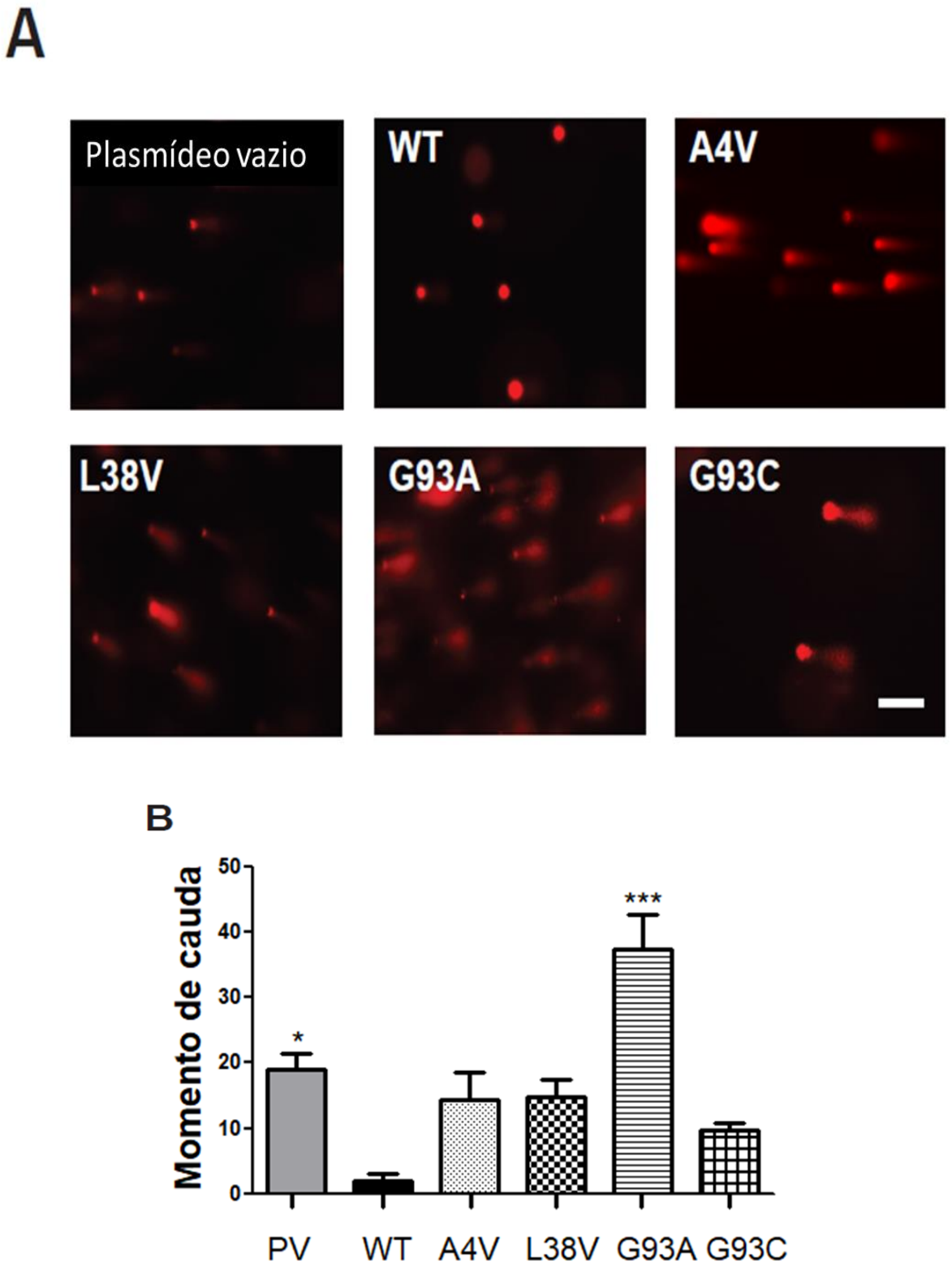


Figura 23. Análise do dano ao DNA através do ensaio cometa. **(a)** Imagens representativas do ensaio cometa. Cometas marcados com iodeto de propídio foram fotografados por microscopia de fluorescência e o momento de cauda calculado usando o software Comet Score. Células transfectadas com plasmídeo vazio foram usadas como controle. Barra de escala 40 μm. **(b)** Níveis de dano ao DNA. A quantificação da quebra da fita dupla e simples de DNA foi feita usando o ensaio cometa alcalino. Os dados apresentados são a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. Análise estatística foi feita usando One-way ANOVA, com correção de Bonferroni, tendo níveis de significância de ***$p<0.05$, comparando WT com mutantes. PV = plasmídeo vazio.

4.6 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE hSOD1 CARBONILADA

Além de verificar o aumento dos níveis de EROS e do dano ao DNA, outra forma de analisar o grau de oxidação das células é dosando os níveis de carbonilação proteica. Carbonilação proteica é um tipo de oxidação de proteínas que ocorre quando EROS reagem com as cadeias laterais da estrutura secundária, levando a formação de cetonas e aldeídos reativos. Um ensaio bastante utilizado para determinar o nível de carbonilação é pela dosagem de DNP formado a partir da reação de DNPH com as cetonas/aldeídos formados durante a carbonilação proteica. Oxidação de resíduos de lisina, arginina, prolina e treonina produz produtos detectáveis por reação com DNPH (SUZUKI; CARINI; BUTTERFIELD, 2010).

Em todos os casos o nível de carbonilação proteica foi determinado comparando a intensidade de carbonilação de hSOD1 endógena e de hSOD1-BiFC. Como pode ser observado na figura 24, não há um aumento na carbonilação de hSOD1 WT. O nível de carbonilação da mutante G93C é igual ao da WT, indicando que a presença desta mutação não induz uma carbonilação de hSOD1. Em contrapartida, as mutantes A4V, L38V e G93A apresentaram um nível de carbonilação de hSOD1 maior que de WT. Dentre as mutantes, G93A apresentou um nível de carbonilação de hSOD1 aproximadamente 2 e 3 vezes maior do que o observado em L38V e A4V, respectivamente.

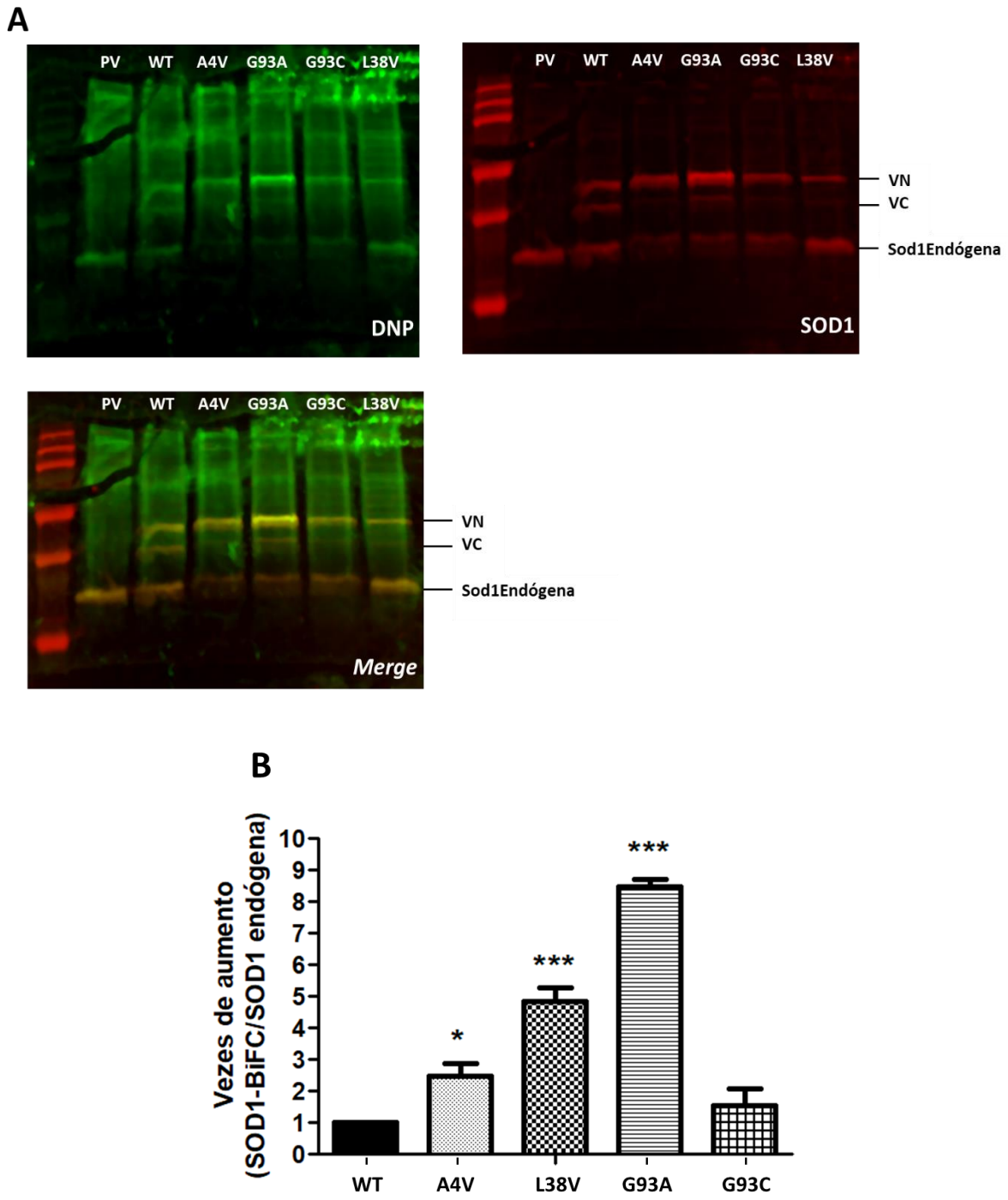


Figura 24. Dosagem dos níveis de hSOD1 carbonilada. (a) Imunoblot representativo para dosagem dos níveis de hSOD1 carbonilada pelo método de DNPH. Após experimento de western blotting seguido de transferência, a membrana obtida foi tratada com solução de DNPH 5M, e depois incubada overnight com anti-hSOD1(vermelho) e anti-DNP (verde). Bandas laranjas indicam que hSOD1 foi carbonilada. As imagens foram obtidas por Odyssey CLX- Imaging System (LI-COR). **(b)** Quantificação do imunoblot. Usando o software Image J foram determinadas as intensidades de cada banda, e os valores normalizados comparando a intensidade das bandas hSOD1-VN + hSOD1-VC com a intensidade da banda do controlo endógeno γ-tubulina. O nível de carbonilação foi dado pela relação entre hSOD1-BiFC/hSOD1 endógena. Dados são expressos como a média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Análise estatística foi feita usando o método T-Student, comparando cada mutante com WT. *$p<0.05$ e ***$p<0.001$ representam valores estatisticamente diferentes de WT.

5. DISCUSSÃO

Assim como nas demais doenças neurodegenerativas, acredita-se que a toxidez por trás das mutações em hSOD1 relacionadas com ELAf está diretamente ligada com a formação de aglomerados proteicos observados em células de pacientes com a doença. Desta maneira, quando o foco do estudo são mutações no gene *SOD1*, geralmente tenta-se entender como os aglomerados são formados, e fazer uma ligação com o desenvolvimento da neurodegeneração. No presente trabalho o estudo da formação de aglomerados foi feito por microscopia de fluorescência, usando células de neuroglioma expressando hSOD1 WT e as mutações A4V, L38V, G93A e G93C fusionadas ao sistema BiFC. Como mencionado anteriormente, este sistema permite visualizar a interação entre duas proteínas fusionadas a fragmentos complementares de uma proteína fluorescente, por exemplo a proteína vênus. Sabendo que hSOD1 forma homodímero de forma espontânea, o uso do sistema BiFC foi apropriado para o estudo dos aglomerados presentes em células expressando hSOD1 mutante. Como foi demonstrado na figura 17, todas as mutações formaram aglomerados, localizados no citoplasma, enquanto que WT só formou homodímeros.

Apesar dos numerosos estudos envolvendo mutações em hSOD1 indicarem a presença e formação de aglomerados, ainda não se sabe ao certo como estes podem exercer um papel tóxico na patologia da doença. Estudos mais recentes tem tentado relacionar esse aglomerados observados em doenças neurodegenerativa a grânulos de estresse. Grânulos de estresse (SG- do inglês *Stress granules*), são compartimentos sem membrana envolvidos na regulação de mRNA durante estresse (MATEJU et al., 2017). Estudos usando modelos como células HeLA e neurônios motores de medula indicaram uma interação entre agregados oriundos de mutantes A4V e G93A com a proteína G3BP1 (GAL et al., 2016; MATEJU et al., 2017). A proteína ligante RAS GTPase-ativadora exerce um papel crítico na dinâmica de SG (GAL et al., 2016). Sabendo disto, as células foram fixadas e incubadas com anticorpo G3BP1, um marcador usado para a caracterização de aglomerados como SG (SIWACH; KAGANOVICH, 2017). A figura 18 mostrou que os aglomerados observados nas células H4 não colocalizaram com a proteína G3BP1, sugerindo um tipo diferente de aglomerado formado. Além disto, este resultado sugere que o tipo de aglomerado formado depende não somente da mutação em questão, mas também da condição tratada e do modelo celular empregado. Assim como observado em células H4 (figura 18), Gal e colaboradores demonstraram que aglomerados estudados em células HEK293 não colocalizaram com G3BP1, porém usando células provenientes de camundongos transgênicos, os aglomerados detectados foram caracterizados como SG (GAL et al., 2016).

Alguns dos aglomerados observados na figura 17 estavam localizados bem próximos ao núcleo, sugerindo uma possível colocalização com o compartimento JUNQ. JUNQ é um compartimento de controle de qualidade composto por chaperonas e proteassomo. Agregados de hSOD1 presentes no JUNQ inibem sua função proteassomal, reduzindo a viabilidade celular. A figura 19 mostrou que em ambas as condições, todas as mutantes apresentaram aglomerados que colocalizaram com a proteína VHL, indicando que os aglomerados formados são direcionados para o JUNQ, o que aumenta os efeitos danosos das mutações. Já foi verificado experimentalmente que as mutantes G93A e A4V acumulam no JUNQ, interferindo na degradação de outras proteínas desenoveladas (FARRAWELL et al., 2015). Estudos mais recentes mostraram que agregados de hSOD1 interagem com proteínas 14-3-3 (chaperonas envolvidas em diversas funções celulares, incluindo apoptose) no JUNQ, inibindo o papel antiapoptópico destas proteínas, aumentando o poder tóxico dos agregados de hSOD1 (PARK et al., 2017).

Cada mutação possui características distintas tais como tempo de expetativa de vida, assim como localização da mutação na estrutura de hSOD1. Por exemplo, A4V, considerada uma das mutações mais severas com uma expectativa de vida em torno de 1.5 anos, é localizada na interface dimérica e considerada uma das mutantes mais instáveis. G93A e G93C ambas são localizadas na fita-β no barril-β, sendo diferenciadas pelo tempo de expectativa de vida, de aproximadamente 2 e 17 anos, respectivamente (KIM et al., 2014). Como observado na figura 17, todas as mutações apresentaram formação de aglomerados, como esperado de acordo com estudos já apresentados na literatura. Porém, pouco ainda se desenvolveu sobre a cinética de formação dos aglomerados, e sua possível relação com o tempo de desenvolvimento da doença. Como observado na figura 20, as mutantes A4V e G93A, as quais têm uma expectativa de vida menor e são consideradas mutações mais severas, apresentaram o menor tempo de formação de aglomerados dentre as mutantes estudadas.

Considerando que uma das etapas inicias de formação de aglomerados é o acúmulo de monômeros de SOD1, estes resultados sugerem que as mutações A4V e G93A induzem a um aumento na concentração de monômeros, desestabilizando o equilíbrio dímero/monômero basal de SOD1. Essa perda de equilíbrio está diretamente ligada com a estabilidade do dímero de SOD1 formado. Apesar de SOD1 formar dímeros altamente estáveis, a presença de algumas mutações, como por exemplo A4V, modificam esta estabilidade dimérica. Estudos termodinâmicos indicam que enquanto SOD1 WT e G93A possuem temperatura de fusão(Tm) próximas, indicando uma termoestabilidade semelhante, a presença de A4V diminui a Tm de

SOD1 em aproximadamente 10 ºC, indicando uma queda na estabilidade do dímero, e uma maior propensão a formar monômeros (RODRIGUEZ et al., 2002). Uma das propriedades de SOD1 relacionadas a estabilidade dimérica é a presença da ligação dissulfeto na interface dimérica, a qual liga os dois monômeros de SOD1(ARNESANO et al., 2004). Estudos já mostraram que mutantes de SOD1 são mais suscetíveis a sofrerem redução desta ligação, desestabilizando a formação do dímero(TIWARI; HAYWARD, 2003). Juntando os resultados da literatura com os de formação de aglomerados (figura 17) e de cinética (figura 20) do presente trabalho, pode-se sugerir que as mutações A4V e G93A de alguma forma desestabilizam a formação do dímero de SOD1, aumentando a concentração de monômero, levando a um acúmulo de aglomerados.

Além da formação de aglomerados, acredita-se que mutantes de hSOD1 induzem uma perda de função da proteína, havendo uma queda na proteção antioxidante das células. Uma das maneiras de verificar essa queda na proteção é dosando os níveis de EROS intracelulares. Como observado na figura 21, após tratamento com H_2O_2, todas as mutantes apresentaram um aumento na concentração de EROS. Uma possível explicação é a localização de hSOD1 mutante A4V, L38V, G93A e G93C na forma de aglomerados no citoplasma. Estudos já mostraram que mutantes de hSOD1 localizadas no citoplasma estão majoritariamente na forma de monômero, forma não ativa da enzima, formando multímeros incapazes de difundirem do citoplasma para outras regiões intracelulares, dentre elas o núcleo (KIM et al., 2014). Isto leva a outra possibilidade para esse aumento de EROS nas mutantes: a queda na localização nuclear (figura 17c). Mesmo frente a um estresse oxidativo, as mutantes permanecem majoritariamente no citoplasma, interferindo na ativação de defesas antioxidantes, consequentemente prejudicando o equilíbrio redox da célula.

Recentemente, foi identificado mais um papel na proteção antioxidante da proteína hSOD1: possível fator de transcrição nuclear. No trabalho, Tsang e colaboradores mostraram a importância da localização nuclear de hSOD1 em resposta a um estresse oxidativo, como regulador da expressão de genes de defesa antioxidante. Além disto, mostraram como a ausência de hSOD1 no núcleo leva a um aumento do dano ao DNA (TSANG et al., 2014). Uma vez que as mutantes apresentaram uma queda na concentração de hSOD1 nuclear (figura 17c) e um aumento na concentração de EROS (figura 21), foi feita uma análise de dano ao DNA. Os resultados apresentados (figura 23) confirmam a importância de hSOD1 no núcleo como forma de proteção, uma vez que todas as mutantes apresentaram um momento de cauda maior que WT e uma queda na concentração nuclear de aproximadamente 50 %. Porém, também sugere

como cada mutação possui um mecanismo tóxico diferente, uma vez que mesmo apresentando os mesmos níveis de concentração de EROS, dinâmica de formação de aglomerados e concentração nuclear, a mutação G93A apresentou um dano ao DNA superior ao da mutação A4V. Estudos anteriores já identificaram a presença de dano ao DNA em pacientes com ELA e em modelos de animais carregando a mutação G93A, sugerindo que dano ao DNA deve exercer um papel importante no mecanismo de morte dos neurônios motores observado em pacientes com ELA (BARBER; MEAD; SHAW, 2006; BARBOSA et al., 2010).

Estudos têm mostrado que algumas mutações aumentam a probabilidade de uma proteína sofrer carbonilação, como consequência de um aumento do estresse oxidativo intracelular. Os resultados da figura 24 mostram que a proteína hSOD1 é mais carbonilada quando apresenta as mutações A4V, L38V ou G93A, sendo esta última a que apresentou um maior nível de carbonilação da proteína. A4V apesar de apresentar o maior número de células com aglomerados, obteve um dos menores níveis de carbonilação, sugerindo uma menor propensão a ser carbonilada do que as demais mutantes, além de indicar que provavelmente sua toxidez esteja diretamente ligada a formação de aglomerados.

Os níveis de proteína carbonilada durante envelhecimento celular e como resposta ao estresse oxidativo ocorre principalmente porque algumas proteínas são mais suscetíveis que outras. Por apresentar sítios de ligação a metal de transição (Cu e Zn), acredita-se que hSOD1 seja uma das proteínas encontradas no cérebro mais suscetíveis a sofrer carbonilação, via oxidação catalisada por metais. Proteínas ligadas a metais de transição são fontes de EROS que colaboram na iniciação de reações em cadeia, o que resulta na adição de grupos carbonila as cadeias laterais da estrutura da proteína. Além disto, acredita-se que proteínas desenoveladas são mais propensas a sofrer carbonilação do que na sua forma nativa, devido a desestruturação e exposição de sítios passiveis de reação com EROS e formação de grupos cetonas/aldeídos (CHEN; GUO; KONG, 2012). Com base nisto, nos resultados de formação de aglomerados e nos níveis de carbonilação, pode-se sugerir que aglomerados de A4V podem ser formados a partir de um acúmulo desordenado de monômeros de SOD1, enquanto que aglomerados G93A podem vir ser formados por proteínas hSOD1 desenoveladas, justificando um maior nível de carbonilação desta mutação, porém níveis de dinâmica de formação de aglomerados igual a de A4V.

Considerações

Os resultados apresentados nesta sessão fazem parte do artigo *Implications of fALS mutations on Sod1 function and Oligomerization in cell models* (BRASIL et al., 2018), e são de suma importância para o desenvolvimento de novos experimentos nesta área que possam vir ajudar no entendimento do mecanismo tóxico por trás das mutações em hSOD1 relacionadas a ELA. Este trabalho foi o primeiro a estudar aglomerados de mutantes de hSOD1 usando o sistema BiFC para sua visualização. Como o promotor dos plasmídeos VN e VC usados é hSOD1, as condições de expressão de hSOD1-BiFC WT e mutantes foram as mesmas que as de expressão de hSOD1 endógena, diminuindo a possibilidade de resultados falso positivos, e aumentando a vantagem do uso do BiFC no presente trabalho. Além disto, pôde-se acompanhar a dinâmica de formação de aglomerados *in vivo*, pouco explorada na literatura.

Apesar de não estarem no artigo, os resultados de carbonilação de hSOD1 são de grande importância principalmente porque abrem caminhos para um estudo mais aprofundado deste efeito em mutações na proteína, usando outras técnicas, como por exemplo espectrometria de massas (EM). Desta maneira, seria interessante averiguar quais modificações ocorrem na estrutura de hSOD1 mutante que levam a um aumento na carbonilação da proteína, assim como identificar os sítios que estão carbonilados, e o mecanismo por trás deste efeito. Entender melhor mecanismos que estão por trás da toxidez das mutantes de hSOD1 são importantes para o desenvolvimento de terapias eficazes contra a ELA.

Porém, assim como em qualquer trabalho, sempre existem questões que não podem ser respondidas com o modelo usado, ou com as técnicas acessíveis no laboratório. No caso do presente trabalho, o uso de células H4 que expressam hSOD1 endógena levantou um questionamento importante: será que a presença de hSOD1 endógena pôde ter interferido nos resultados observados nas células expressando hSOD1 mutante? Além disto, por mais que o sistema BiFC tenha se mostrado bastante eficiente para a visualização dos aglomerados, será que usar um marcador fluorescente acoplado à proteína hSOD1 poderia interferir na sua função antioxidante, principalmente na sua atividade enzimática? Para responder estas e outras perguntas, células de *S.cerevisiae* foram usadas, como será apresentado na próxima sessão.

PARTE II: ESTUDOS COM CÉLULAS DE *Saccharomyces crevisiae*

6. RESULTADOS

A segunda parte deste trabalho usou como modelo experimental células de *S.cerevisiae* deficientes em Sod1p de levedura, expressando SOD1 humana WT (Δ*sod1*hSOD1WT), A4V (Δ*sod1*hSOD1A4V) e G93A (Δ*sod1*hSOD1G93A), sem marcação e com marcação do sistema BiFC. Apenas as mutantes A4V e G93A foram usadas nesta etapa visto que foram as mutações que apresentaram resultados mais interessantes em termos de formação de aglomerados, assim como proteção antioxidante no modelo de célula animal.

6.1 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE hSOD1 EM CEPAS MUTANTES

Para acessar a atividade enzimática de hSOD1 *in vitro*, foi feito um experimento de cinética, no qual se dosava a quantidade de NBT reduzido (Formazan) gerado num meio reacional contendo riboflavina, hSOD1 WT ou mutante e NBT oxidado. Riboflavina na presença de luz, catalisa a reação de redução de O_2 a $O^{-\cdot}_2$. Íons superóxido livres então reduzem o NBT, formando formazan. Se hSOD1 estiver ativa no meio reacional, a concentração de íons superóxido será reduzido, de forma que pouco formazan será gerado (figura 25).

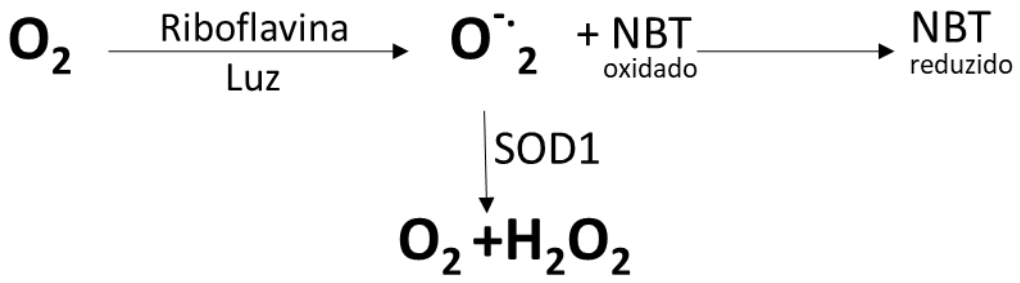


Figura 25. Esquema de formação de NBT reduzido na presença de riboflavina. O_2 na presença de riboflavina e luz é reduzido, gerando radical superóxido. Radical superóxido livre reage com NBT oxidado, formando NBT reduzido (formazan). Na presença de SOD1, radicais superóxido gera peróxido de hidrogênio e oxigênio.

A figura 26 mostra os valores de atividade hSOD1 obtidos. Como pode ser observado, num crescimento fermentativo, sem nenhum tipo de estresse, todas as cepas expressando hSOD1 apresentaram atividade enzimática semelhante. Os resultados indicam que mesmo numa condição sem nenhum tipo de estresse, hSOD1 tem que ser mantida ativa para controle

do equilíbrio redox homeostático, e mesmo na presença das mutações, tal função não foi danificada.

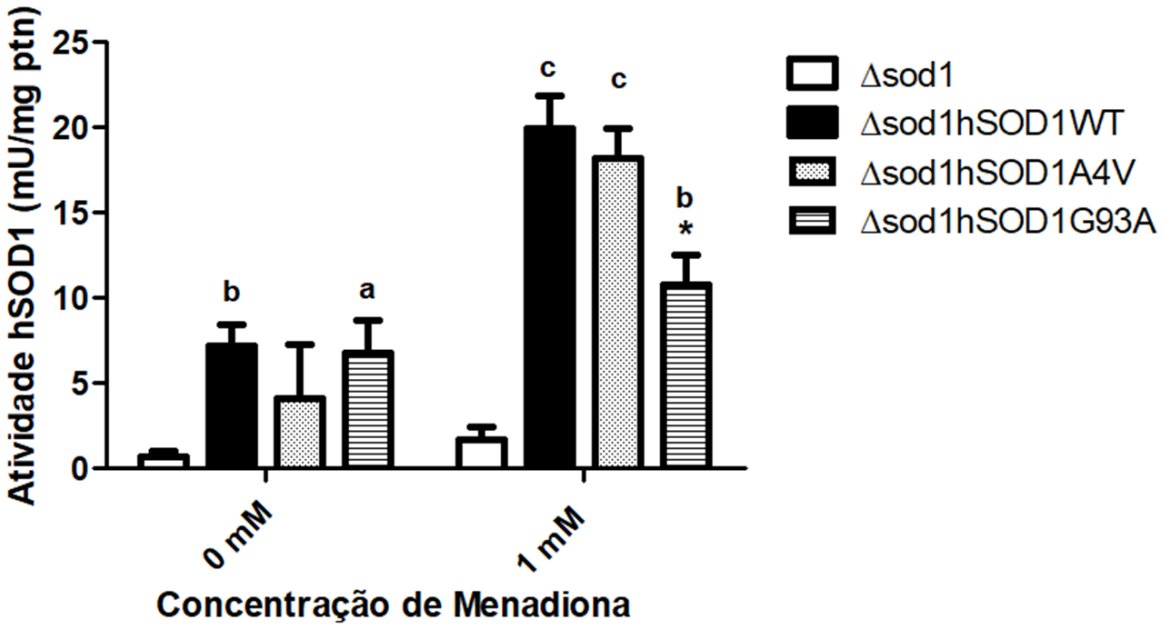


Figura 26. Atividade hSOD1 após indução de estresse oxidativo. Cepas de *S.cerevisiae* deficientes em Sod1p de levedura e expressando SOD1 humana WT e mutante foram cultivadas em meio sintético seletivo rico em glicose até metade da primeira fase exponencial, a 28ºC / 160 rpm. Estresse oxidativo foi induzido por tratamento com menadiona 1mM por 1 h / 28ºC / 160 rpm. Os valores de atividade hSOD1 foram dosados *in vitro* por cinética de formação de NBT reduzido. 1 U equivale a quantidade de proteína capaz de reduzir 50 % de NBT. Os dados são apresentados como uma média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas usando T-Student. Valores com [a] $p<0.05$, [b] $p<0.01$, [c] $p<0.001$ são estatisticamente diferentes de Δ*sod1*. Valores com * $p<0.05$ são estatisticamente diferentes de Δ*sod1*hSOD1WT.

A fim de verificar uma possível diferença nas atividades entre as cepas, as células foram submetidas a um tratamento com 1 mM de menadiona por uma hora. Menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) é um agente oxidante que induz estresse oxidativo pela geração de íons superóxido em uma reação de duas etapas (figura 27) (CRIDDLE et al., 2006). Íons superóxido são substrato para atividade de SOD1, de forma que se espera que sob indução de estresse oxidativo via acúmulo de íons superóxido, a atividade hSOD1 aumente. Como pode ser observado, após indução de estresse, nas cepas WT e A4V ocorreu um aumento de atividade SOD1, aproximadamente 2.5 vezes, enquanto que os valores se mantiveram próximos na cepa G93A (aumento de aproximadamente 1.5 vezes) (figura 26). Este resultado sugere que de certa forma a mutação G93A interfere no mecanismo de ativação enzimática frente um estresse oxidativo, mantendo os níveis de atividade inferiores que os observados na cepa WT.

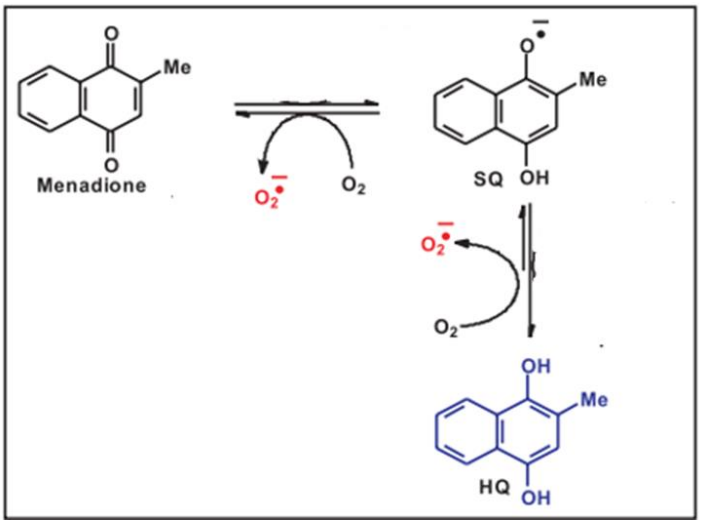


Figura 27. Esquema de formação de íons superóxido na presença de menadiona. Menadiona na presença de oxigênio gera um radical instável de semiquinona (SQ) e radicais superóxido. SQ na presença de oxigênio gera hidroquinona (HQ) e mais radicais superóxido (adaptado de CRIDDLE et al., 2006**)**

A fim de verificar se essa diferença de atividade entre as cepas WT e G93A podia estar relacionada com a expressão da proteína, e não apenas a níveis enzimáticos, foi feito um experimento de imunoblotting. Como pode ser observado na figura 28, a expressão de hSOD1 G93A foi inferior a expressão de hSOD1 WT em ambas as condições estudadas. Além disto, não foi observado um aumento de expressão após estresse oxidativo, justificando os níveis semelhantes de atividade enzimática em ambas as condições. O gráfico também mostra que há um aumento de expressão tanto da cepa WT quanto da cepa A4V de aproximadamente 50 % após estresse oxidativo, indicando que o tratamento com menadiona foi suficiente para induzir um aumento de expressão de hSOD1, justificando o aumento da atividade enzimática pós estresse nestas cepas.

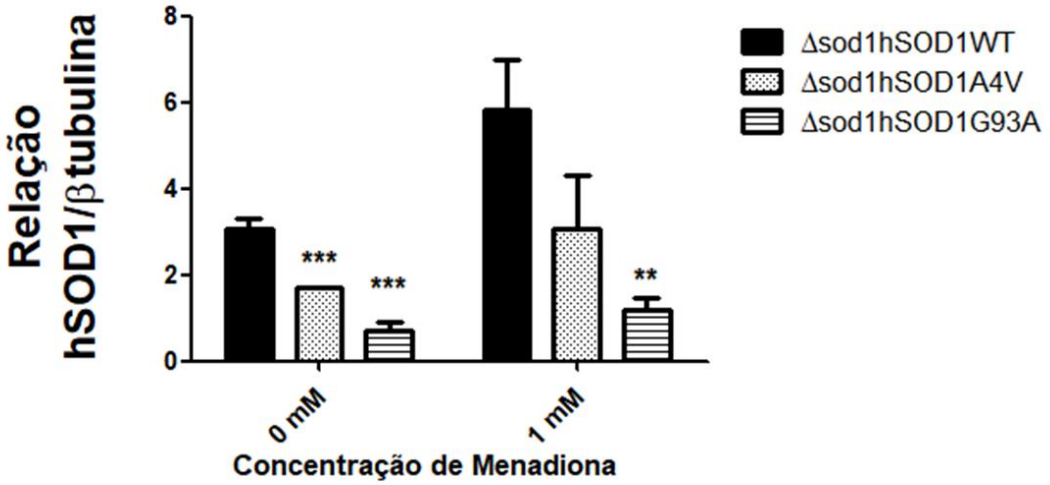


Figura 28. Quantificação da expressão de hSOD1 e mutantes. Usando o software Image J foram determinadas as intensidades de cada banda, e os valores normalizados comparando a intensidade das bandas hSOD1 WT ou mutante com a intensidade da banda do controle endógeno, β-tubulina. Dados são expressos como a média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Análise estatística foi feita usando o método T Student, onde **p<0.01 e *** p<0.001 representam valores estatisticamente diferentes de WT.

Por fim, outra forma de dosar os níveis de atividade SOD1 é por meio de atividade em gel nativo (zimograma). Na figura 29, as três cepas apresentaram um aumento de atividade enzimática após indução de estresse. Porém, observando o gel de atividade, as bandas referentes a cepa G93A são mais fracas que as demais cepas, confirmando a baixa atividade de SOD1 na presença desta mutação.

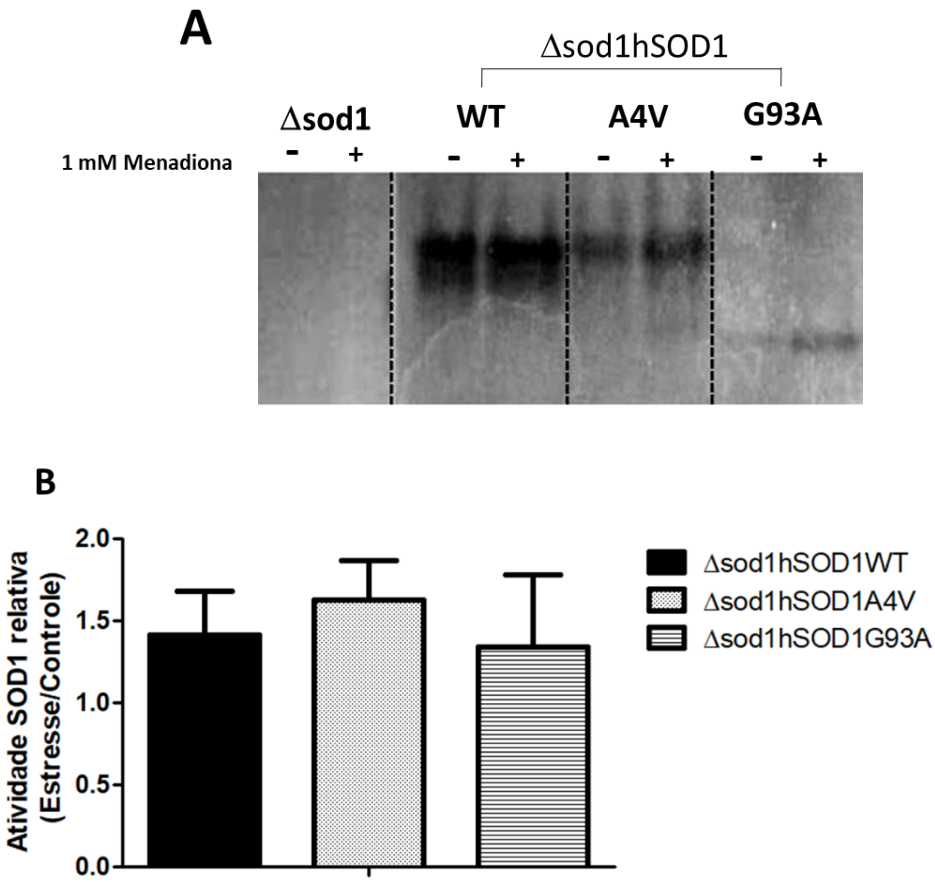


Figura 29. Dosagem de atividade hSOD1 por metodologia gel. (a) Imunoblott representativo para dosagem de atividade hSOD1 pelo método de gel (zimograma). O equivalente a 30 μg de proteína foram aplicados em gel nativo, e submetido a eletroforese por aproximadamente 30 minutos. O gel obtido então tratado com solução de NBT por 20 minutos, seguido de incubação do gel em solução de riboflavina, com exposição à luz. As imagens foram obtidas em sistema Fusion. **(b)** A quantificação da intensidade de cada banda foi obtida através do software Image J.A atividade relativa foi calculada pela relação entre intensidade da banda pós estresse e a intensidade da banda antes do estresse. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes.

6.2 TOLERÂNCIA A ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR TRATAMENTO COM MENADIONA

Uma vez verificado que as cepas estavam expressando hSOD1 e que tratamento com 1 mM de menadiona era suficiente para induzir uma atividade enzimática na cepa WT, a tolerância a diferentes concentrações de menadiona foi verificada. As cepas em fase exponencial foram tratadas com 60, 80, 100 mM e 1M de menadiona por 1 h / 28ºC / 160 rpm. Após término de estresse o equivalente a 40 μg de células (peso-seco) foram diluídas e

plaqueadas em meio sólido, a 28ºC até surgimento de colônias. A figura 30 mostra os resultados obtidos.

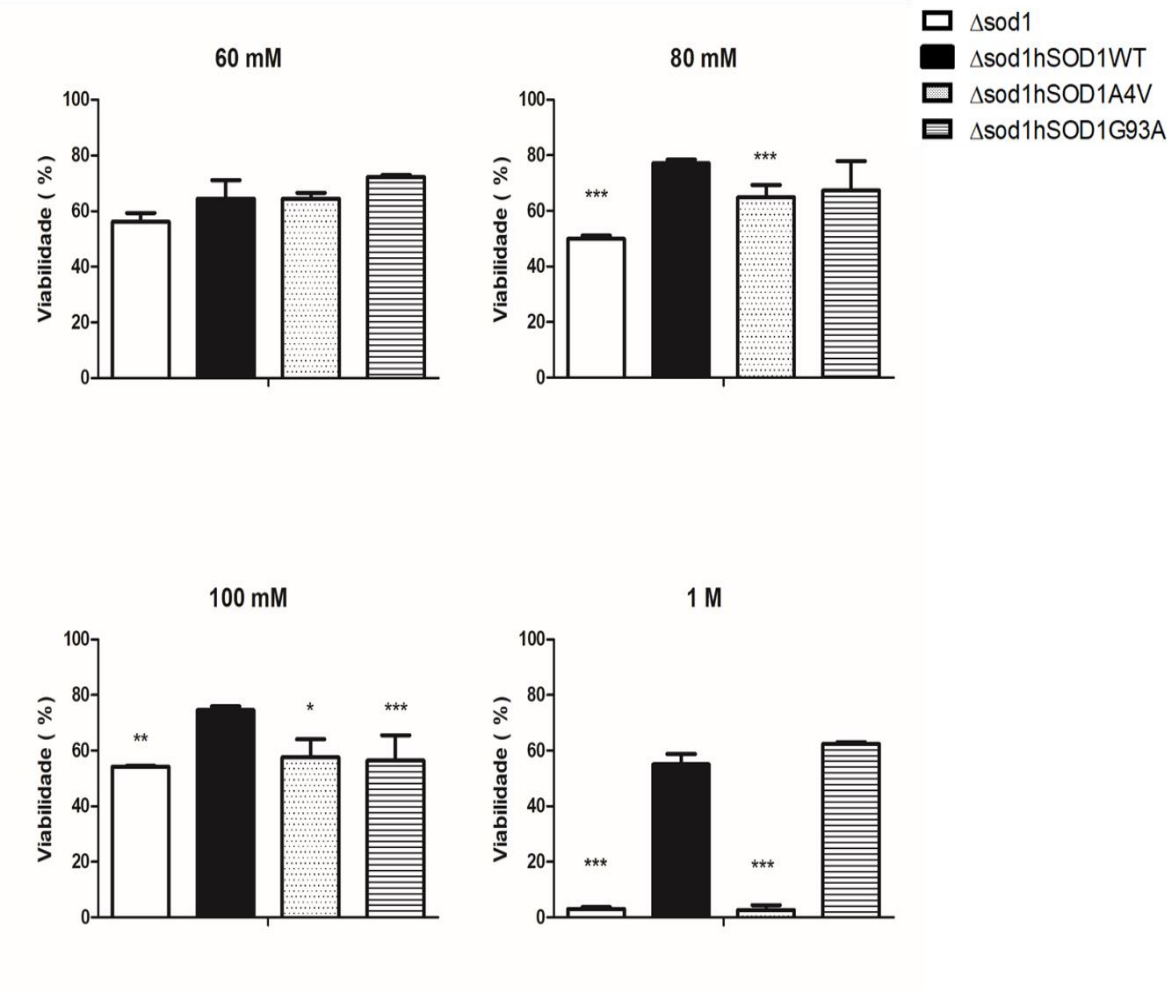


Figura 30. Determinação da tolerância das cepas expressando hSOD1 sob diferentes concentrações de menadiona. As cepas em fase exponencial foram submetidas a tratamento com diferentes concentrações de menadiona (60, 80, 100 mM e 1 M) durante 1 h / 28ºC / 160 rpm. O equivalente a 40 μg de células foram diluídos em água (diluição seriada) e plaqueados em meio SC 2 % sólido. As placas foram mantidas em estufa por aproximadamente 72 h, até o surgimento das colônias. A viabilidade foi determinada fazendo uma relação entre número de colônias observado após estresse e antes do estresse. Os dados apresentados representam a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. Análise estatística foi feita por T Student, comparando, em cada situação, cepas mutantes com cepa WT. *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$ representam valores significativamente diferentes.

As cepas expressando hSOD1WT e hSOD1G93A apresentaram um perfil de tolerância a menadiona semelhantes entre si. Em todos os casos estudados mantiveram viabilidade próxima de 50 %, mesmo após um tratamento severo com 1 M de menadiona. Este resultado sugere que mesmo com uma atividade baixa na mutante G93A, esta foi suficiente para manter

as cepas viáveis mesmo em condições de estresse severo. Já as cepas expressando hSOD1A4V sempre mantiveram uma viabilidade diferente da observada na cepa WT, e após estresse com 1 M atingiram uma viabilidade de aproximadamente 10 % (6 vezes menor que a observada na cepa WT). Estes resultados sugerem que hSOD1 sob estresse oxidativo pode agir como ativador de outros mecanismos de defesa antioxidantes, uma vez que na cepa A4V, mesmo apresentando um valor de atividade semelhante ao da WT, a viabilidade da mutante foi inferior à da WT.

A partir dos resultados de viabilidade foi estipulado que os demais experimentos de averiguação a danos oxidativo e balanço redox seriam feitos com concentração de 80 mM de menadiona. Nesta condição as células não apresentam viabilidade de 100 %, indicando estão sob estresse oxidativo, e capazes de serem usadas para determinação de outros parâmetros oxidativos. Além disto, com a partir de 80 mM de menadiona houve uma diferença significativa entre o resultado da mutante A4V em relação a WT.

6.3 DOSAGEM DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Uma das maneiras de se dosar o grau de oxidação em que uma célula está submetida é pela análise do grau de peroxidação lipídica. Lipídios são um dos principais alvos do estresse oxidativo, sendo mais suscetíveis a modificações oxidativas, e já foi implicado como um dos fatores que podem levar ao desenvolvimento de ELA (PARAKH et al., 2013).

Como pode ser observado na figura 31, numa situação sem nenhum tipo de estresse, todas as cepas apresentaram um acúmulo de MDA semelhante, com exceção da cepa G93A, a qual teve um valor significativamente superior aos valores observados na cepa Δ*sod1* e cepa WT. Isto sugere que numa condição controle, a presença da mutação G93A de certa forma já causa um aumento no dano à membrana celular. Apesar disto, os valores observados, inclusive para esta mutante, são semelhantes aos observados em cepas de *S.cerevisiae* selvagens (BY4741), em mesmas condições, levando-se a crer que a peroxidação observada seja normal e não prejudicial ao metabolismo celular (MAGALHÃES et al., 2018).

Porém quando há tratamento com 80 mM de menadiona, a cepa Δ*sod1* apresentou um aumento de aproximadamente 3 vezes no nível de MDA dosado, enfatizando a importância da SOD1 funcional para uma proteção da membrana contra estresse oxidativo. A expressão de hSOD1 resgatou o fenótipo, uma vez que todas as cepas apresentaram um grau de peroxidação

inferior ao da cepa Δ*sod1*. Dentre as cepas expressando hSOD1 a que teve um grau maior de peroxidação foi a cepa A4V. Este resultado demonstra que a presença da mutação A4V é tão tóxica para a membrana celular quanto a ausência da Sod1p de levedura, sugerindo mais uma vez que SOD1 pode exercer um papel como regulador de mecanismos de defesa antioxidante.

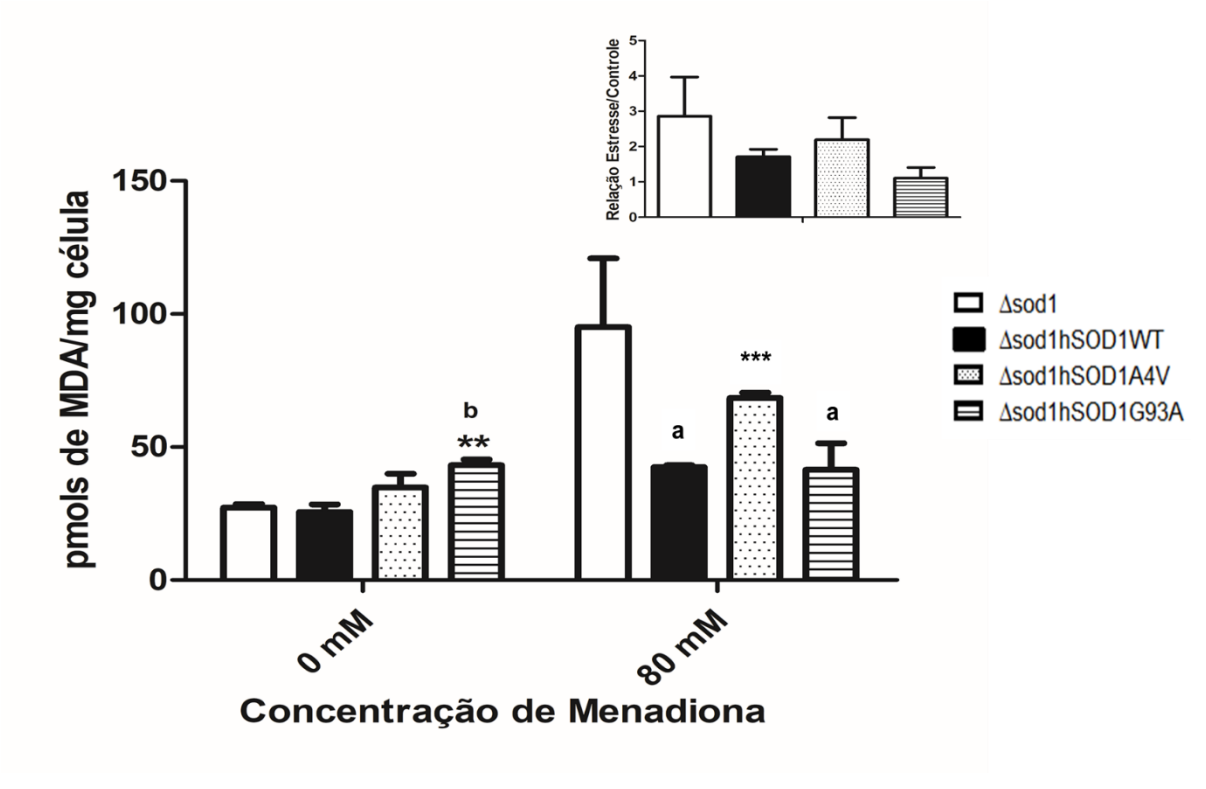


Figura 31. Dosagem do grau de peroxidação lipídica. Os níveis de peroxidação lipídica foram determinados a partir da dosagem do produto MDA nas cepas Δ*sod1* e Δ*sod1* expressando hSOD1WT, A4V e G93A pelo método TBARS, antes e após indução de estresse oxidativo. Células de levedura em fase exponencial foram tratadas com 80 mM de menadiona por 1 h / 28ºC / 160 rpm. Os dados representam a média ± desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas usando T Student. [a] $p<0.05$,[b]$p<0.01$ representam valores estatisticamente diferentes de Δsod1. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ representam valores estatisticamente diferentes de Δ*sod1*hSOD1WT.

Os níveis de peroxidação na mutante G93A se mantiveram os mesmos após indução de estresse, além de manter um valor igual ao da WT. Isto pode sugerir que mesmo não apresentando um nível de atividade enzimática igual ao da cepa WT, o pouco que mantem é suficiente para manter a proteção da membrana lipídica. Além disto, a mutação, sob condições oxidativas induzidas por menadiona, aparentemente não interfere em outros possíveis caminhos de proteção da membrana contra danos oxidativos.

6.4 AVALIAÇÃO DO EQUÍLIBRIO REDOX

Assim como feito em células H4 (figura 21), o nível de oxidação intracelular foi dosado nas cepas sob condição de estresse oxidativo, como mostra a figura 32.

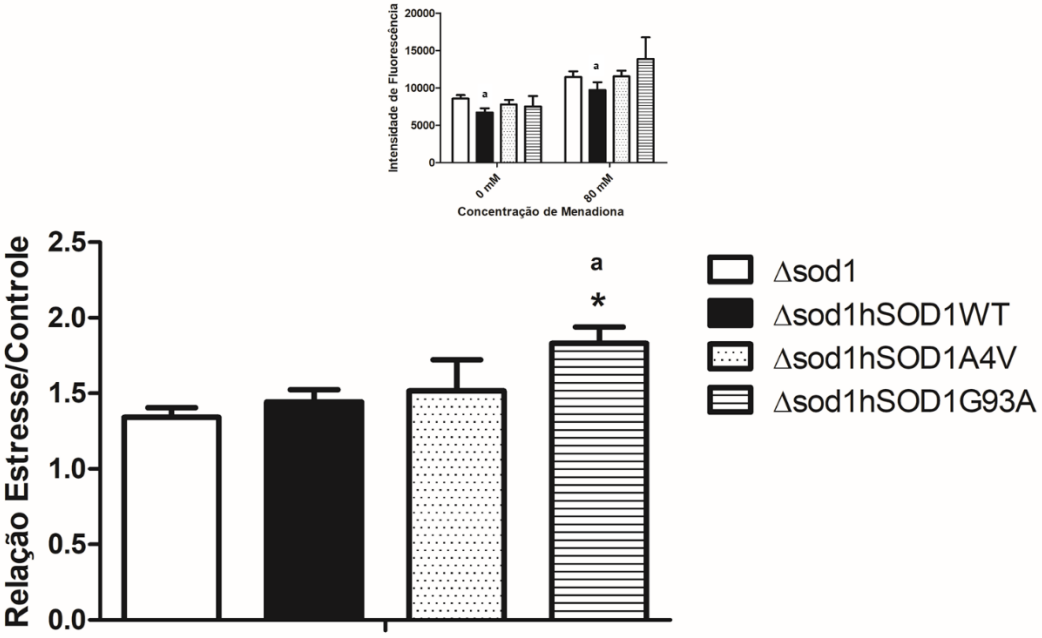


Figura 32. Dosagem dos níveis de oxidação intracelular. Células de *S.cerevisiae* expressando hSOD1 WT, A4V e G93A em fase exponencial foram submetidas a tratamento com 80 mM de menadiona durante 1 h /28ºC /160 rpm. As células foram tratadas com sonda DCFH, e os níveis de fluorescência obtidos por leitura em espectrofluorímetro. Os dados representam a média ± desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas usando T Student, onde * $p<0.05$ representa valores estatisticamente diferentes de Δsod1hSOD1WT; [a] $p<0.05$ representa valores estatisticamente diferentes de Δsod1.

Como observado na figura em todas as cepas o tratamento com menadiona levou a um aumento discreto nos níveis de EROS, aproximadamente 1.5 vezes. Assim como observado nas células H4 sob tratamento com H_2O_2, o nível de oxidação intracelular na mutante G93A foi superior que WT, indicando que existe um dano no sistema antioxidante.

O resultado apresentado para mutante A4V é interessante, pois apesar desta apresentar o maior nível de peroxidação lipídica e menor viabilidade que WT, ainda assim os níveis intracelulares de EROS se mantiveram, sugerindo que os danos até então observados não estão ligados apenas ao acúmulo de EROS nesta mutante.

6.5 ANALISE DOS NÍVEIS DE CARBONILAÇÃO PROTEICA

Assim como feito em células H4 (figura 24), os níveis de proteína carbonilada foram analisados. Porém, enquanto que em células H4 foi determinado o grau de carbonilação de hSOD1, em células de levedura foi determinado o nível total de carbonilação proteica (figura 32).

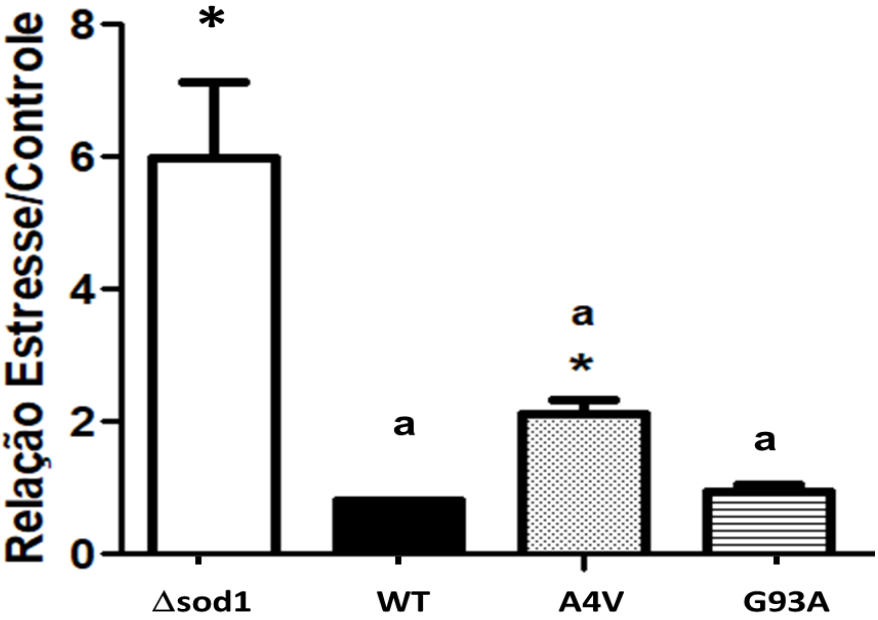


Figura 33. Dosagem dos níveis de proteína carbonilada total. Células de levedura Δsod1 expressando hSOD1 WT, A4V e G93A em fase exponencial foram submetidas a tratamento com 80 mM de menadiona por 1 h / 28ºC /160 rpm. Os níveis de proteína carbonilada foram determinados pelo método de dotblot seguido de tratamento com solução DNPH 2 mM. As bandas obtidas no dotblot foram analisadas e suas intensidades calculadas usando Image J. O valor de carbonilação proteica total foi determinado fazendo a relação entre a intensidade da banda após e antes o estresse com menadiona. Cada resultado representa a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi feita por T student. Valores [a] $p<0.05$ são estatisticamente diferentes de Δsod1 e * $p<0.05$ valores estatisticamente diferentes de Δsod1hSOD1WT.

Como pode ser observado, a ausência de Sod1p foi suficiente para aumentar aproximadamente em 6 vezes os níveis de proteína carbonilada sob indução de estresse oxidativo, reforçando a importância desta enzima como agente antioxidante. O resultado também mostra que a expressão de hSOD1 foi suficiente para baixar os níveis de carbonilação, inclusive nas cepas A4V e G93A. É interessante observar que a cepa G93A teve um perfil de carbonilação semelhante ao perfil da WT, indicando que esta mutação não interfere no mecanismo de defesa antioxidante das células. Este resultado, junto aos resultados de viabilidade e peroxidação confirmam que esta mutação, em termos de defesa antioxidante, se comporta de forma semelhante a uma hSOD1 WT.

Em contrapartida, a cepa A4V mostrou um aumento nos níveis de carbonilação 2 vezes maior que o apresentando na cepa WT. Este resultado enfatiza que esta mutação é mais

prejudicial, e sugere que seu mecanismo tóxico pode estar relacionado a perda da função antioxidante da proteína. Entretanto, comparando os valores da cepa Δ*sod1* com a mutante A4V, verifica-se que a ausência de Sod1p é mais prejudicial à célula do que a presença da mutação. Isto pode estar relacionado com a falta de atividade superóxido dismutásica na cepa Δ*sod1*, assim como uma possível perda da regulação de outros sistemas de proteção antioxidante, levando a um aumento nos danos oxidativos na célula.

6.6 ESTUDO DA FORMAÇÃO DE AGLOMERADOS FRENTE ESTRESSE OXIDATIVO

Células de *S.cerevisiae* Δ*sod1* foram transformadas com plasmídeos contendo VN-hSOD1 e hSOD1-VC WT, A4V e G93A a fim de acessar a atividade enzimática de hSOD1 na presença da proteína vênus e confirmar os resultados obtidos em célula animal, e também para visualizar a possível formação de aglomerados frente indução de estresse oxidativo.

Assim como feito com as cepas sem marcação, células BiFC foram submetidas a estresse com 1 mM de menadiona por 1 h/ 28ºC /160 rpm, e atividade superóxido dismutásica dosada por experimento de cinética. Como pode ser observado na figura 34, as 3 cepas mantiveram um nível de atividade SOD1 basal na condição não estressante, tendo um aumento na atividade nas cepas após indução de estresse oxidativo pela presença de menadiona. Este perfil de atividade enzimática foi estatisticamente igual ao observado em cepas sem marcação, indicando que a presença da proteína vênus não interferiu na função enzimática da proteína, e os resultados obtidos não sofrem influência da proteína fluorescente.

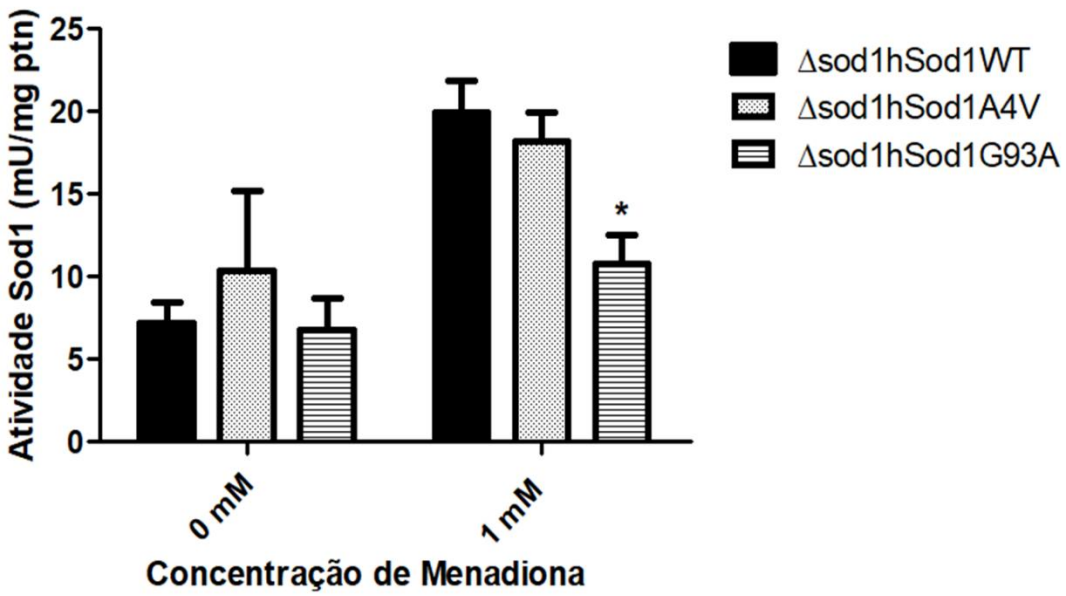


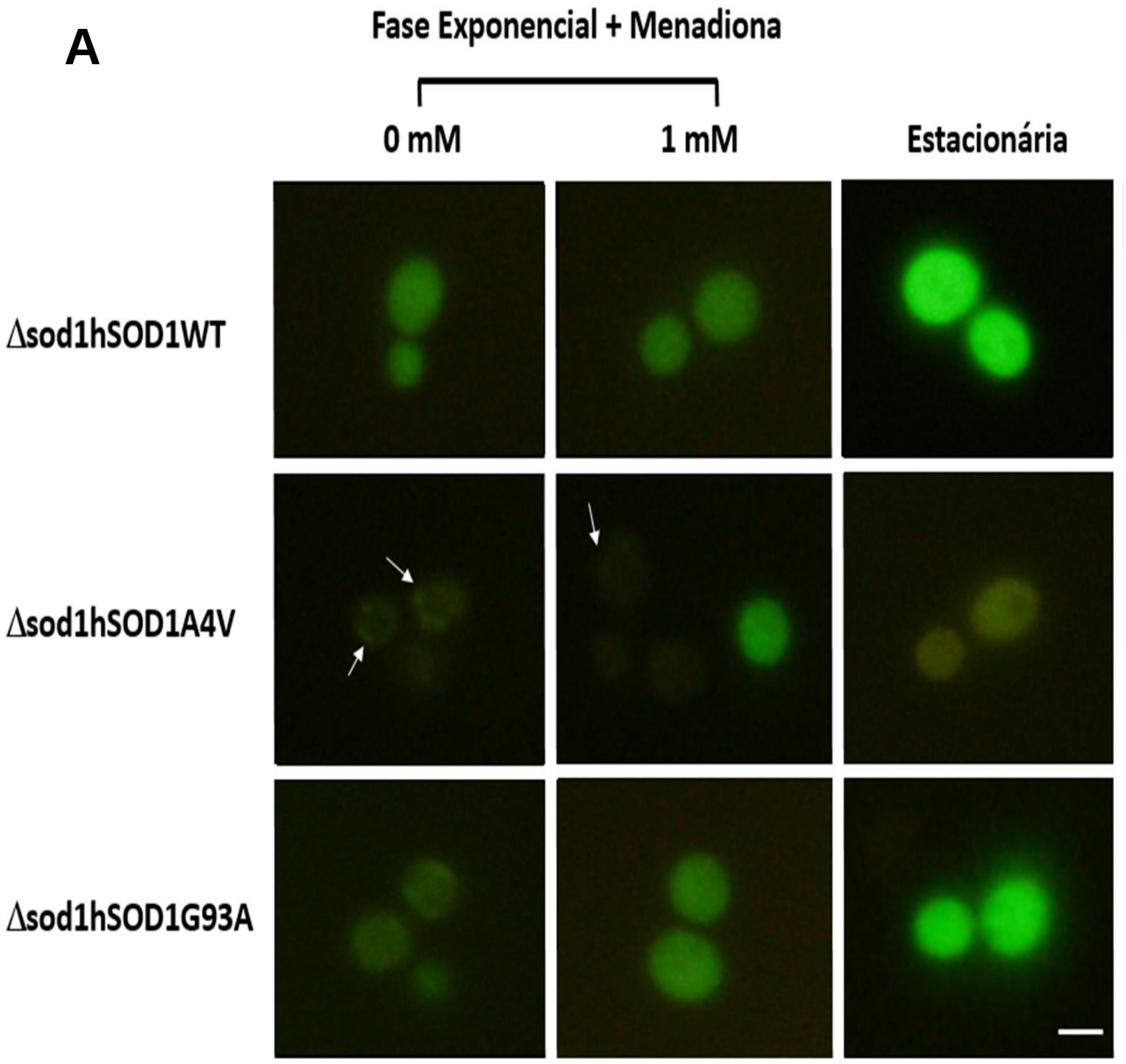
Figura 34.Atividade SOD1 de cepas expressando sistema BiFC. Cepas de *S.cerevisiae* deficientes em Sod1p de levedura e expressando SOD1-BiFC humana WT e mutante foram cultivadas em meio sintético seletivo rico em glicose até metade da primeira fase exponencial, a 28ºC / 160 rpm. Estresse oxidativo foi induzido por tratamento com menadiona 1mM por 1 h / 28ºC / 160 rpm. Os valores de atividade hSOD1 foram dosados *in vitro* por cinética de formação de NBT reduzido. 1 U equivale a quantidade de proteína capaz de reduzir 50 % de NBT. Os dados são apresentados como uma média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas usando T-Student. Valores com * $p<0.05$ são estatisticamente diferentes de Δsod1hSOD1WT.

Uma vez validado o sistema BiFC para uso neste trabalho, as células expressando hSOD1-BiFC foram cultivadas até fase exponencial, e tratadas com 1 mM, a fim de ver a possível formação de aglomerados sob condições de estresse oxidativo induzido (figura 35). Como forma de controle, também foram analisadas imagens de células que foram crescidas por aproximadamente 44 horas (fase estacionária, metabolismo respiratório).

Como pode ser observado na figura 35, houve expressão de fluorescência em todas as condições trabalhadas. Porém, houve um aumento de intensidade quando as células foram deixadas em meio de cultivo até fase estacionária, por aproximadamente 44 horas, deixando as células mais nítidas, e de fácil análise.

Apesar da baixa intensidade durante a fase exponencial e tratamento com 1 mM de menadiona, foi possível observar a formação de aglomerados na cepa A4V. A observação de aglomerados na fase exponencial (aproximadamente 50 % da células) sugere que a sua formação não está relacionada com um estresse oxidativo na célula, e que são formados de forma espontânea. Além disto, os resultados em levedura reforçam o que foi visto em células H4, no qual A4V possui um maior número de células com aglomerados do que a mutante G93A. A visualização de aproximadamente 50 % de células A4V com aglomerados durante tratamento

com 1 mM de menadiona justifica porque mesmo com atividade enzimática alta, estas células possuem um nível elevado de danos oxidativos, quando comparados com a cepa WT (que não apresentou formação de aglomerados em nenhuma das situações analisadas).


A
Fase Exponencial + Menadiona
0 mM
1 mM
Estacionária
Δsod1hSOD1WT
Δsod1hSOD1A4V
Δsod1hSOD1G93A

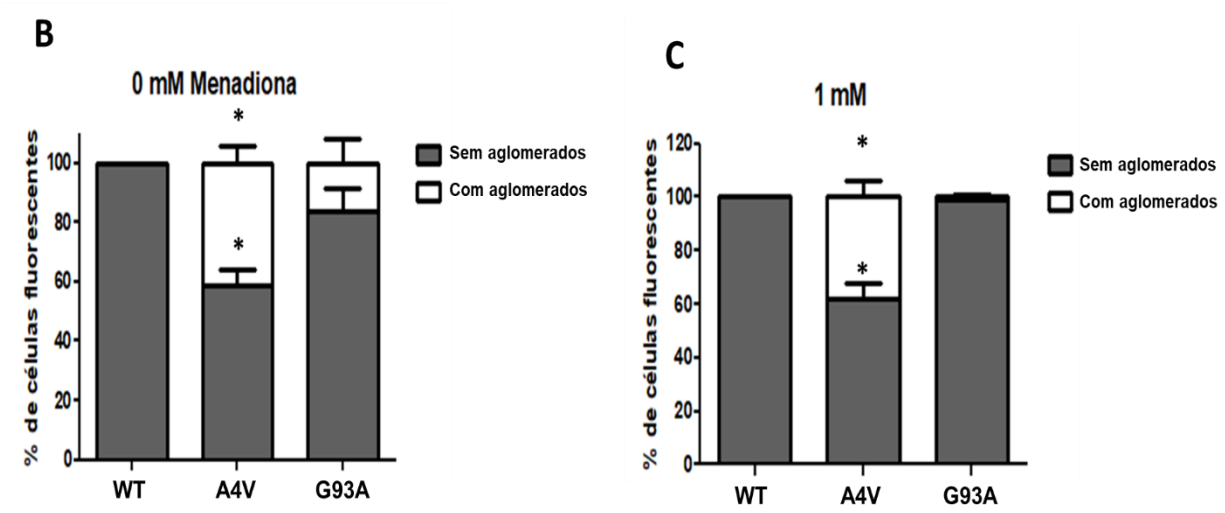


Figura 35. Visualização da formação de aglomerados de hSOD1 sob efeito de estresse oxidativo. (a) Imagens representativas de células Δsod1 expressando hSOD1-BiFC WT e mutantes. Células cultivadas em meio seletivo SC 2 % glicose até fase exponencial foram tratadas com menadiona 1 mM por 1 h / 28 ºC / 160 rpm, para indução de estresse oxidativo. Como controle, células foram cultivadas em meio seletivo SC 2 % glicose até fase estacionária. O total de células com aglomerados foi quantificada durante fase exponencial **(b)** e após tratamento com menadiona **(c)**. Para cada situação foram obtidas imagens de 50 células, e analisadas de acordo com a presença de aglomerados. Os dados representam a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. Análise estatística foi feita por TStudent, onde *p <0.05 representa valores estatisticamente diferentes a cepa Δsod1hSOD1WT. Barra de escala 10 μm.

7. DISCUSSÃO

Apesar de ser um modelo distante do modelo humano, células de *S.cerevisiae* têm sido exaustivamente usadas para o estudo de doenças humanas, dentre elas a ELA, principalmente para geração de hipóteses que levam a estudos mais aprofundados de mecanismos que possam estar por trás da toxidez de mutações relacionadas a doença. Assim como já foi apresentado neste trabalho, a levedura apresenta variadas vantagens como modelo de estudo, principalmente, neste caso, a fácil obtenção de células que não expressem *Sod1* endógena, aumentando a credibilidade dos resultados obtidos.

Uma das primeiras teorias que relacionavam mutantes de hSOD1 com ELA era a possível perda de função da proteína. Inicialmente acreditava-se que as mutações em *SOD1* levavam a uma perda de atividade enzimática, o que poderia estar por trás da toxidez das mutantes relacionadas a ELA. Porém com o aumento de trabalhos científicos nesta área, essa teoria começou a ser substituída por outra, na qual experimentos *in vitro* com mutações em *SOD1* (G37R, por exemplo) indicaram que além da mutação manter atividade enzimática, em alguns casos esta se mantinha estável, promovendo a ativação de apoptose nos tecidos neuronais de forma dominante. Desta maneira, passou-se a postular que as mutações adquiriam um ganho tóxico de atividade enzimática, ou seja, uma hSOD1 mutante poderia estar mais ativa, de forma a iniciar um acúmulo desordenado de peróxido de hidrogênio, levando a perda do equilíbrio redox homeostático, causando estresse oxidativo (BONAFEDE; MARIOTTI, 2017).

Uma das maneiras de se verificar esta teoria é dosando os níveis de atividade hSOD1 enzimática, como observado na figura 26, pelo método cinético. Em condições basais, sem nenhum tipo de estresse, as mutações A4V e G93A não influenciaram na atividade de hSOD1, mantendo os níveis semelhantes a WT. Porém, após indução de estresse oxidativo com menadiona, a proteína hSOD1 G93A não foi capaz de aumentar o nível de atividade enzimática da mesma forma que o observado em hSOD1 WT e A4V. Estes resultados reforçam a ideia de que cada mutação pode influenciar de forma diferente a atividade enzimática de hSOD1, de forma que algumas podem levar a um ganho de atividade, outras a uma perda, ou , como mostrado neste trabalho, algumas manterem atividade semelhante a visualizada em hSOD1 WT (BASTOW; GOURLAY; TUITE, 2011). Alguns estudos já mostraram que a localização da mutação G93A na estrutura da proteína hSOD1 pode interferir na ativação enzimática (BUNTON-STASYSHYN et al., 2015), porém por qual mecanismo ou o porquê disto ocorrer ainda não foi determinado.

Outra maneira de verificar atividade hSOD1 *in vitro* é por visualização de gel nativo, zimograma (figura 29). Apesar de ter sido um ensaio empregado por muito tempo em artigos da literatura, ele tem como desvantagem o fato de não dosar atividade em condições de velocidade inicial, diferentemente do ensaio cinético aqui apresentado. Desta maneira, os valores obtidos podem ser diferentes, como observado quando comparado com os valores obtidos pelo ensaio cinético, e não retratarem a atividade específica de hSOD1 nas condições tratadas. Entretanto, por ser um experimento visual, seu uso é interessante como uma forma de controle, uma vez que podemos observar as bandas referentes a redução de NBT, e assim confirmar que a enzima está ativa, mesmo que com valores baixos.

Visualizar uma queda ou aumento de atividade enzimática também pode estar relacionada com a expressão da proteína na condição estudada. Como observado na figura 28, a expressão de hSOD1 G93A é menor que de hSOD1 WT em ambas condições, justificando uma atividade enzimática baixa tanto na fase exponencial, quanto após indução de estresse oxidativo. Esta baixa expressão sugere que a mutação G93A pode interferir na estabilidade de hSOD1, como foi observado em células H4 expressando a mesma mutante (figura 16). Juntando ambos os resultados, pode-se sugerir que G93A é uma mutação mais instável quando comparada com WT e A4V.

Uma vez sabendo o perfil de atividade enzimática de hSOD1 WT, A4V e G93A, é interessante averiguar como isto pode influenciar na viabilidade das células em diferentes concentrações de menadiona. 1 mM de menadiona é considerado um estresse moderado, ideal para o estudo de expressão de defesas antioxidantes, atividades enzimáticas, nos quais é necessário ter um número elevado de células viáveis. Para ensaios relacionados com proteção antioxidante, estresses com concentrações mais elevadas de agente oxidante são usados para verificar se a proteína mutante interfere na função original. Como observado na figura 30, 4 concentrações diferentes de menadiona foram usadas, as quais normalmente induzem um estresse severo em células de *S.cerevisiae*.

Já está descrito na literatura que cepas de levedura deficientes em SOD1 são sensíveis a estresse oxidativo induzido por menadiona, quando comparado com uma cepa controle (BASTOW; GOURLAY; TUITE, 2011). O resultado aqui apresentado mostra que só há uma queda considerável na sobrevivência da cepa Δ*sod1* quando esta é tratada com 1 M de menadiona. Nas demais concentrações, a sobrevivência é de aproximadamente 50 %. Este resultado não corrobora o que já foi demonstrado na literatura, na qual cepas deficientes em

SOD1 de levedura possuem baixa tolerância a um tratamento de 15 mM de menadiona por 1 hora (FERNANDES et al., 2007). Esta diferença nos resultados pode ser explicada pelo meios diferentes usados em cada ocasião. Diferentemente do artigo, as células foram crescidas em meio sintético mínimo, no qual a repressão catabólica pode estar menos evidente, e portanto outras enzimas de proteção antioxidante ativadas. Dentre as cepas expressando hSOD1, a cepa A4V mesmo tendo uma atividade enzimática igual a WT, não foi suficiente para manter um perfil de viabilidade semelhante a WT, mantendo valores inferiores em todas as condições, e atingindo um valor em torno de 10 % no estresse de 1M. Este resultado sugere que mesmo tendo uma atividade enzimática, a mutação A4V de certa forma não permite com que as células se mantenham viáveis em condições de estresse.

É importante ressaltar que os valores altos de viabilidade observados neste trabalho em condições de estresse oxidativo severo podem estar relacionados a: 1) expressão de hSOD1 é capaz de proteger as células mesmo em condições de estresse oxidativo extremo; 2) tempo de tratamento curto, uma vez que a menadiona usada nos experimentos foi o sal de menadiona bissulfato. Recentemente foi demonstrado que este sal, usualmente usado em experimentos laboratoriais, tem um tempo de formação de íons superóxido em suspensão celular alto, de forma que a exposição destas células as mesmas concentrações de menadiona, porém por um tempo mais prolongado, poderiam diminuir a taxa de viabilidade (YAMASHOJI, 2016).

Uma das maneiras de se dosar o grau de oxidação em que uma célula está submetida é pela análise do grau de peroxidação lipídica. Lipídios são um dos principais alvos do estresse oxidativo, sendo mais suscetíveis a modificações oxidativas, e já foi implicado como um dos fatores que podem levar ao desenvolvimento de ELA (PARAKH et al., 2013). A oxidação de lipídios leva a formação de radicais lipídicos, os quais são altamente reativos e podem atacar outras moléculas lipídicas, levando ao início de uma reação em cadeia, que consiste de 3 etapas: iniciação, propagação e terminação (TRACHOOTHAM et al., 2008). A propagação da peroxidação lipídica é considerada um processo degenerativo que afeta membranas celulares e outras estruturas que contenham lipídios (GIROTTI, 1998).

Uma das maneiras de se determinar o grau de peroxidação lipídica é pela dosagem do produto gerado entre a reação de malondealdeído (MDA) com ácido tiobarbitúrico (TBA). MDA é um aldeído formado como um produto secundário da cisão beta dos ácidos graxos insaturados peroxidados. A sua condensação com o TBA forma produtos, que podem ser determinados por absorção no visível (532 nm) ou por fluorescência. O teste consiste na medida

de um cromógeno rosáceo formado pela reação do MDA com duas moléculas de TBA, em meio ácido e alta temperatura. Essa reação, chamada de “teste das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (SRATB)”, representa múltiplos métodos que utilizam o TBA, formando o complexo MDA: TBA(1:2), que tem absorção máxima em 532 nm (Lima & Abdalla, 2001). Como observado na figura 31, a deleção de *sod1* de levedura tem um efeito pior do que a expressão de hSOD1 A4V, apresentando valores de peroxidação lipídica superiores, sugerindo que hSOD1 é uma enzima extremamente importante para proteção da membrana lipídica. Dentre as cepas expressando hSOD1, a cepa A4V apresentou um nível de peroxidação maior, sugerindo que esta mutação interfere no papel de hSOD1 como protetor de membrana.

Outra forma de se acessar o grau de estresse oxidativo nas células é verificando o nível de carbonilação proteica. Diferente do que foi feito em células de neuroglioma, figura 24, com células de levedura se verificou o total de proteínas carboniladas após estresse oxidativo com menadiona. Mais uma vez verificou-se que a deleção de *sod1* nas células de levedura se mostrou pior do que a expressão de hSOD1 A4V, indicando a importância da proteína na proteção contra danos oxidativos a célula. Comparando os resultados de proteína carbonilada total (figura 33) com os de hSOD1 carbonilada (figura 24) é interessante ver que por mais que células carregando a mutação A4V possuam um nível de carbonilação superior as células com mutação G93A, hSOD1G93A foi mais carbonilada que hSOD1A4V. Isto levanta algumas questões: 1) a carbonilação de SOD1 na mutante G93A estaria interferindo na ativação desta enzima frente um estresse oxidativo?; 2) mesmo hSOD1 A4V tendo um nível de carbonilação e de atividade enzimática semelhante a WT, esta mutação acaba perdendo sua função como regulador de sistemas antioxidante, aumentando a probabilidade de outras proteínas sofrerem danos oxidativos frente um estresse oxidativo?

Observando em conjunto os dados de atividade enzimática, peroxidação lipídica e carbonilação proteica total da cepa A4V, estes resultados sugerem que a proteção antioxidante pode não estar apenas relacionada com a atividade enzimática da proteína, mas também com sua função como possível ativador de outros mecanismos antioxidantes. Isto justificaria o fato de que mesmo apresentando atividade enzimática semelhante a de WT, cepas A4V possuem um nível de peroxidação lipídica e carbonilação proteica superiores. Além disto, os resultados com a cepa G93A sugerem o mesmo, uma vez que mesmo apresentando uma atividade enzimática inferior as demais cepas, tanto a viabilidade quanto a peroxidação lipídica mantiveram um perfil igual ao da WT. Estes resultados reforçam a hipótese de outras funções

que a proteína hSOD1 possui nas células, dentre elas regulador de ativação de outros sistemas antioxidantes.

Além de poder induzir estresse oxidativo e trabalhar com cepas Δ*sod1*, o uso da levedura como modelo neste trabalho pôde confirmar o uso do sistema BiFC para visualização de aglomerados. Quando proteínas são fusionadas a marcadores fluorescentes, deve-se verificar se a presença deste marcador pode interferir na função da proteína estudada. Como apresentado na figura 34, pôde-se concluir que a presença da proteína vênus ligada a hSOD1 WT ou mutante não interferiu na atividade enzimática de hSOD1, e os valores obtidos tiveram um perfil igual ao observado em células sem marcação. Este resultado valida o uso do sistema BiFC para o estudo da formação de aglomerados de hSOD1 em levedura, assim como confirma que os resultados obtidos em célula animal também não sofreram interferência do sistema fluorescente empregado.

Analisando as imagens das cepas expressando hSOD1-BiFC WT e mutantes, primeiramente pode-se observar uma baixa intensidade de fluorescência nas condições em que as células estavam na fase exponencial, e mesmo após indução de estresse oxidativo. A intensidade de fluorescência só aumentou quando as células foram cultivadas até fase estacionária. Esse aumento de intensidade pode estar relacionado com o tempo necessário de regeneração do fluoróforo da proteína vênus e o tempo necessário para que haja uma emissão de fluorescência mais intensa. Acredita-se que uma das limitações do uso do BiFC é o tempo necessário para maturação do fluoróforo, que reflete o tempo do processo químico por trás do ciclo de sua regeneração, além das etapas químicas de emissão de fluorescência (KERPPOLA, 2006). Desta forma, o resultado sugere que em células de levedura, crescendo a 28 ºC, o tempo ótimo para que haja uma fluorescência mais intensa seja de aproximadamente 44 horas. Resultados em nosso laboratório indicam que células envelhecendo a 37ºC por 24 horas e 48 horas apresentam uma intensidade de fluorescência maior, reforçando a ideia de que o sistema BiFC tem como temperatura ótima de funcionamento 37 ºC (KERPPOLA, 2006). Porém, para o objetivo do presente trabalho, esta temperatura não é indicada uma vez que se queria ver a influência da indução de estresse oxidativo na formação de aglomerados em cepas mutantes.

Como mencionado anteriormente, BiFC pode ser usado como ferramenta para visualização da interação entre duas proteínas, e não apenas formação de aglomerados. Em todas as condições, a cepa A4V apresentou uma intensidade de fluorescência inferior as cepas WT e G93A, inclusive na fase estacionária. Sabendo que a fluorescência está diretamente ligada

com a estabilidade do dímero de hSOD1 para assim ocorrer a regeneração da proteína fluorescente vênus, os resultados sugerem que a mutação A4V interfere na estabilidade do equilíbrio dímero/monômero, levando a um acúmulo de monômeros, que por sua vez podem gerar aglomerados (como observado na fase exponencial e sob tratamento oxidativo). Este resultado corrobora com a informação de que a mutação A4V está próxima a interface dimérica, de forma que pode contribuir para a baixa estabilidade do dímero formado, levando ao acúmulo de monômeros, que podem ser tóxicos para a célula (ARNESANO et al., 2004; LINDBERG; TIBELL; OLIVEBERG, 2002).

Considerações

Mais uma vez o uso de células de *S.cerevisiae* para o estudo de uma doença humana, neste caso ELA, se mostrou eficiente para determinar parâmetros que podem vir ajudar em estudos futuros com outros modelos celulares. Poder expressar hSOD1 WT e mutante num modelo sem Sod1p endógena permitiu que se avaliasse a influência das mutações A4V e G93A, consideradas mutações severas em relação ao tempo de expectativa de vida, na atividade enzimática de hSOD1. Além disto, pôde-se verificar como a mutação A4V interfere na proteção antioxidante das células, e comprovar que esta deve possuir algum mecanismo que não permite a ativação de defesas para proteção celular. E todos os experimentos feitos sob indução de estresse oxidativo. Entender como mutações em hSOD1 podem interferir na proteção contra estresse oxidativo é muito importante principalmente porque ELA é uma doença que tem relação com estresse oxidativo. Assim como as demais doenças neurodegenerativas, ELA é uma doença fortemente relacionada ao envelhecimento celular, o qual apresenta um aumento no estresse oxidativo das células. Entender como mutações características de ELA interferem na proteção antioxidante sob efeito de estresse oxidativo, ajuda a entender como células envelhecidas portadoras das mesmas mutações se comportam, assim como ajuda a levantar hipóteses que possam ajudar a entender os mecanismos por trás da toxidez de hSOD1 mutante.

Além disto, este foi o primeiro trabalhado usando células de levedura expressando hSOD1 WT ou mutantes fusionada ao sistema BiFC. Apesar de ser um modelo que já vem sendo explorado na literatura, nenhum trabalho ainda foi publicado usando o sistema BiFC em levedura para o estudo de aglomerados de hSOD1 mutantes relacionados a ELA. Desta maneira, os resultados aqui apresentados são inéditos, e podem contribuir não somente com dados sobre os efeitos das mutantes de hSOD1 na proteção celular, mas também entender um pouco mais

como o sistema BiFC se comporta sob outras condições de estudo, em células de levedura. Por exemplo, geralmente são usados promotores fortes nos plasmídeos para expressão de BiFC, para melhorar a visualização de fluorescência. Neste trabalho, o promotor usado foi o promotor de Sod1p de levedura. Desta forma, todo o processo feito para se atingir uma condição ideal de estudo com o sistema BiFC, como por exemplo condições de crescimento, tempo necessário para visualização de fluorescência, condições de armazenamento de lâminas, entre outros dados (resultados não mostrados na tese), são informações que podem ser usadas para melhorar o entendimento do sistema BiFC em células de levedura.

PARTE III: CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de já serem mais de 3 décadas desde a descoberta da primeira mutação em SOD1 relacionada à ELA (ROSEN et al., 1993), e vários artigos publicados referentes a este assunto, o mecanismo biológico por trás da toxidez das mutantes ainda não foi revelado. Nesses mais de 30 anos de estudo primeiramente se postulou que as mutações inibiam a atividade catalítica de SOD1, levando a uma queda de proteção antioxidante em células envelhecidas (SACCON et al., 2013). A Ciência foi evoluindo, os experimentos sendo aprimorados, e colaborações entre laboratórios de bioquímica e laboratórios de físico-química, por exemplo, cada vez mais aproveitados, de forma que a teoria de perda de função foi dando vez a teoria de um ganho tóxico de função (CHUNG, 2017), assim como uma perda da estabilidade dimérica de hSOD1 devido a presença de mutações próximas a sua interface (como por exemplo A4V), o que se acredita ser a possível causa do surgimento de aglomerados de hSOD1(KIM et al., 2014). Tais trabalhos foram desenvolvidos em variados modelos celulares, tais como levedura, drosófila, camundongos, ratos, células tronco (VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017), de forma que tem contribuído um pouco para entender melhor o metabolismo degenerativo de ELA e sua relação com as mutações em *SOD1*. Não diferente disto tudo, o presente trabalho também contribui nesta área, com resultados inéditos (publicados no artigo em anexo) usando células de neuroglioma como modelo, assim como mais uma vez demonstrando que células de *S.cerevisiae* podem ser usadas como modelo de estudo de doenças humanas, como ELA. Além da validação do uso do sistema BiFC para o estudo da formação de aglomerados de hSOD1 mutantes tanto em célula humana, quanto em levedura.

Apesar de serem modelos e condições diferentes, os resultados obtidos tanto com células H4 quanto com células de levedura Δ*sod1* expressando hSOD1 podem ser considerados complementares e refletem como cada mutação pode se comportar diferente uma da outra, enfatizando a importância de estudar cada uma para entender melhor a patologia de ELA. Dentre todas as mutações estudadas, A4V se mostrou a mais prejudicial para a proteção das células contra estresse oxidativo tanto induzido (tratamento com menadiona), quanto gerado durante respiração celular. Mesmo apresentando uma atividade enzimática semelhante a observada em hSOD1 WT, em todos os casos apresentados, células carregando a mutação A4V apresentaram um nível alto de EROS, aumento no dano ao DNA, tolerância a menadiona semelhante a de uma célula sem Sod1p de levedura, maior nível de peroxidação lipídica e aumento do nível de proteína carbonilada total. Além disto, A4V se mostrou como a mutação

com maior propensão a formação de aglomerados, quando comparadas com as demais mutações aqui estudadas. Os resultados de formação de aglomerados na mutante A4V corroboram os resultados físico-químicos já publicados que sugerem ser esta uma das mutações que mais interferem na estabilidade do equilíbrio monômero/dímero devido a sua proximidade a interface dimérica, levando a um acúmulo de monômeros, que pode levar a formação dos aglomerados de hSOD1 mutante. Desta maneira, a baixa proteção antioxidante, mesmo numa célula com atividade SOD1 elevada sugere que o mecanismo pelo qual a mutação A4V confere toxidez a célula não é pela perda de função enzimática. Esta toxidez pode estar relacionada tanto pela maior propensão a formar aglomerados, mas também por uma possível queda na regulação de outros sistemas de proteção antioxidantes, diretamente relacionada à queda na localização nuclear observada nesta mutante (queda de 50 %, figura 17c).

Em contrapartida, a mutação G93A apesar de formar aglomerados numa mesma velocidade que a mutação A4V e ter os mesmo níveis de EROS, respondeu de forma diferente ao estresse oxidativo, mantendo um perfil de tolerância à menadiona, nível de peroxidação lipídica e proteína carbonilada total semelhante ao de hSOD1WT. Porém manteve os níveis de atividade enzimática após estresse oxidativo semelhantes aos níveis em uma situação sem estresse. Além disto, o nível de dano ao DNA nesta mutante foi superior entre os níveis das outra mutantes e WT, indicando que a mutação G93A de certa forma é mais prejudicial ao DNA do que as demais. Levando em conta que o dano ao DNA possa estar relacionado com a queda na localização nuclear de hSOD1G93A, os resultados sugerem que o mecanismo pelo qual a mutação G93A é toxica para as células pode ser por perda de função enzimática e diminuição da capacidade de localização nuclear de SOD1.

Observando a localização das mutantes de hSOD1 e os resultados dos experimentos referentes a proteção antioxidante, os dados corroboram que SOD1 tem um papel importante na ativação de outros mecanismos de proteção contra estresse oxidativo. hSOD1 WT foi localizada tanto no núcleo quanto no citoplasma, e manteve o nível de estresse oxidativo baixo em todas as condições estudadas. Já a mutação A4V, que mostrou ser a mutação mais severa em relação a viabilidade e defesa antioxidante, teve a localização nuclear diminuída em 50 %, porém manteve os níveis de atividade enzimática semelhantes aos de hSOD1 WT. Isto enfatiza o papel de hSOD1 como regulador de defesas antioxidantes sob indução de estresse oxidativo, seja ele causado pro respiração celular ou por tratamento com menadiona, justificando porque mesmo com atividade enzimática alta, células que apresentaram a mutação A4V não foram protegidas contra estresse oxidativo. Desta maneira, entender como a mutação A4V, assim

como G93A, G93C e L38V interferem na localização nuclear de hSOD1 pode ser importante para entender melhor a toxidez por trás destas mutações, e para o auxílio no futuro desenvolvimento de terapias eficazes no tratamento contra ELA

8. CONCLUSÃO

-Usando o sistema fluorescente BiFC em células H4 expressando hSOD1WT, A4V, L38V, G93A e G93C foi possível visualizar e quantificar a formação de aglomerados nas células mutantes.

-As mutações A4V e G93A apresentaram uma dinâmica de aglomeração mais rápida que a apresentada pelas mutações L38V e G93C.

- 60 % de hSODO1WT expressa em células H4 é localizada no citoplasma e 40 % no núcleo. A expressão das mutações diminuiu a capacidade de localização nuclear de hSOD1 em 50 %.

- Os aglomerados observados nas células H4 expressando as mutantes de hSOD1 não colocalizaram com G3BP1, de forma que não podem ser classificados como grânulos de estresse.

- Os aglomerados de hSOD1 mutante colocalizaram com a proteína VHL, indicando que uma vez formados eles são encaminhados para o compartimento de degradação JUNQ, em células H4.

- A expressão das mutantes em células H4 induziram um aumento de EROS pós tratamento com H_2O_2 5%.

- As mutações G93A e L38V apresentaram um maior aumento no dano ao DNA que as demais mutantes, em células H4. A superexpressão de hSOD1WT diminui o dano ao DNA.

- A mutação G93A apresentou um maior nível de carbonilação de hSOD1 em comparação com hSOD1 endógena e com as demais mutações.

- A deleção de SOD1 de levedura (Δsod1) em células de *Saccharomyces cerevisiae* diminuem a tolerância a menadiona, aumentando o nível de peroxidação lipídica e o nível de proteína carbonilada total.

- Tratamento com 1 mM de menadiona foi suficiente para induzir um aumento na atividade superóxido dismutásica nas cepas Δsod1 expressando hSOD1WT e hSOD1A4V. A cepa Δsod1 expressando hSOD1G93A manteve a atividade enzimática igual a situação controle.

- A mutação A4V apresentou uma menor tolerância a diferentes concentrações de menadiona, apresentando resultados de viabilidade semelhantes aos da cepa Δsod1.

- O tratamento de cepas de *S.cerevisiae*Δsod1 expressando hSOD1WT, A4V e G93A com 80 mM menadiona induziu um aumento nos níveis de peroxidação lipídica na mutante A4V. A mutante G93A apresentou um perfil semelhante ao observado na WT.

- A mutação A4V aumenta a propensão de ocorrer carbonilação proteica em células de levedura sob indução de estresse oxidativo.

- O uso do sistema BiFC fusionado a hSOD1WT, A4V e G93A não interferiu na atividade enzimática em células de *S.cerevisiae*.

- Cepas Δsod1 expressando hSOD1A4V fusionadas ao sistema BiFC apresentaram formação de aglomerados em 50 % das células na fase exponencial e após indução de estresse oxidativo com 1 mM de menadiona.

9. REFERÊNCIAS

AJROUD-DRISS, S.; SIDDIQUE, T. Sporadic and hereditary amyotrophic lateral sclerosis (ALS). **Biochimica et biophysica acta**, v. 1852, n. 4, p. 679–84, abr. 2015.

ALEMASOV, N. A. et al. Dynamic properties of SOD1 mutants can predict survival time of patients carrying familial amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, v. 35, n. 3, p. 645–656, fev. 2017.

ALEMASOV, N. A. et al. Molecular mechanisms underlying the impact of mutations in SOD1 on its conformational properties associated with amyotrophic lateral sclerosis as revealed with molecular modelling. **BMC Structural Biology**, v. 18, n. S1, p. 1, 5 fev. 2018.

ARNESANO, F. et al. The Unusually Stable Quaternary Structure of Human Cu,Zn-Superoxide Dismutase 1 Is Controlled by Both Metal Occupancy and Disulfide Status. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 46, p. 47998–48003, 12 nov. 2004.

BARBER, S. C.; MEAD, R. J.; SHAW, P. J. Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1762, n. 11–12, p. 1051–67, 2006.

BARBOSA, L. F. et al. Increased SOD1 association with chromatin, DNA damage, p53 activation, and apoptosis in a cellular model of SOD1-linked ALS. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1802, n. 5, p. 462–71, maio 2010.

BASTOW, E. L.; GOURLAY, C. W.; TUITE, M. F. Using yeast models to probe the molecular basis of amyotrophic lateral sclerosis. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, n. 5, p. 1482–1487, 1 out. 2011.

BONAFEDE, R.; MARIOTTI, R. ALS Pathogenesis and Therapeutic Approaches: The Role of Mesenchymal Stem Cells and Extracellular Vesicles. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, 21 mar. 2017.

BRASIL, A. A. et al. The involvement of GSH in the activation of human Sod1 linked to FALS in chronologically aged yeast cells. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 5, p. 433–440, ago. 2013.

BRASIL, A. A. et al. Implications of fALS Mutations on Sod1 Function and Oligomerization in Cell Models. **Molecular neurobiology**, v. 55, n. 6, p. 5269–5281, jun. 2018.

BROOM, H. R. et al. Combined Isothermal Titration and Differential Scanning Calorimetry Define Three-State Thermodynamics of fALS-Associated Mutant Apo SOD1 Dimers and an Increased Population of Folded Monomer. **Biochemistry**, v. 55, n. 3, p. 519–533, 26 jan. 2016.

BROWNE, E. C.; ABBOTT, B. M. Recent progress towards an effective treatment of amyotrophic lateral sclerosis using the SOD1 mouse model in a preclinical setting. **European journal of medicinal chemistry**, v. 121, p. 918–925, 4 out. 2016.

BUNTON-STASYSHYN, R. K. A. et al. SOD1 Function and Its Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathology: New and Renascent Themes. **The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 21, n. 5, p. 519–29, out. 2015.

CAMPOS, C.; CASADO, Á. Oxidative stress, thyroid dysfunction & Down syndrome. **The Indian journal of medical research**, v. 142, n. 2, p. 113–9, ago. 2015.

CASTILLO, K. et al. Trehalose delays the progression of amyotrophic lateral sclerosis by

enhancing autophagy in motoneurons. **Autophagy**, v. 9, n. 9, p. 1308–20, set. 2013.

CHAN, P. K. et al. Structural similarity of wild-type and ALS-mutant superoxide dismutase-1 fibrils using limited proteolysis and atomic force microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 27, p. 10934–9, 2 jul. 2013.

CHEN, X.; GUO, C.; KONG, J. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Neural regeneration research**, v. 7, n. 5, p. 376–85, 15 fev. 2012.

CHENG, Y. et al. Mesenchymal stromal cells attenuate sevoflurane-induced apoptosis in human neuroglioma H4 cells. **BMC anesthesiology**, v. 18, n. 1, p. 84, 18 jul. 2018.

CHUNG, W.-H. Unraveling new functions of superoxide dismutase using yeast model system: Beyond its conventional role in superoxide radical scavenging. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 55, n. 6, p. 409–416, jun. 2017.

COWLEY, P. M. et al. Oxidant production and SOD1 protein expression in single skeletal myofibers from Down syndrome mice. **Redox biology**, v. 13, p. 421–425, 2017.

CRIDDLE, D. N. et al. Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 52, p. 40485–92, 29 dez. 2006.

DASURI, K.; ZHANG, L.; KELLER, J. N. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. **Free radical biology & medicine**, v. 62, p. 170–85, set. 2013.

DUENNWALD, M. L. Yeast as a platform to explore polyglutamine toxicity and aggregation. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1017, p. 153–61, 2013.

ELEUTHERIO, E. et al. Oxidative stress and aging: Learning from yeast lessons. **Fungal Biology**, dez. 2017.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free radical biology & medicine**, v. 11, n. 1, p. 81–128, 1991.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation research**, v. 339, n. 1, p. 37–59, fev. 1995.

FARRAWELL, N. E. et al. Distinct partitioning of ALS associated TDP-43, FUS and SOD1 mutants into cellular inclusions. **Scientific reports**, v. 5, p. 13416, 21 ago. 2015.

FAY, J. M. et al. A Phosphomimetic Mutation Stabilizes SOD1 and Rescues Cell Viability in the Context of an ALS-Associated Mutation. **Structure (London, England : 1993)**, v. 24, n. 11, p. 1898–1906, 2016.

FERNANDES, P. N. et al. Oxidative stress response in eukaryotes: effect of glutathione, superoxide dismutase and catalase on adaptation to peroxide and menadione stresses in Saccharomyces cerevisiae. **Redox report : communications in free radical research**, v. 12, n. 5, p. 236–44, 2007.

FRANÇA, M. B.; LIMA, K. C.; ELEUTHERIO, E. C. A. Oxidative Stress and Amyloid Toxicity: Insights From Yeast. **Journal of cellular biochemistry**, v. 118, n. 6, p. 1442–1452, jun. 2017.

GAL, J. et al. ALS mutant SOD1 interacts with G3BP1 and affects stress granule dynamics.

Acta Neuropathologica, v. 132, n. 4, p. 563–576, 1 out. 2016.

GALALELDEEN, A. et al. Structural and biophysical properties of metal-free pathogenic SOD1 mutants A4V and G93A. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 492, n. 1–2, p. 40–7, dez. 2009.

GIROTTI, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. **Journal of lipid research**, v. 39, n. 8, p. 1529–42, ago. 1998.

GUILLAUMET-ADKINS, A. et al. Epigenetics and Oxidative Stress in Aging. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, p. 9175806, 2017.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1634–1658, jun. 2006.

HENRIQUES, A. et al. Gene expression changes in spinal motoneurons of the SOD1(G93A) transgenic model for ALS after treatment with G-CSF. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, p. 464, 2014.

HU, C.-D.; CHINENOV, Y.; KERPPOLA, T. K. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. **Molecular cell**, v. 9, n. 4, p. 789–98, abr. 2002.

KERPPOLA, T. K. Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. **Nature protocols**, v. 1, n. 3, p. 1278–86, 2006.

KERPPOLA, T. K. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. **Annual review of biophysics**, v. 37, p. 465–87, 2008.

KIM, J. et al. Dimerization, oligomerization, and aggregation of human amyotrophic lateral sclerosis copper/zinc superoxide dismutase 1 protein mutant forms in live cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 21, p. 15094–103, 23 maio 2014.

KODAMA, Y.; HU, C.-D. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): A 5-year update and future perspectives. **BioTechniques**, v. 53, n. 5, nov. 2012.

KURUTAS, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p. 71, 25 dez. 2015.

LÁZARO, D. F. et al. Systematic comparison of the effects of alpha-synuclein mutations on its oligomerization and aggregation. **PLoS genetics**, v. 10, n. 11, p. e1004741, nov. 2014.

LÁZARO, D. F. et al. The effects of the novel A53E alpha-synuclein mutation on its oligomerization and aggregation. **Acta neuropathologica communications**, v. 4, n. 1, p. 128, 2016.

LÁZARO, D. F.; PAVLOU, M. A. S.; OUTEIRO, T. F. Cellular models as tools for the study of the role of alpha-synuclein in Parkinson's disease. **Experimental neurology**, v. 298, n. Pt B, p. 162–171, 2017.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescin as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical research in toxicology**, v. 5, n. 2, p. 227–31, 1992.

LINDBERG, M. J.; TIBELL, L.; OLIVEBERG, M. Common denominator of Cu/Zn

superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis: decreased stability of the apo state. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 26, p. 16607–12, 24 dez. 2002.

MAGALHÃES, R. S. S. et al. The trehalose protective mechanism during thermal stress in Saccharomyces cerevisiae: the roles of Ath1 and Agt1. **FEMS yeast research**, v. 18, n. 6, 1 set. 2018.

MATEJU, D. et al. An aberrant phase transition of stress granules triggered by misfolded protein and prevented by chaperone function. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 12, p. 1669–1687, 14 jun. 2017.

MENZIES, F. M.; FLEMING, A.; RUBINSZTEIN, D. C. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 345–57, jun. 2015.

MILLER, R. G.; MITCHELL, J. D.; MOORE, D. H. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 14 mar. 2012.

NAGAI, T. et al. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. **Nature biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 87–90, jan. 2002.

NEWSHOLME, P. et al. Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and β-cell function: a critical role for amino acids. **The Journal of endocrinology**, v. 214, n. 1, p. 11–20, jul. 2012.

NIXON, R. A. et al. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 64, n. 2, p. 113–22, fev. 2005.

NIXON, R. A.; CATALDO, A. M.; MATHEWS, P. M. The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. **Neurochemical research**, v. 25, n. 9–10, p. 1161–72, out. 2000.

OCAMPO, A.; BARRIENTOS, A. Developing yeast models of human neurodegenerative disorders. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 793, p. 113–27, 2011.

OHASHI, K.; MIZUNO, K. A novel pair of split venus fragments to detect protein-protein interactions by in vitro and in vivo bimolecular fluorescence complementation assays. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1174, p. 247–62, 2014.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature protocols**, v. 1, n. 1, p. 23–9, 2006.

ONESTO, E. et al. Muscle cells and motoneurons differentially remove mutant SOD1 causing familial amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of neurochemistry**, v. 118, n. 2, p. 266–80, jul. 2011.

PAPA, L. et al. SOD2 to SOD1 switch in breast cancer. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 9, p. 5412–6, 28 fev. 2014.

PARAKH, S. et al. Redox regulation in amyotrophic lateral sclerosis. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, p. 408681, 2013.

PARAKH, S.; ATKIN, J. D. Protein folding alterations in amyotrophic lateral sclerosis. **Brain research**, v. 1648, n. Pt B, p. 633–649, 2016.

PARK, J.-H. et al. Amyotrophic lateral sclerosis-related mutant superoxide dismutase 1 aggregates inhibit 14-3-3-mediated cell survival by sequestration into the JUNQ compartment. **Human molecular genetics**, v. 26, n. 18, p. 3615–3629, 2017.

PROCTOR, E. A. et al. Nonnative SOD1 trimer is toxic to motor neurons in a model of amyotrophic lateral sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 3, p. 614–9, 19 jan. 2016.

RODRIGUEZ, J. A. et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations decrease the thermal stability of distinctly metallated species of human copper/zinc superoxide dismutase. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 18, p. 15932–7, 3 maio 2002.

ROSEN, D. R. et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. **Nature**, v. 362, n. 6415, p. 59–62, 4 mar. 1993.

SACCON, R. A. et al. Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? **Brain : a journal of neurology**, v. 136, n. Pt 8, p. 2342–58, ago. 2013.

SAEED, M. et al. Age and founder effect of SOD1 A4V mutation causing ALS. **Neurology**, v. 72, n. 19, p. 1634–9, 12 maio 2009.

SAWADA, H. Clinical efficacy of edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 18, n. 7, p. 735–738, 3 maio 2017.

SHAW, B.; VALENTINE, J. How do ALS-associated mutations in superoxide dismutase 1 promote aggregation of the protein? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 2, p. 78–85, fev. 2007.

SIGGERS, K. A; LESSER, C. F. The Yeast Saccharomyces cerevisiae: a versatile model system for the identification and characterization of bacterial virulence proteins. **Cell host & microbe**, v. 4, n. 1, p. 8–15, 17 jul. 2008.

SIWACH, P.; KAGANOVICH, D. Getting stress out of stressed-out stress granules. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 12, p. 1647–1649, 14 jun. 2017.

STICKLAND, L. H. The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. **Journal of general microbiology**, v. 5, n. 4, p. 698–703, out. 1951.

SUBOTIĆ, A. et al. A Bimolecular Fluorescence Complementation Tool for Identification of Protein-Protein Interactions in Candida albicans. **G3 (Bethesda, Md.)**, v. 7, n. 10, p. 3509–3520, 2017.

SUNG, M.-K.; HUH, W.-K. Bimolecular fluorescence complementation analysis system forin vivo detection of protein–protein interaction inSaccharomyces cerevisiae. **Yeast**, v. 24, n. 9, p. 767–775, set. 2007.

SUZUKI, Y. J.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Protein carbonylation. **Antioxidants & redox signaling**, v. 12, n. 3, p. 323–5, mar. 2010.

TALBOT, K. Familial versus sporadic amyotrophic lateral sclerosis--a false dichotomy? **Brain : a journal of neurology**, v. 134, n. Pt 12, p. 3429–31, dez. 2011.

TIWARI, A.; HAYWARD, L. J. Familial amyotrophic lateral sclerosis mutants of copper/zinc superoxide dismutase are susceptible to disulfide reduction. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 8, p. 5984–92, 21 fev. 2003.

TRACHOOTHAM, D. et al. Redox Regulation of Cell Survival. **Antioxidants & Redox**

Signaling, v. 10, n. 8, p. 1343–1374, ago. 2008.

TRUMBULL, K. A.; BECKMAN, J. S. A role for copper in the toxicity of zinc-deficient superoxide dismutase to motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 7, p. 1627–39, jul. 2009.

TSANG, C. K. et al. Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. **Nature communications**, v. 5, p. 3446, 19 mar. 2014.

TSIEN, R. Y. The green fluorescent protein. **Annual review of biochemistry**, v. 67, p. 509–44, 1998.

VALENTINE, J. S.; DOUCETTE, P. A.; ZITTIN POTTER, S. COPPER-ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE AND AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 563–593, jun. 2005.

VAN DAMME, P.; ROBBERECHT, W.; VAN DEN BOSCH, L. Modelling amyotrophic lateral sclerosis: progress and possibilities. **Disease Models & Mechanisms**, v. 10, n. 5, p. 537–549, 1 maio 2017.

VERMA, A. Prions, prion-like prionoids, and neurodegenerative disorders. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 19, n. 2, p. 169–74, 2016.

WAINGER, B. J. et al. Intrinsic membrane hyperexcitability of amyotrophic lateral sclerosis patient-derived motor neurons. **Cell reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 10 abr. 2014.

WATANABE, K. et al. How is edaravone effective against acute ischemic stroke and amyotrophic lateral sclerosis? **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 62, n. 1, p. 20–38, 2018.

WEISBERG, S. J. et al. Compartmentalization of superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) aggregates determines their toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 39, p. 15811–6, 25 set. 2012.

WILCOX, K. C. et al. Modifications of superoxide dismutase (SOD1) in human erythrocytes: a possible role in amyotrophic lateral sclerosis. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 20, p. 13940–7, 15 maio 2009.

WOOD, L. B.; WINSLOW, A. R.; STRASSER, S. D. Systems biology of neurodegenerative diseases. **Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro**, v. 7, n. 7, p. 758–75, jul. 2015.

WRIGHT, G. S. A.; ANTONYUK, S. V; HASNAIN, S. S. A faulty interaction between SOD1 and hCCS in neurodegenerative disease. **Scientific reports**, v. 6, p. 27691, 2016.

WYSS-CORAY, T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. **Nature**, v. 539, n. 7628, p. 180–186, 9 nov. 2016.

YAMASHOJI, S. Different characteristics between menadione and menadione sodium bisulfite as redox mediator in yeast cell suspension. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 6, p. 88–93, jul. 2016.

ZAREI, S. et al. A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. **Surgical neurology international**, v. 6, p. 171, 2015.

ZUFIRÍA, M. et al. ALS: A bucket of genes, environment, metabolism and unknown ingredients. **Progress in neurobiology**, v. 142, p. 104–29, 2016.

ANEXOS

Mol Neurobiol
DOI 10.1007/s12035-017-0755-4

Implications of fALS Mutations on Sod1 Function and Oligomerization in Cell Models

Aline A. Brasil[1,2] · Rayne S. S. Magalhães[1,2] · Mariana D. C. De Carvalho[1,2] · Isabel Paiva[1] · Ellen Gerhardt[1] · Marcos D. Pereira[2] · Tiago F. Outeiro[1,3] · Elis C. A. Eleutherio[2]

Received: 15 May 2017 / Accepted: 23 August 2017
© The Author(s) 2017. This article is an open access publication

Abstract Among the familial forms of amyotrophic lateral sclerosis (fALS), 20% are associated with the Cu,Zn-superoxide dismutase (Sod1). fALS is characterized by the accumulation of aggregated proteins and the increase in oxidative stress markers. Here, we used the non-invasive bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay in human H4 cells to investigate the kinetics of aggregation and subcellular localization of Sod1 mutants. We also studied the effect of the different Sod1 mutants to respond against oxidative stress by following the levels of reactive oxygen species (ROS) after treatment with hydrogen peroxide. Our results showed that only 30% of cells transfected with A4VSod1 showed no inclusions while for the other Sod1 mutants tested (L38V, G93A and G93C), this percentage was at least 70%. In addition, we found that 10% of cells transfected with A4VSod1 displayed more than five inclusions per cell and that A4V and G93A Sod1 formed inclusions more rapidly than L38V and G93C Sod1. Expression of WTSod1 significantly decreased the intracellular oxidation levels in comparison with expression of fALS Sod1 mutants, suggesting the mutations induce a functional impairment. All fALS mutations impaired nuclear localization of Sod1, which is important for maintaining genomic stability. Consistently, expression of WTSod1, but not of fALS Sod1 mutants, reduced DNA damage, as measured by the comet assay. Altogether, our study sheds light into the effects of fALS Sod1 mutations on inclusion formation, dynamics, and localization as well as on antioxidant response, opening novel avenues for investigating the role of fALS Sod1 mutations in pathogenesis.

Keywords Sod1 · fALS · Neurodegeneration · Oxidative stress

Aline A. Brasil and Rayne S. S. Magalhães have equal contribution.

✉ Tiago F. Outeiro
touteir@gwdg.de

✉ Elis C. A. Eleutherio
eliscael@iq.ufrj.br

[1] Department of Experimental Neurodegeneration, Center for Nanoscale Microscopy and Molecular Physiology of the Brain, Center for Biostructural Imaging of Neurodegeneration, University Medical Center Göttingen, 37073 Göttingen, Germany

[2] Departamento de Química, Instituto de Química, Centro de Tecnologia, Cidade Universitária, Universidade Federal do Rio de Janeir, Av. Athos da Silveira Ramos, n 149, Bloco A - sala 547, Rio de Janeiro, RJ 21941-909, Brazil

[3] Max Planck Institute for Experimental Medicine, Göttingen, Germany

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an age-associated neurodegenerative disease characterized by progressive muscle paralysis and death [1]. Approximately 10% of ALS cases are associated with autosomal dominant mutations (fALS) [2]; among them, 20% are caused by Cu, Zn-superoxide dismutase (Sod1) mutations [3]. Sod1 is an abundant and important protein in eukaryotic cells. Its physiological function is mainly related to the reduction of oxidative stress by converting superoxide anions to hydrogen peroxide, which is in turn broken down to water and oxygen by peroxidases [4]. Recently, Sod1 was reported to translocate into the nucleus of yeast cells in response to oxidative stress, where it regulates the expression of antioxidant and repair genes [5].

More than 150 individual mutations have been identified in human Sod1 (hSod1), affecting in different ways the onset and the prognosis of fALS [6, 7]. Nevertheless, despite intense studies, the molecular mechanisms connecting mutation

Published online: 07 September 2017

hSod1 to fALS etiology and pathology are still elusive. The toxicity of fALS hSod1 has been related to structural instability [8], misfolding, aberrant enzymatic activity (lost and gain of function) [9], and disturbance of redox homeostasis [10] as well as to the presence of Sod1-containing aggregates in juxtanuclear quality control compartment (JUNQ) [11]. In this context, while transgenic mice expressing the fALS-associated hSod1 mutants G93A and A4V exhibit ALS-like phenotypes, animal knockouts for endogenous Sod1 do not [9, 12].

In vitro studies have shown that metal coordination and disulfide bond formation are relevant for Sod1 structural stability [13–15], suggesting that an unfolded Sod1 conformation is responsible for the increased aggregation propensity. In addition, it has been shown that aggregation propensity of recombinant Sod1 does not always predict aggregation in a cellular context. It is not surprising due to obvious differences in protein concentration and surrounding environment between in vitro and in cell [16]. Therefore, in this study, we set out to assess the contribution of fALS hSod1 (A4V, L38V, G93A and G93C) towards protein aggregation, oxidative stress, and DNA damage. Using the bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay, which allows to observe protein interactions in vivo, we found that these Sod1 mutations induce defective dimerization and, consequently, affect protein aggregation [17]. Importantly, we investigated, for the first time, the dynamics of fALS Sod1 aggregation in living cells and the subcellular partitioning of Sod1 inclusions in respect to the JUNQ compartment. We found that the fALS-associated hSod1 mutants tested are unable to overcome oxidative stress and DNA damage.

Altogether, our results clearly define a common mechanism of action of mutant Sod1, resulting in cytotoxicity, impaired function, aggregation, and in alterations in intracellular distribution, opening novel territory for the identification of targets for therapeutic intervention in ALS.

Material and Methods

Bimolecular Fluorescence Complementation Plasmids

The cDNA sequence of human WT (wild-type) *SOD1* and the mutants A4V, L38V, G93A, and G93C were subcloned from the yeast plasmid YEp351 [18, 19] into the Venus-BiFC plasmids previously described [20]. In particular, we used a larger N-terminal fragment of Venus (VN), corresponding to amino acids 1–158, and a smaller C-terminal fragment (VC), corresponding to amino acids 159–239. Human *SOD1* cDNA (WT, A4V, L38V, G93A and G93C) was cloned to the 3′-end of the VN-fragment (VN-*SOD1*) and upstream of the VC-fragment (*SOD1*-VC) by PCR, using specific primers including restriction enzyme sites AflII at the 5′ and XhoI at the 3′-end. The primers used were as follows:

VN-SOD1 (WT, L38V, G93A, G93C)

Forward: 5′-GGGCTTAAGATGGCGACGAAGGCCGTG -3′
Reverse: 5′-CCCCTCGAGTTATTGGGCGATCCCAATTACACC -3′

SOD1-VC (WT, L38V, G93A, G93C)

Forward: 5′-GGGCTTAAGATGGCGACGAAGGCCGTG -3′
Reverse: 5′-CCCCTCGAGTTGGGCGATCCCAATTACACCACAAG -3′

VN-SOD1 (A4V)

Forward: 5′-GGGCTTAAGATGGCGACGAAGGTCGTGTGCG -3′
Reverse: 5′-CCCCTCGAGTTATTGGGCGATCCCAATTACACC -3′

SOD1-VC (A4V)

Forward: 5′-GGGCTTAAGATGGCGACGAAGGTCGTGTGCG -3′
Reverse: 5′-CCCCTCGAGTTGGGCGATCCCAATTACACCACAAG -3′

PCR fragments were restriction digested and cloned into alpha-synuclein BiFC constructs by replacing the alpha-synuclein insert [20]. All constructs were verified by DNA sequencing.

Cell Culture and Transfections

Human neuroglioma cells (H4) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies-Invitrogen, CA, USA), supplemented with 10% (*v*/*v*) fetal bovine serum (FBS) gold and 1% (*v*/*v*) penicillin-streptomycin, at 37 °C, and 5% CO_2 humidified atmosphere. Transfections were performed by calcium phosphate using equal amounts of plasmids encoding the wild-type (WT) or mutant (A4V, L38V, G93A and G93C) hSod1 fused to Venus BiFC system and the JUNQ substrate (mCherry-VHL). To improve the visualization of VHL-mCherry proteins into JUNQ compartments, 48 h transfected H4 cells were incubated with proteasome inhibitor MG132 (10 μM) for 7 h.

Fluorescence Microscopy

Forty-eight hours after transfection, H4 cells were washed with Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 min at room

temperature (RT). Followed by three washing steps with DPBS, cells were stained with Hoechst 33258 (Life Technologies-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (1 : 5000 in DPBS) for 5 min and maintained in DPBS for fluorescence microscopy. Fluorescence images were acquired with a Leica DMI 6000B microscope (Leica, Germany), with a ×40 objective. Scale bars were calculated by using ImageJ software and were included in the figure legends together with the actual magnification.

Quantification of Nuclear and Cytoplasmic Fluorescence Intensities

Nuclear and cytoplasmic fluorescence intensities were quantified using ImageJ software (http://rsbweb.nih.gov/ij/). Using the freehand tool, the nucleus and cytosol were selected and the respective intensities were measured. The results reflect the counting of at least 50 cells per condition.

Quantification of hSod1 Inclusions

Transfected cells were detected and scored based on the hSod1 inclusions pattern and classified into three groups: cells without inclusions, five or less inclusions (≤ 5 inclusions), and more than five inclusions (≥ 5 inclusions). Results reflect the counting of at least 50 cells per condition.

Immunocytochemistry

Forty-eight hours after transfection, cells were fixed on coverslips with 4% (*v*/*v*) PFA, for 15 min at RT. After washing with ×1 PBS, cells were permeabilized with 0.1% (*v*/*v*) Triton/PBS, for 15 min at RT. After blocking with 3% (*w*/*v*) bovine serum albumin (BSA)/PBS for 1 h at RT, cells were incubated for 2 h with primary antibody anti-G3BP 1:200 (BD Transduction Laboratories, kind gift of Prof. Flaviano Giorgini, University of Leicester) diluted in blocking solution. Cells were washed with ×1 PBS before incubation with secondary Alexa Fluor antibody (mouse, 555, Life Technologies), prepared at 1:1000 in blocking solution, for 1 h at RT. Before mounting the coverslips with Mowiol (Calbiochem, Germany), nuclei were stained with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Roth, Germany). Immunofluorescence images were acquired with Leica DMI 6000B microscope (Leica, Germany), using ×63 magnification objective.

Live Cell Imaging

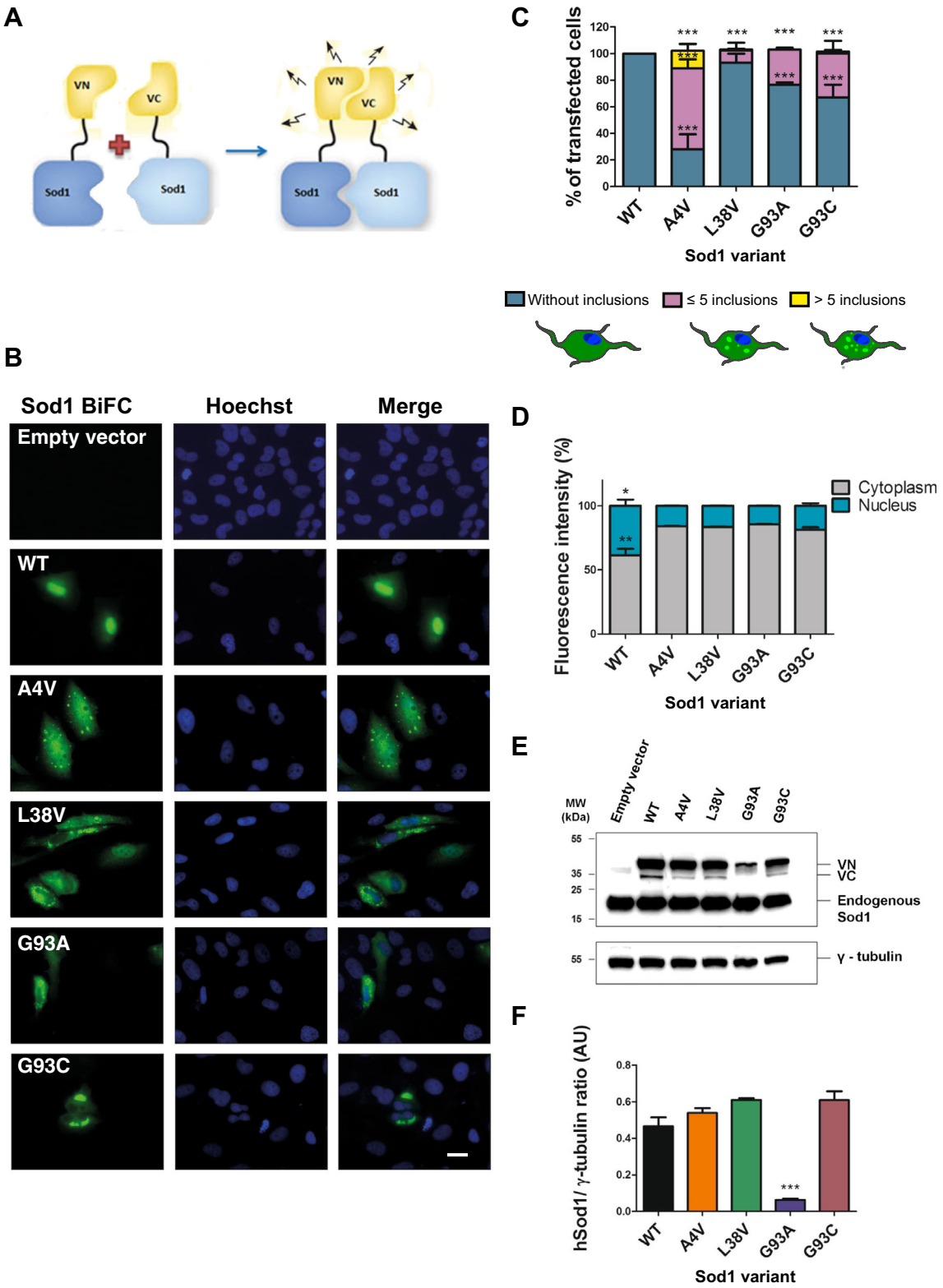
Images of H4 cells expressing BiFC-tagged hSod1 were recorded by using the Olympus IX81-ZDC microscope system (Olympus, Germany). Cells were maintained in DMEM, (Life Technologies-Invitrogen, CA, USA), supplemented with 10% (*v*/*v*) FBS and 1% (*v*/*v*) penicillin-streptomycin at 5% atmospheric CO_2, with the incubation unit set to a temperature of 37 °C. Live cells were imaged every 30 min over a time course of 20 h overnight.

Immunoblotting

Forty-eight hours post-transfection cells were washed with room temperature DPBS and then harvested. H4 cells were lysed with radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer (50 mM Tris pH 8.0, 0.15 M NaCl, 0.1% (*w*/*v*) SDS, 1% NP40 (*v*/*v*), 0.5% (*w*/*v*) Na-deoxycholate), 2 mM EDTA, and a protease inhibitor cocktail (one tablet/10 mL) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Protein concentration was determined using the Bradford assay (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA), and the gels were loaded with 30 μg protein after denaturation for 5 min at 95 °C in a protein sample buffer (125 mM of 1 M Tris HCl pH 6.8, 4% (*w*/*v*) SDS, 0.5% (*w*/*v*) bromophenol blue, 4 mM EDTA 20% (*v*/*v*) glycerol 10% (*v*/*v*) β-mercaptoethanol). Samples were separated on 15% (*w*/*v*) SDS-polyacrylamide gels (SDS-PAGE) with a constant voltage of 120 V using Tris-Glycine SDS 0.5% (*w*/*v*) running buffer (250 mM Tris, 200 mM Glycine, 1% (*w*/*v*) SDS, pH 8.3) for 75 min. Protein transference to PVDF membrane was carried out by using Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Biorad, Hercules, CA, USA) during 30 min with constant current at 0.3 A. The membranes were blocked with 4% (*w*/*v*) BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in ×1 TBS-Tween (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% (*v*/*v*) Tween, pH 7.5) for 60 min at RT. The membranes were further incubated with primary antibody 1:2000 anti-hSod1 (sc-8637 Santa Cruz Biotechnology, INC) and mouse 1:5000 anti-γ-tubulin (T5326, produced by Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 4% (*w*/*v*) BSA/TBS-Tween overnight at 4 °C. After washing three times in TBS-Tween for 5 min, the membranes were incubated for 1 h with anti-mouse IgG and anti-goat IgG horseradish peroxidase labeled secondary antibody (GE Healthcare, Bucks, UK) at 1 : 6000 in 4% (*w*/*v*) BSA/TBS-Tween. Detection was carried out using luminol reagent and peroxide solution (Millipore, Billerica, MA, USA) and applied to the membrane 1 min before scanning with in Fusion FX (Vilber Lourmat, Collégien, France). The band intensity was estimated using the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA) and normalized against γ-tubulin.

Detection of DNA Damage

The comet assay, a single cell gel electrophoresis-based method, was used to the detect DNA single- and double-strand breaks, according to the protocol previously described in [21]. Agarose coated slides were prepared by dipping the slides into a 1% (*w*/*v*) low-gelling temperature agarose (PeqLab) and allowed to air-dry. Approximately 5×10^4



cells/mL were harvested in DPBS, mixed with 1% agarose and placed on a precoated slide. After agarose has gelled, alkaline lysis was performed by submerging the slides in alkaline buffer (1.2 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA, 0.1% (*w*/*v*) sodium lauryl sarcosinate, 0.26 M NaOH, pH > 13) and stored overnight at 4 °C. After overnight lysis, the alkaline rinse solution (0.03 M NaOH, 2 mM Na_2EDTA, pH = 12.3) was used to wash the slides three times and to conduct the

◀ **Fig. 1** Sod1 mutations affect oligomerization subcellular distribution of inclusions. **a** Schematic representation of the bimolecular fluorescence complementation assay (BiFC). Sod1 fused to either the N- (VN-Sod1) or C-terminal (Sod1-VC) fragments of Venus. **b** Representative pictures of cells expressing fALS hSod1 mutants. H4 cells expressing WT or mutant hSod1 (A4V, L38V, G93A and G93C) VN-Sod1 and Sod1-VC constructs were analyzed by fluorescence microscopy. Scale bar 10 μm. Magnification ×1000. **c** Quantification of the number of inclusion per cell. At least 50 cells were counted per condition and classified in three different groups: blue, purple, and yellow bars represent the percentage of cells without any inclusion, with five or less inclusions and cells with more than five inclusions, respectively. Data was combined from at least three independent experiments. One-way ANOVA, with Bonferroni correction, was used for statistical analysis to compare differences between WT vs mutant cells (*** $p < 0.001$). **d** Subcellular localization of BiFC-hSod1. BiFC fluorescence intensity was quantified using ImageJ. For each condition, 50 cells were analyzed. **e** Representative immunoblot confirming expression of VN-Sod1 and Sod1-VC fragments. **f** Quantification of the immunoblots. Data is expressed as mean ± SD of at least three replicates. One-way ANOVA, with Bonferroni correction, was used for statistical analysis with significance level of $p < 0.001$ represented by three asterisks

electrophoresis for 25 min at a constant voltage of 0.6 V/cm. Slides were neutralized with distilled water and stained with 2.5 μg/mL of propidium iodide for 20 min at RT. DNA damage quantification was carried out by examining at least 50 comet images from each slide. The images were acquired with an epifluorescence microscope (Leica DMI 6000B microscope, Leica, Germany). CometScore software (TriTek Corp) was used to determine the tail moment (product of the tail length and the percentage of total DNA in the tail) of each individual comet image.

Analysis of Intracellular Oxidation

The generation of intracellular reactive oxygen species (ROS) was assessed in H4 cells expressing BiFC-tagged hSod1 or untagged hSod1 (WT and mutants). Briefly, the cells were seeded in 48-well plates and washed once with DPBS. For ROS production measurement, cells were incubated with 25 μM 2′,7′-dichlorofluorescin diacetate (DCFDA, Sigma) at 37 °C for 30 min. Following the incubation period, two washing steps with DPBS were performed to remove excess probe and fluorescence intensity (excitation 485 nM; emission 535 nM) was measured using the microplate reader Infinite M2000 PRO, Tecan. After three basal measurements, cells were challenged with 5% (*v*/*v*) H_2O_2. The fluorescence values were recorded up to 45 min and normalized to those obtained from non-H_2O_2-induced cells.

Statistical Analyses

Data were analyzed using Graph Pad Prism 5 (San Diego, California, USA) software and were expressed as the mean ± SD of at least three replicates. Statistical differences from WT Sod1 were calculated using one-way ANOVA and two-way ANOVA with Bonferroni correction. Significance was assessed for, where an asterisk corresponds to $p < 0.05$, double asterisks corresponds to $p < 0.01$, and triple asterisks corresponds to $p < 0.001$.

Results

fALS Mutations on hSod1 Promote Oligomerization and Impair Nuclear Localization

In order to assess the effect of hSod1 mutations on oligomerization and subcellular localization, we used the BiFC-based assay which involves the fusion of Sod1 with non-fluorescent fragments of the Venus protein [22]. This assay is based on the reconstitution of a functional Venus fluorescent protein upon dimerization of hSod1, enabling the direct visualization of the formation of hSod1 oligomers and inclusions in living cells (Fig.1a). WT hSod1 formed only dimers/oligomers in H4 cells, but not inclusions, unlike all other variants tested (Fig. 1b, c). The inclusions formed by the hSod1 mutants tested exhibited different sizes and shapes (Fig. 1b). In addition, the number of inclusion per cell was also variable (Fig. 1c). For hSod1 A4V, 80% of the cells displayed small round inclusions. For the other mutants, around 30% of the cells displayed larger and elongated inclusions. A4V and L38V inclusions were found scattered over the cytoplasm, and G93A and G93C formed a larger number of inclusions per cell.

In addition, we also found that all fALS hSod1 mutations reduced the nuclear localization of Sod1 to half of that observed with WT hSod1 (Fig. 1b, d). The levels of A4V, G93C, and L38V hSod1 variants were identical, except those of G93A, suggesting this mutant may be more unstable (Fig. 1e, f).

Next, we asked whether the inclusions formed by Sod1 were localized in stress granules (SG), and costained cells with an antibody against G3BP, an established marker of SGs [23, 24]. We found that none of the inclusions formed by the hSod1 mutants tested in this study colocalized with G3BP (Fig. 2).

In order to investigate the site of accumulation of hSod1 in H4 cells, we monitored the localization of the inclusions using von Hippel-Lindau (VHL) fused to mCherry as a marker for the JUNQ compartment. VHL is a heterologous protein that misfolds and forms soluble aggregates that are targeted to the JUNQ compartment, where they colocalize with the quality control machinery [25]. To improve the visualization of VHL-mCherry proteins into JUNQ, H4 cells were incubated with the proteasome inhibitor MG132 (10 μM) for 7 h, 48 h after transfection. The inhibition of the proteasome did not change the visualization of the hSod1 variants into JUNQ, suggesting that the levels of fALS inclusions were sufficiently high under normal conditions (Fig. 3).

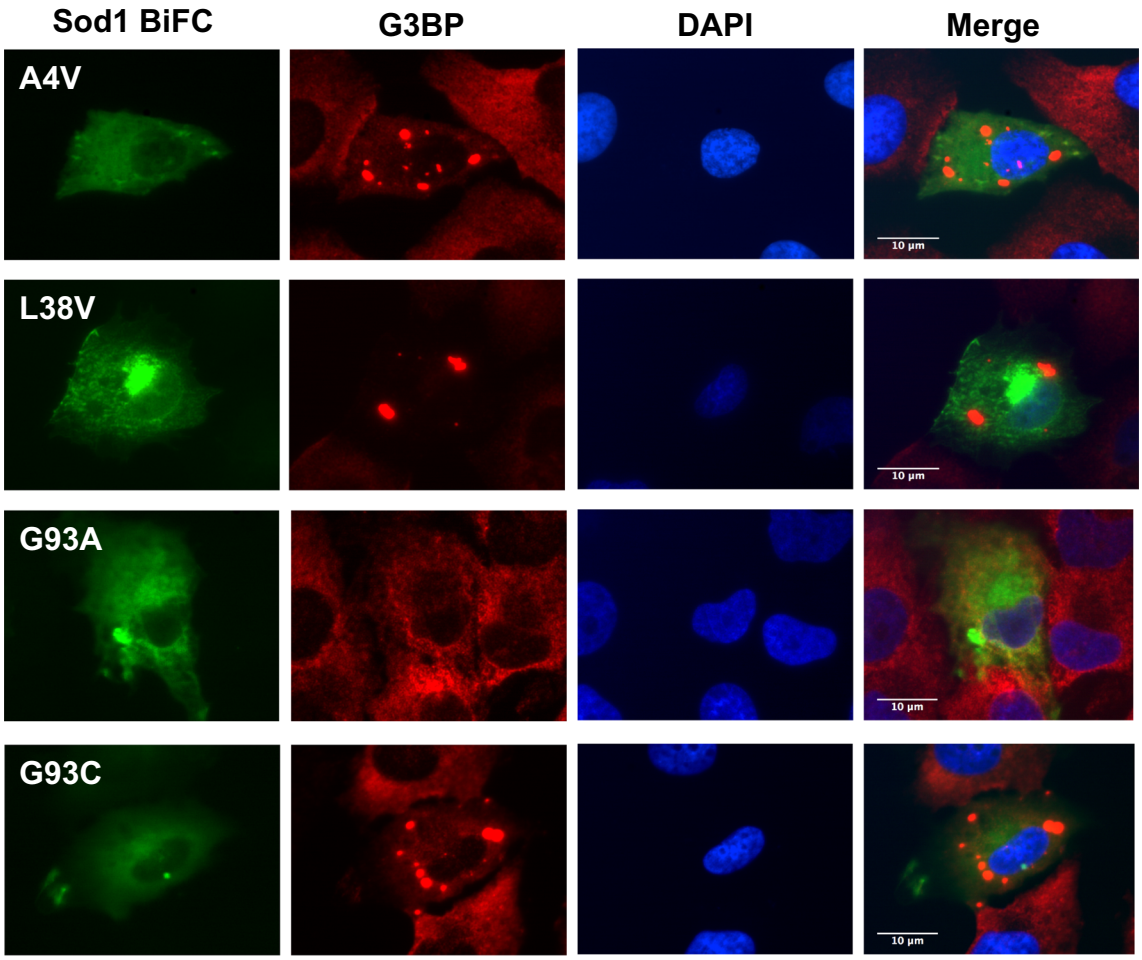


Fig. 2 fALS mutant Sod1 inclusions do not colocalize with SGs. Inclusions of Sod1 were visualized by expression of BiFC-tagged Sod1 (green), and SGs were labeled by immunostaining with an antibody against G3BP (red). Nuclei were visualized with DAPI staining. Scale bar 10 µm. Magnification ×1000

To investigate the dynamics of the formation of Sod1 inclusions in vivo, live-cell imaging was performed during 20 h post-transfection. The time of appearance of the first inclusions was recorded and compared among the variants of hSod1 tested. Upon careful analysis of the data, we verified that A4V and G93A hSod1 inclusions appeared about 3 h earlier than L38V and G93C hSod1 inclusions (Fig. 4) and persisted in the cells for more than 5 h. This clearly suggests a distinct aggregation dynamics between A4V/G93A and L38V/G93C fALS mutations.

fALS hSod1 Mutants Do Not Efficiently Protect against ROS and DNA Damage

In order to assess whether BiFC-tagged Sod1 retains function, we measured intracellular ROS levels using the oxidative stress sensitive 2′,7′-dichlorofluorescein (DCFH) probe. Using this approach, we also analyzed whether A4V, L38V, G93A, and G93C fALS mutations affected hSod1 function. We found that the levels of ROS observed in cells carrying an empty vector were similar to those observed in cells transfected with hSod1 constructs. Thus, we then asked whether we could detect differences in the handling of ROS in cells transfected with the hSod1 constructs. After 30 min of exposure of the cells expressing the different hSod1 variants to hydrogen peroxide (H_2O_2), we found that the WT, but not the mutant hSod1, reduced the levels of ROS (Figs. 5 and 6). This suggests that the fusions of WT hSod1 with the BiFC Venus protein fragments retain dismutase function, leading to reduced levels of ROS. In contrast, the Sod1 mutants lacked dismutase activity, suggesting the mutations affected the antioxidant activity of Sod1. This suggests the following: (i) the fusions of WT hSod1 with the BiFC Venus protein fragments do not impair the antioxidant role of the enzyme; (ii) A4V, L38V, G93A, and G93C fALS mutations cause hSod1 loss of function.

Next, to investigate whether the different hSod1 variants protected from DNA damage, we measured DNA single- and double-strand breaks using the comet assay. In this assay, the tail moment is expressed as the relation between the tail length

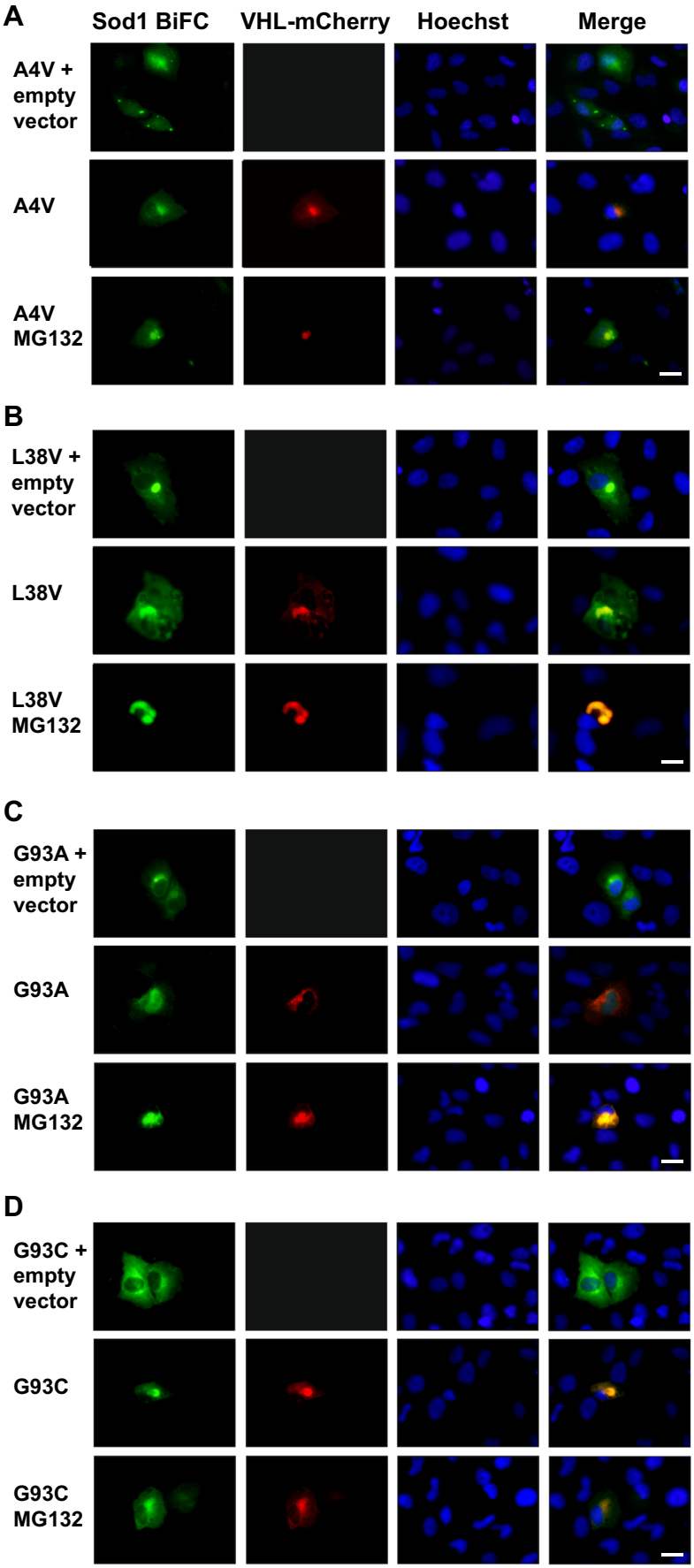


Fig. 3 hSod1 mutants are preferentially directed to the JUNQ compartment in H4 cells. Colocalization of the hSod1 mutants with the VHL protein. As a control, H4 cells were transfected with pcDNA vector. Inclusions were visualized by expression of BiFC-tagged Sod1 (green) and JUNQ was observed by expression of VHL-mCherry (red), nuclei in all experiments were visualized with Hoechst staining. Representative pictures of BiFC. hSod1 A4V (**a**), L38V (**b**), G93A (**c**), and G93C (**d**) colocalizing with JUNQ. The inclusions formed by BiFC-tagged hSod1 A4V, L38V, and G93C are clearly visualized when proteasome is functional, whereas G93A inclusions are more observed into JUNQ after proteasome inhibition with MG132. Scale bar 20 μm. Magnification ×500

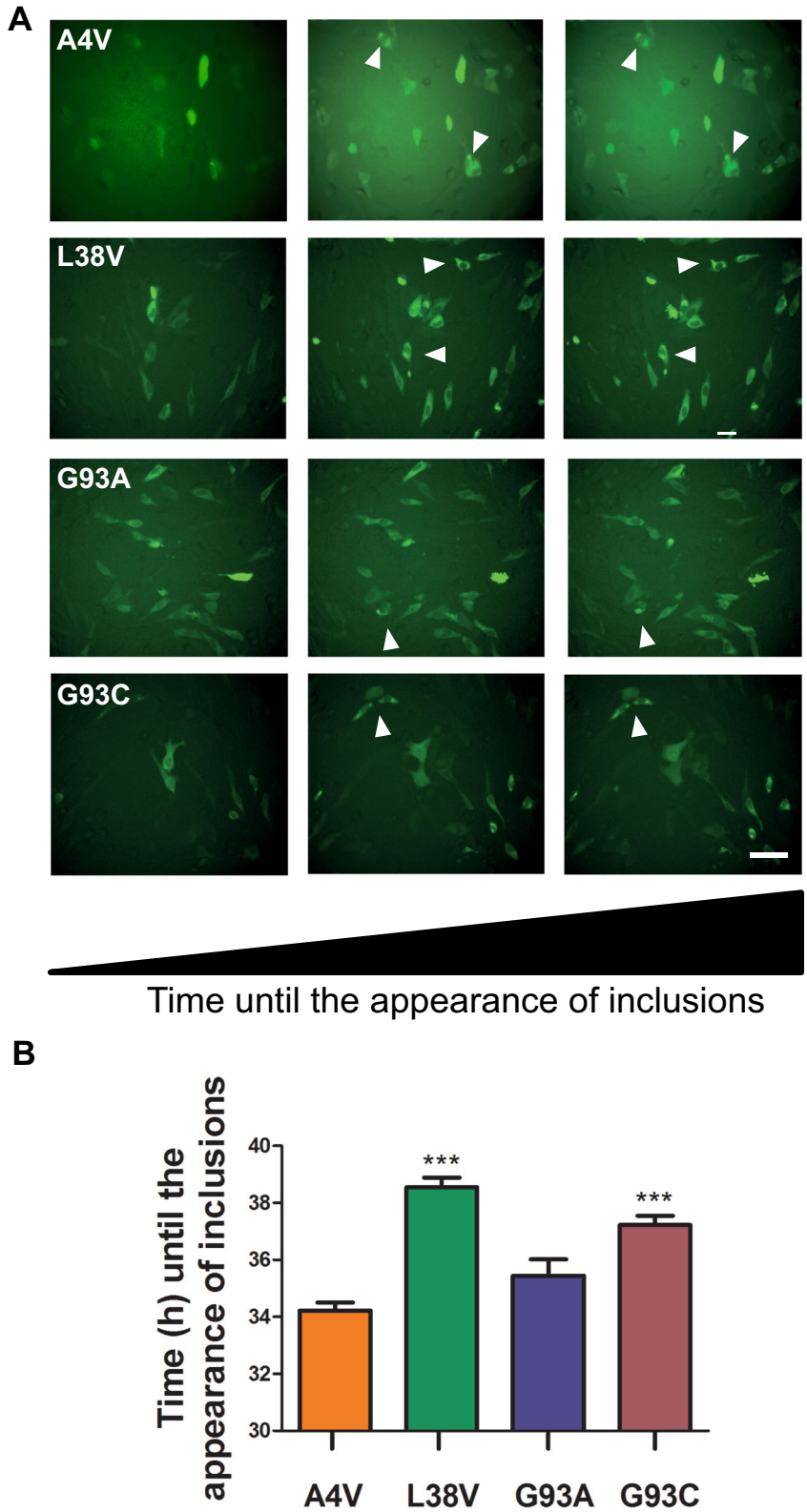


Fig. 4 Live-cell imaging of cells expressing hSod1 BiFC constructs. **a** Representative frames of a time course showing inclusions in hSod1 BiFC expressing cells. Live-cell imaging was initiated 24 h post-transfection, and the pictures were taken every 30 min for 20 h. Scale bar 40 μm. Magnification ×250. **b** Chronological and comparative analyses of the dynamics of inclusions formation. Data is expressed as mean ± SD of at least three replicates. One-way ANOVA, with Bonferroni correction, was used for statistical analysis with significance level of *** $p < 0.001$, comparing hSod1A4V with L38V, G93C, and G93C hSod1 mutations

(the smallest detectable size of migrating DNA) and the fraction of total DNA in the tail (the number of relaxed/broken pieces) [26]. Interestingly, we found that WT hSod1 protected against DNA damage, confirming that the BiFC tags did not affect Sod1 activity. In contrast, expression of A4V, L38V, and G93C hSod1 mutants did not protect against DNA damage as

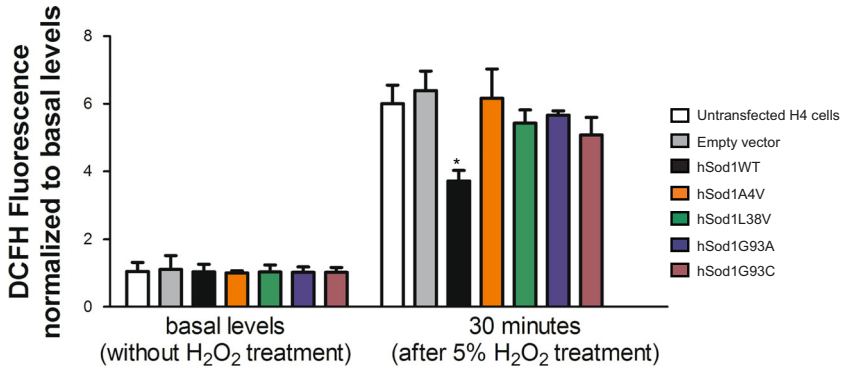


Fig. 5 FALS mutants do not protect cells against ROS production. Intracellular ROS measurements were conducted in transfected H4 cells expressing the BiFC-tagged hSod1 by using the oxidant-sensing probe 2′,7′-dichlorofluorescein (DCFH). Thirty minutes after treatment with 5% H_2O_2, total cellular levels of ROS were significantly lower in H4 cells expressing BiFC-tagged WT Sod1 in comparison to fALS mutations A4V, L38V, G93A, and G93C levels. At basal levels, no differences in intracellular ROS between WT, and the four Sod1 mutations were observed. Data is expressed as mean ± SD of at least three replicates. Two-way ANOVA, with Bonferroni correction, was used for statistical analysis with significance level of * $p < 0.05$, comparing WT with Sod1 mutants

WT hSod1, having tail moments about five times larger, suggesting that these fALS Sod1 mutants are not able to maintain genomic stability due to their reduced presence in the nucleus (Fig. 1d). Strikingly, cells expressing the G93A hSod1 mutant

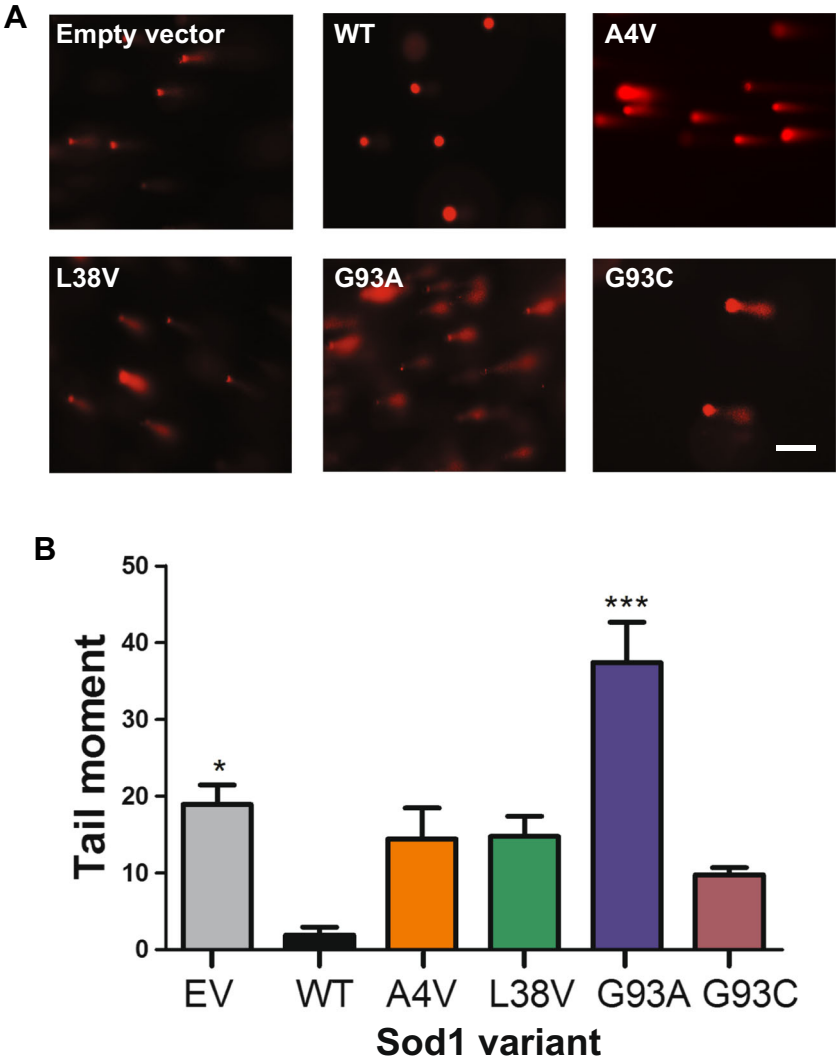


Fig. 6 The G93A hSod1 mutation increases DNA damage in H4 cells. **a** Representative images of comet assay. Prestained comets with propidium iodide (PI) were imaged using fluorescence microscopy and tail moments were calculated using the Comet Score software. Scale bar: 40 μm. Magnification: 250X. **b** Levels of DNA damage in H4 cells expressing BiFC-tagged Sod1 WT and mutants. Quantification of double- and single-strand DNA breaks was made using alkaline comet assay method. BiFC-tagged hSod1expressing cells as well as control cells transfected with empty vector were all examined using the overnight alkaline method to analyze DNA damage. Data is expressed as mean ± SD of at least three replicates. One-way ANOVA, with Bonferroni correction, was used for statistical analysis between WT hSod1 and mutants hSod1 cells with significance level of an asterisk, *** $p < 0.05$

exhibited the highest levels of DNA damage, which were about 50% higher than those observed for cells expressing WT Sod1.

Discussion

hSod1 mutations associated with fALS are prone to misfolding and aggregation [27]. Various in vitro and in vivo studies have assessed the effects of fALS-associated mutations on hSod1, in an attempt to afford novel insight into the molecular basis of the disease [13–15, 17, 28–31]. Several studies suggested that the toxicity of hSod1 mutants is related with the respective amino acid substitution [32] and with alterations in the intracellular localization of the protein [11, 25, 33]. Moreover, the cytotoxic mechanisms exerted by Sod1 mutants have also been associated with a bulk saturation of clearance mechanisms (e.g., proteasomal or autophagic protein degradation), saturation of chaperone function and dysfunction of mitochondria, alterations in apoptotic pathways, and axonal disorganization and disrupted axonal transport [34–37]. However, the precise molecular underpinnings of fALS are still unclear.

The aggregation of mutant Sod1 in living cells and the alteration in conformation and localization have been monitored by tagging the protein with fluorescent fluorophores [31, 38]. Although such approaches may alter the biological function of proteins, they enable important studies that cannot be performed otherwise.

Given that hSod1 spontaneously dimerizes in normal conditions and forms a homodimer [39], we took advantage of the BiFC assay, based on the complementation of two non-fluorescent fragments of the fluorescent protein, in order to investigate the effect of fALS-associated mutants on hSod1 dimerization, oligomerization and aggregation, and on functional readouts of activity.

Initially, we observed that BiFC-tagged Sod1 A4V, L38V, G93A, and G93C dimerized and formed intracellular inclusions. This effect was particularly strong for the A4V mutant, which significantly increase in the percentage of cells with inclusions.

It is still unclear whether Sod1 inclusions are toxic, and additional studies using different model systems will be instrumental to address this. Recent studies have connected protein inclusions with SGs [24]. Using spinal cord motor neurons [40] or HeLa cells as models [23], it was shown that inclusions formed by G93A and A4V Sod1 mutants colocalize with G3BP, an established marker of SGs. In our study, we did not observe colocalization of the inclusions formed with G3BP, suggesting differences in the types of inclusions formed. Our observations are consistent with those reported recently, where inclusions of G93A Sod1 did not colocalize with SGs in HEK 293 cells [40]. Thus, our results suggest that, in normal conditions, the Sod1 mutants studied do not colocalize with SGs.

Sod1 aggregation is directly dependent of dimer dissociation, which is promoted by mutations that weaken the interactions at the dimer interface [41, 42]. FRET analysis indicated that fALS mutations impaired Sod1 dimerization, consequently affecting protein aggregation [17]. In addition, it was reported that mutant Sod1 tagged with YFP formed cytoplasmic inclusions in cultured cells, in contrast to WT Sod1 [43]. Consistently, WT Sod1-GFP chimeric protein maintain its dismutase activity and does not really form inclusions when expressed in PC12 cultured cells [44]. Thus, considering only the number of inclusions counted per cell, the A4V mutation promoted the most harmful effect in comparison to the other mutations. Live-cell imaging revealed that A4V and G93A mutations formed inclusion faster than G93C and L38V, suggesting, for the first time, that Sod1 variants A4V and G93A need the same time to aggregate and have more propensities to form inclusions over a time course. It has been shown that A4V variant had the most considerable dimerization defect and the strongest Sod1 aggregation activity, which is in agreement with the earlier aggregate formation observed in Fig. 3 [17]. In addition, G93A accumulated at lower levels, indicating that this altered protein is more rapidly degraded in cells. In comparison to other mutations related to fALS, G93A showed early disease onset related to the worst prognostic [45]. Moreover, in vitro studies that investigated the correlation between the propensity for aggregation and conformational stability of Sod1, showed that G93A have the highest conformation instability compared to other mutations, including A4V [46]. These fALS-linked mutations are located throughout the three-dimensional structure of the Sod1 protein. The G93A is located on turns of β-sheets of the β-barrel, and the A4V mutation is at the dimer interface. Studies using spectroscopic techniques [47, 48], thermal stability measurement [49], and disulfide reduction [32] have demonstrated that G93A and A4V mutation contribute to a reduction in protein stability, which may be related to their toxic gain of function. It has been shown that accumulation of toxic G93A Sod1 in the JUNQ compartment interferes with the quality control function, inhibiting the degradation of other misfolded proteins by sequestering Hsp70, thereby blocking proteasomal function. It was previously demonstrated that Sod1 A4V is a JUNQ-like aggregate which colocalizes with ubiquitin [33]. Thus, we verified whether the BiFC-tagged G93A Sod1 was indeed directed to JUNQ. Remarkably, we observed that all mutations analyzed colocalized with VHL protein. Thus, the mutant Sod1 localization in the JUNQ was confirmed a well-established hallmark feature of fALS, which increases the harmful effects of the mutations.

In addition to the observation of Sod1 inclusions, we observed that about 40% of dimeric Sod1 WT is located in the nucleus, while only 20% of mutant Sod1 was found in this compartment, showing a significant increase in fluorescence intensity of mutSod1 in the cytoplasm. These results indicate that the presence of Sod1 mutations decreases the ability to this protein to move into the nucleus. It has been shown in yeast cells that exposure to oxidants is sufficient to promote Sod1 nuclear localization through Dun1-Sod1 interaction and regulation of Sod1 by phosphorylation at S60, 99 [5]. In the nucleus, Sod1 affects the expression of oxidative resistance and repair genes [5] and interacts with DNA [50].

In this study, we confirmed that BiFC-tagged Sod1 mutants respond differently to mild exposure to H_2O_2 in comparison to WT Sod1. Sod1 mutants do not properly respond against intracellular ROS production. One possible explanation is that A4V, G93A, G93C, and L38V hSod1 as aggregates at cytoplasm are unable to enter the nucleus (Fig. 1d). Another possibility is that the fALS mutations impair the ROS signaling that mediates hSod1 nuclear translocation; by remaining at cytoplasm, fALS hSod1 mutants aggregate.

Although all fALS-associated hSod1 mutants showed a similar distribution between cytosol and nucleus (80 versus 20%), leading to an impaired ability to prevent DNA damage when compared to WT Sod1, G93A hSod1 exhibited the worst performance. The levels of damage were twofold higher in G93A hSod1 expressing cells than in cells which contain only the endogenous Sod1, empty vector, meaning that G93A hSod1 is non-active and harmful with respect to DNA protection.

Our study reveals an in vivo aggregation timeline between Sod1 mutants, which were probably responsible to induce DNA damage as well as a decreased nuclear localization in comparison to the WT form. Regarding the stages of ALS disease when Sod1 aggregates are formed, some aspects have been reported. Sod1 aggregate was found to accumulate at the highest levels as symptoms appear in mouse models of fALS [45, 51]. Moreover, inclusion-like structures were seen in symptomatic mice that express the ALS mutant G85R-SOD1, especially in mice motor neuron at the end-stage paralysis [52]. More recently, a timing of mutant Sod1 aggregation was reported in prion-like transmission studies with G85R-Sod1 expressing mice [53]. ALS patients harboring the A4V or G93A mutation have a short mean survival time of only about 1.5 years post diagnosis [17, 54]. On the contrary, G93C mutation patients present a long survival time [17]. The ephemeral survival time of fALS patients carrying G93A or A4V mutations correlates with the fastest aggregation observed in cells in the current study. Ultimately, our findings may impact on the development of therapeutic strategies aimed at modulating the aggregation of Sod1, by providing novel and detailed information about the behavior of WT and mutant Sod1 in living cells.

Acknowledgements Open access funding provided by Max Planck Institute of Experimental Medicine. We thank Marina Trombin Marques from Departamento de Neurologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa (São Paulo, Brazil) for technical assistance with cell culture.

Funding This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and by CAPES/DAAD under the PROBRAL Program. TFO is supported by the DFG Center for Nanoscale Microscopy and Molecular Physiology of the Brain (CNMPB).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no competing interests.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

1. Rowland LP, Shneider NA (2001) Amyotrophic lateral sclerosis. N Engl J Med 344:1688–1700. https://doi.org/10.1056/NEJM200105313442207
2. Schymick JC, Talbot K, Traynor BJ (2007) Genetics of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Hum Mol Genet 16:R233–R242. https://doi.org/10.1093/hmg/ddm215
3. Abe K, Aoki M, Ikeda M et al (1996) Clinical characteristics of familial amyotrophic lateral sclerosis with Cu/Zn superoxide dismutase gene mutations. J Neurol Sci 136:108–116. https://doi.org/10.1016/0022-510X(95)00314-R
4. Fukai T, Ushio-Fukai M (2011) Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. Antioxid Redox Signal 15:1583–1606. https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999
5. Tsang CK, Liu Y, Thomas J et al (2014) Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. Nat Commun. https://doi.org/10.1038/ncomms4446
6. Valentine JS, Doucette PA, Zittin Potter S (2005) Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. Annu Rev Biochem 74:563–593. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161647
7. Valdmanis PN, Daoud H, Dion PA, Rouleau GA (2009) Recent advances in the genetics of amyotrophic lateral sclerosis. Curr Neurol Neurosci Rep 9:198–205. https://doi.org/10.1007/s11910-009-0030-9
8. Matsumoto G, Stojanovic A, Holmberg CI et al (2005) Structural properties and neuronal toxicity of amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu/Zn superoxide dismutase 1 aggregates. J Cell Biol 171:75–85. https://doi.org/10.1083/jcb.200504050
9. Bruijn LI, Miller TM, Cleveland DW (2004) Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. Annu Rev Neurosci 27:723–749. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144244
10. Allen S, Badarau A, Dennison C (2012) Cu (I) affinities of the domain 1 and 3 sites in the human metallochaperone for Cu,Zn-

superoxide dismutase. Biochemistry 51:1439–1448. https://doi.org/10.1021/bi201370r
11. Weisberg SJ, Lyakhovetsky R, Werdiger AC et al (2012) Compartmentalization of superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) aggregates determines their toxicity. Proc Natl Acad Sci 109: 15811–15816. https://doi.org/10.1073/pnas.1205829109
12. Tu PH, Raju P, Robinson K a et al (1996) Transgenic mice carrying a human mutant superoxide dismutase transgene develop neuronal cytoskeletal pathology resembling human amyotrophic lateral sclerosis lesions. Proc Natl Acad Sci 93:3155–3160. https://doi.org/10.1073/pnas.93.7.3155
13. Roberts K, Zeineddine R, Corcoran L et al (2013) Extracellular aggregated Cu/Zn superoxide dismutase activates microglia to give a cytotoxic phenotype. Glia 61:409–419. https://doi.org/10.1002/glia.22444
14. Yerbury JJ, Gower D, Vanags L et al (2013) The small heat shock proteins αb-crystallin and Hsp27 suppress SOD1 aggregation in vitro. Cell Stress Chaperones 18:251–257. https://doi.org/10.1007/s12192-012-0371-1
15. Furukawa Y, Kaneko K, Yamanaka K et al (2008) Complete loss of post-translational modifications triggers fibrillar aggregation of SOD1 in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis. J Biol Chem 283:24167–24176. https://doi.org/10.1074/jbc.M802083200
16. McAlary L, Aquilina JA, Yerbury JJ (2016) Susceptibility of mutant SOD1 to form a destabilized monomer predicts cellular aggregation and toxicity but not in vitro aggregation propensity. Front Neurosci 10:499. https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00499
17. Kim J, Lee H, Lee JH et al (2014) Dimerization, oligomerization, and aggregation of human amyotrophic lateral sclerosis copper/zinc superoxide dismutase 1 protein mutant forms in live cells. J Biol Chem 289:15094–15103. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.542613
18. Gralla EB, Valentine JS (1991) Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu,Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. J Bacteriol 173:5918–5920
19. Brasil AA, Belati A, Mannarino SC et al (2013) The involvement of GSH in the activation of human Sod1 linked to FALS in chronologically aged yeast cells. FEMS Yeast Res 13:433–440
20. Outeiro TF, Putcha P, Tetzlaff JE et al (2008) Formation of toxic oligomeric α-synuclein species in living cells. PLoS One. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001867
21. Olive PL, Banáth JP (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. Nat Protoc 1:23–29. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.5
22. Gonçalves SA, Matos JE, Outeiro TF (2010) Zooming into protein oligomerization in neurodegeneration using BiFC. Trends Biochem Sci 35:643–651. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.05.007
23. Mateju D, Franzmann TM, Patel A et al (2017) An aberrant phase transition of stress granules triggered by misfolded protein and prevented by chaperone function. EMBO J 36:e201695957. https://doi.org/10.15252/embj.201695957
24. Siwach P, Kaganovich D (2017) Getting stress out of stressed-out stress granules. EMBO J 36:e201797176. https://doi.org/10.15252/embj.201797176
25. Kaganovich D, Kopito R, Frydman J (2008) Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. Nature 454:1088–1095. https://doi.org/10.1038/nature07195
26. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995) The comet assay: a comprehensive review. Mutat Res Genet Toxicol 339:37–59. https://doi.org/10.1016/0165-1110(94)00013-3
27. Kaur SJ, McKeown SR, Rashid S (2016) Mutant SOD1 mediated pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. Gene 577:109–118. https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.11.049
28. Park J-H, Park H-S, Hong S, Kang S (2016) Motor neurons derived from ALS-related mouse iPS cells recapitulate pathological features of ALS. Exp Mol Med 48:e276. https://doi.org/10.1038/emm.2016.113
29. Wei R, Bhattacharya A, Hamilton RT et al (2013) Differential effects of mutant SOD1 on protein structure of skeletal muscle and spinal cord of familial amyotrophic lateral sclerosis: role of chaperone network. Biochem Biophys Res Commun 438:218–223. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.07.060
30. Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Culotta VC et al (2001) Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. Neurobiol Dis 8:933–941. https://doi.org/10.1006/nbdi.2001.0443
31. Ayers JI, McMahon B, Gill S et al (2016) Relationship between mutant SOD1 maturation and inclusion formation in cell models. J Neurochem. https://doi.org/10.1111/jnc.13864
32. Tiwari A, Hayward LJ (2003) Familial amyotrophic lateral sclerosis mutants of copper/zinc superoxide dismutase are susceptible to disulfide reduction. J Biol Chem 278:5984–5992. https://doi.org/10.1074/jbc.M210419200
33. Farrawell NE, Lambert-Smith IA, Warraich ST et al (2015) Distinct partitioning of ALS associated TDP-43, FUS and SOD1 mutants into cellular inclusions. Sci Rep 5:13416. https://doi.org/10.1038/srep13416
34. Taylor JP, Brown RH, Cleveland DW (2016) Decoding ALS: from genes to mechanism. Nature 539:197–206. https://doi.org/10.1038/nature20413
35. Tafuri F, Ronchi D, Magri F et al (2015) SOD1 misplacing and mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis. Front Cell Neurosci. https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00336
36. Keskin I, Forsgren E, Lange DJ et al (2016) Effects of cellular pathway disturbances on misfolded superoxide dismutase-1 in fibroblasts derived from ALS patients. PLoS One 11:e0150133. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150133
37. Tiwari A, Hayward LJ (2006) Mutant SOD1 instability: implications for toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. Neurodegener Dis 2:115–127. https://doi.org/10.1159/000089616
38. Zhang F, Zhu H (2006) Intracellular conformational alterations of mutant SOD1 and the implications for fALS-associated SOD1 mutant induced motor neuron cell death. Biochim Biophys Acta Gen Subj 1760:404–414. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.11.024
39. Saccon RA, Bunton-Stasyshyn RKA, EMC F, Fratta P (2013) Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? Brain 136:2342–2358. https://doi.org/10.1093/brain/awt097
40. Gal J, Kuang L, Barnett KR et al (2016) ALS mutant SOD1 interacts with G3BP1 and affects stress granule dynamics. Acta Neuropathol 132:563–576. https://doi.org/10.1007/s00401-016-1601-x
41. Broom HR, Rumfeldt JAO, Vassall KA, Meiering EM (2015) Destabilization of the dimer interface is a common consequence of diverse ALS-associated mutations in metal free SOD1. Protein Sci 24:2081–2089. https://doi.org/10.1002/pro.2803
42. Fay JM, Zhu C, Proctor EA et al (2016) A phosphomimetic mutation stabilizes SOD1 and rescues cell viability in the context of an ALS-associated mutation. Structure 24:1898–1906. https://doi.org/10.1016/j.str.2016.08.011
43. Prudencio M, Durazo A, Whitelegge JP, Borchelt DR (2010) An examination of wild-type SOD1 in modulating the toxicity and aggregation of ALS-associated mutant SOD1. Hum Mol Genet 19:4774–4789. https://doi.org/10.1093/hmg/ddq408
44. Stevens JC, Chia R, Hendriks WT et al (2010) Modification of superoxide dismutase 1 (SOD1) properties by a GFP tag—implications for research into amyotrophic lateral sclerosis (ALS). PLoS One. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009541
45. Karch CM, Prudencio M, Winkler DD et al (2009) Role of mutant SOD1 disulfide oxidation and aggregation in the pathogenesis of

familial ALS. Proc Natl Acad Sci U S A 106:7774–7779. https://doi.org/10.1073/pnas.0902505106

46. Stathopulos PB, Rumfeldt JAO, Scholz GA et al (2003) Cu/Zn superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis show enhanced formation of aggregates in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 100:7021–7026. https://doi.org/10.1073/pnas.1237797100
47. Liu H, Zhu H, Eggers DK et al (2000) Copper (2+) binding to the surface residue cysteine 111 of His46Arg human copper-zinc superoxide dismutase, a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant. Biochemistry 39:8125–8132. https://doi.org/10.1021/bi000846f
48. Shipp EL, Cantini F, Bertini I et al (2003) Dynamic properties of the G93A mutant of copper-zinc superoxide dismutase as detected by NMR spectroscopy: Implications for the pathology of familial amyotrophic lateral sclerosis. Biochemistry 42:1890–1899. https://doi.org/10.1021/bi026704y
49. Hayward LJ, Rodriguez JA, Kim JW et al (2002) Decreased metallation and activity in subsets of mutant superoxide dismutases associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. J Biol Chem 277:15923–15931. https://doi.org/10.1074/jbc.M112087200
50. Barbosa LF, Cerqueira FM, Macedo AFA et al (2010) Increased SOD1 association with chromatin, DNA damage, p53 activation, and apoptosis in a cellular model of SOD1-linked ALS. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 1802:462–471. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.01.011
51. Wang J, Xu G, Li H et al (2005) Somatodendritic accumulation of misfolded SOD1-L126Z in motor neurons mediates degeneration: αB-crystallin modulates aggregation. Hum Mol Genet 14:2335–2347. https://doi.org/10.1093/hmg/ddi236
52. Wang J, Farr GW, Zeiss CJ et al (2009) Progressive aggregation despite chaperone associations of a mutant SOD1-YFP in transgenic mice that develop ALS. Proc Natl Acad Sci U S A 106:1392–1397. https://doi.org/10.1073/pnas.0813045106
53. Ekhtiari Bidhendi E, Bergh J, Zetterström P et al (2016) Two superoxide dismutase prion strains transmit amyotrophic lateral sclerosis-like disease. J Clin Invest 126:2249–2253. https://doi.org/10.1172/JCI84360
54. Galaleldeen A, Strange RW, Whitson LJ et al (2009) Structural and biophysical properties of metal-free pathogenic SOD1 mutants A4V and G93A. Arch Biochem Biophys 492:40–47. https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.09.020

Fungal Biology xxx (2018) 1–12

Contents lists available at ScienceDirect

Fungal Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/funbio

Oxidative stress and aging: Learning from yeast lessons

Elis Eleutherio*, Aline de Araujo Brasil, Mauro Braga França, Diego Seixas Gomes de Almeida, Germana Breves Rona, Rayne Stfhany Silva Magalhães

Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), 21941-909, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 August 2017
Received in revised form
4 December 2017
Accepted 5 December 2017
Available online xxx

Corresponding Editor: Drauzio E.N. Rangel

Keywords:
Cancer
Lifespan
Neurodegenerative diseases
Reactive oxygen species (ROS)
Saccharomyces cerevisiae

ABSTRACT

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has played a vital role in the understanding of the molecular basis of aging and the relationship of aging process with oxidative stress (non-homeostatic accumulation of Reactive Oxygen Species, ROS). The mammalian and yeast antioxidant responses are similar and over 25 % of human-degenerative disease related genes have close homologues in yeast. The reduced genetic redundancy of yeast facilitates visualization of the effect of a deleted or mutated gene. By manipulating growth conditions, yeast cells can survive only fermenting (low ROS levels) or respiring (increased ROS levels), which facilitates the elucidation of the mechanisms involved with acquisition of tolerance to oxidative stress. Furthermore, the yeast databases are the most complete of all eukaryotic models. In this work, we highlight the value of *S. cerevisiae* as a model to investigate the oxidative stress response and its potential impact on aging and age-related diseases.

© 2017 British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Oxygen is required for aerobic life but may also play a crucial role in the aging process. According to the oxidative stress theory of aging, aging and age-associated diseases are associated with the damage caused by reactive oxygen species, ROS, to cellular constituents (Finkel and Holbrook, 2000).

The majority of ROS production occurs in the electron transport chain (ETC) of the mitochondria (Sheu et al., 2006). In this process, one molecule of oxygen receives four electrons being reduced to water; however, throughout the process, some of the electrons leak prematurely from electrons carriers to oxygen yielding ROS (Murphy, 2009). As electrons are sequentially transferred from complex I or complex II to complex III and then to complex IV, protons are translocated from the mitochondrial matrix to intermembrane space creating an electrochemical gradient, which is used as energy to ATP synthesis by ATP synthase. During this transport, electrons can be directly transferred to oxygen to generate superoxide (single-electron transfer) or hydrogen peroxide (pair-electron transfer), mainly at complex I, II and III, which use ubiquinone as acceptor (Brand, 2016). Superoxide remains within the compartment in which is generated, because it is unable to cross membranes. Superoxide is rapidly converted to hydrogen peroxide by the enzyme superoxide dismutase (SOD) (Herrero et al., 2008). Superoxide can also undergo spontaneous dismutation, although at a slower rate (Abreu and Cabelli, 2010). Contrary to superoxide, peroxide can cross membranes and be fully reduced to water by catalases or peroxidases. Alternatively, peroxide can be partially reduced to hydroxyl radical, the most reactive and dangerous radical, a reaction which requires the presence of reduced iron or cupper (Herrero et al., 2008). Hydroxyl radical can also be generated when superoxide reacts with nitric oxide, producing another highly reactive and dangerous radical, nitrogen dioxide (Sheu et al., 2006).

The oxygen consumption rate depends on the organism and its physiological condition. Human body extracts around 2500 calories from food by consuming around one hundred millions molecules of oxygen per cell per minute (Wagner et al., 2011). It is estimated that 0.01 % of all oxygen consumed is converted to ROS in the skeletal muscle during exercise (at rest, this percentage is 10-fold higher); thus, 10^4–10^5 molecules of ROS are formed per cell each minute (Goncalves et al., 2015). In face of these high ROS production rates, which increase the risk of hydroxyl radical formation, against which there is no defense, the cellular antioxidant system is very efficient: i) the proportion between antioxidant enzyme and its substrate is inverted (there is much more catalyst than substrate);

* Corresponding author.
E-mail address: eliscael@iq.ufrj.br (E. Eleutherio).

https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.12.003
1878-6146/© 2017 British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

ii) the rate of the antioxidant enzyme-catalysed reaction is only limited by diffusion (kcat/Km in the order of 10^8–10^9 M^{-1} s^{-1}) (Chelikani et al., 2004; Abreu and Cabelli, 2010).

The efficient and sophisticated antioxidant defense system counteracts and regulates overall ROS levels to maintain physiological homeostasis (Fig 1A). Lowering ROS levels below the homeostatic set point impairs the physiological role of ROS in some cellular processes, such as induction of antioxidant defense, cell proliferation, and host defense. On the other hand, increased ROS levels are also detrimental. ROS are able to damage all the cell building blocks, such as DNA, lipids, and proteins, leading to membrane damage, loss of organelle functions, reduction in metabolic efficiency, chromatid breaks and mutations (Schieber and Chandel, 2014). Fig 1B outlines the impact of ROS levels on cellular physiology.

According to oxidative stress theory of aging, first proposed in 1954, aging is correlated to the accumulation of cellular damages triggered by ROS produced by normal cell metabolism (Harman, 2006). Therefore, throughout the aging process, antioxidants decreased, increasing oxidative damage and, consequently, the chance of disease and death. Oxidative stress has been implicated in the progression of age-related diseases, such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (Barnham et al., 2004b). Several data support the oxidative stress theory of aging (Harman, 2006; Viña et al., 2013). In 2011, a review was published which summarized the main data obtained from different studies that evaluated the oxidative stress indexes in healthy individuals related to age (Del Valle, 2011). In those studies, hundreds of volunteers from diverse nationalities were analyzed, and healthy individuals were divided according to their ages, confirming the oxidative stress theory of aging. However, some studies presented conflicting and contradictory results concerning the level of some antioxidants found in older people. In the last years, genetically modified animals were obtained to test the oxidative stress theory of aging. Some studies found that the overexpression of antioxidant enzymes extends lifespan, corroborating the theory, but other works put it in doubt by showing that increased ROS levels increase longevity (López-Otín et al., 2013; Viña et al., 2013). Taken into consideration the role of ROS in the response to stress condition, which is crucial for cell survival, it is possible to harmonize both interpretations (Reczek and Chandel, 2015). Mild concentrations of ROS are necessary to induce antioxidant defense, increasing cell protection and longevity. However, if the level of ROS exceeds the protective capacity of the antioxidants,

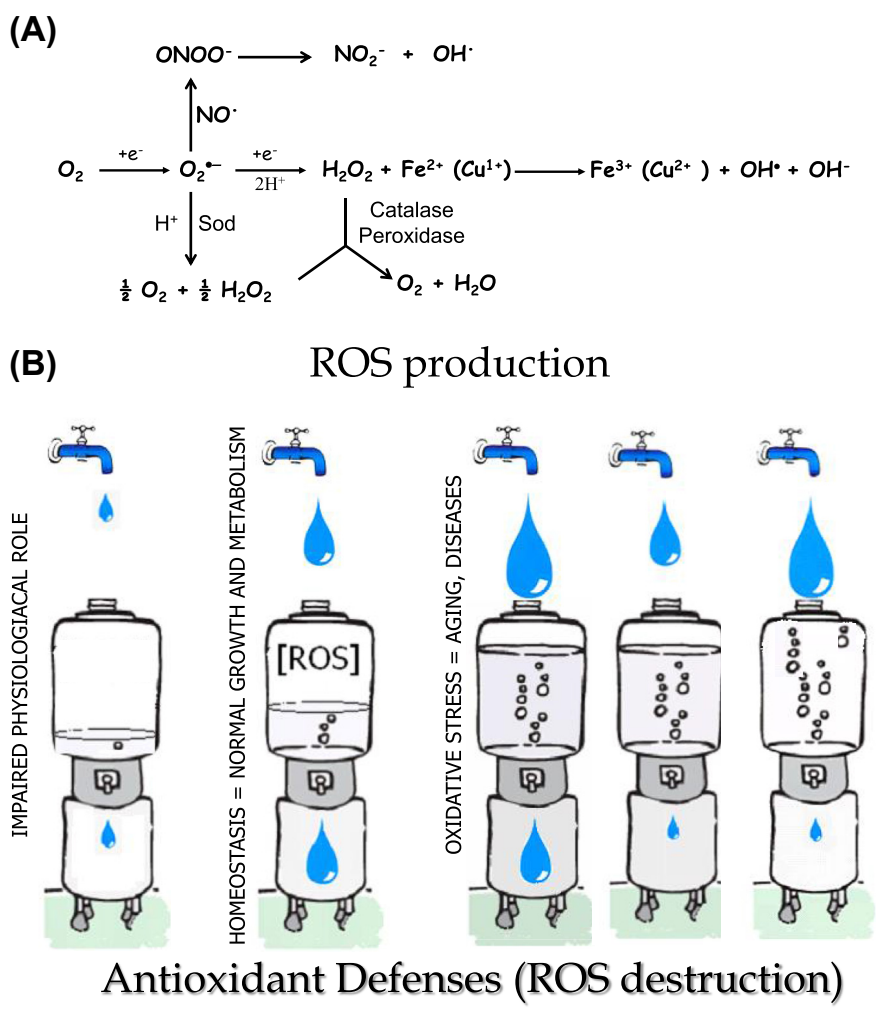


Fig 1. (A) ROS production, as a result of normal metabolism, and antioxidant enzymes that counteract and regulate overall ROS levels to maintain physiological homeostasis. (B) Reduced ROS levels, which can be achieved by a low ROS production (for example, during fermentative metabolism), are detrimental due to impaired physiological process, such as the induction of antioxidant defense system. As a consequence, cells are more sensitive to increased levels of oxidants, accelerating aging and increasing the chances of diseases. On the other hand, increased ROS levels (oxidative stress) are also deleterious. An oxidative stress occurs when the production of ROS overcome the antioxidant defense, which can be achieved by an increase in ROS production, a decrease in the antioxidant activity, or both.

Please cite this article in press as: Eleutherio, E., et al., Oxidative stress and aging: Learning from yeast lessons, Fungal Biology (2018), https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.12.003

oxidative damage will take place, accelerating aging and increasing the chance of diseases.

The molecular mechanisms of the oxidative stress response and the role of ROS in the biology of aging and in the development of age-related diseases have not yet been fully understood. The use of simple models such as the microorganism *Saccharomyces cerevisiae* has helped with the elucidation of these questions. Studies using this yeast have already contributed to the understanding of basic cellular and molecular processes. In 1996, *S. cerevisiae* had its genome fully sequenced and published. Since then, the extensive functional characterization of its genome (around 90 %) along with the huge genetic conservation with humans have triggered a series of new works which humanized the yeast (Khurana and Lindquist, 2010; Engel et al., 2013; Kachroo et al., 2015). Corroborating this evidence is the fact that between 2001 and 2016, five Nobel Prize winners (in Table 1) have used yeast as experimental model. Thus, in addition of being used in ancient biotechnological processes, such as alcoholic fermentation and backing, yeasts are currently explored for the production of therapeutic products, such as human hormones (insulin, insulin analogues, somatotropin, glucagon), vaccines (hepatitis B virus surface antigen and virus-like particles of protein L1 of human papillomavirus), human growth factors (IGF1, NGF, EGF) and human blood proteins (hemoglobin, factors VIII and XIII, antithrombin III, serum albumin albumin) (Ferrer-Miralles et al., 2009).

S. cerevisiae has some interesting characteristics that explain its extensive use as an experimental eukaryotic cell model or as a platform to produce recombinant proteins. Besides being non-pathogenic and classified as GRAS (Generally Recognized as Safe) by Food and Drug Administration (FDA), it has a short generation time (1.5–3 h) and grows in a highly reproducible and genetically stable way. In addition, it is amenable to genetic modifications by recombinant DNA technology or classical genetic manipulations. Other advantages for choosing *S. cerevisiae* as model are: (i) the ease in obtaining mutants from commercial collections of yeast strains for studies of functional genomics, subcellular protein localization, ant protein–protein interaction; (ii) the availability of public databases, such as Saccharomyces Genome Database (SGD), which organize and permanently actualize data obtained from omics studies, such as transcriptomics, proteomics, metabolomics, interactomics (protein–protein interactions), and locasomics (protein localization) (Laurent et al., 2016).

Studies of budding yeast have made immense contributions to our understanding of the aging process and age related-diseases (Kaeberlein, 2010). It is possible to study both chronological and replicative ageing using *S. cerevisiae* (Oliveira et al., 2017). Chronological aging is defined by how long a cell can survive in a non-dividing state. Throughout aging, cellular and molecular damages accumulate. Chronological lifespan is measured by culturing cells in non-proliferating conditions and then determining viability over time. Replicative ageing is defined by the number of daughter cells produced by a mother cell before senescence. Damages are asymmetrically inherited by the mother cell and removed from the daughter cell. Replicative lifespan (RLS) is measured by physical removal of daughter cells, which are easily distinguished from mother cells.

Several pathways involved in degenerative diseases are conserved in yeast, such as protein folding and degradation, autophagy, vesicular trafficking, lysosomal and peroxisomal role, and apoptosis (Tenreiro and Outeiro, 2010). Moreover, 17 % of the *S. cerevisiae* genes (approximately 1000 genes) are members of orthologous genes families associated with several human diseases (Botstein and Fink, 2011).

The oxidative stress response of *S. cerevisiae* is similar to that of mammals, including the sites of ROS formation in the ETC and the main antioxidant enzymes (Herrero et al., 2008). Yeast lacks complex I, but has three rotenone-insensitive NADH-ubiquinone oxidoreductase, Ndi1, Nde1, and Nde2, located at the mitochondrial inner membrane space. Mitochondrial matrix NADH is oxidized by the internal Ndi1, while Nde1 and Nde2, with their active sites facing the mitochondrial intermembrane space, oxide the external NADH. Like complex I of mammals, Nde1 and Nde2 are important sources of ROS in the *S. cerevisiae* ETC (Fang and Beattie, 2003).

By manipulating growth conditions, yeast cells can survive only fermenting or respiring (Kayikci and Nielsen 2015). At high concentrations of glucose (above 70 mM), *S. cerevisiae* can only undergo fermentation; therefore, ROS levels are reduced. As consequence, intracellular antioxidant defense system is repressed and cells are highly sensitive to oxidative stress. However, yeast cells can adapt to severe oxidative stress if exposed to external antioxidants or moderate concentrations of oxidants (Fernandes et al., 2007). Thus, this strategy helps to processes involved with acquisition of tolerance to oxidative stress and its correlation with degenerative processes. In other experimental models, such as mammal cells, which depend on respiration to obtain energy, the correlation ROS-aging is more difficult to analyze.

S. cerevisiae is only able to respire when growing in non-repressor carbon sources, such as glycerol and ethanol. Thus by plating yeast cells in media containing glucose or glycerol, we are able to determine the frequency of respire-deficient mutant cells, known as petite (Mannarino et al., 2008). Petites are unable to respire because they possess some mitochondrial dysfunction, a process highly implicated with degenerative diseases (Barnham et al., 2004a; López-Otín et al., 2013). On the other hand, since

Table 1
Nobel prizes for yeast! Nobel Prizes awarded for Physiology or Medicine and Chemistry which used *S. cerevisiae* as eukaryotic cell model.

Year	Nobel prize in	Laureates	Rationale
1907	Chemistry	E. Buchner	"for his biochemical researches and his discovery of cell-free fermentation".
1929	Chemistry	A. Harden & H. von Euler-Chelpin	"for their investigations on the fermentation of sugar and fermentative enzymes"
1968	Physiology or Medicine	R. Holley, H. Khorana & M. Nirenberg	"for their interpretation of the genetic code and its function in protein synthesis". The first primary structural determination of a tRNA, that of yeast alanine tRNA by R. Holley's group at Cornell University
1999	Physiology or Medicine	G. Blobel	"for the discovery that proteins have intrinsic signals that govern their transport and localization in the cell".
2001	Physiology or Medicine	L. Hartwell, P. Nurse & T.Hunt	Hartwell discovered genes that control the cell cycle in *S. cerevisiae*
2004	Chemistry	A. Ciechanover, A. Hershko & I. Rose	Ciechanover used yeast to elucidate the ubiquitin-mediated protein degradation
2006	Chemistry	R. Kornberg	"for his studies of the molecular basis of eukaryotic transcription".
2009	Physiology or Medicine	E. Blackburn, C. Greider & J. Szostak	Szostak studied the role of telomere elongation in yeast senescence
2013	Physiology or Medicine	J. Rothman, R. Schekman & T. Südhof	Schekman used yeast to study the mechanisms of vesicle traffic
2016	Physiology or Medicine	Y. Ohsumi	"for his discoveries of mechanisms for autophagy".

Please cite this article in press as: Eleutherio, E., et al., Oxidative stress and aging: Learning from yeast lessons, Fungal Biology (2018), https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.12.003

S. cerevisiae is not exclusively dependent on respiration to survive, mutations that result in mitochondrial dysfunction can be investigated in this model organism (De Carvalho et al., 2017).

This review focuses on the contribution of yeast in understanding the binomial oxidative stress-molecular mechanisms involved in age-related pathologies, such as neurodegenerative diseases and cancer.

2. Neurodegenerative diseases

2.1. Cellular processes and aggregation in yeast models

Protein misfolding and aggregation are widely recognized as key features of age-related illness, specifically neurodegenerative diseases (Hartl et al., 2011; Saez and Vilchez, 2014). In recent years, the budding yeast *S. cerevisisae* has provided important general insights for deciphering the basis of neurodegeneration, underlying protein misfolding (Shrestha and Megeney, 2015). Furthermore, yeast models of neurodegeneration have identified cellular factors that modulate aggregation and subsequent toxicity of proteins associated with PD (Outeiro, 2003), AD (Vandebroek et al., 2005; Caine et al., 2007), Huntington's Disease (HD) (Krobitsch and Lindquist, 2000; Willingham, 2003) and ALS (Johnson et al., 2009; Bastow et al., 2016). These proteins include fibrillar α-synuclein (α-Syn), which accumulates in proteinaceous inclusions, known as Lewy bodies observed in familial and sporadic cases of PD (Spillantini et al., 1997). The AD pathological hallmarks include the formation of extracellular plaques structures containing amyloid-β (Aβ) as well as intracellular buildup of neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated tau protein (Fruhmann et al., 2017). Likewise, HD is characterized by the presence of intracellular cytotoxic aggregation of huntingtin protein (Htt) containing polyglutamine (polyQ) expansions (Ross and Poirier, 2004; Novak and Tabrizi, 2010). The accumulation of cytoplasmic aggregates of Cu,Zn-superoxide dismutase (Sod1), the RNA-binding proteins TDP-43 and FUS, has been implicated in ALS affected patients (Rosen et al., 1993; Neumann et al., 2006; Vance et al., 2009). The abnormal structures formed by these different protein species have also been implicated in impairing the proteasomal functionality as well as the expression of proteins involved in proteostasis (Tyedmers et al., 2010; Shrestha and Megeney, 2015). Because the protein misfolding, quality control, and degradation machineries as well as oxidative stress response are remarkably well conversed across eucaryotes (Tenreiro et al., 2013; Oliveira et al., 2017), yeast has emerged as a robust and tractable organism to model proteostasis and oxidative modifications in neurodegenerative diseases.

The mechanisms underlying α-Syn dysfunction in PD as well as in other disorders termed synucleinopathies have been successfully studied in yeast models based on the heterologous expression of human α-Syn (Outeiro, 2003). The first study conducted in yeast models of PD showed that α-Syn toxicity led to the formation of intracellular inclusions and the expression of α-Syn resulted in dose-dependent cytotoxicity (Outeiro, 2003). In this study, the intracellular localization was investigated in yeast cells by expressing the fluorescently labeled wild type (WT) and mutant A53T α-Syn. Both WT and A53T α-Syn were directed to the plasma membrane at lower expression levels, and they were able to accumulate into cytoplasmic inclusions upon increased expression levels. Moreover, α-Syn expression in yeast established dysfunction in several cellular processes promoting lipid accumulation and affecting vesicular trafficking as well as the proteostasis machinery (Outeiro, 2003; Lázaro et al., 2017). Extensive evidences on the involvement of the protein quality control systems, response to mitochondrial damages and regulation of vacuolar transport in neurodegeneration came from studies of mutations in several genes associated with PD (eg. DJ-1, Parkin, Pink1, ATP13A2) as well as using yeast humanized models (Menezes et al., 2015). Hsp31, Hsp32, Hsp33, and Hsp34 are examples of Heat shock proteins highly conserved in yeast which belong to DJ-1 family. It was found that human DJ-1 and the yeast orthologues physically interacted with α-Syn, ameliorating the α-Syn induced toxicity and reducing α-Syn aggregation in yeast cells (Zondler et al., 2014). Human Parkin expressed in yeast has promoted chronological longevity and oxidative stress resistance, which appeared to be dependent on mitochondrial function (Pereira et al., 2015). Yeast models were also used to confirm the relevance of Pink1-dependent phosphorylation of ubiquitin, in the activation of Parkin (Koyano et al., 2014). *YPK9* gene is the yeast orthologue of lysosomal P-type ATPase ATP13A2, and the mutated protein can cause early-onset PD (Gitler et al., 2009). Studies performed in yeast cells showed *YPK9* suppressed the α-Syn toxicity and that this benefit depends on the vacuolar localization and ATPase activity of Vps35. In addition, the enhanced α-Syn toxicity in *vps35*Δ yeast strain corroborated the increase in α-Syn inclusion accumulation in the vacuole (Dhungel et al. 2015).

The uses of AD humanized yeast models have provided powerful new approaches to help understand the molecular mechanisms underlying tau and Aβ toxicity. Using *S. cerevisiae* to study the mechanisms and phenotypical influence of expression of alpha-synuclein as well as the coexpression of protein tau, Zabrocki et al., 2005 showed that both proteins are synergistically toxic in yeast cells, as observed by inhibition of proliferation (Zabrocki et al., 2005). It has been shown that the human phosphorylated Tau-3R and 4R isoforms expressed in yeast assumed a pathological conformation and aggregated (Vandebroek et al., 2005). In addition to post-translational modifications and oligomerization/aggregation, oxidative stress is also involved in AD pathogenesis; however, the interaction between them are still unclear. In yeast, oxidative stress and mitochondrial dysfunction, produced by the addition of Fe^{2+} ions, enhanced human tau aggregation independent of phosphorylation (Vanhelmont et al., 2010). Although Aβ aggregation is associated with the formation of extracellular amyloid plaques in AD patients, Aβ species also accumulate inside the cell, including intracellular multivesicular bodies (Almeida, 2006), lysosomes, or other vesicular compartments (Nixon, 2007; D'Angelo et al., 2013). The creation of the first yeast model to study AD in yeast cells by the expression of GFP-fused Aβ served as an important basis to investigate the toxic effects of Aβ on these cellular processes in yeast cells (Caine et al., 2007). Further, by using a By4741 based yeast system expressing Aβ-link-GFP construct, D'Angelo et al., 2013 established a system in which Aβ enters the secretory pathway and goes to the plasma membrane becoming toxic to the cells (D'Angelo et al., 2013). Using this model, the authors were able to define intracellular traffic pathways as a necessary process for the generation of toxic species in yeast cells.

Yeast models to study HD have recapitulated the polyQ length-dependent aggregation and toxicity by expressing different versions of human Htt protein. Moreover, many other mechanisms involved in the mutant Htt-induced toxicity have been identified from yeast models, such as the modulation of specific molecular chaperones (eg. Hsp104, Sis1 and Ssa1/2), the propagation of endogenous prions, and the autophagic clearance of polyQ protein in yeast (Krobitsch and Lindquist, 2000; Meriin et al., 2002). It has also been successfully established that aggregation of mutant Htt in yeast affects endocytosis, cell cycle progression, proteolysis and mitochondrial function (Meriin et al., 2007; Bocharova et al., 2008; Duennwald and Lindquist, 2008; Tauber et al., 2011; Kochneva-Pervukhova et al., 2012). Recently, the beneficial effect of the protein refolding machinery in inhibiting the aggregation of the mutant Htt 103Q was demonstrated as result of the activation of

Please cite this article in press as: Eleutherio, E., et al., Oxidative stress and aging: Learning from yeast lessons, Fungal Biology (2018), https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.12.003

trehalose synthetic enzyme, trehalose-6-phosphate synthase 1 and Hsp104 in heat shocked *S. cerevisiae* cells (Saleh et al., 2014).

Since oxidative modifications to proteins increase during aging, it had been proposed that oxidation of Sod1 mutants associated to the familial form of ALS (FALS) may trigger their misfolding and aggregation (Dal Vechio et al., 2014; Petrov et al., 2016). By using chronologically aged yeast cells, it was shown that the expression of A4V mutation on human Sod1 as well as the absence of the antioxidant glutathione (GSH) affected human Sod1 activation and increased oxidative damage compared to the WT isoform. This study indicated GSH as a prominent target in the molecular mechanism of FALS during aging (Brasil et al., 2013). In addition, studies using a yeast background to investigate FALS found that pathogenic mutations in TDP-43 protein promote its aggregation and toxicity (Johnson et al., 2009). The inclusions readily formed by TDP-43 protein in yeast models showed similar effects in higher eukaryotic models (Figley and Gitler, 2013) and were structurally identical to aggregates in degenerating neurons of patients with ALS (Johnson et al., 2008). Such studies suggest the yeast model remains an ideal platform to study the cellular processes of several aggregation-prone proteins that characterize neurodegeneration.

2.2. Mitochondrial dysfunction, oxidative biomarkers and antioxidant molecules

A large number of studies demonstrate that mitochondrial dysfunction and oxidative stress are hallmarks of PD (Sharma et al., 2006; Vila et al., 2008; Federico et al., 2012). As mentioned before, the accumulation of α-syn protein is one of the main causes of PD. *In vitro* experiments showed that α-syn reversibly blocks the largest flow channel of metabolites in and out of mitochondria (VDAC), located on the mitochondrial outer membrane (Rostovtseva et al., 2015). The same work, using a yeast model for PD, demonstrated that the α-syn toxicity is VDAC dependent. On the other hand, the autosomal recessive form of PD is associated with mutations in the Parkin protein, an E3 ubiquitin ligase. Parkin and Pink1 are associated with mitochondrial autophagy process in response to stress (Shiba-Fukushima et al., 2017). Pereira et al (2015) used a yeast model to study the human Parkin protein, and noted that Parkin was able to increase the chronological lifespan and resistance to oxidative stress of yeast cells. In response to stress with hydrogen peroxide, the Parkin protein, initially expressed in the cytosol, is translocated to the mitochondria, promoting greater degradation.

In AD, the Aβ accumulates intra and mainly extracellularly, as a result of amyloid precursor protein (APP) cleavage (Deyts et al., 2016). In 2011, a yeast model was created for studying amyloid toxicity, and in order to establish the relationship between Aβ toxicity, endocytosis and risk factors of AD (Treusch et al., 2011). Yeast cells were transfected with a multicopy plasmid containing Aβ1-42 amino acid sequence (driven to the secretory pathway) whose expression was controlled by the galactose-inducible promoter. This construction allowed identification of a series of Aβ toxicity modifiers, involved either in endocytosis or cytoskeleton. Using a similar model, Chen and Petranovic (2015) observed that yeast cells which produce Aβ constitutively, and directed to the secretory pathway, have decreased growth and respiratory rates, increased oxidative stress, and markers of mitochondrial dysfunction. More recently, França et al. (2017) demonstrated that mitochondrial dysfunction and, consequently, ROS increase occurs due to a change in the activities of complexes III and IV in the electron transport chain (ETC). Furthermore, to minimize the increase in intracellular oxidation, a series of cellular responses are triggered. One of these responses was the signaling transmitted to the nucleus to regulate the increase of the expression of enzymes like aconitase (Aco1), catalases (Cta1 and Ctt1) and superoxide dismutases (Sod1 and Sod2). In the mitochondria, Cta1 and Sod2 demonstrated to operate jointly in the maintenance of redox homeostasis and mitochondria integrity.

The Sod1 isoform of superoxide dismutase also plays an important role in ALS. Martins and English (2014) used yeast cells as a model for non-dividing motor neurons and observed that the protein misfolding mechanisms that give rise to sporadic ALS (SALS) are triggered by oxidative damage in the wild-type Sod1. Recently, Bastow et al. (2016) used yeast to demonstrate that the toxic effect of Sod1 instability promotes senescence because it avoids vacuole acidification and impairs metabolic regulation, and not because it is related to loss of mitochondrial function or ROS increase.

Despite the advances made in the research on neurodegenerative disorders, they have no cure and therapeutics needs information about the mechanisms involved in the process, which are still poor elucidated. The neurotoxicity exhibited in a series of disorders is associated with increased levels of oligomers and fibers in the brain. Hence, a number of compounds have been studied in order to find toxicity suppressors by disaggregation and/or oxidative stress reduction, and yeast has proven to be an excellent model for this type of analysis.

Polyphenols represent the most abundant class of antioxidants in the human diet, being widely found in different types of foods. Therefore, in the past several years, a great number of studies have demonstrated their beneficial effects on neurodegenerative disorders such as AD and PD (Moosavi et al., 2016). Recently, a family of 21 polyphenolic compounds, consisting of those found naturally in leaves of salvia, and some of their analogues, were synthesized and subsequently screened for their activity against the Aβ peptide in yeast cells, which found that they were able to revert the toxicity generated by the peptide (Porzoor et al., 2015). The same work observed that 14 of these compounds were able to significantly decrease fluorescence in yeast cells transformed with Aβ fused to GFP. In another work, polyphenols from *Corema Album* leaves were able to reduce the formation of α-syn inclusions, ROS levels, and consequently, cytotoxicity in yeast cells (Macedo et al., 2015).

3. Mitochondrial dysfunction in cancer and yeast cells

Mutations in mtDNA and impairment of mitochondrial function arise as an inevitable consequence of aging and oxidative stress. Mutations in nuclear and mitochondrial genes involved in the oxidative phosphorylation (OXPHOS) were reported to play a significant role in the development of tumorigenesis (Chandra and Singh, 2011), and mitochondrial dysfunction is being considered an important hallmark of cancer cells (Modica-napolitano and Singh, 2004; Rossignol et al., 2009). The damage to mitochondrial function and structure can be caused by ROS generated during respiration. The progressive loss of mitochondria respiratory capacity has been linked to the metabolic and genetic transformation observed in cancer cells (Seyfried, 2015).

Mitochondrial DNA mutations and changes in their content have been increasingly identified in various types of cancer and correlated to malignancy (Chandra and Singh, 2011). Mutations in mtDNA D-loop region have been reported as an independent molecular prognostic indicator in breast cancer (Mantripragada et al., 2008).

mtDNA is small, lacks introns, has a limited DNA repair capability, lacks protective histones and relies on a single control region (D-loop) to control replication and transcription of its genes (Chandra and Singh, 2011). As mitochondrial biomolecules are directly exposed to ROS generated during cell respiration, mitochondria are highly susceptible to oxidative damage. ROS generated during the ETC can damage mitochondrial lipids (e.g., lipid

peroxidation), causing changes in membrane fluidity and permeability; can oxidize proteins, causing loss of function and metabolic burden to the cell; and direct damage mtDNA, which causes progressive defects in the expression of the OXPHOS components coded by mtDNA. ROS damage to mtDNA can also impair the replicative capacity of mtDNA or even interfere with fusion and fission events that are necessary for mitochondrial remodelling. The cumulative generation of ROS progressively damages mitochondrial structure and function; as a consequence, the respiratory capacity of the cell becomes impaired (Van et al., 2003).

Given the importance of mtDNA for the proper expression and constitution of the OXPHOS system, any mutations in its genetic content will have a huge impact on the respiratory capacity of the cell. To keep the energetic level and produce metabolic intermediates to maintain its proper metabolic function the cell must express adaptive responses to mitochondrial dysfunction. These responses include genetic and metabolic adaptations that act to rearrange primary biochemical pathways and intracellular responses to maintain cell viability in the presence of a respiratory dysfunction (Singh, 2004; Seyfried, 2015).

The progressive oxidative damage is a well-known effect of aging, but the specific oxidative damage to mitochondria has been gaining increase attention by the scientific community and is being considered by some authors one of the most important factors in the malignant metabolic transformation of the cell observed in cancers (Seyfried, 2015). *S. cerevisiae* is an interesting model to study cancer as a mitochondrial metabolic disease, because this yeast is able to survive without functional mitochondria and even in the total absence of mtDNA, enabling study about the effects of respiratory impairment on the genomic and metabolic profile of the cell. Yeast cells that contain wild-type mtDNA (referred to as rho^{+}) are able to perform the OXPHOS and metabolize non-fermentable carbon sources. If there are mutations in mtDNA (rho^{-} cell) or a complete loss of mtDNA (rho^{0} cell), the cells are unable to express functional mtDNA-encoded subunits of the ETC and/or OXPHOS, thus they become respiratory-deficient and are unable to metabolize non-fermentable carbon sources (Dirick et al., 2014). These cells, usually referred to as *petite*, because of their small colony size, are only capable of growing on fermentable carbon sources (such as glucose), which are a substrate for glycolysis. The *petite* phenotype can arise as a consequence of mtDNA (cytoplasmic *petite*) or nDNA (nuclear *petite*) mutations that compromise the OXPHOS system. The relative simplicity in identifying and isolating *petite* mutants in *S. cerevisiae* allowed researchers to study the effects of mtDNA depletion and respiratory damage on the metabolic and gene expression profile of the cell (Merz and Westermann, 2009), helping identify fundamental gene-products that are essential for mitochondrial function. The investigation of mitochondrial processes in yeast provided important data for the comprehension of mitochondrial dynamics in human cells (Kuzmenko et al., 2016), mostly because of the similarity between human and yeast mtDNA biochemistry (Smith and Snyder, 2006). For example, the first gene encoding a mtDNA polymerase was discovered in yeast (MIP1) (Foury, 1989).

S. cerevisiae has been used as a model organism to investigate not only mitochondrial dynamics, function and oxidative stress, but also the dynamics of the metabolic adaptation to mitochondrial damage. *S. cerevisiae* studies showed that there is a causal relationship between mtDNA damage and genomic instability in the nucleus (Rasmussen et al., 2003; Doudican et al., 2005). These studies provide important data to support that mitochondrial oxidative damage caused by ROS, associated with respiratory impairment, can cause genomic instability and direct mutations in the nucleus. The question raised by using yeast model in these experiments is whether mitochondrial damage can act as a driver cause in the malignant metabolic and genetic transformation observed in cancer cells. As ROS can damage mitochondria structure over time, could ROS play a central role in cancer development? This issue has been investigated and growing evidence supports direct damage by ROS to mtDNA is important for tumorigenic profile development (Sabharwal and Schumacker, 2014).

To cope with respiratory function impairment caused by progressive loss of mitochondrial function due to oxidative damage, the cell must be able to perform an adaptive response to reorganize cellular metabolism in order to obtain metabolite intermediates in the presence of an impaired TCA, ETC or OXPHOS. The first well characterized pathway that signals mitochondrial dysfunction to the nucleus in order to express and adaptive response was studied in *S. cerevisiae* and is referred to as retrograde pathway (RTG) (Butow and Avadhani, 2004; Da Cunha et al., 2015). Basically, the yeast protein Rtg2p senses variations in homeostatic signals from mitochondria that are related to respiratory dysfunction, which causes a cascade of events that culminates with translocation of the heterodimeric complex Rtg1-Rtg3p to the nucleus and activation of gene expression in response to the mitochondrial dysfunction. Some of the genes controlled by RTG response are required for activation of anaplerotic pathways and glyoxylate cycle, which provides precursors for the biosynthesis of tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediates from acetate, even in the presence of a truncated TCA cycle due to mitochondrial dysfunction (Jazwinski, 2013). The retrograde pathway was also found to play a significant role in extending yeast chronological lifespan (Hashim et al., 2014) and promoting nuclear genome stability (Borghouts et al., 2004). The retrograde pathway is well known and characterized in the yeast model human cells also have a pathway that signals mitochondrial dysfunction and stress signals to the nucleus to express adaptive responses to respiratory impairment. One important effector of this response in human cells is the transcription factor NFκ-B, considered to have evolved from RTG-dependent retrograde pathway (Srinivasan et al., 2010), and is responsible for a wide spectrum of signalling, genetic and metabolic adaptations to stress, organelle dysfunction and aging (Hoesel and Schmid, 2013; Jing and Lee, 2014). Bioinformatics analysis has found a structural homology between mammalian Myc-Max heterodimer and yeast Rtg1-Rtg3 complex, which is responsible for the activation of gene expression in yeast retrograde pathway. The transcription factor c-Myc was found to be activated in human cells upon activation of the retrograde response. NFκ-B has two binding sites for Myc, a transcription factor found to be activated upon retrograde response, suggesting communication of these factors in the retrograde response pathway in human cells (Jazwinski, 2013). RTG pathway in yeast also plays an important role in oxidative response. Mutant cells, with an impaired RTG pathway, decrease in important antioxidant enzymes, such as catalase and glutathione peroxidase, making them more vulnerable to oxidative stress (Da Cunha et al., 2015).

ROS damage to mitochondria gradually increases with aging. As a consequence, the respiratory function of the cell is progressively impaired. In order to cope with the loss of respiratory function, the cell activates a retrograde pathway that signals the mitochondrial damage to the nucleus, activating the expression of a transient metabolic response to allow the cell to deal with the impaired respiration until the mitochondrial damage is repaired by other pathways, such as the mitocheckpoint (Singh et al., 2009). If the mitochondria function is restored, the cell returns to its homeostatic metabolic state. If mitochondria damage is severe and cannot be repaired, the retrograde response is persistent, which leads to a progressive shift in the metabolic profile of the cell and causes genome instability in yeast (Doudican et al., 2005). In human cells, this process culminates with the development of the tumour

Please cite this article in press as: Eleutherio, E., et al., Oxidative stress and aging: Learning from yeast lessons, Fungal Biology (2018), https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.12.003

metabolic profile, resistance to apoptosis, upregulation of oncogenes and nuclear genome instability (Singh, 2004).

S. cerevisiae has a variety of genes that are homologous to the proto-oncogenes of human cells, which allows the use of the yeast model to study how such genes control essential processes in the cell. For example, the glucose-induced repression of oxidative metabolism in yeast, referred to as catabolite repression or Crabtree effect, is regulated by oncogene homologues, such as RAS and SCH9 (Guaragnella et al., 2014). The yeast Crabtree effect and the Warburg effect of cancer cells are similar in terms of the metabolic outcome (Diaz-ruiz et al., 2009; Diaz-Ruiz et al., 2011; Natter and Kohlwein, 2013). In both cell types, there is a downregulation of oxidative metabolism and an enhancement of fermentation, despite the presence of oxygen. These changes cause a rearrangement of the oxidative profile of the cell. While the Warburg effect is considered an irreversible phenotype of cancer cells, *S. cerevisiae* Crabtree effect is a reversible phenotype, as the catabolic repression depends on high glucose concentration. These metabolic similarities indicate that *S. cerevisiae* is a useful model to study cancer cell metabolism and screen for metabolic-targeted drugs for antitumour therapy.

The yeast genes RAS1 and RAS2 are homologous to the RAS proto-oncogenes of the mammalian cells and were the first ones to be implicated in yeast longevity (Tamanoi, 2011). The convergence of the RAS pathway and the RTG pathway, through the regulatory function of Mks1p (Sekito, 2002), controls stress resistance and life span in yeast (Shama et al., 1998; Jazwinski, 1999). The SCH9 gene of *S. cerevisiae* codes for a protein kinase with a catalytic domain, which is very similar to that of the human Akt1, a known oncogene that promotes cellular growth and activates proliferation and survival pathways in cancer (Carpten et al., 2007). Sch9p plays an important role in glucose signalling in yeast (Diaz-Ruiz et al., 2011), regulating the expression of ETC genes (Lavoie and Whiteway, 2008), and is a central component that controls the metabolic shift from TCA cycle and respiration (oxidative metabolism) to Glycolysis (Wei et al., 2009).

In the absence of orthologs, *S. cerevisiae* usually have an analogous pathway, or the human gene can be studied by heterologous expression and the resulting phenotype can be evaluated (Tosato et al., 2012). The well-known p53 protein, which controls some cellular processes related to cellular growth and apoptosis (Farnebo et al., 2010) and is frequently found mutated in cancer cells, does not have a direct homologous in yeast. However, the effect of its expression in yeast can provide relevant information about the role performed by this protein in regulating fundamental cellular processes conserved among yeast and human cells. Yeast has been used to screen for toxic mutations of p53 (Inga and Resnick, 2001; Šmardová et al., 2005), to identify intracellular location and dynamics of this protein (Abdelmoula-Souissi et al., 2011) and even to find functional homologous proteins that are able to metabolically interact with p53 (Facchin et al., 2003).

3.1. Anti-cancer drugs

The causes of cancer are related to point mutations, activation of oncogene, inactivation of tumor suppressors and epigenetic changes (Wiedemann and Morgan, 1992; Gao Guangxun and Chen Liang, 2014). Epigenetic modifications throughout aging lead the cells to cancer transformation, changing essential epigenetics process, such as DNA methylation and histone modifications, which are essential for normal cellular development (Fraga et al., 2007). Growth signaling in *S. cerevisiae* and in higher eukaryotes may impact oxidative stress and age-related diseases, like cancer, stimulating DNA replication stress, which leads to DNA damage and genome instability (Dayan et al., 2017). Targeted therapy is applied in cancer drug design to interfere in a specific site (usually a protein) that plays an important role in tumor growth and progression (Sawyers, 2004).

Chemical genetics is the intervention in biological systems using small molecules, this technique employs protein-bindings, high-throughput screening and phenotypic methods, and have been developed in the pharmaceutical field (Spring, 2005). Chemical genetics will lead to better development of studies in new antitumor drugs (Spring, 2005). Currently, model organisms, with the biochemistry of cancer-like tumor cells, have been used to study the effect and design of new antitumor drugs (Gao Guangxun and Chen Liang, 2014). In this context, *S. cerevisiae* is a widely known and used model organism in the investigation of cellular processes due to yeast conserved genome and cellular biology (Khurana and Lindquist, 2010). The current trend in cancer treatment research is development of drugs with defined molecular targets (Sangmalee et al., 2012).

The antitumor effect of some anticancer drugs is due to the production of ROS (Lu, 2005). β-Lapachone (β-lap) is a known natural products isolated from *Tabebuia impetiginosa* and is a naphthoquinone that holds anticancer activities (Hussain and Green 2017). *S. cerevisiae* was used to investigate the mechanisms by which β-lap acts against cancer. Unlike other quinone drugs, β-lap cannot inactivate enzymes involved in cancer, like topoisomerase II. Toxicity caused by β-lap in yeast cell is mainly due to oxidative and environmental stresses, and it leads to cell death like necrosis process. This compound has already entered in phase I and II clinical trials against cancer (Ramos-Pérez et al., 2014). Quercetin has powerful anticancer effects but presents some limitations like it poor water solubility. However, 3,7-dihydroxy-2-[4-(2-chloro-1,4-naphthoquinone-3-yloxy)-3-hydroxyphenyl]-5-hydroxychromen-4-one (CHNQ) is a quercetin derivative naphthoquinone, which induces ROS production and autophagy in yeast cells. CHNQ can be suggested as chemotherapeutic drug, because it can guide tumor cell to death (Enayat et al., 2016).

S. cerevisiae has been used to investigate drugs that act on DNA topoisomerases, which are important targets of anticancer therapeutics (Harbury et al., 1992; Sangmalee et al., 2012). Topoisomerases can be divided in type I (Top1) and type II (Top2) enzymes. Top1 cleaves a single strand of a DNA double-strand to allow passage of a second strand between the DNA break, which is reattached. Camptothecin is a Top1 inhibitor indicated as a antitumor drug and has been tested in the budding yeast (Nitiss and Wang, 1988; Reid et al., 1998). Top2 is highly conserved, is essential during mitosis, and responsible for cleaving and rejoin duplex DNA (Reid et al., 1998). Top2 enzymes are also important in cell growth and proliferation, with an increased expression. Many drugs have been tested in *S. cerevisiae*. Salvacine is a diterpenoid with a quinone moiety synthetized from a natural product isolated from *Salvia prionitis lance*. When tested in *S. cerevisiae*, Salvacine targeted topoisomerase II, inducing intracellular ROS production and generating double-strand DNA breaks (Lu, 2005). Top2 poisons are drugs capable of increasing breaking complexes top2-DNA, converting the enzyme in a cellular toxin, which leads to cell death (Hammonds et al., 1998; McClendon and Osheroff, 2007). Etoposide, amsacrine, and doxorubicin can inhibit the link of the cleaved strand (Froelich-Ammon and Osheroff, 1995; Hammonds et al., 1998; Van Hille and Hill, 1998). The other Top2 poison activity tested in *S. cerevisiae* include Daunorubicin, Genistein, Actinomycin D, Distamycin A, TOP 53, Cisplatin, Camptothecin, mitoxantrone, Vinorelbine, Cytosine arabinoside, Podophyllotoxin, Epipodophyllotoxin, Colchicine, Suramin, Irinotecan, Azatoxin, Etopophos (Van Hille and Hill, 1998), Ellipticine (Reid et al., 1998; Van Hille and Hill, 1998), and bisdioxopiperazine compounds (Reid et al., 1998; Van Hille and Hill, 1998).

Please cite this article in press as: Eleutherio, E., et al., Oxidative stress and aging: Learning from yeast lessons, Fungal Biology (2018), https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.12.003

Inhibition of histone deacetylase and DNA methyltransferase, using drugs with epigenetic modulating activity, has become a therapeutic target against cancer and aging (Khan et al., 2016). SIR2 encodes an NAD+-dependent histone deacetylase in charge of the hypoacetylated state of histones in chromatin silencing (Imai et al., 2000; Moazed, 2001). In yeast, Sir2p act in transcriptional regulation, cell cycle progression, DNA-damage repair, stress response, and aging (Gartenberg, 2000; Rodriguez and Fraga, 2010). Sirtuins have a high level of conservation of the catalytic domain (Grozinger et al., 2001). Splitomicin inhibits Sir2p activity (Bedalov et al., 2001; Hirao et al., 2003) and can be a drug candidate in other deacetylases for treating cancer. Acetylation or deacetylation leads to a chromatin remodeling, which drives the availability and transcriptional ability of a gene. Mistarget of enzymes can lead to a pathological gene silencing that appears in cancer. Histone deacetylases inhibitors are a promising candidate to desing of new antitumor drugs (Wolffe, 2001). A3 and sirtinol were the most powerful inhibitors of human SIR2 tested in *S. cerevisiae* (Grozinger et al., 2001).

Methylthioadenosine phosphorylase (MTAP), an important enzyme in the methionine salvage pathway, is silenced in a variety of human cancers (Subhi et al., 2003; Kadariya et al., 2011). All human tissues express MTAP, so it is important to investigate compounds that are capable of inhibiting the growth of MTAP deficient cells (Kadariya et al., 2011). *S. cerevisiae* was used to screen compounds that were able to inhibit the growth of cells lacking MTAP, which showed that compounds containing a 1,3,4-thiadiazine ring enhanced growth inhibition in yeast and human cells deleted in MTAP (Kadariya et al., 2011). MTA is a by-product of polyamine metabolism. The limiting enzyme in polyamine synthesis is ornithine decarboxylase (ODC), and overexpression of ODC can be observed in different kinds of cancers (Subhi et al., 2003). 4-methylthio-2-oxobutanoic acid (MTOB), an Intermediary of MTAP pathway, is suggested as a negative regulator of polyamine metabolism, which justifies MTAP as a tumor suppressor (Subhi et al., 2003).

When *S. cerevisiae* does not have direct orthologous with human cells, these genes can be expressed in heterologous form to study their functions and mechanisms (Guaragnella et al., 2014). *S. cerevisiae* has been used to identify PARP inhibitors. Inhibition of PARP1 and PARP2 (Poly(ADP-ribose) polymerases) activity has potential anticancer drug activity (Perkins et al., 2001). These enzymes are activated in oxidative stress (Hocsak et al., 2017) involved in the DNA repair pathways DNA replication and error-repair is a critical component of cancer cell survival (Dziadkowiec et al., 2016). Cells with BRCA-1 and BRCA-2 mutations harbor a defect in homologous repair and seem to be highly vulnerable to the effects of PARP inhibition. Therefore, inhibition of PARP presents a potential anticancer drug activity (Dziadkowiec et al., 2016). *S. cerevisiae* has been used to screen and identify active inhibitors of mammalian PARF in biochemical assay and in yeast cell extracts (Perkins et al., 2001). Thiochromenone and benzothiazinone are new inhibitors that appears to have more selectivity to PARP1; on the other hand, phthalazine seems to be more selective to PARP2 (Perkins et al., 2001). Some available PARF inhibitors are already in phase III trial, and showed antitumor efficacy (Dziadkowiec et al., 2016).

S. cerevisiae can be used to study the mechanism of a drug action. Antitumor drugs that damage DNA are considered to interfere in chromosomal DNA replication; however, the molecular mechanisms are not known (Wang et al., 2001). It was shown in *S. cerevisiae* that Adozelesin, an anticancer drug, blocks replication fork progression and inhibits the activity of replication origin (Wang et al., 2001). Another way to use *S. cerevisiae* is to analyze the cellular mechanism of antitumor drugs resistance. Cisplatin is a famous anticancer drug that forms platinum-DNA adducts (Perez et al., 1998) and induces ROS production by a process independent of DNA damage signaling in *S. cerevisiae* (Marullo et al., 2013). Unfortunately, some patients presents cellular resistance against cisplatin, which limits its therapeutic potential (Perez et al., 1998). Nitrogen permease regulator 2 (NPR2) is a yeast gene responsible for the inhibition of TORC1 activity, by regulating the synthesis and the intake of glutamine as a nitrogen source (Laxman et al., 2014). Cells lacking Npr2 have faster proliferative rate, and these gene is a tumor suppressor (Laxman et al., 2014). Cells with deleted Npr2 are resistant to cisplatin and doxorubicin (Schenk et al., 2003). Ruthenium compounds belong to the most promising candidates of non-platinum metal complexes in cancer therapy, and include KP1019, a promising anticancer drug during cancer treatment. Research in *S. cerevisiae* demonstrated that K1019 targets histone proteins, interacting with histone 3 (H3), with important consequences for DNA damage responses and epigenetics (Singh et al., 2014).

Another way to use *S. cerevisiae* to study anticancer drugs is related to the delivery of nanoparticles (drugs) to tumor cells. Antitumor drugs, mainly composed of small interfering RNA (siRNA) and other nucleic acids, have some problems such as poor solubility and stability, unwanted toxicity, and inability to pass over cell membrane. Therefore, it is important to investigate the delivery of drugs to the target cells (Yoo et al., 2011). The lipid composition in cell membrane of *S. cerevisiae* is quite similar to the composition of mammal membranes (Weisman, 2003; Armstrong, 2010); therefore, the yeast vacuoles are a good system for drug delivery through the mammal membrane to targeted cells or tissues (Gujrati et al., 2016). Gujrat and co-workers, genetically engineered *S. cerevisiae* to produce vacuoles displaying human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-specific antibody. The vacuoles were charged with anticancer doxorubicin and then displayed to cancer cell culture. This system enhanced drug cellular entrance, which improved the drug delivery and avoided tumor growth (Gujrati et al., 2016). Studies in this area are increasing, pointing to *S. cerevisiae* as a potential candidate in nanoparticle delivery development.

4. Human premature aging

In addition to cancer and neurodegenerative disease, *S. cerevisiae* has been used to study human diseases related to aging and oxidative stress, as human premature aging. Progeroid syndromes are classified as monogenic syndrome because they are related to single mutations in genes from the DNA damage repair (mutations in RecQ helicases), Lamin A/C (LMNA) and Nucleotide Excise Repair (NER) (Martin and Oshima, 2000). There are more than ten different syndromes related to progeroid, differentiated mainly by the mutated protein, including Werner (WS) and Bloom's syndromes (BS) (mutations in WRN and BLM, helicases from the RecQ-like DNA helicases family) (Myung et al., 2001) and *Xeroderma pigmentosum* (XP) (mutation in XPG endonuclease) (Moriel-Carretero et al., 2015; Kang et al., 2014).

Some of the characteristics on progeroid syndromes, such as predisposition to cancer in BS and WS and the appearance of neuronal degeneration in XP, as well as the premature aging, are directly linked to genomic instability and defects in the protective mechanisms against oxidative stress (Herrero et al., 2008; Moriel-Carretero et al., 2015). ROS can induce DNA damage as double/single strand break, interstrand cross-link, and genomic instability observed in premature aging phenotypes (Hasty, 2003).

RecQ-like helicases are important, as the nucleotide excision repair (NER) system, to maintain genome integrity, sense DNA damage, and guarantee fork maintains the right replication process

(Yoshimura et al., 2017). Beside this, DNA damage caused by exposition to UV are initially repaired by the NER system (Kang et al., 2014).

To better understand the importance of WRN, BLM and XPG to protect human cells and how mutations can lead to progeroid syndromes, it is fundamental to work with an experimental cell model, which lacks WRN, BLM, and XPG and mimics the disease phenotype. The difficulty to obtain mutant animal cell lines (Aggarwal and Brosh Jr., 2010) and the high degree of conservation of RecQ-like DNA helicases (Mirzaei et al., 2011) are the main reasons why *S. cerevisiae* has become an useful model to study the molecular mechanisms involved in progeroid syndromes (Chen and Brill, 2014).

Sgs1 is the only RecQ-helicase in yeast homologue to human WRN and BLM (Madia et al., 2008). *S. cerevisiae* cells lacking *SGS1* have a short lifespan (Madia et al., 2008). Sgs1 and WRN interact with RPA (single-stranded DNA binding protein) as well as with Top3 (Schmidt et al., 2006; Levens et al., 2016).

The first yeast model to study progeroid syndrome was construct by expressing WRN and BLM in mutant cells *sgs1*. With this model, Aggarwal and Brosh showed that WRN is not able to rescue *sgs1* sensitivity to DNA damage, while BLM rescue the phenotype. This was the first time that an experiment showed that WRN and BLM are human RecQ-helicase with distinct functions (Aggarwal and Brosh, 2009). Beyond the function, using the same mutant, Chen and Brill determinate that the activity of WRN is associated to N-terminus and this helicase has a coiled coil domain (Chen and Brill, 2014). Using a double yeast mutant *sgs1top3*, Aggarwal & Brosh observed for the first time that WRN interact genetically with Top3, because WRN was able to restore phenotype in the double mutant (Aggarwal and Brosh, 2009). Working with combination of different mutation in genes related to DNA damage in mutant yeast cells *sgs1*, followed by expression of WRN, Madia and co-workers showed that WRN suppressed certain phenotypes, which indicates that the human RecQ helicase has some functional similarity to Sgs1(Madia et al., 2008).

To verify the relation between oxidative stress and progeroid syndrome, Madia and co-workers using *S. cerevisiae sgs1* cells showed that these cells treated with hydrogen peroxide had the lower chronological survival than the same mutant, without any kind of oxidative induction. The same was observed with cells treated with menadione. This result confirms that cells that lack Sgs1, in a model that mimics progeroid syndrome, have a rate of cell death higher that in control cell and are more sensitive to oxidative agents, confirmed that RecQ-helicases are essential to protect cells against oxidative stress (Madia et al., 2008).

S. cerevisiae is also useful to study XPG endonuclease, which are related to XS. As in WS and BS, *S. cerevisiae* has a homologue to XPG known as Rad2. The characterization and the role of XPG was only determined after the discovered of Rad2 (Kang et al., 2014). Patients with XS are extremely sensitive to UV; hence, they have high incidence of cancer (mainly skin cancer) (Moriel-Carretero et al., 2015). This was confirmed using yeast cells lacking RAD3 and treated with UV light, finding that these cells are more sensitive than a cell with no mutation. As UV light releases ROS, this also indicated that Rad and XPG are important to protect cells against oxidative stress (Herrera-Moyano et al., 2014).

Although *S. cerevisiae* has shown to be a very useful model to study progeroid syndromes, the literature still lacks works using yeast to better understand these syndromes. However, it is believed that in about ten years more researches will use yeast cell to gain new insight about cancer and aging related disease (Brosh and Bohr, 2007), to development treatment to cure or prevent this disease.

5. Conclusions

Some works have focused on the mechanism by which *S. cerevisiae* acquires tolerance to oxidative stress, which has been linked to diseases, such as cancer, and to the aging process. Because of the universal response to this stress, further insight into the response of *S. cerevisiae* will improve our understanding of human defense mechanisms and, consequently, the necessary foundation for practical applications. Remarkable examples of the utility of this organism for the elucidation of the molecular mechanisms involved in human diseases are the application of fundamental knowledge of cell cycle regulation and autophagy uncovered in yeast towards research in cancer and neurodegenerative diseases. These studies won the medicine Nobel prizes in 2002 and 2016, respectively. *S. cerevisiae* is a very attractive organism to work with, given its tractability, susceptibility to genetic modifications and the high genetic conservation with humans. For studies that aim to investigate the relation between oxidative stress and age-related diseases, the great advantage of *S. cerevisiae,* compared with other experimental models, is its capacity to grow using fermentative or oxidative metabolism. Thus, by shifting cells from the reduced environment of fermentation to a more oxidant condition, it is easy to verify the effect of oxidative stress on the molecular mechanisms of age-related diseases. Researchers have been humanizing yeast by expressing human proteins in yeast or even by humanizing entire pathways. The use of these 'humanized yeast systems' together with the metabolic versatility of this yeast should help identify disease-related cellular events and novel pharmacological agents to interfere with these processes.

Acknowledgements

This review was supported by grants from FAPERJ, CAPES and CNPq. It was also facilitated by grants in support of the International Symposium on Fungal Stress (ISFUS)-2017 meeting from CAPES (PAEP 88887.126652/2017-00) and (FAPEG – 201710267000110).

References

Abdelmoula-Souissi, S., Delahodde, A., Bolotin-Fukuhara, M., Gargouri, A., Mokdad-Gargouri, R., 2011. Cellular localization of human p53 expressed in the yeast Saccharomyces cerevisiae: effect of NLSI deletion. Apoptosis 16, 746–756.

Abreu, I.A., Cabelli, D.E., 2010. Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. Biochim. Biophys. Acta Protein Proteonomics 1804, 263–274.

Aggarwal, M., Brosh, R.M., 2009. WRN helicase defective in the premature aging disorder Werner syndrome genetically interacts with topoisomerase 3 and restores the top3 slow growth phenotype of sgs1 top3. Aging 1, 219–233.

Aggarwal, M., Brosh Jr., R.M., 2010. Genetic studies of human DNA repair proteins using yeast as a model system. JoVE 1–5. https://doi.org/10.3791/1639.

Almeida, C.G., 2006. Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. J. Neurosci. 26, 4277–4288.

Armstrong, J., 2010. Yeast vacuoles: more than a model lysosome. Trends Cell Biol. 20, 580–585.

Barnham, K.J., Masters, C.L., Bush, A.I., 2004a. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. Biomed. Pharmacother. 58, 39–46.

Barnham, K., Masters, C., Bush, A., 2004b. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. Nat. Rev. Drug Discov. 3, 205–214.

Bastow, E.L., Peswani, A.R., Tarrant, D.S.J., Pentland, D.R., Chen, X., Morgan, A., Staniforth, G.L., Tullet, J.M., Rowe, M.L., Howard, M.J., Tuite, M.F., Gourlay, C.W., 2016. New links between SOD1 and metabolic dysfunction from a yeast model of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). J. Cell Sci. 129, 4118–4129.

Bedalov, A., Gatbonton, T., Irvine, W.P., Gottschling, D.E., Simon, J.A., 2001. Identification of a small molecule inhibitor of Sir2p. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 15113–15118.

Bocharova, N.A., Sokolov, S.S., Knorre, D.A., Skulachev, V.P., Severin, F.F., 2008. Unexpected link between anaphase promoting complex and the toxicity of expanded polyglutamines expressed in yeast. Cell Cycle 7, 3943–3946.

Borghouts, C., Benguria, A., Wawryn, J., Jazwinski, S.M., 2004. Rtg2 protein links metabolism and genome stability in yeast longevity. Genetics 166, 765–777.

Botstein, D., Fink, G.R., 2011. Yeast: an experimental organism for 21st century biology. Genetics 189, 695–704.
Brand, M.D., 2016. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. Free Radic. Biol. Med. 100, 14–31.
Brasil, A.A., Belati, A., Mannarino, S.C., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., Pereira, M.D., 2013. The involvement of GSH in the activation of human Sod1 linked to FALS in chronologically aged yeast cells. FEMS Yeast Res. 13, 433–440.
Brosh, R.M., Bohr, V.A., 2007. Human premature aging, DNA repair and RecQ helicases. Nucleic Acids Res. 35, 7527–7544.
Butow, Ronald A., Avadhani, Narayan G., 2004. Mitochondrial signalling: the retrograde response. Mol. Cell 14, 1–15.
Caine, J., Sankovich, S., Antony, H., Waddington, L., Macreadie, P., Varghese, J., Macreadie, I., 2007. Alzheimer's Aβ fused to green fluorescent protein induces growth stress and a heat shock response. FEMS Yeast Res. 7, 1230–1236.
Carpten, J.D., Faber, A.L., Horn, C., Donoho, G.P., Briggs, S.L., Robbins, C.M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T.Y., Savage, S., Uhlik, M., Lin, A., Du, J., Qian, Y., Zeckner, D.J., Tucker-Kellogg, G., Touchman, J., Patel, K., Mousses, S., Bittner, M., Schevitz, R., Lai, M.T., Blanchard, K.L., Thomas, J.E., 2007. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. Nature 448, 439–444.
De Carvalho, M.D.C., De Mesquita, J.F., Eleutherio, E.C.A., 2017. In Vivo characterization of I91T Sod2 polymorphism of Saccharomyces cerevisiae. J. Cell. Biochem. 118, 1078–1086.
Chandra, D., Singh, K.K., 2011. Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer. Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 1807, 620–625.
Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C., 2004. Diversity of structures and properties among catalases. Cell. Mol. Life Sci. 61, 192–208.
Chen, C.-F., Brill, S.J., 2014. Multimerization domains are associated with apparent strand exchange activity in BLM and WRN DNA helicases. DNA Repair 22, 137–146.
Chen, X., Petranovic, D., 2015. Amyloid-ß peptide-induced cytotoxicity and mitochondrial dysfunction in yeast. FEMS Yeast Res. 15, fov061.
Da Cunha, F.M., Torelli, N.Q., Kowaltowski, A.J., 2015. Mitochondrial retrograde signaling: triggers, pathways, and outcomes. Oxidative Med. and Cell. Longev. https://doi.org/10.1155/2015/482582.
Dal Vechio, F.H., Cerqueira, F., Augusto, O., Lopes, R., Demasi, M., 2014. Peptides that activate the 20S proteasome by gate opening increased oxidized protein removal and reduced protein aggregation. Free Radic. Biol. Med. 67, 304–313.
Dayan, I.E., Arga, K.Y., Ulgen, K.O., 2017. Multiomics approach to novel therapeutic targets for cancer and aging-related diseases: role of Sld7 in yeast aging network. OMICS A J. Integr. Biol. 21, 100–113.
Deyts, C., Thinakaran, G., Parent, A.T., 2016. APP Receptor? To Be or not to Be. Trends Pharmacol. Sci. https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.01.005.
Dhungel, N., Eleuteri, S., Li, L bo, Kramer, N.J., Chartron, J.W., Spencer, B., Kosberg, K., Fields, J.A., Stafa, K., Adame, A., Lashuel, H., Frydman, J., Shen, K., Masliah, E., Gitler, A.D., 2015. Parkinson's disease genes VPS35 and EIF4G1 interact genetically and converge on alpha-synuclein. Neuron 85, 76–88.
Diaz-ruiz, R., Uribe-carvajal, S., Devin, A., Rigoulet, M., 2009. Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism. Biochim. Biophys. Acta Rev. Canc. 1796, 252–265.
Diaz-Ruiz, R., Rigoulet, M., Devin, A., 2011. The Warburg and Crabtree effects: on the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 1807, 568–576.
Dirick, L., Bendris, W., Loubiere, V., Gostan, T., Gueydon, E., Schwob, E., 2014. Metabolic and environmental conditions determine nuclear genomic instability in budding yeast lacking mitochondrial DNA. G3 Genes Genomes Genomics 4, 411–423.
Doudican, N.A., Doudican, N.A., Song, B., Song, B., Shadel, G.S., Shadel, G.S., Doetsch, P.W., Doetsch, P.W., 2005. Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability. Society 25, 5196–5204.
Duennwald, M.L., Lindquist, S., 2008. Impaired ERAD and ER stress are early and specific events in polyglutamine toxicity. Genes Dev. 22, 3308–3319.
Dziadkowiec, K.N., Gąsiorowska, E., Nowak-Markwitz, E., Jankowska, A., 2016. PARP inhibitors: review of mechanisms of action and BRCA1/2 mutation targeting. Menopausal Rev. 4, 215–219.
D'Angelo, F., Vignaud, H., Di Martino, J., Salin, B., Devin, A., Cullin, C., Marchal, C., 2013. A yeast model for amyloid- aggregation exemplifies the role of membrane trafficking and PICALM in cytotoxicity. Dis. Mol. Med. 6, 206–216.
Enayat, S., Şeyma Ceyhan, M., Taşkoparan, B., Stefek, M., Banerjee, S., 2016. CHNQ, a novel 2-Chloro-1,4-naphthoquinone derivative of quercetin, induces oxidative stress and autophagy both in vitro and in vivo. Arch. Biochem. Biophys. 596, 84–98.
Engel, S.R., Dietrich, F.S., Fisk, D.G., Binkley, G., Balakrishnan, R., Costanzo, M.C., Dwight, S.S., Hitz, B.C., Karra, K., Nash, R.S., Weng, S., Wong, E.D., Lloyd, P., Skrzypek, M.S., Miyasato, S.R., Simison, M., Cherry, J.M., 2013. The reference genome sequence of Saccharomyces cerevisiae: then and now. G3 Genes Genomes Genomics 4, 389–398.
Facchin, S., Lopreiato, R., Ruzzene, M., Marin, O., Sartori, G., Götz, C., Montenarh, M., Carignani, G., Pinna, L.A., 2003. Functional homology between yeast piD261/Bud32 and human PRPK: both phosphorylate p53 and PRPK partially complements piD261/Bud32 deficiency. FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett. 549, 63–66.
Fang, J., Beattie, D.S., 2003. External alternative NADH dehydrogenase of Saccharomyces cerevisiae: a potential source of superoxide. Free Radic. Biol. Med. 34, 478–488.
Farnebo, M., Bykov, V.J.N., Wiman, K.G., 2010. Biochemical and Biophysical Research Communications the p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. Biochem. Biophys. Res. Commun. 396, 85–89.
Federico, A., Cardaioli, E., Da Pozzo, P., Formichi, P., Gallus, G.N., Radi, E., 2012. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. J. Neurol. Sci. 322, 254–262.
Fernandes, P.N., Mannarino, S.C., Silva, C.G., Pereira, M.D., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., 2007. Oxidative stress response in eukaryotes: effect of glutathione, superoxide dismutase and catalase on adaptation to peroxide and menadione stresses in Saccharomyces cerevisiae. Redox Rep. Commun. Free Radic. Res. 12, 236–244.
Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espín, J., Corchero, J., Vázquez, E., Villaverde, A., 2009. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. Microb. Cell Factories 8, 17.
Figley, M.D., Gitler, A.D., 2013. Yeast genetic screen reveals novel therapeutic strategy for ALS. Rare Dis. 1, e24420.
Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature 408, 239–247.
Foury, F., 1989. Cloning and sequencing of the nuclear gene MIP1 encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. J. Biol. Chem. 264, 20552–20560.
Fraga, M.F., Agrelo, R., Esteller, M., 2007. Cross-talk between aging and cancer: the epigenetic language. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1100, 60–74.
França, M.B., Lima, K.C., Eleutherio, E.C.A., 2017. Oxidative stress and amyloid toxicity: insights from yeast. J. Cell. Biochem. 118, 1442–1452.
Froelich-Ammon, S.J., Osheroff, N., 1995. Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. J. Biol. Chem. 270, 21429–21432.
Fruhmann, G., Seynnaeve, D., Zheng, J., Ven, K., Molenberghs, S., Wilms, T., Liu, B., Winderickx, J., Franssens, V., 2017. Yeast buddies helping to unravel the complexity of neurodegenerative disorders. Mech. Ageing Dev. 161, 288–305.
Gartenberg, M.R., 2000. The Sir proteins of Saccharomyces cerevisiae: mediators of transcriptional silencing and much more. Curr. Opin. Microbiol. 3, 132–137.
Gitler, A.D., Chesi, A., Geddie, M.L., Strathearn, K.E., Hamamichi, S., Hill, K.J., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A., Cooper, A.A., Rochet, J.-C., Lindquist, S., 2009. α-Synuclein is part of a diverse and highly conserved interaction network that includes PARK9 and manganese toxicity. Nat. Genet. 41, 308–315.
Goncalves, R.L.S., Quinlan, C.L., Perevoshchikova, I.V., Hey-Mogensen, M., Brand, M.D., 2015. Sites of superoxide and hydrogen peroxide production by muscle mitochondria assessed ex vivo under conditions mimicking rest and exercise. J. Biol. Chem. 290, 209–227.
Grozinger, C.M., Chao, E.D., Blackwell, H.E., Moazed, D., Schreiber, S.L., 2001. Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. J. Biol. Chem. 276, 38837–38843.
Gao Guangxun, Chen Liang, H.C., 2014. Anti-cancer drug Discovery: update and comparisons in yeast, Drosophila, and Zebrafish. Curr. Mol. Pharmacol. 7, 44–51.
Guaragnella, N., Palermo, V., Galli, A., Moro, L., Mazzoni, C., Giannattasio, S., 2014. The expanding role of yeast in cancer research and diagnosis: insights into the function of the oncosuppressors p53 and BRCA1/2. FEMS Yeast Res. 14, 2–16.
Gujrati, V., Lee, M., Ko, Y.-J., Lee, S., Kim, D., Kim, H., Kang, S., Lee, S., Kim, J., Jeon, H., Kim, S.C., Jun, Y., Jon, S., 2016. Bioengineered yeast-derived vacuoles with enhanced tissue-penetrating ability for targeted cancer therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am. 113, 710–715.
Hammonds, T.R., Maxwell, A., Jenkins, J.R., 1998. Use of a rapid throughput in vivo screen to investigate inhibitors of eukaryotic topoisomerase II enzymes. Antimicrob. Agents Chemother. 42, 889–894.
Harbury, P., Wasserman, R., Wang, J.C., 1992. Amsacrine and etoposide hypersensitivity of yeast cells overexpressing DNA topoisomerase II. Canc. Res. 52, 4467–4472.
Harman, D., 2006. Free radical theory of aging: an update - increasing the functional life span. In: annals of the New York Academy of Sciences, pp. 10–21.
Hartl, F.U., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. Nature 475, 324–332.
Hashim, Z., Mukai, Y., Bamba, T., Fukusaki, E., 2014. Metabolic profiling of retrograde pathway transcription factors Rtg1 and Rtg3 knockout yeast. Metabolites 4, 580–598.
Hasty, P., 2003. Aging and genome maintenance: lessons from the mouse? Science 299, 1355–1359.
Herrera-Moyano, E., Moriel-Carretero, M., Montelone, B.A., Aguilera, A., 2014. The rem mutations in the ATP-binding groove of the Rad3/XPD helicase lead to Xeroderma pigmentosum-cockayne syndrome-like phenotypes. PLoS Genet. 10. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004859.
Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., Cabiscol, E., 2008. Redox control and oxidative stress in yeast cells. Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 1780, 1217–1235.
Van Hille, B., Hill, B.T., 1998. Yeast cells expressing differential levels of human or yeast DNA topoisomerase II: a potent tool for identification and characterization of topoisomerase II-targeting antitumour agents. Canc. Chemother. Pharmacol. 42, 345–356.
Hirao, M., Posakony, J., Nelson, M., Hruby, H., Jung, M., Simon, J.A., Bedalov, A., 2003. Identification of selective inhibitors of NAD+-dependent deacetylases using phenotypic screens in yeast. J. Biol. Chem. 278, 52773–52782.
Hocsak, E., Szabo, V., Kalman, N., Antus, C., Cseh, A., Sumegi, K., Eros, K., Hegedus, Z., Gallyas, F., Sumegi, B., Racz, B., 2017. PARP inhibition protects mitochondria and

reduces ROS production via PARP-1-ATF4-MKP-1-MAPK retrograde pathway. Free Radic. Biol. Med. 108, 770–784.
Hoesel, B., Schmid, J.A., 2013. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. Mol. Canc. 12, 1.
Hussain, H., Green, I.R., 2017. Lapachol and lapachone analogs: a journey of two decades of patent research (1997-2016). Expert Opin. Ther. Pat. 3776, 13543776.2017.1339792.
Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M., Guarente, L., 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. Nature 403, 795–800.
Inga, A., Resnick, M.A., 2001. Novel human p53 mutations that are toxic to yeast can enhance transactivation of specific promoters and reactivate tumor p53 mutants. Oncogene 20, 3409–3419.
Jazwinski, S.M., 1999. The RAS genes: a homeostatic device in Saccharomyces cerevisiae longevity. Neurobiol. Aging 20, 471–478.
Jazwinski, S.M., 2013. The retrograde response: when mitochondrial quality control is not enough. Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res. 1833, 400–409.
Jing, H., Lee, S., 2014. NF-κB in cellular senescence and cancer treatment. Mol. Cell. 37, 189–195.
Johnson, B.S., McCaffery, J.M., Lindquist, S., Gitler, A.D., 2008. A yeast TDP-43 proteinopathy model: exploring the molecular determinants of TDP-43 aggregation and cellular toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am. 105, 6439–6444.
Johnson, B.S., Snead, D., Lee, J.J., McCaffery, J.M., Shorter, J., Gitler, A.D., 2009. TDP-43 is intrinsically aggregation-prone, and amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations accelerate aggregation and increase toxicity. J. Biol. Chem. 284, 20329–20339.
Kachroo, A.H., Laurent, J.M., Yellman, C.M., Meyer, A.G., Wilke, C.O., Marcotte, E.M., 2015. Evolution. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity. Science 348, 921–925.
Kadariya, Y., Tang, B., Myers, C.B., Fukui, J., Peterson, J.R., Kruger, W.D., 2011. Chemical genetic screening for compounds that preferentially inhibit growth of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP)–Deficient Saccharomyces cerevisiae. J. Biomol. Screen 16, 44–52.
Kaeberlein, M., 2010. Lessons on longevity from budding yeast. Nature 464, 513–519.
Kang, M.-S., Yu, S.-L., Kim, H.-Y., Gorospe, C.M., Choi, B.H., Lee, S.H., Lee, S.-K., 2014. Yeast RAD2, a homolog of human XPG, plays a key role in the regulation of the cell cycle and actin dynamics. Biol. Open 3, 29–41.
Kayikci, Ö., Nielsen, J., 2015. Glucose repression in Saccharomyces cerevisiae. FEMS Yeast Res. 15 https://doi.org/10.1093/femsyr/fov068.
Khan, S., Shukla, S., Sinha, S., Meeran, S.M., 2016. Epigenetic targets in cancer and aging: dietary and therapeutic interventions. Expert Opin. Ther. Targets 20, 689–703.
Khurana, V., Lindquist, S., 2010. Modelling neurodegeneration in Saccharomyces cerevisiae: why cook with baker's yeast? Nat. Rev. Neurosci. 11, 436–449.
Kochneva-Pervukhova, N.V., Alexandrov, A.I., Ter-Avanesyan, M.D., 2012. Amyloid-mediated sequestration of essential proteins contributes to mutant huntingtin toxicity in yeast. PLoS One 7.
Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., Endo, T., Fon, E.A., Trempe, J.-F., Saeki, Y., Tanaka, K., Matsuda, N., 2014. Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. Nature 510, 162–168.
Krobitsch, S., Lindquist, S., 2000. Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am. 97, 1589–1594.
Kuzmenko, A., Derbikova, K., Salvatori, R., Tankov, S., 2016. Aim-less translation: loss of Saccharomyces cerevisiae mitochondrial translation initiation factor mIF3/Aim23 leads to unbalanced protein synthesis. Nature Publishing Group, pp. 1–9. https://doi.org/10.1038/srep18749.
Laurent, J.M., Young, J.H., Kachroo, A.H., Marcotte, E.M., 2016. Efforts to make and apply humanized yeast. Briefings Funct. Genom. Proteomics 15, 155–163.
Lavoie, H., Whiteway, M., 2008. Increased respiration in the sch9Delta mutant is required for increasing chronological life span but not replicative life span. Eukaryot. Cell 7, 1127–1135.
Laxman, S., Sutter, B.M., Shi, L., Tu, B.P., 2014. Npr2 inhibits TORC1 to prevent inappropriate utilization of glutamine for biosynthesis of nitrogen-containing metabolites. Sci. Signal. 7. ra120–ra120.
Lázaro, D.F., Pavlou, M.A.S., Outeiro, T.F., 2017. Cellular models as tools for the study of the role of alpha-synuclein in Parkinson's disease. Exp. Neurol. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.05.007.
Levens, D., Baranello, L., Kouzine, F., 2016. Controlling gene expression by DNA mechanics: emerging insights and challenges. Biophys. Rev. 8, 259–268.
López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G., 2013. The hallmarks of aging. Cell 153, 1194–1217.
Lu, H.-R., 2005. Reactive oxygen species elicit apoptosis by concurrently Disrupting topoisomerase II and DNA-dependent protein kinase. Mol. Pharmacol. 68, 983–994.
Macedo, D., Tavares, L., McDougall, G.J., Vicente Miranda, H., Stewart, D., Ferreira, R.B., Tenreiro, S., Outeiro, T.F., Santos, C.N., 2015. (Poly)phenols protect from α-synuclein toxicity by reducing oxidative stress and promoting autophagy. Hum. Mol. Genet. 24, 1717–1732.
Madia, F., Gattazzo, C., Wei, M., Fabrizio, P., Burhans, W.C., Weinberger, M., Galbani, A., Smith, J.R., Nguyen, C., Huey, S., Comai, L., Longo, V.D., 2008. Longevity mutation in SCH9 prevents recombination errors and premature genomic instability in a Werner/Bloom model system. JCB (J. Cell Biol.) 180, 67–81.
Mannarino, S.C., Amorim, M.A., Pereira, M.D., Moradas-Ferreira, P., Panek, A.D., Costa, V., Eleutherio, E.C.A., 2008. Glutathione is necessary to ensure benefits of calorie restriction during ageing in Saccharomyces cerevisiae. Mech. Ageing Dev. 129, 700–705.
Mantripragada, K., Caley, M., Stephens, P., Jones, C., Kluwe, L., Guha, A., Mautner, V., Upadhyaya, M., 2008. Telomerase activity is a biomarker for high grade malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis type 1 individuals. Gene Chromosome Canc. 47, 238–246.
Martin, G.M., Oshima, J., 2000. Lessons from human progeroid syndromes. Nature 408, 263–266.
Martins, D., English, A.M., 2014. SOD1 oxidation and formation of soluble aggregates in yeast: relevance to sporadic ALS development. Redox Biol. 2, 632–639.
Marullo, R., Werner, E., Degtyareva, N., Moore, B., Altavilla, G., Ramalingam, S.S., Doetsch, P.W., 2013. Cisplatin induces a mitochondrial-ros response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. PLoS One 8, 1–15.
McClendon, A.K., Osheroff, N., 2007. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. Mutat. Res. Fund Mol. Mech. Mutagen 623, 83–97.
Menezes, R., Tenreiro, S., Macedo, D., Santos, C., Outeiro, T., 2015. From the baker to the bedside: yeast models of Parkinson's disease. Microbial Cell 2, 262–279.
Meriin, A.B., Zhang, X., He, X., Newnam, G.P., Chernoff, Y.O., Sherman, M.Y., 2002. Huntingtin toxicity in yeast model depends on polyglutamine aggregation mediated by a prion-like protein Rnq1. JCB (J. Cell Biol.) 157, 997–1004.
Meriin, A.B., Zhang, X., Alexandrov, I.M., Salnikova, A.B., Ter-Avanesian, M.D., Chernoff, Y.O., Sherman, M.Y., 2007. Endocytosis machinery is involved in aggregation of proteins with expanded polyglutamine domains. Faseb. J. 21, 1915–1925.
Merz, S., Westermann, B., 2009. Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in Saccharomyces cerevisiae. Genome Biol. 10, R95.
Mirzaei, H., Syed, S., Kennedy, J., Schmidt, K.H., 2011. Sgs1 truncations induce genome rearrangements but suppress detrimental effects of BLM overexpression in Saccharomyces cerevisiae. J. Mol. Biol. 405, 877–891.
Moazed, D., 2001. Enzymatic activities of Sir2 and chromatin silencing. Curr. Opin. Cell Biol. 13, 232–238.
Modica-napolitano, J.S., Singh, K.K., 2004. Mitochondrial dysfunction in cancer. Front Oncol. 4, 755–762.
Moosavi, F., Hosseini, R., Saso, L., Firuzi, O., 2016. Modulation of neurotrophic signaling pathways by polyphenols. Drug Des. Dev. Ther. 10, 23–42.
Moriel-Carretero, M., Herrera-Moyano, E., Aguilera, A., 2015. A unified model for the molecular basis of Xeroderma pigmentosum -Cockayne Syndrome. Rare Dis. 3, e1079362.
Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem. J. 417, 1–13.
Myung, K., Datta, A., Chen, C., Kolodner, R.D., 2001. SGS1, the Saccharomyces cerevisiae homologue of BLM and WRN, suppresses genome instability and homeologous recombination. Nat. Genet. 27, 113–116.
Natter, K., Kohlwein, S.D., 2013. Yeast and cancer cells – common principles in lipid metabolism. Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids 1831, 314–326.
Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., McCluskey, L.F., Miller, B.L., Masliah, E., Mackenzie, I.R., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H.A., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 2006. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Science 314, 130–133.
Nitiss, J., Wang, J.C., 1988. DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am. 85, 7501–7505.
Nixon, R.A., 2007. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. J. Cell Sci. 120, 4081–4091.
Novak, M.J.U., Tabrizi, S.J., 2010. Huntington's disease. BMJ (Clinical research ed.) 340, c3109.
Oliveira, A.V., Vilaça, R., Santos, C.N., Costa, V., Menezes, R., 2017. Exploring the power of yeast to model aging and age-related neurodegenerative disorders. Biogerontology 18, 3–34.
Outeiro, T.F., 2003. Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. Science 302, 1772–1775.
Pereira, C., Costa, V., Martins, L.M., Saraiva, L., 2015. A yeast model of the Parkinson's disease-associated protein Parkin. Exp. Cell Res. 333, 73–79.
Perez, R.P., Mehboobali, N., Iqbal, M.P., Thatcher, N., Crowther, D., Fox, B., 1998. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. Eur. J. Canc. 34, 1535–1542.
Perkins, E., Sun, D., Nguyen, A., Tulac, S., Francesco, M., Tavana, H., Nguyen, H., Tugendreich, S., Barthmaier, P., Couto, J., Yeh, E., Thode, S., Jarnagin, K., Jain, A., Morgans, D., Melese, T., 2001. Novel inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase/PARP1 and PARP2 identified using a cell-based screen in yeast novel inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase/PARP1 and PARP2 identified using a cell-based screen in yeast. Canc. Res. 10, 4175–4183.
Petrov, D., Daura, X., Zagrovic, B., 2016. Effect of oxidative damage on the stability and Dimerization of superoxide dismutase 1. Biophys. J. 110, 1499–1509.
Porzoor, A., Alford, B., Hügel, H., Grando, D., Caine, J., Macreadie, I., 2015. Anti-amyloidogenic properties of some phenolic compounds. Biomolecules 5, 505–527.

Ramos-Pérez, C., Lorenzo-Castrillejo, I., Quevedo, O., García-Luis, J., Matos-Perdomo, E., Medina-Coello, C., Estévez-Braun, A., MacHín, F., 2014. Yeast cytotoxic sensitivity to the antitumour agent ??-lapachone depends mainly on oxidative stress and is largely independent of microtubule- or topoisomerase-mediated DNA damage. Biochem. Pharmacol. 92, 206–219.
Rasmussen, A.K., Chatterjee, A., Rasmussen, L.J., Singh, K.K., 2003. Mitochondria-mediated nuclear mutator phenotype in Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Res. 31, 3909–3917.
Reczek, C.R., Chandel, N.S., 2015. ROS-dependent signal transduction. Curr. Opin. Cell Biol. 33, 8–13.
Reid, R.J.D., Benedetti, P., Bjornsti, M.-A., 1998. Yeast as a model organism for studying the actions of DNA topoisomerase-targeted drugs. Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expr. 1400, 289–300.
Rodriguez, R.M., Fraga, M.F., 2010. Aging and cancer: are sirtuins the link? Future Oncol. 6, 905–915.
Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.-X., Rahmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S.M., Berger, R., Tanzi, R.E., Halperin, J.J., Herzfeldt, B., den Bergh Van, R., Hung, W.-Y., Bird, T., Deng, G., Mulder, D.W., Smyth, C., Laing, N.G., Soriano, E., Pericak–Vance, M.A., Haines, J., Rouleau, G.A., Gusella, J.S., Horvitz, H.R., Brown, R.H., 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 362, 59–62.
Ross, C.A., Poirier, M.A., 2004. Protein aggregation and neurodegenerative disease. Nat. Med. 10, S10–S17.
Rossignol, R., Karbowski, M., Arismendi-Morillo, G., 2009. Electron microscopy morphology of the mitochondrial network in human cancer. Int. J. Biochem. Cell Biol. 41, 2062–2068.
Rostovtseva, T.K., Gurnev, P.A., Protchenko, O., Hoogerheide, D.P., Yap, T.L., Philpott, C.C., Lee, J.C., Bezrukov, S.M., 2015. α-synuclein shows high affinity interaction with voltage-dependent anion channel, suggesting mechanisms of mitochondrial regulation and toxicity in Parkinson disease. J. Biol. Chem. 290, 18467–18477.
Sabharwal, S.S., Schumacker, P.T., 2014. Mitochondrial ROS in cancer. Nature Publish. Group 14, 709–721.
Saez, I., Vilchez, D., 2014. The mechanistic links between proteasome activity, aging and age-related diseases. Curr. Genom. 15, 38–51.
Saleh, A.A., Gune, U.S., Chaudhary, R.K., Turakhiya, A.P., Roy, I., 2014. Roles of Hsp104 and trehalose in solubilisation of mutant huntingtin in heat shocked Saccharomyces cerevisiae cells. Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res. 1843, 746–757.
Sangmalee, S., Laorpaksa, A., Sukrong, S., 2012. A topoisomerase II poison screen of ethnomedicinal Thai plants using a yeast cell-based assay. J. Ethnopharmacol. 142, 432–437.
Sawyers, C., 2004. Targeted cancer therapy. Nature 432, 294–297.
Schenk, P.W., Brok, M., Boersma, A.W.M., Brandsma, J.A., Den Dulk, H., Burger, H., Stoter, G., Brouwer, J., Nooter, K., 2003. Anticancer drug resistance induced by disruption of the Saccharomyces cerevisiae NPR2 gene: a novel component involved in cisplatin- and doxorubicin-provoked cell kill. Mol. Pharmacol. 64, 259–268.
Schieber, M., Chandel, N.S., 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. Curr. Biol. 24, R453–R462.
Schmidt, K.H., Wu, J., Kolodner, R.D., 2006. Control of translocations between highly Diverged genes by Sgs1, the Saccharomyces cerevisiae homolog of the Bloom's syndrome protein. Mol. Cell Biol. 26, 5406–5420.
Sekito, T., 2002. RTG-dependent mitochondria-to-nucleus signaling is regulated by MKS1 and is linked to formation of yeast prion [URE3]. Mol. Biol. Cell 13, 795–804.
Seyfried, T.N., 2015. Cancer as a mitochondrial metabolic disease. Fron. Cell Dev. Biol 3, 1–12.
Shama, S., Kirchman, P.A., Jiang, J.C., Jazwinski, S.M., 1998. Role of RAS2 in recovery from chronic stress: effect on yeast life span. Exp. Cell Res. 245, 368–378.
Sharma, N., Brandis, K.A., Herrera, S.K., Johnson, B.E., Vaidya, T., Shrestha, R., Debburman, S.K., 2006. alpha-Synuclein budding yeast model: toxicity enhanced by impaired proteasome and oxidative stress. J. Mol. Neurosci. MN 28, 161–178.
Sheu, S.S., Nauduri, D., Anders, M.W., 2006. Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis. 1762, 256–265.
Shiba-Fukushima, K., Ishikawa, K.I., Inoshita, T., Izawa, N., Takanashi, M., Sato, S., Onodera, O., Akamatsu, W., Okano, H., Imai, Y., Hattori, N., 2017. Evidence that phosphorylated ubiquitin signaling is involved in the etiology of Parkinson's disease. Hum. Mol. Genet. 26, 3172–3185.
Shrestha, A., Megeney, L.A., 2015. Yeast proteinopathy models: a robust tool for deciphering the basis of neurodegeneration. Microbial Cell 2, 1–8.
Singh, K.K., 2004. Mitochondria damage checkpoint in apoptosis and genome stability. FEMS Yeast Res. 5, 127–132.
Singh, K., Kulawiec, M., Ayyasamy, V., 2009. p53 regulates mtDNA copy number and mitocheckpoint pathway. J. Carcinog. 8, 8.
Singh, V., Kumar, G., Mandal, P., Reddy, M.A., Tomar, R.S., 2014. Anti-cancer drug KP1019 modulates epigenetics and induces DNA damage response in Saccharomyces cerevisiae. FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett. 588, 1044–1052.
Šmardová, J., Šmarda, J., Koptíková, J., 2005. Functional analysis of p53 tumor suppressor in yeast. Differentiation 73, 261–277.
Smith, M.G., Snyder, M., 2006. Yeast as a model for human disease. In: Current Protocols in Human Genetics, pp. 1230–1237.
Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., Goedert, M., 1997. Alpha-synuclein in Lewy bodies. Nature 388, 839–840.
Spring, D.R., 2005. Chemical genetics to chemical genomics: small molecules offer big insights. Chem. Soc. Rev. 34, 472.
Srinivasan, V., Kriete, A., Sacan, A., Michal Jazwinski, S., 2010. Comparing the yeast retrograde response and NF-κB stress responses: implications for aging. Aging Cell 9, 933–941.
Subhi, A.L., Diegelman, P., Porter, C.W., Tang, B., Lu, Z.J., Markham, G.D., Kruger, W.D., 2003. Methylthioadenosine phosphorylase regulates ornithine decarboxylase by production of Downstream metabolites. J. Biol. Chem. 278, 49868–49873.
Tamanoi, F., 2011. Ras signaling in yeast. Genes Canc. 2, 210–215.
Tauber, E., Miller-Fleming, L., Mason, R.P., Kwan, W., Clapp, J., Butler, N.J., Outeiro, T.F., Muchowski, P.J., Giorgini, F., 2011. Functional gene expression profiling in yeast implicates translational dysfunction in mutant huntingtin toxicity. J. Biol. Chem. 286, 410–419.
Tenreiro, S., Outeiro, T.F., 2010. Simple is good: yeast models of neurodegeneration. FEMS Yeast Res. 10, 970–979.
Tenreiro, S., Munder, M.C., Alberti, S., Outeiro, T.F., 2013. Harnessing the power of yeast to unravel the molecular basis of neurodegeneration. J. Neurochem. 127, 438–452.
Tosato, V., Grüning, N.-M., Breitenbach, M., Arnak, R., Ralser, M., Bruschi, C.V., 2012. Warburg effect and translocation-induced genomic instability: two yeast models for cancer cells. Frontiers in Oncol. 2, 212.
Treusch, S., Hamamichi, S., Goodman, J.L., Matlack, K.E.S., Chung, C.Y., Baru, V., Shulman, J.M., Parrado, A., Bevis, B.J., Valastyan, J.S., Han, H., Lindhagen-Persson, M., Reiman, E.M., Evans, D.A., Bennett, D.A., Olofsson, A., DeJager, P.L., Tanzi, R.E., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A., Lindquist, S., 2011. Functional links between a toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. Science 334, 1241–1245.
Tyedmers, J., Mogk, A., Bukau, B., 2010. Cellular strategies for controlling protein aggregation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 777–788.
Del Valle, L.G., 2011. Oxidative stress in aging: theoretical outcomes and clinical evidences in humans. Biomed. Aging Pathol. 1, 1–7.
Van, R.H., Hamilton, M.L., Richardson, A., 2003. Oxidative damage to DNA and aging. Exerc. Sport Sci. Rev. 31, 149–153.
Vance, C., Rogelj, B., Hortobagyi, T., De Vos, K.J., Nishimura, A.L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., Ganesalingam, J., Williams, K.L., Tripathi, V., Al-Saraj, S., Al-Chalabi, A., Leigh, P.N., Blair, I.P., Nicholson, G., de Belleroche, J., Gallo, J.-M., Miller, C.C., Shaw, C.E., 2009. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. Science 323, 1208–1211.
Vandebroek, T., Vanhelmont, T., Terwel, D., Borghgraef, P., Lemaire, K., Snauwaert, J., Wera, S., Van Leuven, F., Winderickx, J., 2005. Identification and isolation of a hyperphosphorylated, conformationally changed intermediate of human protein tau expressed in yeast. Biochem. 44, 11466–11475.
Vanhelmont, T., Vandebroek, T., De Vos, A., Terwel, D., Lemaire, K., Anandhakumar, J., Franssens, V., Swinnen, E., Van Leuven, F., Winderickx, J., 2010. Serine-409 phosphorylation and oxidative damage define aggregation of human protein tau in yeast. FEMS Yeast Res. 10, 992–1005.
Vila, M., Ramonet, D., Perier, C., 2008. Mitochondrial alterations in Parkinson's disease: new clues. J. Neurochem. 107, 317–328.
Viña, J., Borras, C., Abdelaziz, K.M., Garcia-Valles, R., Gomez-Cabrera, M.C., 2013. The free radical theory of aging Revisited: the cell signaling disruption theory of aging. Antioxidants Redox Signal. 19, 779–787.
Wagner, B.A., Venkataraman, S., Buettner, G.R., 2011. The rate of oxygen utilization by cells. Free Radic. Biol. Med. 51, 700–712.
Wang, Y., Beerman, T.A., Kowalski, D., 2001. Antitumor drug adozelesin differentially affects active and silent origins of DNA replication in yeast checkpoint kinase mutants. Canc. Res. 61, 3787–3794.
Wei, M., Fabrizio, P., Madia, F., Hu, J., Ge, H., Li, L.M., Longo, V.D., 2009. Tor1/Sch9-Regulated carbon source substitution is as effective as calorie restriction in life span extension (SK kim, ed,). PLoS Genet. 5, e1000467.
Weisman, L.S., 2003. Yeast vacuole inheritance and dynamics. Annu. Rev. Genet. 37, 435–460.
Wiedemann, L.M., Morgan, G.J., 1992. How are cancer associated genes activated or inactivated? Eur. J. Canc. 28, 248–251.
Willingham, S., 2003. Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or -synuclein. Science 302, 1769–1772.
Wolffe, A.P., 2001. Chromatin remodeling: why it is important in cancer. Oncogene 20, 2988–2990.
Yoo, J.-W., Irvine, D.J., Discher, D.E., Mitragotri, S., 2011. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. Nat. Rev. Drug Discov. 10, 521–535.
Yoshimura, A., Seki, M., Enomoto, T., 2017. The role of WRNIP1 in genome maintenance. Cell Cycle 16, 515–521.
Zabrocki, P., Pellens, K., Vanhelmont, T., Vandebroek, T., Griffioen, G., Wera, S., Van Leuven, F., Winderickx, J., 2005. Characterization of alpha-synuclein aggregation and synergistic toxicity with protein tau in yeast. FEBS J. 272, 1386–1400.
Zondler, L., Miller-Fleming, L., Repici, M., Gonçalves, S., Tenreiro, S., Rosado-Ramos, R., Betzer, C., Straatman, K.R., Jensen, P.H., Giorgini, F., Outeiro, T.F., 2014. DJ-1 interactions with α-synuclein attenuate aggregation and cellular toxicity in models of Parkinson's disease. Cell Death Dis. 5, e1350.

Please cite this article in press as: Eleutherio, E., et al., Oxidative stress and aging: Learning from yeast lessons, Fungal Biology (2018), https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.12.003