

Flávio Romero Palma

**Investigação dos fenótipos e efeitos da expressão da
proteína VAPB humana em *Saccharomyces cerevisiae*
como modelo para Esclerose Lateral Amiotrófica**

Investigation of phenotypes and effects of human VAPB
protein expression in *Saccharomyces cerevisiae* as a model
for Amyotrophic Lateral Sclerosis

São Paulo

2016

Flávio Romero Palma

**Investigação dos fenótipos e efeitos da expressão da
proteína VAPB humana em *Saccharomyces cerevisiae*
como modelo para Esclerose Lateral Amiotrófica**

Investigation of phenotypes and effects of human VAPB
protein expression in *Saccharomyces cerevisiae* as a model
for Amyotrophic Lateral Sclerosis

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Doutor em
Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientador (a): Prof. Dr. Luis Eduardo
Soares Netto

São Paulo

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Palma, Flávio Romero
Investigação dos fenótipos e efeitos da
expressão da proteína VAPB humana em
Saccharomyces cerevisiae como modelo
para Esclerose Lateral Amiotrófica

130 pp

Tese (Doutorado) - Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São Paulo.
Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

1. Esclerose Lateral Amiotrófica 2.
VAPB 3. *Saccharomyces cerevisiae*

Universidade de São Paulo. Instituto
de Biotecnologia. Departamento de
Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto

Orientador

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que participaram da minha trajetória até a obtenção deste título. De modo especial aos meus familiares.

EPÍGRAFE

O novo sempre acontece à revelia da esmagadora força das leis estatísticas e de sua probabilidade que, para fins práticos e cotidianos, equivale à certeza; assim, o novo sempre surge sob o disfarce do milagre.

Hannah Arendt, *The human condition*

AGRADECIMENTOS

À minha família, Telma, Josué, Bruno e Nicole, por todo o suporte. Sem este apoio eu pouco teria realizado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto, pela confiança depositada e pelos ensinamentos e dedicação.

Aos meus grandes amigos Renato Vieira, Rafael Moraes, que me incentivaram e apoiaram a seguir a carreira acadêmica, e Rafael Ruiz, que me ensinou como seguir neste caminho.

Aos amigos do CCP e do CEAC por todo afeto que sempre demonstraram.

Ao amigo Fernando Gomes que, com ideias, mil ajudas e companheirismo, viabilizou este trabalho.

Ao amigo Eduardo Tassoni pela ajuda e momentos divertidos.

À amiga Thaiany Quevedo pelo carinho, amizade, ideias e bons momentos.

Aos amigos Daniel Salgado, Ricardo Carvalho, Luiz Belderrain e Max Fritz, companheiros de todas as horas, que me ajudaram tanto e de tantas maneiras.

Aos amigos do laboratório: Renato, Rogério, Anita, Thiago, Renata, Valesca, Vanessa, Cris, Andressa, Simone, Diogo, César, Júlia, Amanda, Eduardo, Helena, Verônica, Janaína e Erina. A convivência com vocês tornou todo o caminho ao mesmo tempo proveitoso e divertido.

Aos funcionários do Departamento de Genética e do Instituto de Biociências por toda a disponibilidade.

À CAPES e demais agências financiadoras.

A Deus, por ter me dado o maior dos presentes.

ÍNDICE

Lista de Figuras	I
Lista de Tabelas	III
I. INTRODUÇÃO GERAL	01
1. Doença do Neurônio Motor e Esclerose Lateral Amiotrófica.....	01
1.1. Histórico e epidemiologia.....	01
1.2. Fatores genéticos ligados a ELA.....	02
1.3. Mecanismos moleculares alterados em ELA.....	05
2. Metabolismo redox.....	07
2.1. Radicais livres, estresse oxidativo e defesas antioxidantes.....	07
2.2. O estresse oxidativo em ELA.....	09
3. Proteostase celular.....	10
3.1. O sistema ubiquitina-proteassomo (UPS).....	11
3.2. A autofagia.....	13
3.3. <i>Unfolded protein response</i> (UPR).....	14
3.4. Formação de agregados proteicos.....	16
3.5. Estresse do RE e estresse oxidativo.....	17
4. A família das proteínas VAP.....	18
4.1. VAPB e ELA 8.....	20
4.2. Modelos de ELA 8.....	21
5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo para doenças.....	23
II. OBJETIVOS	27
1. Objetivo geral.....	27
2. Objetivos específicos.....	27
III. MATERIAIS E MÉTODOS	28
Parte I. Construção de um modelo de <i>S. cerevisiae</i> para ELA8	29
1. Obtenção das linhagens.....	29
1.1. Clonagem gênica de VAPB ^{WT} e VAPB ^{P56S}	29

1.2. Transformação de <i>E. coli</i>	31
1.3. Fusão das proteínas VAPB à GFP.....	32
1.4. Transformação de <i>S. cerevisiae</i>	32
1.5. Cultivo de pré-inóculo de <i>S. cerevisiae</i>	33
2. Verificação da expressão de VAPB ^{WT} e VAPB ^{P56S}	33
2.1. Extração do RNA total.....	33
2.2. Síntese de cDNA e verificação dos transcritos.....	34
2.3. Extração de proteínas e SDS-PAGE.....	35
2.4. <i>Western blotting</i>	36
3. Localização de VAPB.....	36
3.1. Fracionamento celular.....	37
3.2. Microscopia de fluorescência.....	39
4. Ensaio de sensibilidade e viabilidade.....	40
4.1. Curvas de crescimento.....	40
4.2. Diluição seriada.....	40
4.3. Complementação heteróloga.....	40
Parte II. Avaliação de parâmetros de estado redox em ELA8	41
1. Ensaio de sensibilidade e viabilidade após tratamento com H ₂ O ₂	41
2. Razão GSH/GSSG.....	41
2.1. HPLC com detecção eletroquímica.....	41
2.2. Método da reciclagem enzimática.....	43
3. Medição dos níveis de H ₂ O ₂ em mitocôndrias isoladas.....	44
3.1. Obtenção de mitocôndrias isoladas.....	44
3.2. Medição de H ₂ O ₂ pela oxidação de <i>Amplex Red</i>	45
4. Viabilidade e razão GSH/GSSG após tratamento com N-acetil-L-cisteína.....	46
Parte III. Avaliação da proteostase em ELA8	47
1. Ensaio de sensibilidade e viabilidade após inibição do UPS e autofagia.....	47
2. Análise da degradação proteica (<i>Cycloheximide chase assay</i>).....	47
3. Medição da atividade do proteassomo.....	50
4. Marcação das proteínas ubiquitinadas e das subunidades do proteassomo.....	50
5. Monitoramento da autofagia pela fusão GFP-Atg8.....	51
6. Avaliação da UPR e estresse do RE por <i>splicing</i> alternativo de <i>Hac1</i>	51

7. Análise de marcadores moleculares de estresse do RE por qRT-PCR.....	52
8. Viabilidade após aumento na expressão de Tsa1.....	54
IV. RESULTADOS.....	55
Parte I. Construção de um modelo de <i>S. cerevisiae</i> para ELA8.....	56
1. Clonagem gênica, fusão à GFP e níveis de expressão de VAPB.....	56
2. Localização de VAPB e verificação da formação de agregados.....	59
3. Viabilidade das células expressando VAPB.....	63
4. Complementação heteróloga das linhagens $\Delta Scs2$	64
Parte II. Avaliação de parâmetros de estado redox em ELA8.....	68
1. Sensibilidade e viabilidade após tratamento com H ₂ O ₂	68
2. Razão GSH/GSSG.....	71
3. Medição dos níveis de H ₂ O ₂ em mitocôndrias isoladas.....	74
4. Viabilidade e razão GSH/GSSG após tratamento com N-acetil-L-cisteína.....	75
Parte III. Avaliação da proteostase em ELA8.....	78
1. Ensaio de sensibilidade e viabilidade após inibição do UPS e autofagia.....	78
2. Análise da degradação proteica (<i>Cycloheximide chase assay</i>).....	83
3. Medição da atividade do proteassomo.....	88
4. Marcação das proteínas ubiquitinadas e das subunidades do proteassomo.....	88
5. Monitoramento da autofagia pela fusão GFP-Atg8.....	90
6. Avaliação da UPR e estresse do RE por <i>splicing</i> alternativo de <i>Hac1</i>	91
7. Análise de marcadores moleculares de estresse do RE por qRT-PCR.....	92
8. Viabilidade após aumento na expressão de Tsa1.....	94
V. DISCUSSÃO.....	97
VI. CONCLUSÕES.....	105
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
VIII. ANEXOS.....	123

Anexo I. Sequências dos genes clonados.....	123
Anexo II. Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> e plasmídeos utilizados.....	124
Anexo III. Meios de cultura de microorganismos.....	125
Anexo IV. Anticorpos utilizados.....	126
IX. RESUMO.....	127
X. ABSTRACT.....	129

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01. MECANISMOS MOLECULARES ASSOCIADOS À PATOFISIOLOGIA DE ELA.	6
FIGURA 02. PROTEOSTASE EM EUKARIOTOS	11
FIGURA 03. O ERAD	12
FIGURA 04. OS DIFERENTES TIPOS DE AUTOFAGIA EM <i>S. CEREVISIAE</i>	13
FIGURA 05. A UPR EM LEVEDURAS E EM MAMÍFEROS.....	15
FIGURA 06. ESTRUTURA E CONSERVAÇÃO DA PROTEÍNA VAPB.....	19
FIGURA 07. MECANISMOS E PROCESSOS CELULARES CONSERVADOS EM EUKARIOTOS	24
FIGURA 08. O PLASMÍDEO PYES2.1.....	30
FIGURA 09. FRACIONAMENTO CELULAR.....	38
FIGURA 10. CURVAS DE CALIBRAÇÃO DE GSH E GSSG OBTIDAS POR HPLC-ECD.....	42
FIGURA 11. CROMATOGRAMA OBTIDO POR HPLC-ECD	42
FIGURA 12. SISTEMA GSH-DTNB-GR.....	43
FIGURA 14. CURVA DE CALIBRAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE H ₂ O ₂	45
FIGURA 13. OXIDAÇÃO DO AMPLEX RED™.....	45
FIGURA 15. CURVA DE PRODUÇÃO DE H ₂ O ₂ POR MITOCÔNDRIAS ISOLADAS.....	46
FIGURA 16. ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO PROTEICA.....	49
FIGURA 17. NÍVEIS DE TRANSCRITOS DE <i>VAPB</i> ^{WT} E <i>VAPB</i> ^{P56S} NA LINHAGEM BY4741	57
FIGURA 18. EXPRESSÃO DE <i>VAPB</i> ^{WT} E <i>VAPB</i> ^{P56S} NA LINHAGEM BY4741.....	57
FIGURA 19. TEMPO DE INDUÇÃO ÓTIMO PARA A EXPRESSÃO DE <i>VAPB</i> ^{WT} E <i>VAPB</i> ^{P56S}	58
FIGURA 20. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS FUSIONADAS À GFP NA LINHAGEM BY 4741	58
FIGURA 21. FRACIONAMENTO CELULAR NAS LINHAGENS BY4741 <i>VAPB</i> ^{WT} E BY4741 <i>VAPB</i> ^{P56S}	60
FIGURA 22. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DA LINHAGEM CONTROLE.....	61
FIGURA 23. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DA LINHAGEM EXPRESSANDO GFP- <i>VAPB</i> ^{WT}	62
FIGURA 24. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DA LINHAGEM EXPRESSANDO GFP- <i>VAPB</i> ^{P56S}	62
FIGURA 25. VIABILIDADE DAS LINHAGENS BY4741 EXPRESSANDO <i>VAPB</i> ^{WT} E <i>VAPB</i> ^{P56S}	64
FIGURA 26. EXPRESSÃO DE <i>VAPB</i> ^{WT} E <i>VAPB</i> ^{P56S} NA LINHAGEM Δ Scs2	65
FIGURA 27. VIABILIDADE DAS LINHAGENS Δ Scs2 EXPRESSANDO <i>VAPB</i> ^{WT} E <i>VAPB</i> ^{P56S}	66
FIGURA 28. VIABILIDADE E SENSIBILIDADE DAS LINHAGENS BY4741 EM GLICOSE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE H ₂ O ₂	69
FIGURA 29. VIABILIDADE E SENSIBILIDADE DAS LINHAGENS BY4741 EM GALACTOSE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE H ₂ O ₂	70
FIGURA 30. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA POR HPLC-ECD.....	72
FIGURA 31. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA PELO MÉTODO DE RECICLAGEM ENZIMÁTICA	73
FIGURA 32. COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE DETECÇÃO DE GLUTATIONA	74
FIGURA 33. MARCAÇÃO DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS NAS LINHAGENS BY4741 CONTROLE E BY4741 EXPRESSANDO <i>VAPB</i> ^{WT} OU <i>VAPB</i> ^{P56S}	74
FIGURA 34. PRODUÇÃO DE H ₂ O ₂ EM FRAÇÕES ENRIQUECIDAS DE MITOCÔNDRIA	75
FIGURA 35. VIABILIDADE, SENSIBILIDADE E RAZÃO GSH/GSSG DAS LINHAGENS BY4741 EM GALACTOSE TRATADAS COM NAC.....	76
FIGURA 36. COMPARAÇÃO DA OD ₆₀₀ MÁXIMA ATINGIDA RELATIVA AO CONTROLE NAS LINHAGENS TRATADAS COM NAC.	77
FIGURA 37. EXPRESSÃO DE <i>VAPB</i> ^{WT} E <i>VAPB</i> ^{P56S} NA LINHAGEM Δ PDR5	78
FIGURA 38. VIABILIDADE DAS LINHAGENS Δ PDR5 EXPRESSANDO <i>VAPB</i> ^{WT} E <i>VAPB</i> ^{P56S} APÓS TRATAMENTO COM 80 μ M DE MG132	79
FIGURA 39. EXPRESSÃO DE <i>VAPB</i> ^{WT} E <i>VAPB</i> ^{P56S} NA LINHAGEM Δ ATG8.	80
FIGURA 40. VIABILIDADE DAS LINHAGENS Δ ATG8 EXPRESSANDO <i>VAPB</i> ^{WT} E <i>VAPB</i> ^{P56S}	81
FIGURA 41. VIABILIDADE DAS LINHAGENS Δ PDR5 EXPRESSANDO <i>VAPB</i> ^{WT} E <i>VAPB</i> ^{P56S} APÓS TRATAMENTO COM 80 μ M DE MG132 E 1 μ M DE BAFILOMICINA	82
FIGURA 42. PORCENTAGEM RELATIVA AO CONTROLE DA OD ₆₀₀ MÁXIMA ATINGIDA EM GALACTOSE.....	83
FIGURA 43. DEGRADAÇÃO DE <i>VAPB</i> ^{WT} E <i>VAPB</i> ^{P56S} NA LINHAGEM BY4741	84
FIGURA 44. DEGRADAÇÃO DE <i>VAPB</i> ^{WT} E <i>VAPB</i> ^{P56S} NA LINHAGEM Δ PDR5.....	85
FIGURA 45. DEGRADAÇÃO DE <i>VAPB</i> ^{WT} E <i>VAPB</i> ^{P56S} NA LINHAGEM Δ ATG8	86

FIGURA 46. DEGRADAÇÃO DE VAPB ^{WT} E VAPB ^{P56S} NA LINHAGEM $\Delta PDR5$ COM INIBIÇÃO CONJUNTA DO PROTEASSOMO E AUTOFAGIA	87
FIGURA 47. COMPARAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE VAPB ^{WT} E VAPB ^{P56S}	87
FIGURA 48. MARCAÇÃO DAS PROTEÍNAS UBIQUITINADAS E DAS SUBUNIDADES DO PROTEASSOMO.	89
FIGURA 49. MONITORAMENTO DA AUTOFAGIA EM LINHAGENS EXPRESSANDO VAPB ^{WT} E VAPB ^{P56S}	90
FIGURA 50. NÍVEIS DE TRANSCRITOS DE <i>HAC1</i>	91
FIGURA 51. EXPRESSÃO RELATIVA DE MARCADORES DE ESTRESSE DO RE	93
FIGURA 52. EXPRESSÃO DE TSA1 NAS LINHAGENS BY4741	94
FIGURA 53. VIABILIDADE DAS LINHAGENS BY4741 EXPRESSANDO TSA1.	95
FIGURA 54. EXPRESSÃO DE DÍMEROS DE TSA1 NAS LINHAGENS BY4741.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Doenças do neurônio motor.....	1
Tabela 02. Genes associados a ELA esporádica.....	3
Tabela 03. Genes associados a ELA familiar.....	4
Tabela 04. Expressão de proteínas mutantes associadas à ELA em levedura.....	25
Tabela 05. Reação de amplificação de VAPB ^{WT} e VAPB ^{P56S}	29
Tabela 06. Reação de digestão com enzimas de restrição.....	30
Tabela 07. Reação de ligação entre gene e vetor de expressão.....	31
Tabela 08. Reação de amplificação dos transcritos de VAPB ^{WT} e VAPB ^{P56S}	35
Tabela 09. Reagentes utilizados para a amplificação dos transcritos de <i>Hac1</i>	52
Tabela 10. <i>Primers</i> utilizados para qRT-PCR.....	53
Tabela 11. Linhagens de trabalho I.....	56
Tabela 12. Linhagens de trabalho II.....	65
Tabela 13. Linhagens de trabalho III.....	65
Tabela 14. Atividade do proteassomo.....	88
Tabela 15. Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas.....	124
Tabela 16. Plasmídeos utilizados.....	124
Tabela 17. Anticorpos utilizados.....	126

I. INTRODUÇÃO

1. DOENÇA DO NEURÔNIO MOTOR E ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

1.1. Histórico e epidemiologia

As doenças do neurônio motor (DNM) formam um grupo de enfermidades neurodegenerativas caracterizadas pela perda prioritária de neurônios motores, levando à atrofia muscular progressiva, e cujo diagnóstico ocorre, na maioria das vezes, em fase tardia da progressão da doença (SHETTY *et al.*, 2015). As principais DMNs são a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), a Paralisia Bulbar Progressiva (PBP), Esclerose Lateral Primária (ELP), Atrofia Muscular Progressiva (AMP) e Atrofia Muscular Espinhal (AME) (CHIEIA, 2005). Estas doenças, apesar de apresentarem sintomas semelhantes, afetam diferentes tipos de neurônios motores – neurônios motores superiores (NMS) ou neurônios motores inferiores (NMI) – e possuem características genéticas distintas (**Tabela 01**).

Tabela 01. Doenças do neurônio motor

Doença	Neurônios afetados	Genes associados
ELA	NMS do córtex motor e NMI da medula e tronco cerebral	Mais de 30
PBP	NMI do tronco cerebral	Ausente
ELP	NMS dos braços, pernas e face	Ausente
AMP	NMI	Ausente
AME	NMI	<i>SMN1</i> e <i>SMN2</i>

A ELA é a mais comum DNM. Foi descrita em 1869 pelo neurologista francês Jean-Martin Charcot e, portanto, é também conhecida como Doença de Charcot, ou ainda como Doença de Lou Gehrig (WIJESEKERA & LEIGH, 2009).

A perda dos NMSs do córtex motor e dos NIMs da medula e tronco cerebral leva à fraqueza e atrofia muscular, fasciculações e espasticidade. Os sintomas e sinais surgem quando falham as conexões axonais, isto é, quando o axônio se retrai e ocorre a denervação dos NMI ou do músculo. Inicialmente, esta retração é compensada pela reinervação de axônios dos neurônios mais resistentes ao processo degenerativo. No entanto, com a progressão da doença, este mecanismo compensatório se torna insuficiente. É somente após

esta fase inicial de disfunção e retração axonal que o corpo celular neuronal torna-se visivelmente anormal e morre (ROBBERECHT & PHILIPS, 2013). Neurônios do córtex pré-frontal e do córtex temporal podem ser afetados em diferentes graus, resultando em uma disfunção frontal em muitos pacientes com este transtorno e concomitante demência fronto-temporal (DFT) em cerca de 15% dos pacientes. Esta situação é conhecida como esclerose lateral amiotrófica com a degeneração do lobo fronto-temporal (ELA-DFT) (RINGHOLZ *et al.*, 2005).

A incidência mundial de ELA atinge 1,9/100.000 indivíduos e a prevalência estimada é de 4,48/100.000 indivíduo (CHIÒ *et al.*, 2013). Alguns locais, como a ilha Guam e a Península de Kii no Japão, possuem prevalência de 50 a 100 vezes maior do que em outras partes do mundo (PLATO *et al.*, 2003; KUZUHARA *et al.*, 2001).

A incidência de ELA é maior em homens que em mulheres, com uma relação masculino-feminino geral de 1,5-2 homens para cada mulher afetada. Após a idade de 65 anos, a incidência entre homens e mulheres é igual (ARMON, 2003).

As primeiras manifestações podem ocorrer desde a adolescência até o final da oitava década de vida, mas o pico de aparecimento dos sintomas ocorre aos 55 anos (PASINELLI & BROWN, 2006). A sobrevivência média é de 3-5 anos após o início dos sintomas. No entanto, maior sobrevida não é rara. Cerca de 15% dos pacientes com ELA vivem até 5 anos após o diagnóstico e cerca de 5% sobrevivem por mais de 10 anos (ZALDIFAR *et al.*, 2009).

Não há cura para a ELA até o momento. O Riluzol, um possível antagonista do glutamato, é o único medicamento aprovado para o tratamento de ELA, mas o mecanismo exato de ação do riluzol ainda é incerto (LACOMBLEZ *et al.*, 1996). Seus efeitos prolongam a sobrevivência dos pacientes de ELA de dois a três meses, em média, apresentando, porém, um número considerável de efeitos colaterais adversos (BRYSON *et al.*, 1996).

1.2. Fatores genéticos ligados à ELA

Aproximadamente 90% dos casos de ELA são esporádicos (ELAe) e os 10% restantes são familiares (ELAf). Em ELAe cerca de 10% dos casos foram associados a algum gene, entre eles alguns envolvidos em ELAf (**Tabela 02**). Os 90% restantes possivelmente apresentam fatores ambientais associados (MARANGI & TRAYNOR, 2014). Dados epidemiológicos revelam que alguns dos fatores possivelmente envolvidos em ELAe são o tabagismo (ARMON, 2009), baixa massa corporal e alto condicionamento físico (TURNER,

2013), atividade física vigorosa e esportes de alto impacto (LEHMAN *et al.*, 2012), exposição a pesticidas (KAMEL *et al.*, 2012) e exposição a metais, como o chumbo (KAMEL *et al.*, 2003), manganês (ROOS *et al.*, 2012) e ferro (KWAN *et al.*, 2012).

Tabela 02. Genes associados a ELA esporádica

Gene	Locus	Associado à ELAf
<i>APEXI</i>	14q11.2	Não
<i>HFE</i>	6p22.2	Não
<i>SMN1</i>	5q12.2-5q13.3	Não
<i>SMN2</i>	5q12.2-5q13.3	Não
<i>PON</i>	7q21.3	Não
<i>PRPH</i>	12q13.12	Não
<i>VEGF</i>	6p21	Não
<i>PGRN</i>	17q21.31	Não
<i>SOD1</i>	21q22.1	Sim
<i>FUS</i>	16q11.2	Sim
<i>TARDBP</i>	1p36.22	Sim
<i>C9ORF42</i>	9p21.2	Sim
<i>ATXN2</i>	2q33.2	Sim
<i>CHMP2B</i>	18q21	Sim
<i>NFH</i>	22q12.2	Sim

Nos casos familiares há um padrão mendeliano de herança, sendo majoritariamente autossômicos dominantes (ROBBERECHT & PHILIPS, 2013). Até o momento, os genes já associados em ELAf perfazem cerca de dois terços dos casos familiares, sendo o um terço restante de etiologia ainda desconhecida (RENTON *et al.*, 2014). Os genes associados à ELAf estão apresentados na **Tabela 03**.

Os genes responsáveis pela maioria dos casos de ELAf descritos até o momento são *SOD1*, *FUS*, *TARDBP* e *C9ORF72*, com aproximadamente 20%, 5%, 5% e 50%, respectivamente (ROBBERECHT & PHILIPS, 2013).

A primeira associação entre um gene específico e ELA foi feita por ROSEN *et al.* (1993). O gene em questão, *SOD1*, codifica a enzima Cu/Zn-Superóxido Dismutase, que é responsável pela dismutação do radical ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (CUDKOWICZ *et al.*, 2004). Até o momento, mais de 180 variações alélicas foram descritas no gene *SOD1*, sendo a maioria mutações *missense*, mas havendo também algumas deleções ou inserções (ANDERSEN & AL-CHALABI, 2011). De maneira geral, a mutação D90A é a mais comum, porém diferenças regionais são observadas: na América do Norte a mutação A4V é a mais comum, no Reino Unido a mutação I113T, e no Japão a

mutação H46R (LI & WU, 2016).

Tabela 03. Genes associados a ELA familiar

Tipo	Locus	Gene	Herança	Associação com DFT
ELA 1	21q22.1	<i>SOD1</i>	AD / AR / <i>de novo</i>	Rara
ELA 2	2q33.2	<i>ALS2</i>	AR	Ausente
ELA 3	18q21	Desconhecido	AD	Desconhecido
ELA 4	9q34	<i>SETX</i>	AD	Ausente
ELA 5	15q21.1	<i>SPG11</i>	AR	Rara
ELA 6	16q11.2	<i>FUS</i>	AD / AR / <i>de novo</i>	Rara
ELA 7	20p13	Desconhecido	AD	Desconhecido
ELA 8	20q13.3	<i>VABP</i>	AD	Ausente
ELA 9	14q11.2	<i>ANG</i>	AD	Presente
ELA 10	1p36.22	<i>TARDBP</i>	AD / AR	Presente
ELA 11	6q21	<i>FIG4</i>	AD	Ausente
ELA 12	10p13	<i>OPTN</i>	AD / AR	Presente
ELA 13	12q24	<i>ATXN2</i>	AD	Ausente
ELA 14	9p13	<i>VCP</i>	AD	Presente
ELA 15	Xp11.21	<i>UBQLN2</i>	XD	Presente
ELA 16	9p13.3	<i>SIGMAR1</i>	AD	Rara
ELA 17	3p12.1	<i>CHMP2B</i>	AD	Presente
ELA 18	17p13.2	<i>PFN1</i>	AD	Ausente
ELA 19	2q33.3-q34	<i>ERBB4</i>	AD	Ausente
ELA 20	12q13.1	<i>hnRNPA1</i>	AD	Presente
ELA 21	5q31.3	<i>MATR3</i>	AD	Presente
ELA-DFT	9p21.2	<i>C9ORF72</i>	AD	Presente
ELA	12q24	<i>DAO</i>	AD	Ausente
ELA	2p13	<i>DCTN1</i>	AD	Ausente
ELA	22q12.2	<i>NFH</i>	AD	Ausente

*AD: Autossômica Dominante; AR: Autossômica Recessiva; XD: ligada ao cromossomo X

Mais de 60 mutações no gene *FUS* (*fused in sarcoma*) foram relacionadas à ELA, sendo R521C a mais comum (ANDERSEN & AL-CHALABI, 2011). A proteína FUS está envolvida na transcrição e *splicing* de RNA e apresenta alta homologia com a proteína TDP-43. Esta última, codificada pelo gene *TARDBP*, também está relacionada com o metabolismo de RNA e possui mais de 50 mutações associadas com ELA (LI & WU, 2016), sendo comum a associação com DFT.

Atualmente, a maior parte dos casos de ELAf está associada a expansões massivas do hexanucleotídeo GGGGCC (G4C2) na região não codificante C9ORF72, atingindo cerca de

um terço dos casos de ELAf na América do Norte e Europa (SMITH *et al.*, 2013). Esta alteração está associada com ELA, ELA-FTD e outras DNMs, como AMP e ELP (BOYLAN, 2015), e ainda com outras doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer (MAJOUNIE *et al.*, 2012), Huntington (HENSAMAN *et al.*, 2014) e Parkinson (LESAGE *et al.*, 2013).

As proteínas codificadas por estes genes atuam em diferentes vias moleculares. A via exata que causa a degeneração em ELA permanece desconhecida, mas, como ocorre em outras doenças neurodegenerativas, é provável que haja uma interação complexa entre vários mecanismos patogênicos não mutuamente exclusivos (MANCUSO & NAVARRO, 2015).

1.3. Mecanismos moleculares alterados em ELA

Os genes associados à ELA estão agrupados na **Figura 01** segundo os mecanismos moleculares que estão alterados. Os principais mecanismos descritos até o momento são: estresse oxidativo (BARBER & SHAW, 2010; COPPEDÈ, 2011; CAI *et al.*, 2005; YEN *et al.*, 2004; D'AMICO *et al.*, 2013), processamento de RNA (CHEN *et al.*, 2004; CALINI *et al.*, 2013; VANCE *et al.*, 2009; JOHNSON *et al.*, 2014; GREENWAY *et al.*, 2006; KABASHI *et al.*, 2008; WALSH *et al.*, 2015), excitotoxicidade (MITCHELL *et al.*, 2010), tráfego e sinalização intracelular (KUIJPERS *et al.*, 2013; VILARIÑO-GÜELL *et al.*, 2009; BELZIL *et al.*, 2013; CHOW *et al.*, 2009; RENTON *et al.*, 2012; MARUYAMA *et al.*, 2010; LAI *et al.*, 2009; COX *et al.*, 2010; AL-CHALABI *et al.*, 1999), proteostase e agregação proteica (BARBER & SHAW, 2010; MARUYAMA *et al.*, 2010; DENG *et al.*, 2011; JOHNSON *et al.*, 2010; CHOW *et al.*, 2009; PARKINSON *et al.*, 2006) e disfunção mitocondrial (MUYDERMAN & CHEN, 2014).

O estresse oxidativo pode levar a danos estruturais e afetar a sinalização redox nas células por meio do acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs, respectivamente). Este mecanismo em células de vida longa, como os neurônios, pode ter papel preponderante na morte celular (ROSEN *et al.*, 1993). Proteínas associadas ao metabolismo redox na célula, como SOD1, mostram a importância do estudo das vias redox para o entendimento da patofisiologia de ELA.

O processamento de RNA foi implicado pela primeira vez em degeneração de neurônios motores pela identificação de mutações em *SMNI* como causa de AME (LEFEBRVE *et al.*, 1995). Porém, foi a associação das ribonucleoproteínas TDP-43 e FUS à ELA que elevou a importância do processamento de RNA na patofisiologia da doença (VANCE *et al.*, 2009; KABASHI *et al.*, 2008). Ambas possuem dois domínios de reconhecimento de RNA que, quando mutados, podem afetar o transportes de mRNAs ao longo do axônio, causando,

assim, danos ao neurônio. Alternativamente, a diminuição da expressão nuclear de proteínas poderia interromper vários aspectos do processamento de RNAs, como o *splicing* de pré-mRNAs, a exportação de mRNAs nucleares, o endereçamento de mRNAs para diferentes compartimentos citoplasmáticos e o processamento de RNAs não codificantes (FERRAIUOLO *et al.*, 2011).

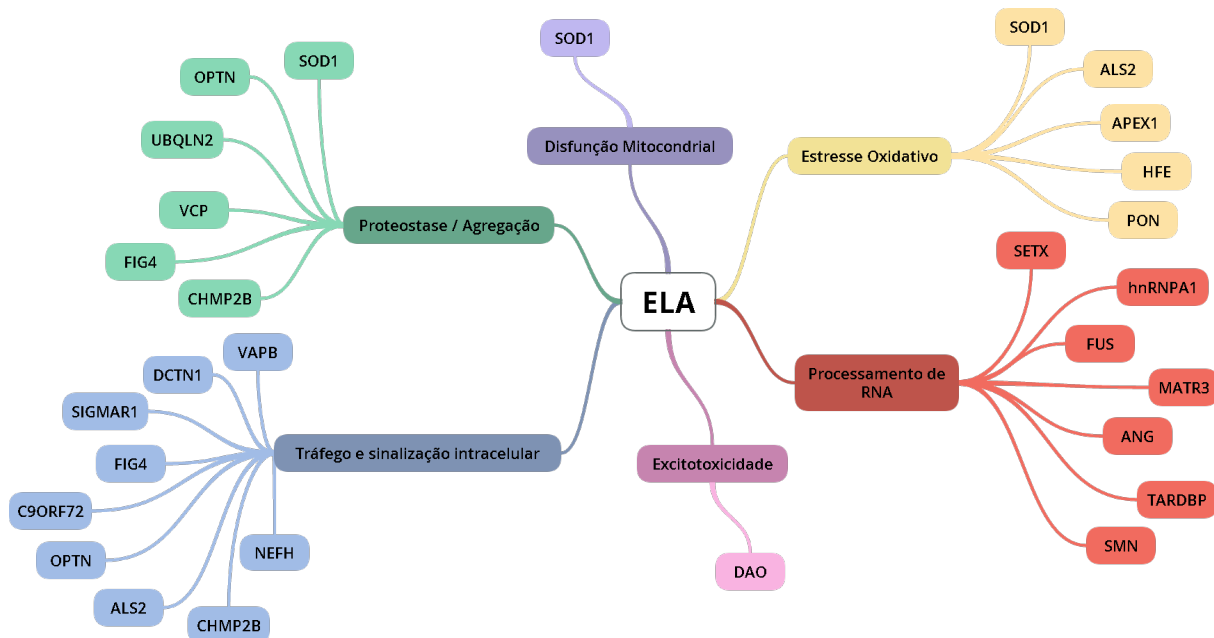


Figura 01. Mecanismos moleculares associados à patofisiologia de ELA (adaptado de COATTI *et al.*, 2015).

A excitotoxicidade é causada pela ativação excessiva dos receptores de glutamato, seja pelo aumento dos níveis sinápticos de glutamato, seja pelo aumento da sensibilidade do neurônio pós-sináptico ao glutamato. Este mecanismo altera a homeostase neuronal e pode provocar lesões do neurônio motor (VAN DAMME *et al.*, 2005). A enzima DAO (d-aminoácido oxidase), responsável pela desaminação oxidativa de d-aminoácidos, como d-serina, é ativadora e co-agonista de NMDA (N-metil d-aspartato) e mutações no gene que codifica DAO estão associadas à ELA (MITCHELL *et al.*, 2010).

Alterações no tráfego intracelular têm sido associadas a vários subtipos genéticos de ELA, como aqueles causados pelas mutações nos genes FIG4, C9ORF72, entre outros. A proteína FIG4, uma fosfatase, controla a abundância celular de fosfatidilinositol 3,5-bifosfato, um lipídeo sinalizador que atua no tráfego retrógrado de vesículas endossomais para o aparelho de Golgi. Mutações em FIG4 são particularmente suscetíveis a estas alterações, uma vez que são dependentes do *turnover* de componentes de membrana (MICHELL & DOVE,

2009). FARG *et al.* (2014) mostraram que em pacientes com expansões na C9ORF72 o tráfego intracelular dependente de proteínas Rab está alterado.

A agregação proteica na forma de inclusões ubiquitinadas é uma característica central em ELA. Várias proteínas, como SOD1, FUS, TDP-43, VCP, entre outras, formam agregados em pacientes com ELA e modelos animais (FERRAIUOLO *et al.*, 2011).

Evidências de disfunção mitocondrial em ELA foram observadas em modelos murinos de SOD1 nos quais esta proteína formava agregados no espaço intermembrana, afetando a importação de proteínas pela membrana mitocondrial externa (VANDE VELDE *et al.*, 2008). Além disso, alterações na morfologia mitocondrial foram observadas em músculo estriado esquelético e neurônios motores de pacientes de ELA (SASAKI & IWATA, 2007).

As causas que levam à morte seletiva dos neurônios motores em ELA são ainda desconhecidas. O tamanho extenso dos prolongamentos dos neurônios motores pode ser um fator relevante, pois mecanismos de tráfego, sinalização, metabolismo energético e regulação da distribuição do RNA mensageiro para a síntese proteica poderiam ser mais afetados por esta característica intrínseca (FERRAIUOLO *et al.*, 2011). Além disso, a maior demanda energética nestas células pode favorecer alterações mitocondriais que aumentam o estresse oxidativo e os níveis de cálcio extracelular (SULLIVAN *et al.*, 2004; PANOV *et al.*, 2011).

2. METABOLISMO REDOX

2.1. Radicais livres, estresse oxidativo e defesas antioxidantes

Radicaes livres são moléculas ou átomos que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, alguns dos quais apresentam propriedade oxidativa (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

As espécies reativas, outro termo bastante usado na área redox, incluem as espécies radicalares livres e outras que, embora não possuam elétrons desemparelhados, são muito reativas em decorrência de sua instabilidade (RIBEIRO *et al.*, 2005).

As espécies radicalares mais comuns são o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila (OH^{\bullet}) e o radical óxido nítrico (NO^{\bullet}). As espécies não radicalares mais comuns incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os hidroperóxidos orgânicos (ROOH), o oxigênio singlete (1O_2) e o peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

Historicamente, o termo estresse oxidativo se refere ao desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNs) e a remoção destas espécies e

reparo dos danos causados por elas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006). JONES (2006), alternativamente, define estresse oxidativo como uma perturbação no controle e na sinalização redox. Esta definição parece mais útil para relacionar processos redox com doenças que representariam um estado patológico menos drástico do que a morte celular.

As espécies reativas reagem com um grande número de moléculas diferentes e podem desencadear a morte celular por diversas vias diferentes ao provocar danos às biomoléculas. Lipídios insaturados são particularmente suscetíveis a danos oxidativos e a peroxidação lipídica, constituindo importantes marcadores de estresse oxidativo. As quatro bases nitrogenadas do DNA também são suscetíveis a danos oxidativos e produtos como a 8-hidroxi-2-desoxiguanina e 8-hidroxi-2-desoxiguanina atuam como marcadores de estresse oxidativo. Para proteínas, eventos de carbonilação e nitrotirosinação são importantes e geram produtos específicos detectáveis (BARNHAM *et al.*, 2004).

As EROs são produzidas por uma série de vias diferentes. As principais fontes endógenas são a degradação de ácidos graxos nos peroxissomos, os mecanismos de detoxificação pelo citocromo P-450, o processo de fagocitose e, principalmente, a cadeia transportadora de elétrons. Durante a respiração mitocondrial, a cadeia transportadora de elétrons cria um fluxo de elétrons através da cadeia respiratória. Este fluxo estabelece um gradiente de prótons, através da membrana mitocondrial interna, que é usado como uma fonte de energia para a síntese de ATP. Os elétrons são extraídos a partir de substratos reduzidos e são transferidos para o oxigênio molecular (O_2) através de uma cadeia de complexos enzimáticos (I a IV). No passo final da cadeia transportadora de elétrons, citocromo c oxidase (complexo IV) garante a redução completa de O_2 à água sem a formação de radicais de oxigênio. No entanto, pode ocorrer a redução parcial de O_2 e a geração do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (BALABAN *et al.*, 2005). Estima-se que 0,1% a 0,5% do oxigênio consumido na mitocôndria são apenas parcialmente reduzidos formando, em consequência, $O_2^{\cdot-}$ (BAYNE *et al.*, 2005). Este radical pode ser subsequentemente dismutado a H_2O_2 e O_2 pela enzima Cu/Zn-SOD1 no espaço intermembrana ou pela enzima Mn-SOD2 na matriz mitocondrial. Sendo assim, grande parte do H_2O_2 produzido intracelularmente é subproduto da respiração celular.

As células podem se defender contra os danos provocados por EROs por meio da utilização de mecanismos específicos que podem ser enzimáticos ou não-enzimáticos (BONNEFOY *et al.*, 2002). Dentre as enzimas que atuam no metabolismo redox temos a SOD, a glutatona peroxidase (GPx), a catalase, as peroxirredoxinas (Prxs), entre outras.

Os antioxidantes não-enzimáticos incluem o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol

(vitamina E), a glutatona, a N-acetil-L-cisteína, entre outros (BORELLA & VARELA, 2004). Estas moléculas atuam prioritariamente como agentes quelantes de metais, como bloqueadores de peroxidação ou componentes de ciclos de óxido-redução (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2001).

A glutatona é o tiol celular mais abundante e é um dos principais agentes protetores contra a ação de EROs e ERNs. Ela atua por meio da redução destas espécies de forma não-enzimática ou por ação conjunta com a enzima glutatona peroxidase. Com a redução das espécies reativas, há a formação de glutatona dissulfeto, GSSG, que, por sua vez, pode ser reduzida a GSH pela ação da enzima glutatona redutase (GR) com elétrons provenientes de NADPH (DICKINSON & FORMAN, 2002). Além disso, a conjugação de GSH com compostos eletrofilicos, mediada pela glutatona-S-transferase (GST), e subsequente eliminação destes conjugados, também protegem as células de subprodutos tóxicos do metabolismo (DRINGEN, 2000). Quando o estado redox de uma célula é alterado, ocorre um aumento na demanda de GSH e maior formação de GSSG. O esgotamento de GSH resultante deste processo é atenuado pela síntese *de novo* desta molécula. Assim, os níveis de GSH e GSSG celular comumente vêm sendo usados como indicadores do estado redox na célula (GRIFFITH, 1999). É necessário, porém, ter em conta que a razão GSH/GSSG e outros sistemas tiol/dissulfeto, como a razão tioredoxina reduzida/tiorredoxina oxidada (-SH₂/-SS-) e a razão cisteína/cistina (Cys/CySS), não estão sempre em equilíbrio redox e podem, portanto, funcionar como pontos-chave de sinalização em processos redox-dependentes (JONES, 2006; HANSEN *et al.*, 2006).

A N-acetil-L-cisteína (NAC) é um aminoácido que atua como antioxidante diretamente, substituindo o papel de redutor que a glutatona possui, ou indiretamente, por ser um de seus precursores ao disponibilizar resíduos de cisteína. O seu uso têm sido avaliado como potencial agente na atenuação do estresse oxidativo em diferentes enfermidades (LI *et al.*, 2016; NAZIROĞLU *et al.*, 2014; UNNITHAN *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2013).

2.2. O estresse oxidativo em ELA

Diversos estudos evidenciam o estresse oxidativo como um dos possíveis mecanismos envolvidos na morte de neurônios motores em ELA. Marcadores de estresse oxidativo têm sido repetidamente encontrados em pacientes de ELAe, o que indica relevância para a questão (D'AMICO *et al.*, 2013).

O interesse nos mecanismos de estresse oxidativo em ELAf surge a partir da

associação de ELA1 com a enzima Cu/Zn-SOD1, uma vez que esta enzima possui um papel importante como defesa antioxidante. Foi inicialmente sugerido que as mutações em SOD1 levariam ao fenótipo por **(1)** uma perda de função da proteína, o que levaria ao aumento dos níveis de $O_2^{\cdot-}$, que, por sua vez, ao reagir com outras moléculas poderia produzir espécies ainda mais reativas; **(2)** por um mecanismo dominante-negativo em que a proteína mutante SOD1 é não só inativa, mas também inibe a função da proteína selvagem; ou **(3)** pelo aumento da atividade de SOD1, que levaria a maior produção de H_2O_2 e OH^{\cdot} . (BARBER *et al.*, 2006). Hoje, porém, a hipótese de um ganho de função tóxica associada a um efeito dominante negativo parece ser mais aceita.

Em outros casos familiares, o estresse oxidativo tem recebido atenção e parece desempenhar um papel importante na patologia. Por exemplo, a expressão da proteína VCP mutante (ELA14) em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y as torna sensíveis ao estresse oxidativo induzido por tratamento com L-butionina sulfoximina, um inibidor da síntese de glutatona (HIRANO *et al.*, 2014).

A expressão de TDP-43 mutante (ELA10) leva a um aumento nos marcadores de estresse oxidativo, apoptose e necrose em levedura (BRAUN *et al.*, 2011) e ao aumento de carbonilação de proteínas e dos níveis de glutatona-S-transferase em *Drosophila melanogaster* (ZHAN *et al.*, 2015).

Em pacientes com ELA1, ELA6 e ELA 10 a proteína PDI1 colocaliza com SOD1, FUS e TDP-43, respectivamente, sendo esta proteína um marcador de estresse do retículo, UPR e estresse oxidativo, uma vez que está envolvida no enovelamento proteico (ATKIN *et al.*, 2008; HONJO *et al.*, 2011; FARG *et al.*, 2012; WALKER *et al.*, 2013). Além disso, PDI colocaliza com inclusões formadas por VAPB (ELA8) em um modelo de *Drosophila* (TSUDA *et al.*, 2008).

3. PROTEOSTASE CELULAR

A proteostase celular é mantida por um sistema complexo de vias e mecanismos que coordenam síntese, enovelamento, desagregação e degradação de proteínas (POWERS *et al.*, 2009).

Grande parte das proteínas sintetizadas por uma célula eucariótica ocorre em ribossomos aderidos à membrana do RE. O correto enovelamento de proteínas no RE é monitorado por mecanismos de controle de qualidade de proteínas do RE, denominados coletivamente como ERQC (*ER Quality Control*). As proteínas que passam pelos critérios de

transporte do ERQC são destinadas para as vias secretórias, mas quando a funcionalidade de uma proteína mal-enovelada ou em agregação não pode ser restaurada, aumentando a sua propensão para formar grandes agregados, diversas chaperonas ajudam a direcionar essa proteína para vias de degradação. Se, ainda assim a concentração dessas proteínas potencialmente tóxicas à célula aumenta, vias compensatórias são induzidas (VEMBAR & BRODSKY, 2008). Uma dessas vias é a UPR (*Unfolded protein response*) (SCHRÖDER, 2008), que envolve a ativação transcricional de vários genes, sendo evolutivamente conservada desde leveduras até mamíferos (MORI, 2009). Os dois principais mecanismos de degradação são o sistema ubiquitina-proteassomo (UPS) e a autofagia (LABBADIA & MORIMOTO, 2015). Os principais mecanismos estão resumidos na **Figura 02**.

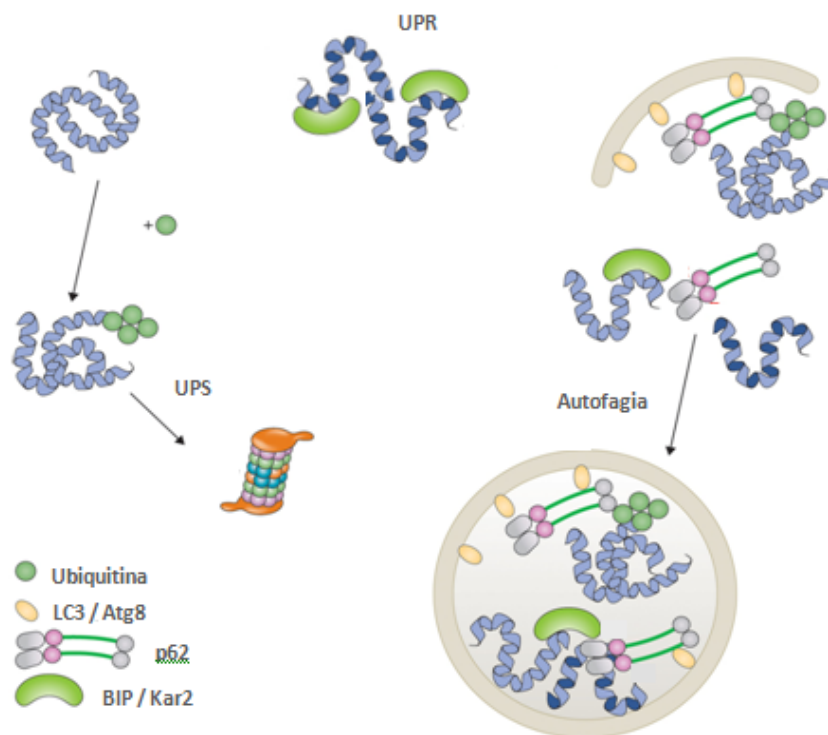


Figura 02. Proteostase em eucariotos (adaptado de MARTENS & BACHMAIR, 2015). O proteassomo degrada proteínas individualmente e a via canônica depende de marcação específica com o peptídeo ubiquitina. A autofagia é capaz de degradar agregados e proteínas que não podem ser degradadas pelo proteassomo. A UPR associa ambos os mecanismos e regula vias de apoptose.

3.1. O sistema ubiquitina-proteassomo (UPS)

A degradação via UPS depende de marcação específica com ubiquitina, um polipeptídeo de 76 aminoácidos altamente conservado. A ligação covalente da ubiquitina com o substrato a ser degradado ocorre através de um mecanismo em cascata de três passos.

Primeiramente a ubiquitina é ligada a um resíduo de cisteína de uma enzima E1 ativadora de ubiquitina em uma reação dependente de ATP. Após esta ligação, a ubiquitina ativada é transferida para uma enzima E2 conjugadora de ubiquitina. Finalmente, a ubiquitina é ligada por um resíduo de lisina à proteína a ser marcada direta ou indiretamente por uma enzima E3 ligase de ubiquitina. A ubiquitina pode se ligar ao substrato de várias maneiras, gerando um amplo repertório de sinais com diferentes topologias e comprimentos que podem ser encaminhados para vias diversas. A marcação para degradação via proteassomo é composta por, pelo menos, quatro ubiquitinas ligadas entre si através do resíduo de lisina (K48) (CHAU *et al.*, 1989).

O proteassomo é uma protease complexa formada por duas subunidades distintas que possuem componentes e funções diferentes. A subunidade 19S tem função regulatória e reconhece substratos ubiquitinados, remove suas cadeias de ubiquitina, promove o seu desdobramento e o encaminha para a degradação na subunidade catalítica, o 20S (FINLEY, 2009).

Apesar de possuir localização citosólica e nuclear, o proteassomo está associado ao ERAD (“*Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*”), um mecanismo de degradação associado ao RE. As proteínas mal-enoveladas formadas no RE são reconhecidas por um dos dois complexos do ERAD, Doa10 ou Hrd1, translocadas para o citoplasma, ubiquitinadas pela E3 ligase correspondente e encaminhadas para o proteassomo (Figura 03) (NAKATSUKASA *et al.*, 2014).

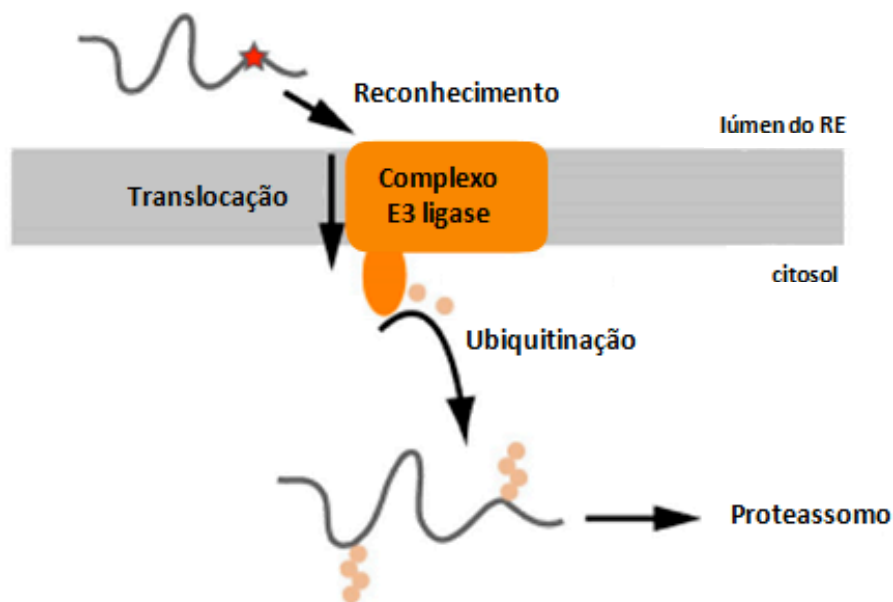


Figura 03. O ERAD (adaptado de RUGGIANO *et al.*, 2014).

3.2. A autofagia

Embora o proteassomo seja o mecanismo mais comum de degradação de proteínas no citosol da célula, limitações biofísicas da subunidade 20S do proteassomo não permitem a degradação de grandes complexos de proteínas mal-enoveladas (FINLEY, 2009). Alternativamente, esses substratos são direcionados para o lisossomo, que contém uma série de proteases não específicas que podem degradar uma ampla gama de substratos (YANG & KLIONSKY, 2010). Este processo, denominado autofagia, possui três formas distintas: a microautofagia, a macroautofagia e a autofagia mediada por chaperonas, esta última descrita apenas em mamíferos (LABBADIA & MORIMOTO, 2015). A **Figura 04** sumariza os tipos de autofagia presentes em leveduras.

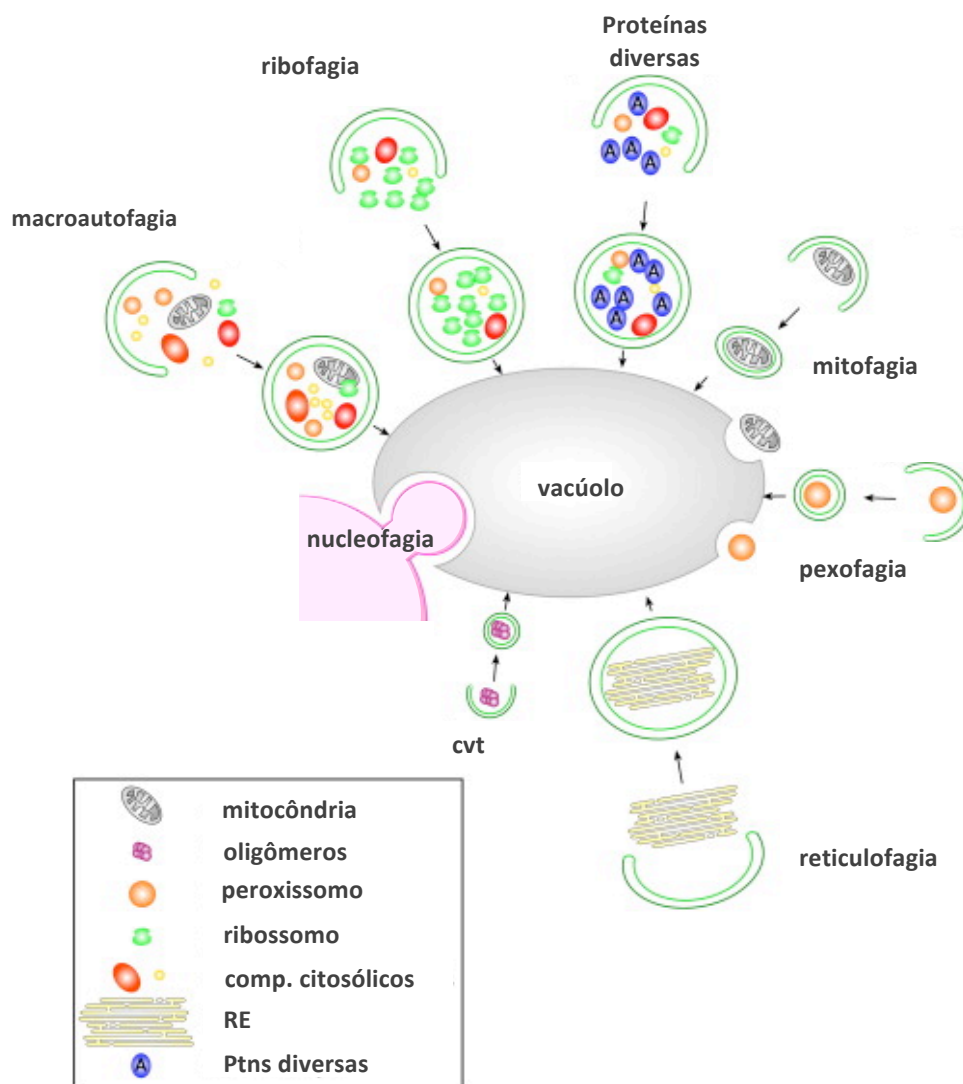


Figura 04. Os diferentes tipos de autofagia em *S. cerevisiae* (adaptado de KRAFT *et al.*, 2009).

A microautofagia ocorre quando há necessidade do *turnover* de mitocôndrias (DEFFIEU *et al.*, 2009), de partes do núcleo (KRICK *et al.*, 2008), de peroxissomos (DUNN *et al.*, 2005), do RE (CEBOLLERO *et al.*, 2012) e outras organelas. O componente a ser eliminado é recrutado e sequestrado diretamente pelas membranas vacuolares e, por invaginação, entregue ao lúmen vacuolar, onde será degradado.

A macroautofagia é a forma mais bem estudada de autofagia e implica o sequestro de organelas ou regiões do citoplasma em uma estrutura vesicular de membrana dupla, o autofagossomo. Este autofagossomo é, então, transportado para o vacúolo onde, após fusão com este, disponibiliza o substrato para a degradação (YANG & KLIONSKY, 2010).

A autofagia é um processo dinâmico que depende de um número grande de proteínas e possui regulação ainda pouco conhecida. Um dos componentes mais importantes no processo autofágico é Atg8. Esta proteína é uma *ubiquitin-like protein* que sofre ação proteolítica da protease Atg4. A partir desta ação, ocorre a exposição de um resíduo de glicina que pode se ligar covalentemente à fosfatidiletanolamina, formando o complexo Atg8-PE. Este é, então, incluído nas membranas do autofagossomo em formação (NAKATOGAWA *et al.*, 2009). Atg8-PE forma uma capa na superfície dos autofagossomos impedindo a fusão prematura destes com o vacúolo. Atg8-PE é removido em um evento que antecede a fusão do autofagossomo com o vacúolo por meio de uma segunda clivagem mediada por Atg4 (KLIONSKY, 2005).

3.3. *Unfolded protein response (UPR)*

O acúmulo de proteínas mal-enoveladas no RE leva à UPR. Em situações de estresse prolongado e da inabilidade da célula em reverter este estresse, ocorre a indução de apoptose (SCHRÖDER, 2008). Diferentes condições celulares podem levar a este acúmulo de proteínas mal-enoveladas, como a grande demanda de secreção de proteínas (GASS *et al.*, 2002; LIPSON *et al.*, 2006), infecções virais (ISLER *et al.*, 2005), privação de nutrientes e oxigênio (LEE, 1992; FELDMAN *et al.*, 2005) e expressão de proteínas mutantes (BARTOSZEWSKI *et al.*, 2008; ITO & SUZUKI, 2009). A **Figura 05** compara a UPR em levedura e em mamíferos.

Em levedura, a UPR é ativada pela via de Ire1 (OIKAWA *et al.*, 2009). Esta proteína transmembrana é codificada pelo gene *Ire1* e funciona como serina/treonina quinase e endoribonuclease (SIDRAUSKI & WALTER, 1997). Quando há acúmulo de proteínas mal-enoveladas no RE, a chaperona Kar2, outro componente da UPR em leveduras, se dissocia de

Ire1 e se liga a estas proteínas. Uma vez livre, Ire1 forma oligômeros, se autofosforila e ganha atividade RNase, promovendo, então, o *splicing* alternativo de *Hac1* mRNA. *Hac1* codifica um fator de transcrição com um domínio zíper de leucina, Hac1p, que, por sua vez, induz a expressão de genes ativados pela UPR, como aqueles que codificam chaperonas, componentes do ERAD e fatores pró-apoptóticos (NIKAWA *et al.*, 1996).

Em mamíferos, além de IRE1 – IRE1 α em mamíferos – outras duas proteínas estão envolvidas na sinalização e ativação da UPR: a PERK e a ATF6. Quando há proteínas mal-enoveladas no RE, as proteínas BIP (homólogo de Kar2) se dissociam de IRE1, ATF6 e PERK em um processo semelhante ao que ocorre em leveduras (SZEGEZDI *et al.*, 2006).

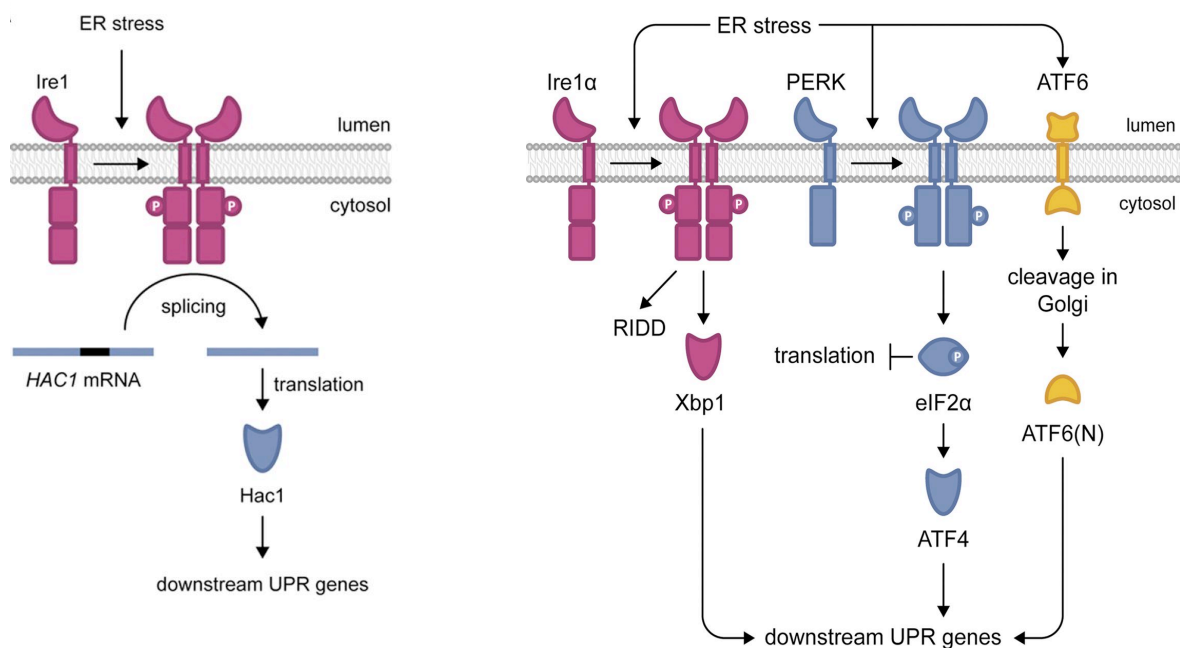


Figura 05. A UPR em leveduras e em mamíferos (adaptado de WU *et al.*, 2014).

Com a dissociação de BIP, PERK sofre uma mudança conformacional que promove sua dimerização e autotransfosforilação (HARDING *et al.*, 2000). Uma vez fosforilada, PERK promove a fosforilação do fator de iniciação da tradução eIF2 α que, por sua vez, atenua o processo de tradução global de proteínas, por impedir que eIF2B recicle o complexo eIF2, mantendo-o na forma ligada à GTP (HARDING *et al.*, 1999). Embora a fosforilação de eIF2 α atenua a tradução global, ela é capaz de promover a tradução seletiva de vários mRNAs, dentre eles ATF4 (RON, 2002). Este fator de transcrição é translocado para o núcleo e induz a expressão de genes responsivos a estresse, biossíntese e transporte de aminoácidos e apoptose (HARDING *et al.*, 2003; MA *et al.*, 2002).

A proteína ATF6, após dissociação de BIP, sofre uma mudança conformacional, seguida da translocação para o Complexo de Golgi (HAZE *et al.*, 1999). Uma vez nessa organela, ATF6 é clivada em ATF6 α e ATF6 β , que são translocados para o núcleo. Estes fatores regulam a expressão de elementos responsivos ao estresse no RE como chaperonas e a transcrição de *XBPI* (YOSHIDA *et al.*, 2001).

A proteína IRE1, ao se dissociar de BIP, sofre dimerização e promove o *splicing* alternativo de *XBPI*. Uma vez no núcleo, a forma processada de XBPI controla a transcrição de chaperonas, genes envolvidos na degradação de proteínas e o inibidor de PERK, P58^{IPK} (SZEGEZDI *et al.*, 2006).

A ação conjunta destas três proteínas durante a UPR controla o estresse do RE pelo aumento da expressão de chaperonas e consequente melhora no enovelamento das proteínas e degradação de proteínas mal-enoveladas (SZEGEZDI *et al.*, 2006).

3.4. Formação de agregados proteicos

Estudos recentes demonstraram que o sequestro de proteínas mal-enoveladas é uma característica fisiológica do controle de qualidade de proteínas no ambiente celular (ESCUSA-TORET *et al.*, 2013). Diversos compartimentos celulares distintos concentram diferentes tipos de espécies proteicas mal-enoveladas, impedindo, assim, a interação com proteínas enoveladas corretamente. Dessa forma, mecanismos similares aos realizados por príons são evitados, mantendo, assim, a proteostase celular. A partir de estudos de doenças neurodegenerativas de início tardio e estudos com inibição do proteassomo e estresse celular, foram descritas inclusões contendo agregados proteicos insolúveis e solúveis em leveduras e mamíferos como o JUNQ, os *Q-bodies*, o IPOD e o agregossomo (SOTO & ESTRADA, 2008; SONTAG *et al.*, 2014).

Quando há o comprometimento da função do proteassomo, proteínas mal-enoveladas que seriam normalmente degradadas de um modo dependente de chaperonas e do UPS são sequestradas para um compartimento associado ao RE perinuclear chamado JUNQ (*Juxta nuclear quality control*). Estes agregados são solúveis e são marcados com ubiquitina e sua formação depende de actina (KAGANOVICH *et al.*, 2008; SPECHT *et al.*, 2011; MALINOVSKA *et al.*, 2012).

Os *Q-bodies*, outro compartimento celular observado em eucariotos, é formado por proteínas mal-enoveladas solúveis e independe de actina e da falha do UPS. Localizados no RE cortical, os *Q-bodies* continuamente são formados e desfeitos, podendo, em casos de falha

do UPS, se juntar em estruturas maiores e não degradáveis pelo proteassomo, como o JUNQ (SONTAG *et al.*, 2014).

Além de agregados proteicos solúveis, também podem ser formados agregados de proteínas mal-enoveladas insolúveis que são sequestrados em uma estrutura denominada IPOD (*Insoluble protein deposit*) localizados junto ao vacúolo (KAGANOVICH *et al.*, 2008; Tyedmers *et al.*, 2010). Este compartimento é o principal imobilizador de proteínas do tipo amiloide e se forma independentemente da falha do UPS (SONTAG *et al.*, 2014).

Por fim, exclusivamente em células de mamíferos, os agregados insolúveis se concentram no agregossomo, que está localizado no centrossomo (JOHNSTON *et al.*, 1998). Os agregossomos estão associados com chaperonas e componentes do UPS e autofagia.

3.5. Estresse do RE e estresse oxidativo

Uma prolongada situação de estresse do RE pode ser fonte de estresse oxidativo. Durante a formação de pontes dissulfeto nas proteínas, atividade que ocorre no RE, a enzima Pdi1 (*Protein disulfide isomerase 1*) promove a oxidação destas, tornando-se ela mesma reduzida. A enzima Ero1 (*Endoplasmic reticulum oxidoreductase 1*), por sua vez, reoxida Pdi1, tornando-a novamente disponível para novo ciclo de oxidação. Ero1 reduzida transfere elétrons para o oxigênio molecular, resultando na formação de H₂O₂ (TU & WEISSMAN, 2004). HAYNE *et al.* (2004) demonstraram que a expressão de Ero1 é aumentada em situações de ativação da UPR. Isto explica que, em situações de prolongado estresse do RE, haja também aumento da produção de EROs e consequente estresse oxidativo.

O acúmulo de proteínas mal-enoveladas no RE pode favorecer a saída de íons Ca²⁺ para o citosol e aumentar a produção de EROs na mitocôndria (MALHOTRA & KAUFMAN, 2007). Esta geração de EROs induzida por Ca²⁺ ocorre por intermédio dos complexos proteicos da cadeia de transporte de elétrons (FEISSNER *et al.*, 2009). Além disso, o dobramento e o redobramento de proteínas no lúmen do RE são processos altamente dependentes de energia. Assim, o acúmulo de proteínas mal-enoveladas, e a atividade UPR consequente, poderia estimular a fosforilação oxidativa mitocondrial a fim de aumentar a produção de ATP, e, assim, aumentar a produção de EROs (MALHOTRA & KAUFMAN, 2007).

JANG *et al.* (2004), utilizando *S. cerevisiae*, demonstraram que a proteína Tsa1, uma peroxirredoxina, pode apresentar atividade chaperona em certas condições. Tsa1 possui, em condições de estresse oxidativo controlado, atividade peroxidase dependente de tióis. Porém, em situações de alto estresse oxidativo e de choque térmico, esta proteína se comporta como

chaperona do tipo *holdase* ou sHSP (*Small heat shock protein*), formando complexos de alto peso molecular. Esta atividade chaperona também foi observada por outros grupos (KAYA *et al.*, 2014; MACDIARMID *et al.*, 2013; IRAQUI *et al.*, 2009; WEIDS & GRANT, 2014). Kimata *et al.* (2005) demonstraram, também em *S. cerevisiae*, que a expressão de Tsa1 pode ser induzida pelo uso de tunicamicina e é mediada por vias da UPR. Recentemente HAZÉN *et al.* (2016) mostraram que Tsa1 pode interagir fisicamente com chaperonas da família Hsp70 em um mecanismo que depende da hiperoxidação de Tsa1 por H₂O₂. Nesta situação, inclusões proteicas presentes no citoplasma induzidas por tratamento com H₂O₂ recrutam Tsa1 e as chaperonas Ssa1 e Ssa2, membros citoplasmáticos da família Hsp70. Hsp104, que atua em conjunto com as chaperonas Hsp70, é, então, recrutada por Tsa1-Hsp70 e promove a desagregação das inclusões de forma redox-dependente, com a necessidade da redução de Tsa1 pela sulforredoxina 1 (Srx1).

4. A FAMÍLIA DAS PROTEÍNAS VAP

As proteínas VAP (*VAMP-associated proteins*) foram identificadas primeiramente em *Aplysia californica* em associações com proteínas VAMP (*vesicle-associated membrane proteins*) (SKEHEL *et al.*, 1995), que são proteínas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) de vesículas sinápticas (CHEN & SCHELLER, 2001). As VAPs são proteínas de membrana do tipo II e estão ancoradas no RE, sendo conservadas em organismos eucarióticos (LEV *et al.*, 2008).

Mamíferos possuem três proteínas da família VAP: VAPA, VAPB e VAPC. A proteína VAPA (*VAMP-associated protein A*), codificada pelo gene de mesmo nome localizado no cromossomo 18, possui 28 kDa e 249 aminoácidos. As proteínas VAPB e VAPC (*VAMP-associated protein B/C*) são isoformas resultantes do *splicing* alternativo do gene *VAPB* localizado no cromossomo 20. VAPB possui 27 kDa e 243 aminoácidos, enquanto VAPC possui 11 kDa e 99 aminoácidos (NISHIMURA *et al.*, 1999).

VAPA e VAPB compartilham 63% de identidade de sequência de aminoácidos e possuem três domínios conservados. O primeiro domínio, na porção N-terminal, é denominado MSP. Contém aproximadamente 125 aminoácidos organizados em uma estrutura globular e recebe este nome por apresentar 22% de identidade com a proteína MSP (*major sperm protein*) de *Caenorhabditis elegans*. O segundo domínio, *coiled-coil*, é similar àqueles encontrados em outras proteínas da família VAMP. O terceiro domínio, de aproximadamente 23 aminoácidos na porção C-terminal, é transmembrana e contém o motivo de dimerização

GxxxG (LEV *et al.*, 2008). VAPA e VAPB podem formar homo- ou heterodímeros por meio deste domínio, porém, os homólogos de levedura, Scs2 e Scs22, não possuem o motivo e a capacidade de dimerização (RUSS & ENGELMAN, 2000).

A proteína VAPB, objeto de estudo deste trabalho, apresenta uma sequência de 16 aminoácidos com alto grau de conservação entre as espécies no seu domínio MSP (LEV *et al.*, 2008). Homólogos da VAPB humana foram descritos em *S. cerevisiae* (Scs2), *C. elegans* (VPR-1), *D. melanogaster* (VAP-33), e diversos vertebrados (PENNETTA *et al.*, 2002).

Na **Figura 06** são mostradas a estrutura da proteína VAPB e a conservação das sequências entre os homólogos de VAPB em diferentes espécies.

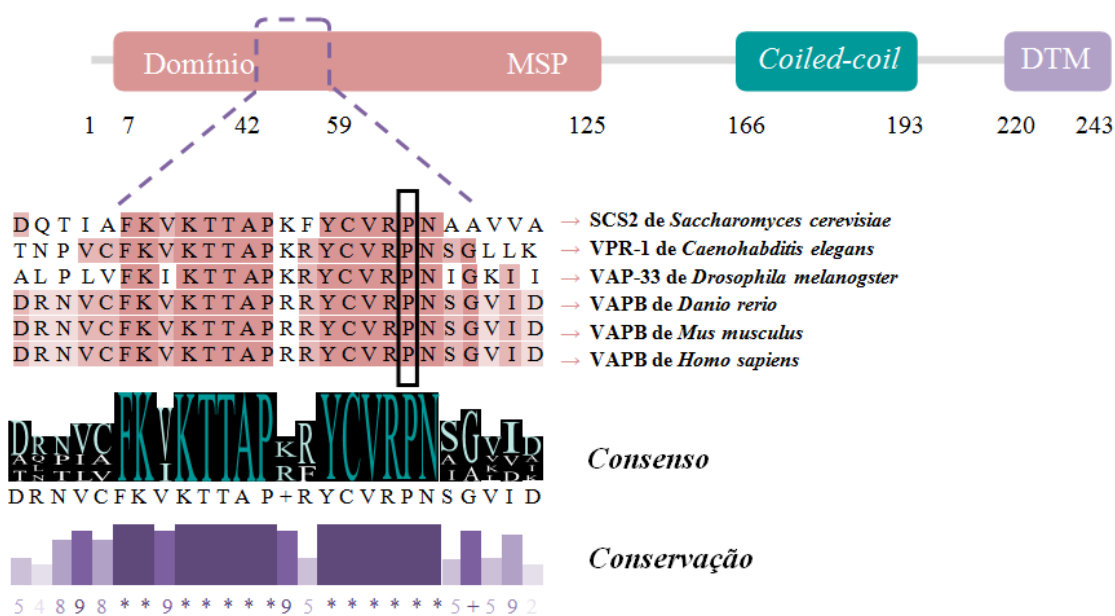


Figura 06. Estrutura e conservação da proteína VAPB (adaptado de LEV *et al.*, 2008). O domínio MSP apresenta uma sequência de 16 aminoácidos altamente conservados entre eucariotos. A marcação evidencia a Prolina 56, mutação associada à ELA 8.

As proteínas VAP e seus homólogos parecem estar envolvidos em diferentes processos celulares, como o tráfego e sinalização intracelular, organização de microtúbulos, localização mitocondrial, homeostase de cálcio, metabolismo de lipídeos, UPR e proliferação tumoral. FOSTER *et al.* (2000) verificaram que a superexpressão de VAP-33 de *D. melanogaster* em mioblastos regula o transporte de GLUT4 (*glucose transporter 4*) para a superfície celular em resposta ao tratamento com insulina. Além disso, WEIR *et al.* (2001) sugerem que VAPA, pela sua interação com diferentes proteínas SNARE, atue no tráfego de vesículas entre o RE e o Aparelho de Golgi.

O domínio MSP de VAP-33 pode atuar como sinalizador ao ser clivado, secretado e

se ligar a receptores de efrina, modulando sua atividade e competindo com as moléculas de efrina (TSUDA *et al.*, 2008).

O papel da VAPB na estabilização de organelas pelos microtúbulos foi sugerido por AMARILIO *et al.* (2005). O autor observou a VAPB como um ligante entre a membrana do RE e o citoesqueleto em células HeLa e HEK293. Isso ocorreu após a superexpressão de VAPB e Nir3, uma proteína com motivos FFAT ligante de VAPB, causar uma mudança estrutural no RE, com agregação de microtúbulos ao longo de suas membranas. No trabalho de PENNETTA *et al.* (2002) foi observado que VAP-33 de *D. melanogaster* está envolvida na organização dos microtúbulos nos terminais pré-sinápticos.

Em *C. elegans*, VPR-1 pode ter papel preponderante na localização, morfologia, mobilidade e nos processos de fissão e fusão em mitocôndrias (HAN *et al.*, 2012). Além disso, VAPB interage com a proteína mitocondrial PTPIP51 formando uma ligação entre RE e mitocôndria que parece ser essencial para a homeostase de Ca²⁺ em células HEK293 (DE VOS, 2012).

A proteína Scs2, homóloga de VAPB em levedura, interage com várias proteínas com o motivo FFAT que estão associadas ao metabolismo de lipídeos (LOEWEN *et al.*, 2003), como a síntese e degradação de fosfatidilinositóis e fosfatidilcolina (KAGIWADA *et al.*, 2003).

KANEKURA *et al.* (2006) sugerem que a superexpressão de VAPB^{WT} promove a UPR ao interagir com IRE1, um componente fundamental da UPR. De modo similar, GKOGKAS *et al.* (2008) associa VAPA e VAPB à UPR por meio da interação com ATF6.

Em *D. melanogaster* a proteína VAP-33 parece ser necessária para o controle de qualidade de proteínas do RE (ERQC), uma vez que sua ausência leva à expansão e ao estresse do RE (MOUSTAQIM-BARRETTE *et al.*, 2014).

RAO *et al.* (2012) fornecem evidências de que VAPB regula a ativação de AKT e a proliferação de células tumorais de mama. Verificou-se que a expressão da proteína VAPB é elevada em amostras tumorais metastáticas, e os níveis de expressão de mRNAs de VAPB estão negativamente correlacionados com a sobrevida de pacientes com câncer de mama.

4.1. VAPB e ELA 8

A primeira mutação pontual na VAPB associada à ELA foi identificada por NISHIMURA *et al.* (2004) em uma família brasileira que possuía 28 indivíduos afetados distribuídos em quatro gerações. A mutação (c.C166T, p.P56S), que ocorre no domínio MSP

da proteína, é herdada de forma autossômica dominante e leva a um quadro de progressão lenta da doença, denominado ELA 8. Trabalhos posteriores identificaram outras famílias que possuíam a mesma mutação, sugerindo haver um ancestral comum entre eles e um evento fundador que teria ocorrido 23 gerações atrás, em Portugal (NISHIMURA *et al.* 2005). A mesma mutação foi encontrada em um paciente francês de ascendência japonesa (MILLECAMPS *et al.*, 2010) e um paciente alemão (FUNKE *et al.*, 2010) sem possíveis ancestrais portugueses ou brasileiros, o que sugere não haver apenas um ancestral comum ou evento fundador para todos os casos descritos até o momento. A segunda mutação associada à ELA8 (c.C137T, p.T46I) foi descrita em um paciente de 73 anos no Reino Unido (CHEN *et al.*, 2010) e uma terceira (p.V234I) identificada em um paciente holandês de 43 anos que apresentava conjuntamente expansões na C9ORF72 (VAN BLITTERSWIJK *et al.*, 2012).

Pouco se sabe a respeito das vias e processos celulares que estão alterados quando há expressão da proteína mutante VAPB^{P56S}. TEULING *et al.* (2007) mostraram que VAPB^{P56S} pode formar agregados citosólicos que não colocalizam com marcadores do RE. Segundo o grupo, a proteína mutante é capaz de recrutar a proteína selvagem para estes agregados e isto poderia levar à perda de função de VAPB selvagem. Outros estudos também sugerem que o envolvimento da VAPB com ELA8 ocorreria por um mecanismo de haploinsuficiência (MITNE-NETO *et al.*, 2011), apontando para a limitação de disponibilidade da VAPB como um dos disparos para a degeneração neuronal. Embora esta seja uma hipótese atrativa para explicar o mecanismo de patogênese da mutante VAPB^{P56S}, efeitos tóxicos adicionais são possíveis.

DE VOS *et al.* (2012) sugerem que a proteína mutante altera a homeostase do cálcio na mitocôndria e no RE ao interagir de maneira aberrante com PTPIP51. Ademais, VAPB^{P56S} parece diminuir o transporte axonal anterógrado de mitocôndrias (MOROTZ *et al.*, 2012).

Sugere-se, ainda, que a VAPB esteja envolvida em sinalização para a UPR, um importante processo de controle de qualidade de proteínas do RE (KANEKURA *et al.*, 2006). Apesar de não se saber ao certo de que forma ocorreria esta sinalização, acredita-se que a expressão da proteína VAPB^{P56S} levaria à desregulação da UPR.

4.2. Modelos de ELA 8

Os mecanismos exatos envolvidos na patogênese de ELA são limitantes para o desenvolvimento de uma terapia para a doença, e a construção de modelos adequados é fator crucial para o entendimento destes mecanismos. A precisão com que os modelos de ELA

conseguem replicar sintomas clínicos e alterações celulares continua a ser uma questão central. Cada organismo tem as suas próprias vantagens e desvantagens como modelo. A escolha depende da questão que se coloca, sendo que, muitas vezes, é necessário executar experiências em paralelo em dois ou mais modelos para compreender diferentes aspectos de um mecanismo subjacente à doença (BERTHOD & GROS-LOUIS, 2012).

Modelos animais são, provavelmente, os mais utilizados em pesquisas em ELA devido à sua facilidade de manipulação e por sua semelhança com a anatomia, genética e fisiologia humanas, o que torna a obtenção de informações *in vivo* particularmente atrativa. Atualmente os modelos animais existentes para ELA 8 são camundongo, *D. melanogaster*, *C. elegans* e *Danio rerio* (zebrafish). Além disso, modelos *in vitro*, como células HeLa, HEK293, e mais recentemente, neurônios derivados de iPSC de pacientes também estão disponíveis.

Até o momento, três grupos diferentes criaram modelos murinos para ELA 8. Os modelos de superexpressão de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} criados por TUDOR *et al.* (2010) não apresentaram nenhuma diferença fenotípica evidente na avaliação locomotora e de sobrevivência dos animais, porém foram observados agregados citoplasmáticos de TDP-43 em neurônios motores da medula espinhal de animais transgênicos expressando a proteína selvagem. KABASHI *et al.* (2013), avaliando camundongos nocaute para VAPB, observaram um comprometimento tardio da atividade motora dos animais, porém sem qualquer defeito nas junções neuromusculares ou qualquer denervação muscular. Por fim, ALIAGA *et al.* (2013), ao superexpressar VAPB^{P56S} em camundongos, observaram defeitos motores nos animais, incluindo a diminuição da coordenação motora e equilíbrio, além do aumento de marcadores de estresse do RE, UPR e fatores pró-apoptóticos.

Dois diferentes modelos de *Drosophila* mostraram que a proteína VAPB^{P56S} poderia atuar de forma dominante negativa. Em um modelo transgênico, a expressão da proteína humana mutante não é capaz de recuperar completamente o fenótipo da deleção de VAP-33, mas a expressão da proteína selvagem sim, o que sugere que a mutação leva a uma perda parcial de função (PENNETTA *et al.*, 2002). No outro modelo, expressando a proteína de *Drosophila* com a mutação correspondente (VAP-33^{P58S}), também se verificou que a mutação leva à perda de função associada à formação de agregados com a proteína selvagem, o que sugere um efeito dominante negativo (RATNAPARKHI *et al.*, 2008).

HAN *et al.* (2012), usando *C. elegans*, mostraram que superexpressão de VPR-1^{P56S} faz com que as mitocôndrias do tecido muscular possuam formato mais fino e ramificado comparadas com o controle. Além disso, a distribuição destas mitocôndrias também está

alterada, semelhante ao que ocorre em animais nocautes para VPR-1.

Usando *D. rerio*, KABASHI *et al.* (2013) mostraram que animais nocautes para VAPB exibiam defeitos na natação e que a expressão de VAPB^{P56S} não foi capaz de recuperar o fenótipo dos animais nocaute, enquanto a VAPB^{WT} conseguiu.

Finalmente, em um modelo de neurônio motor derivado iPSC de um paciente com ELA8 foi observado que os níveis de VAPB podem estar diretamente relacionados com a doença, estando reduzidos neste caso. Além disso, MITNE-NETO *et al.* (2011) não encontraram agregados de VAPB neste modelo, o que difere de outros trabalhos descritos anteriormente.

5. *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* COMO MODELO PARA DOENÇAS

A levedura *S. cerevisiae* é um excelente organismo modelo para o estudo da biologia celular, bioquímica e genética de eucariotos por possuir processos celulares, vias moleculares, proteínas e genes que evolutivamente se mantiveram bem conservados (SMITH & SNYDER, 2006).

A levedura foi o primeiro organismo eucarioto a ter seu genoma sequenciado e, como tal, tem servido como base de estudos genômicos (GOFFEAU *et al.*, 1996). Aproximadamente 30% dos genes de levedura têm ortólogos no genoma humano e dois terços de todos os genes de levedura partilham pelo menos um domínio conservado com genes humanos (WALBERG, 2000). Além disso, a possibilidade de expressar proteínas de outros organismos com relativa facilidade e o seu curto tempo de divisão celular (1,5-3 horas) tornam a levedura um modelo bastante atrativo.

Alguns mecanismos conservados em eucariotos permitem usar *S. cerevisiae* como modelo para enfermidades como o câncer e doenças neurodegenerativas (**Figura 07**).

O uso de *S. cerevisiae* contribuiu consideravelmente para o entendimento da biologia do câncer. Dentre as descobertas feitas no modelo estão a identificação de substratos e mecanismos de ação de diversas caspases com papel ativo na enfermidade, como as caspases 3 e 8, a descrição de atividades pró- ou anti-apoptóticas de proteínas da família Bcl-2 e estudos com a proteína supressora de tumor p53 (PEREIRA *et al.* 2011).

As doenças neurodegenerativas mais comuns, como Alzheimer, Parkinson, Huntington e ELA, estão associadas com a existência de agregados proteicos intracelulares, que se formam, muitas vezes, pelo mal-enovelamento (*misfolding*) resultante de uma mutação, deleção ou expansão de nucleotídeos. Os processos de *misfolding*, oligomerização e

agregação proteica são facilmente estudados em levedura, pois há conservação do sistema de controle de qualidade de proteínas (KHURANA & LINDQUIST, 2010).

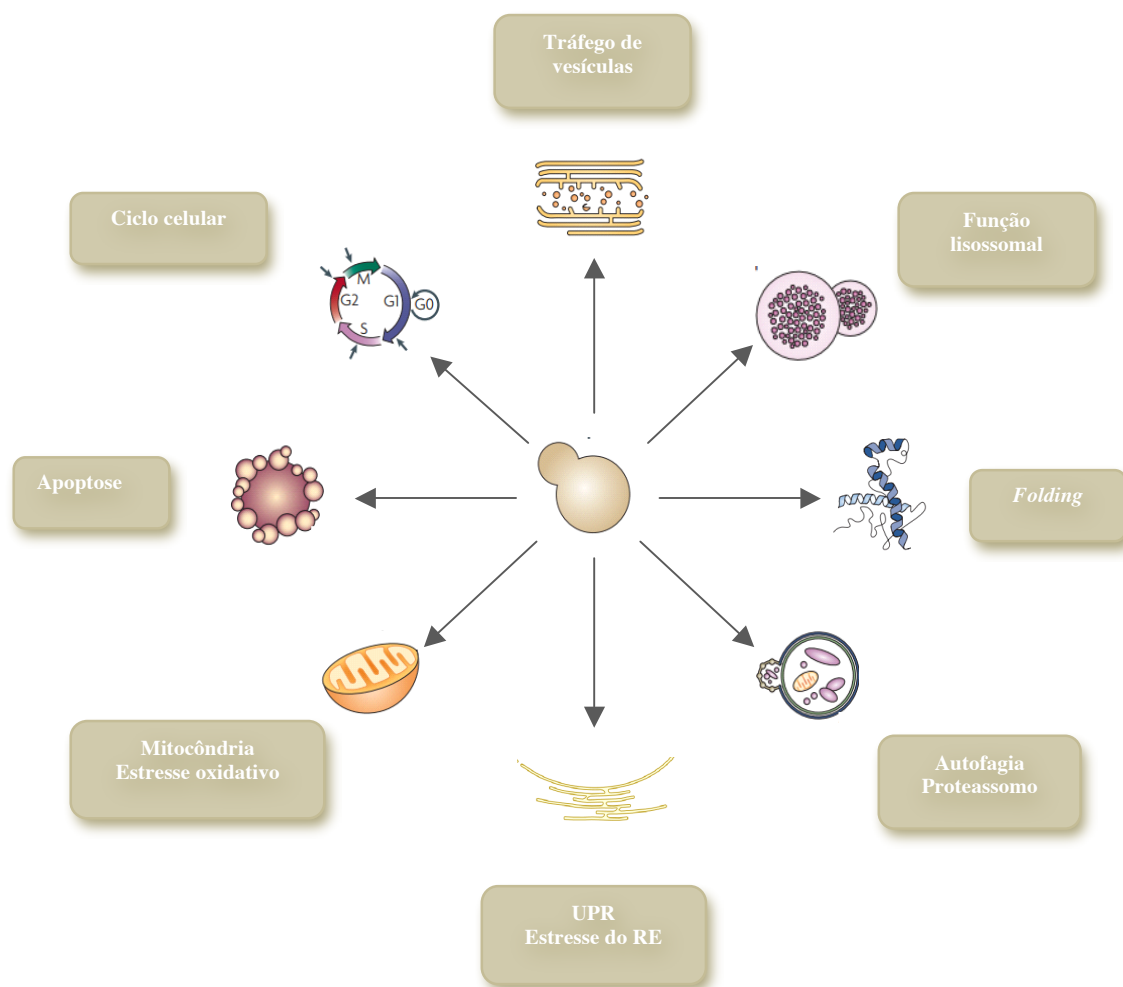


Figura 07. Mecanismos e processos celulares conservados em eucariotos (adaptado de KHURANA & LINDQUIST, 2010).

O mecanismo de autofagia e o UPS na degradação proteica têm recebido grande atenção nas pesquisas em neurodegeneração, uma vez que são as duas principais vias de degradação proteica na célula. Estudos mostram o papel preponderante da autofagia (NAKATOGAWA *et al.*, 2009) e do UPS (SHARMA *et al.*, 2006) em modelos de levedura.

DUENNWALD & LINDQUIST (2008), usando levedura como modelo de Huntington, mostraram que o estresse do RE estava aumentado em células expressando a proteína mutante. Os marcadores comumente utilizados para estresse do RE – BIP/Kar2, CHOP, ERO1 e PDI1 – são altamente conservados entre eucariotos.

O estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial estão associados à neurodegeneração.

Em levedura, tal como em mamíferos, a organela central para a produção de EROs é a mitocôndria. A capacidade que a levedura possui de crescer em meio fermentativo permite a análise de defeitos mitocondriais que seriam letais em células de mamífero. Desta maneira, estudos em levedura têm sido fundamentais para o entendimento da biologia mitocondrial e, eventualmente, para a descrição de alterações mitocondriais relacionadas à neurodegeneração (KNOTT *et al.*, 2008).

Os mecanismos celulares de apoptose em levedura, apesar de menos complexos do que aqueles presentes em eucariotos superiores, apresentam sinais conservados como a condensação da cromatina, alteração do potencial de membrana mitocondrial, liberação de citocromo c, entre outros (JIN & REED, 2002).

As funções de degradação lisossomal, tráfego de vesículas e ciclo celular possuem mecanismos e proteínas altamente conservados entre eucariotos e alguns desses mecanismos, como as vias secretoras, possuem particular interesse em neurônios.

Especificamente para ELA existem, até o momento, quatro modelos de *S. cerevisiae*: para ELA1, ELA 6, ELA 10 e ELA 13, expressando as proteínas humanas SOD1, FUS, TDP-43 e ATXN2 respectivamente. Na **Tabela 4** estão resumidos alguns dos avanços obtidos pela expressão da proteína humana mutante em levedura.

Tabela 04. Expressão de proteínas mutantes associadas à ELA em levedura

Tipo	Proteína	Principais conclusões	Referência
ELA 1	SOD1	Diminui a sensibilidade a hipóxia e a indutores de radical ânion superóxido	RABIZADEH <i>et al.</i> (1995)
		Diminui o fluxo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria	GUNTHER <i>et al.</i> (2004)
ELA 6	FUS	Formação de agregados tóxicos citoplasmáticos	JU <i>et al.</i> (2011)
		Agregados colocalizam com <i>P-bodies</i> e grânulos de estresse	SUN <i>et al.</i> (2011)
ELA 10	TDP-43	Formação de agregados tóxicos citoplasmáticos	JOHNSON <i>et al.</i> (2008)
		Aumento do estresse oxidativo e disfunção mitocondrial	BRAUN <i>et al.</i> (2011)
		Descoberta de supressores de toxicidade de TDP-43	ARMAKOLA <i>et al.</i> (2012)
ELA 13	ATXN2	Deleção de <i>PBP1</i> (ortólogo de <i>ATXN2</i> em <i>S. cerevisiae</i>) diminui a toxicidade de TDP-43	ELDEN <i>et al.</i> (2010)

Por ser um organismo unicelular, a limitação mais óbvia da levedura como modelo

ocorre nas análises de aspectos histológicos, onde a multicelularidade e as interações celulares são importantes. Tais interações incluem as respostas imunes e inflamatórias, as transmissões sinápticas e interações glia-neuronais, entre outros. Apesar disso, a conservação de aspectos fundamentais de biologia celular ainda é um fator importante para o uso de *S. cerevisiae* na compreensão das bases moleculares de doenças e teste terapêutico, com posterior validação em sistemas mais complexos (KHURANA & LINDQUIST, 2010).

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Uma vez que a mutação P56S na proteína VAPB causa ELA 8 e que há poucos dados disponíveis na literatura a respeito dos possíveis mecanismos moleculares associados ao fenótipo da doença, pretendeu-se construir um novo modelo onde fosse possível avaliar vias e processos envolvidos na patologia, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A hipótese levantada neste trabalho é que a expressão da VAPB^{P56S} pode afetar a proteostase celular por interferir nos seus mecanismos de controle e degradação proteica, como UPR, UPS e autofagia. Além disso, por VAPB estar localizada no RE, um local importante de enovelamento proteico, sendo possível que a mutação P56S ocasione um aumento nos estresses oxidativo e do retículo, justificando a avaliação do estado redox das células superexpressando VAPB e os mecanismos de proteostase.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar os genes *VAPB* fusionados ou não à GFP e transformar as linhagens de leveduras com estes genes;
- Avaliar a localização celular de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} e verificar a formação de agregados proteicos;
- Testar a viabilidade das células expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S};
- Avaliar a sobreposição de funções entre VAPB e Scs2 por complementação heteróloga;
- Testar as linhagens para marcadores de estresse oxidativo e avaliar a resposta a agentes antioxidantes;
- Avaliar os mecanismos de degradação proteica e a sua requisição para a proteostase;
- Verificar, pelo uso de marcadores moleculares, a UPR e o estresse do retículo endoplasmático;
- Avaliar a viabilidade celular após aumento de expressão de chaperonas.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

A seção Materiais e Métodos foi dividida em três partes a fim de agrupar, por semelhança de objetivos, os dados apresentados.

A Parte I se refere à construção do modelo de *S. cerevisiae* para ELA8. Na Parte II estão descritos os experimentos cujo objetivo era avaliar parâmetros de estado redox no modelo construído. A Parte III contém os métodos utilizados para a avaliação da proteostase no modelo de *S. cerevisiae*.

PARTE I. CONSTRUÇÃO DE UM MODELO DE *S. CEREVISIAE* PARA ELA8

1. OBTENÇÃO DAS LINHAGENS DE TRABALHO

1.1. Clonagem gênica de $VAPB^{WT}$ e $VAPB^{P56S}$

Os plasmídeos contendo os genes $VAPB^{WT}$ e $VAPB^{P56S}$ foram obtidos pelo Dr. Bruno Horta, como parte do seu trabalho de Pós-Doutorado.

Os genes $VAPB^{WT}$ e $VAPB^{P56S}$ foram amplificados por PCR a partir dos vetores pGEM-MSP e pGEM-MSP-P56S, respectivamente, cedidos pela Prof^a. Mayana Zatz (Departamento de Genética e Biologia Evolutiva – IB/USP). A reação utilizada para a amplificação está na **Tabela 05**. Todas as reações de PCR descritas foram feitas usando o termociclador Perkin Elmer 9700 (Applied Biosystems) e a enzima Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). O **Anexo I** contém as sequências dos dois genes.

Tabela 05. Reação de amplificação de $VAPB^{WT}$ e $VAPB^{P56S}$

Reagentes	Vol (µL)
pGEM-MSP / pGEM-MSP-P56S	2
<i>primerF</i> (5'-CGGGATCCAAAAAATGGCGAAGGTGG-3')	2
<i>primerR</i> (5'-GCTCTAGAGGGCAATCTTCCCAATAATTACACCAAC-3')	2
dNTP mix (10 mM)	1,5
10X PCR <i>Buffer</i>	5
MgCl ₂ 50mM	1,5
Taq DNA Polimerase (5 U/µL)	0,5
Água ultrapura	35,5

O programa utilizado para a amplificação consistiu de uma etapa inicial de desnaturação à 94°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (57°C por 60 segundos) e extensão (72°C por 60 segundos). Para garantir a completa extensão do DNA sintetizado foi acrescentada uma etapa a 72°C por 10 minutos ao final do programa. A amplificação dos genes de interesse foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%.

O vetor utilizado para a expressão das proteínas humanas foi o plasmídeo episomal pYES 2.1 (Invitrogen) (**Figura 08**). Ele possui o promotor GAL1 e as marcas de seleção para ampicilina e uracila em bactérias e leveduras respectivamente. Induz forte expressão dos

genes aos quais está ligado quando as células são crescidas em meio de cultura contendo galactose como fonte de carbono; o crescimento em glicose, por sua vez, reprime a expressão gênica.

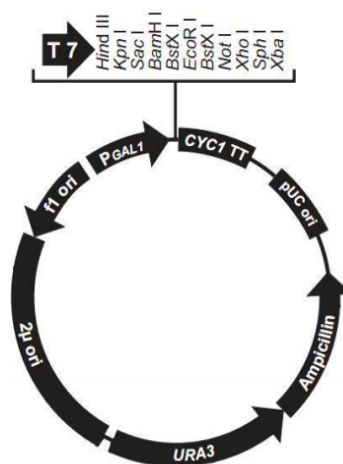


Figura 08. O plasmídeo pYES2.1

O produto de PCR referente ao gene de interesse e o vetor de expressão foram simultaneamente digeridos com as enzimas de restrição BamHI e XbaI por meio da reação descrita na **Tabela 06**.

Tabela 06. Reação de digestão com enzimas de restrição

Reagentes	Vol (µL)
PCR purificado / Vetor de expressão	60 / 20
NEB <i>Buffer</i> 3.1	10
BamHI	5
XbaI	5
Água ultrapura	20 / 60

Ao final da digestão, os produtos, gene e vetor de expressão, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e os fragmentos correspondentes foram isolados do gel utilizando o Wizard SV Gel and PCR Clean-up system (Promega), segundo o protocolo do fabricante. Após extração do gel, o gene e o vetor de expressão foram ligados utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) conforme a reação descrita na **Tabela 07**.

Tabela 07. Reação de ligação entre gene e vetor de expressão

Reagentes	Vol (μ L)
Produto da digestão do vetor de expressão	5
Produto da digestão do PCR	5
Ligase <i>Buffer</i>	2
T4 DNA ligase	0.5
Água ultrapura	8.5

1.2. Transformação de *E. coli*

Para a obtenção de células eletrocompetentes, uma colônia de *Escherichia coli* DH5 α [endA1, hsdR17 (rk- mk+), supE44, thi-1, recA1, gyrA (Na 1r), relA1, Δ (lacZYA-argF)U169 (m80lacZ Δ M15)] foi colocada em 5 mL de meio LB (*Luria-Bertani Broth*) líquido sem antibiótico em tubo falcon de 15 mL e deixada em agitação *overnight* a 200 rpm e 37°C. 1 mL deste pré-inóculo foi incubado em erlenmeyer contendo 199 mL de meio LB líquido durante, aproximadamente, 5 horas (agitação a 200 rpm e 37°C). Os 200 mL do inóculo foram distribuídos em 4 tubos gelados (Falcon, 50 mL) e colocados por 30 minutos no gelo. Após este período, os tubos foram centrifugados a 1000 x g por 25 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e 50 mL de água destilada autoclavada foram acrescentados aos tubos. As amostras foram centrifugadas a 1000 x g por 20 minutos a 4°C e, posteriormente, o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuscitado em 25 mL de glicerol 10% gelado e o conteúdo dos 4 tubos foram juntados 2 a 2. Foi feita uma nova centrifugação a 3000 x g por 15 minutos a 4°C, com o posterior descarte do sobrenadante. Adicionou-se 15 mL de glicerol 10% gelado e o conteúdo dos dois tubos foram transferidos para um só. Este tubo foi centrifugado a 1000 x g por 15 minutos a 12°C e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuscitado em solução GYT (10% de glicerol; 0,125% de extrato de levedura e 0,25% de triptona) e distribuídos em microtubos.

As células eletrocompetentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas por eletroporação utilizando o GenePulser II (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) fixado em 2,5 Kv e 200 W. Foi adicionado 1 μ L dos plasmídeo pYES2 contendo as proteínas de interesse a um microtubo contendo 50 μ L de célula eletrocompetente. A suspensão foi transferida para uma cuveta e imediatamente levada ao eletroporador. Todo o procedimento foi feito com o material mantido no gelo. Após a eletroporação, foi acrescentado 1 mL de meio LB na suspensão, sendo imediatamente incubada por 1 hora a 37°C e 200 rpm. Em seguida, 100 e 200 μ L do

transformado foram plaqueados em meio LB-Ágar contendo o ampicilina (100 µg/mL). O material foi incubado a 37°C *overnight* e as transformantes foram selecionadas.

As bactérias transformadas foram crescidas em 5 mL de meio LB contendo o ampicilina (100 µg/mL) a 37°C e 200 rpm. A extração plasmidial foi feita com o kit da Qiagen (QIAprep® Spin Miniprep Kit).

A confirmação da correta clonagem se deu por sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco da USP. Verificada a integridade das sequências codificadoras, foi feita a transformação da levedura com o plasmídeo.

1.3. Fusão das proteínas VAPB à GFP

Esta etapa foi feita com o auxílio do aluno de Iniciação Científica Eduardo Tassoni Tsuchida, como parte componente do seu projeto.

Para avaliar a localização celular de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} e a possível via de degradação de ambas na levedura, foi feita a fusão de GFP (*green fluorescent protein*) na porção N-terminal de ambas proteínas. As regiões codificadoras correspondentes à GFP foram amplificadas por PCR a partir do plasmídeo pKT0128 (Euroscarf), utilizando os *primers* 5'-GGCGGTACCATGTCTAAAGGTGAAGAATTA-3', contendo o sítio para a enzima KpnI, e 5'-GGCGGATCCATTTGTACAATTCATCCATAC-3', contendo o sítio para a enzima BamHI. Os produtos de amplificação foram digeridos com estas enzimas de restrição, sendo posteriormente ligados ao plasmídeo pYES2 contendo os genes *VAPB*^{WT} e *VAPB*^{P56S} já construídos. Os processos de amplificação, digestão, ligação e multiplicação em *E. coli* foram feitos como descrito anteriormente.

1.4. Transformação de *S. cerevisiae*

As linhagens BY4741 (genótipo: Mat α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YHR104w:kanMX4; *Euroscarf collection, Frankfurt, Germany*) e Δ Scs2 foram utilizadas para as transformações com o plasmídeo pYES2 contendo os genes VAPB^{WT} ou VAPB^{P56S} fusionadas ou não à GFP. A proteína Scs2 está envolvida no metabolismo de inositolis em *Saccharomyces cerevisiae* e é homóloga à VAPB humana.

O método usado para a transformação foi o do Acetato de Lítio, adaptado de SCHIESTL & Gietz (1989). As células foram crescidas em 10 mL de meio YPD *overnight* a

30°C e 200 rpm. Foi transferido 1 mL da cultura *overnight* para 29 mL de meio YPD, a agitação constante de 200 rpm e 30°C. As amostras foram então centrifugadas a 1000 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi removido. Foi feita uma lavagem do pellet com 5 mL de TEL (tampão TE 1X + Acetato de Lítio 1X). As amostras foram centrifugadas a 1000 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi removido e o pellet ressuscitado em TEL. Ao ressuscitado foram adicionados 5 µL de DNA *carrier* de salmão e 5 µL do plasmídeo a ser inserido na levedura. As amostras foram deixadas por 20 minutos em temperatura ambiente e após este tempo foram adicionados 700 µL de PEG 40% (polietileno glicol), seguido de novo descanso em temperatura ambiente por 35 minutos. Os tubos foram transferidos para banho-maria a 42°C por 10 minutos. Adicionou-se 500 µL de solução TE, centrifugou-se a 16000 x g por 1 minuto e o sobrenadante parcialmente descartado. A partir do sobrenadante restante ressuscitou-se o pellet formado e foram plaqueados 100 µL da suspensão em Meio Mínimo. A seleção das células transformantes foi feita pela recuperação da auxotrofia à uracila conferida pelo alelo selvagem URA3 presente no plasmídeo pYES2.1.

A lista com todas as linhagens de *S. cerevisiae* e plasmídeos utilizados neste trabalho estão no **Anexo II**.

1.5. Cultivo de pré-inóculo de *S. cerevisiae*

Como pré-inóculo, as linhagens foram crescidas em Meio Mínimo com glicose como fonte de carbono *overnight* a 30°C sob agitação contínua (200 rpm). A OD₆₀₀ foi medida e as amostras foram centrifugadas para remover o meio de cultura (1000 x g por 5 minutos), ressuscitadas em meio mínimo e diluídas para OD₆₀₀ = 0,2.

A lista com todos meios de cultura utilizados neste trabalho estão no **Anexo III**.

2. VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE VAPB^{WT} E VAPB^{P56S}

A expressão de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} foi verificada em nível de RNA, por RT-PCR, e de proteína, por *Western blotting*.

2.1. Extração do RNA total

O método utilizado foi a Extração com Fenol Quente, adaptado de SCHERRER &

DARNELL (1962). Foi obtido um pré-inóculo como descrito anteriormente (**Materiais e Métodos, Parte I, item 1.5**). Novo crescimento foi feito em Meio Mínimo com galactose como fonte de carbono a 200 rpm e 30°C até $OD_{600} = 1,0$. As células foram coletadas por centrifugação a 1000 x g por 2 minutos e 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 1 mL de água DEPC (dietilpirocarbonato). As células foram centrifugadas a 16000 x g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e o pellet foi ressuscitado em 500 µL de TES (10mM de Tris-HCl pH 7,5; 10 mM de EDTA e 0,5% de SDS). Foram adicionados 500 µL de Fenol Ácido a esta suspensão. As células foram incubadas a 65°C por 1 hora em banho seco com agitação por vórtex a cada 10 minutos. Ao final deste passo, as células foram deixadas em gelo por 5 minutos e então centrifugadas a 16000 x g por 5 minutos a 4°C. A fase aquosa superior foi transferida para novo tubo e foram adicionados mais 500 µL de Fenol Ácido. As células foram agitadas em vórtex, novamente deixadas em gelo por 5 minutos e então centrifugadas a 1000 x g por 5 minutos a 4°C. A fase superior aquosa foi transferida para novo tubo e foram adicionados 500 µL de clorofórmio. As células foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 1000 x g por 5 minutos a 4°C. A fase superior foi transferida para novo tubo e foram adicionados 50 µL de Acetato de Sódio 3 M (pH 5,2) e 1 mL de Etanol Absoluto gelado. As amostras foram incubadas a -80°C por 2 horas e centrifugadas a 16000 x g por 10 minutos a 4°C. O RNA precipitado foi lavado duas vezes com Etanol 70% gelado, secado e ressuscitado em 50 µL de água DEPC.

O RNA total obtido foi analisado no NanoDrop1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) anotando-se a concentração e razão 260/280 nm. Amostras que possuíam a razão variando entre 1,8-2,0 foram utilizadas para trabalhos posteriores. Além disso, a quantidade e integridade do RNA também foram analisadas por gel de agarose desnaturante 1,5%, verificando-se as bandas de RNA ribossomal 28S e 18S.

2.2. Síntese de cDNA e verificação dos transcritos

O RNA total obtido foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando o kit SuperScript II RT (Thermo Fisher Scientific). O cDNA obtido foi tratado com 1 µL de RNase H de *E. coli* a 37°C por 20 minutos. Após a remoção de RNA da amostra, os níveis de transcritos de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} nas linhagens foram obtidos a partir da amplificação do cDNA obtido com *primers* específicos (**Tabela 08**). O produto da reação possui 729 pb.

Tabela 08. Reação de amplificação dos transcritos de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}

Reagentes	Vol (µL)
cDNA (1 µg/µL)	2
<i>primer F</i> (5'-ATGGCGAAGGTGGAGCAGGT-3') - (10µM)	1
<i>Primer R</i> (5'-TAATTACACCAACGATAAAG-3') - (10µM)	1
dNTP mix (10 mM)	1,5
10X PCR <i>Buffer</i>	5
MgCl ₂ 50mM	1,5
Taq DNA Polimerase (5 U/µL)	0,5
Água ultrapura	37,5

O programa utilizado para a amplificação consistiu de uma etapa inicial de desnaturação à 94°C por 2 minutos, seguidos de 25 ciclos de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (54°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 60 segundos). Para garantir a completa extensão do DNA sintetizado foi acrescentada uma etapa de extensão a 72°C por 10 minutos ao final do programa. A amplificação dos genes de interesse foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%.

2.3. Extração de proteínas e SDS-PAGE

As células foram crescidas e foi obtido um pré-inóculo como descrito anteriormente (**Materiais e Métodos, Parte I, item 1.5**). Novo crescimento foi feito em Meio Mínimo com glicose ou galactose como fonte de carbono a 200 rpm e 30°C por 8 horas. Cerca de 3 OD₆₀₀ de células foram coletadas por centrifugação a 16000 x g por 1 minuto a 4°C. As células foram ressuspensas com 1 mL de água ultrapura e foram adicionados 160 µL de NaOH 2 M e 7.4 % de β-mercaptoetanol. Após incubação em banho de gelo por 10 minutos, foram adicionados 160 µL de ácido tricloroacético (TCA) 50%. Após nova incubação em banho de gelo por 10 minutos, a suspensão foi centrifugada a 16000 x g por 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 500 µL de Tris-Base 1 M. A amostra foi novamente centrifugada a 16000 x g por 10 segundos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensado em 150 µL de tampão de amostra Laemmli 5x (Tris-HCl 60 mM pH 6,8; glicerol 20%; SDS 2%; β-mercaptoetanol 14,4 mM; azul de bromofenol 0,1%). As amostras foram tratadas com 1 mM de DTT e fervidas por 5 minutos a 95°C.

Os géis de poliacrilamida em condição desnaturante foram feitos conforme descrito

em Laemmli (1970), usando sistema de minigéis (BioRad). As porcentagens de acrilamida dos géis de separação e de empilhamento foram de 12% e 5%, respectivamente. O gel de separação foi preparado com 1,25 mL de Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), 2 mL de acrilamida-bis 30:0,8, 50 µL de persulfato de amônio 10% (PSA), 2 µL de TEMED e 1,65 mL de água, para um volume final de 5 mL. O gel de empilhamento foi feito com 0,25 mL de Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), 0,34 mL de acrilamida-bis 30:0,8, 20 µL de SDS 10%, 0,02 mL de PSA 10%, 2 µL de TEMED e 1,35 mL de água, para um volume final de 2 mL.

As amostras fervidas foram aplicadas nos géis de poliacrilamida e realizou-se a corrida eletroforética por 1 hora, a 200 V em tampão de corrida Tris-Glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%).

2.4. Western blotting

Após a corrida eletroforética de SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando o sistema de transferência i-BLOT™ Gel Transfer System (Invitrogen), a 24 V, 650 mA, por 30 minutos, conforme recomendações do fabricante. A membrana de nitrocelulose foi então bloqueada com solução de TBS-T 1X (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, Cloreto de Sódio 150 mM, Tween 0,1%) com 5% de leite (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk –BioRad) por 1 hora em temperatura ambiente. As proteínas de interesse foram detectadas por meio de incubação por uma hora com anticorpo primário. A membrana foi, então, lavada três vezes, por 10 minutos cada lavagem, com TBS-T 1X para retirada do excesso de anticorpo primário. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário fusionado a HRP (1:10000) por 1 hora em temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada três vezes com TBS-T 1X. A visualização dos complexos antígeno-anticorpo foi feita pela lavagem da membrana com solução 1:1 ECL™ Prime Western Blotting Detection (GE Healthcare) para anticorpos secundários fusionados a HRP, seguido de exposição da mesma em filmes de raio-X (GE Healthcare). Os anticorpos utilizados neste trabalho estão descritos no **Anexo IV**.

3. LOCALIZAÇÃO DE VAPB

A localização de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} nas linhagens BY4741 foi feita por fracionamento celular e microscopia de fluorescência.

3.1. Fracionamento celular

O fracionamento celular foi adaptado de RIEDER E EMR (2001) e está resumido na **Figura 09**. As linhagens BY4741 expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} foram crescidas como descrito anteriormente (**Materiais e Métodos, Parte I, item 1.5**). Novo crescimento foi feito em 1 L de Meio Mínimo contendo galactose como fonte de carbono a 200 rpm por 24 horas a 30°C. Aproximadamente 5000 OD₆₀₀ de células foram coletadas por centrifugação a 1000 x g por 5 minutos, lavadas com solução de sorbitol 1,2 M e novamente centrifugadas nas condições anteriores. Em seguida, o *pellet* celular foi pesado e ressuspensionado com 3 mL/g de tampão de digestão (Sorbitol 1,2 M; tampão Fosfato de Sódio pH 7,5 60 mM; EDTA 1 mM; 1% β-mercaptoetanol e 1 mg/mL de Zymoliase MP Biomedicals) e, após 2 horas de incubação a 37°C, os esferoplastos resultantes foram lavados com tampão A (Sorbitol 1,2 M; tampão Fosfato de Sódio pH 7,5 20 mM) e centrifugados a 1000 x g por 10 minutos a 4°C. A etapa de lavagem foi repetida duas vezes. Os esferoplastos foram ressuspensionados a uma concentração final de 1000 OD₆₀₀ por mL no tampão de lise (sorbitol 100 mM; HEPES pH 6,8 20 mM; Acetato de Potássio 50 mM, EDTA 2 mM; PMSF 1 mM) e em seguida lisados mecanicamente em homogeneizador do tipo *potter* por 10 ciclos. A suspensão resultante (Extrato Total – ET) foi centrifugada a 1000 x g por 10 minutos a 4°C. O *pellet* obtido, P₁₀₀₀, contendo células não lisadas, núcleos e agregados, foi reservado para análises e posteriores e o sobrenadante, S₁₀₀₀, foi submetido a centrifugação a 27000 x g por 10 minutos e a 4°C. O sobrenadante (S₂₇₀₀₀), livre de porções membranares, foi reservado para análises posteriores e o *pellet* resultante, P₂₇₀₀₀, contendo a fração composta por mitocôndrias, aparelho de Golgi, vacúolo e RE, foi ressuspensionado em 1 mL de tampão de lise.

Para isolar a fração contendo apenas o RE, P₂₇₀₀₀ ressuspensionado foi submetido a um gradiente de Sacarose. A primeira fase continha 1 mL de Sacarose 1,5 M (Sacarose 1,5 M, Acetato de Potássio 50 mM, HEPES pH 6,8 20 mM, EDTA 2 mM, DTT 1mM, PMSF 1 mM), a segunda continha 1 mL de Sacarose 1,2 M (Sacarose 1,2 M, Acetato de Potássio 50 mM, HEPES pH 6,8 20 mM, EDTA 2 mM, DTT 1mM, PMSF 1 mM) e a terceira continha 200 µL da suspensão de P₂₇₀₀₀. O gradiente foi centrifugado a 10000 x g por 1 hora a 4°C. A fração entre as fases 1,5 M e 1,2 M de Sacarose, F₁₀₀₀₀₀, foi coletada. Os níveis proteicos de todas as frações obtidas foram verificados por BCA e os ajustes necessários foram feitos.

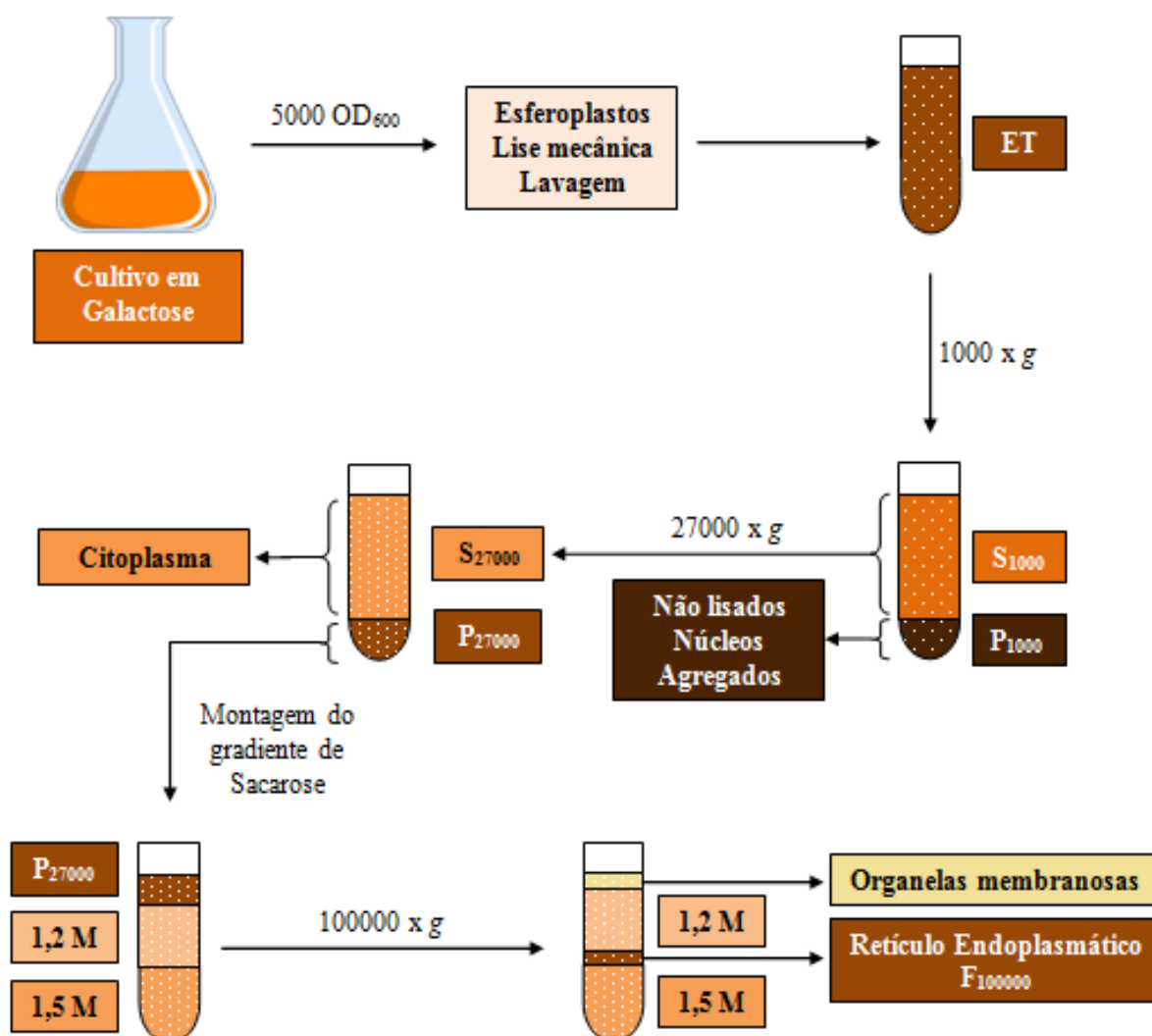


Figura 09. Fracionamento celular. O método foi adaptado de RIEDER E EMR (2001) para a obtenção de Retículo Endoplasmático isolado.

Foi feita uma corrida eletroforética das frações e, em seguida, foram feitos *Western blottings*. Foram utilizados anticorpos específicos para VAPB (produzido pelo Dr. Miguel Mitne-Neto) e para as proteínas Dpm1 (Dolicol fosfato manose sintase) (Life Technologies), Por1 (Porina) (Life Technologies), Pep12 (Carboxipeptidase Y-deficiente 12) (Life Technologies), Pgc1 (3-Fosfoglicerato Quinase) (Nordic Immunology), e V-ATPase (Life Technologies). O anticorpo para VAPB foi utilizado a uma diluição 1:5000 e os demais anticorpos foram utilizados como marcadores para as frações contendo o RE (Dpm1 em diluição 1:2000), mitocôndrias (Por1 em diluição 1:5000), aparelho de Golgi (Pep12 em diluição 1:1000), citoplasma (Pgc1 em diluição 1:10000) e vacúolo (V-ATPase em diluição 1:1000).

3.2. Microscopia de fluorescência

Para a microscopia de fluorescência foi necessário a obtenção de esferoplastos, células que perderam parcial ou completamente sua parede celular, a fim de facilitar a entrada dos marcadores fluorescentes apropriados.

As linhagens BY4741 expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} foram crescidas como descrito anteriormente (**Materiais e Métodos, Parte I, item 1.5**). Novo crescimento foi feito em 10 mL de Meio Mínimo contendo galactose como fonte de carbono a 200 rpm até que as células atingissem $OD_{600} = 1,0$. As células foram, então, centrifugadas a 1000 x g por 5 minutos a 25°C e lavadas duas vezes com água ultrapura. Novamente centrifugou-se as células, descartando o sobrenadante e pesando-se o *pellet*, que foi ressuspensionado em 3 mL de tampão MP1 (Tris-Base 100 mM, DTT 10 mM) para cada 1 g de células. As células então foram incubadas a 30°C, 200 rpm por 10 minutos, centrifugadas, lavadas com Sorbitol 1,2 M e novamente centrifugadas. Ressuspendeu-se o *pellet* em 6,7 mL de tampão MP2 (Sorbitol 1,2 M, Fosfato de Potássio 50 mM, 3 mg de Zymoliase para cada 1 g de células) para cada 1 g de *pellet*, seguido de incubação a 30°C, 200 rpm por 30 minutos. Para confirmar a eficiência na preparação dos esferoplastos, mediu-se a OD_{600} das células em Sorbitol 1,2 M e em água ultrapura. Quando a preparação é bem-sucedida, deve haver uma queda na OD_{600} das células quando medida com água ultrapura em comparação a Sorbitol 1,2 M, pois se trata de uma solução hiposmótica em relação às células.

As células foram, então, incubadas com o marcador *ER-Tracker™ Blue-White DPX* (ThermoFisher Scientific) numa concentração final de 500 nM, por 30 minutos. Após a marcação, as células foram centrifugadas a 1000 x g por 5 minutos e ressuspensionadas em Sorbitol 1,2 M. Duas lavagens com Sorbitol 1,2 M foram feitas a fim de remover o excesso do marcador.

Para a obtenção das imagens, foi utilizado o microscópio AxioImager Z1 (Zeiss) pertencente à professora Dra. Mariz Vainzof do Instituto de Biociências da USP e Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-USP). As imagens foram obtidas com as células vivas, utilizando PBS 1X (NaCl 137 mM, Fosfato de Potássio 10 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4) com Agarose 1% como suporte. As emissões das fluorescências de GFP e do *ER Tracker Blue-White DPX* foram detectadas a 510 nm e 450 nm respectivamente.

4. ENSAIOS DE SENSIBILIDADE E VIABILIDADE

A viabilidade das células foi avaliada por meio de curvas de crescimento e diluições seriadas.

4.1. Curvas de crescimento

Para o ensaio de curva de crescimento, as linhagens foram crescidas como descritos anteriormente (**Materiais e Métodos, Parte I, item 1.5**). A partir deste ponto as linhagens BY4741 expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} foram colocadas em Meio Mínimo contendo glicose ou galactose como fonte de carbono sob agitação contínua (200 rpm) a 30°C. Alíquotas foram periodicamente retiradas em diferentes tempos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas) e a OD₆₀₀ foi medida em cada um destes pontos.

4.2. Diluição seriada

Para o ensaio de diluição seriada, as linhagens foram crescidas como descritos anteriormente (**Materiais e Métodos, Parte I, item 1.5**). A partir deste ponto as células foram colocadas em Meio Mínimo com ou sem inositol contendo glicose ou galactose como fonte de carbono até atingir OD₆₀₀ = 1,0. A suspensão foi diluída em outras quatro concentrações diferentes (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000) e as diluições foram alíquotadas em placas de Petri (5 µL) com meios de cultura preparados adequadamente e temperatura requerida para a avaliação de cada linhagem.

4.3. Complementação heteróloga

As linhagens BY4741 $\Delta Scs2$ foram transformadas com os plasmídeos contendo VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} e avaliadas para a sua expressão. Foram feitos ensaios de curvas de crescimento e diluição seriada como descrito anteriormente. Uma vez que as linhagens BY4741 $\Delta Scs2$ apresentam auxotrofia a inositol quando crescidas em Meio Mínimo sem inositol a 34°C, foi possível avaliar a capacidade das proteínas VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} de restaurar a viabilidade das células nocautes quando crescidas em meio seletivo.

PARTE II. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTADO REDOX EM ELA8.

1. ENSAIOS DE SENSIBILIDADE E VIABILIDADE APÓS TRATAMENTO COM H₂O₂

A fim de verificar a viabilidade e a sensibilidade ao estresse oxidativo induzido por H₂O₂ nas células expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} foram feitas diluições seriadas e curvas de crescimento como descrito previamente.

As células foram submetidas a tratamento com três concentrações diferentes de H₂O₂ (0,75 mM, 1,0 mM e 2,0 mM) em placa, no experimento de diluição seriada, e a partir do ponto inicial da curva de crescimento.

2. RAZÃO GSH/GSSG

Os níveis de GSH, GSSG e da razão entre as duas são parâmetros que estimam o estado redox do ambiente celular, sendo que menores valores obtidos para a razão refletem um ambiente mais oxidativo.

As células foram crescidas como descritos anteriormente (**Materiais e Métodos, Parte I, item 1.5**). Novo crescimento foi feito em Meio Mínimo em galactose como fonte de carbono a 200 rpm e 30°C por 8 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 1000 x g por 5 minutos. Os *pellets* formados receberam igual volume de Ácido Sulfossalicílico 3,5% e *beads* de vidro e foram vortexadas por 20 minutos a 4°C, a fim de romper as células. O extrato foi centrifugado a 16000 x g por 40 minutos. O sobrenadante, contendo peptídeos de baixo peso molecular, foi coletado e utilizado para análises. O *pellet* formado foi ressuspenso em Tris base para a quantificação proteica pelo método de Bradford e foram feitos os ajustes necessários.

2.1 HPLC com detecção eletroquímica

Para a determinação de GSH/GSSG por HPLC com detecção eletroquímica (HPLC-ECD) utilizou-se o sistema Coulochem III (ESA, Inc.) equipado com uma célula guarda modelo 5020 e célula analítica com o eletrodo BDD (boron doped diamond) modelo 5040. Neste sistema, as amostras foram separadas por cromatografia de fase reversa utilizando coluna M.S. GEL C18 (EP-DF-5-120A, 4,6×150 mm, MC Medical, Inc.), equilibrada a 35°C

em um fluxo isocrático de 0,7 ml/min, com fosfato de sódio monobásico 25 mM, ácido 1-octanosulfônico 1,4 mM, acetonitrila 6% (v/v), pH final 2,65 (ajustado com ácido fosfórico). A eluição dos componentes foi monitorada aplicando potencial de +1400 mV na célula analítica. O potencial aplicado na célula guarda foi de +900 mV. Ao final de cada corrida foi aplicado um potencial de +1900 mV por 30 segundos, seguido de reequilíbrio por 5 minutos.

Inicialmente foram feitas curvas de calibração contendo diferentes concentrações de GSH (0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM e 10 mM) e GSSG (5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM e 100 µM) para uso como padrões quantitativos (**Figura 10**). O sobrenadante obtido após a lise celular foi filtrado em membrana de 0,22 µm (Millipore). Alíquotas de 50 µL de cada amostra foram injetadas no aparelho. Os cromatogramas das detecções dos tióis e dissulfetos totais foram analisados e os picos correspondentes a GSH e GSSG foram identificados e quantificados. A **Figura 11** mostra um exemplo de cromatograma obtido.

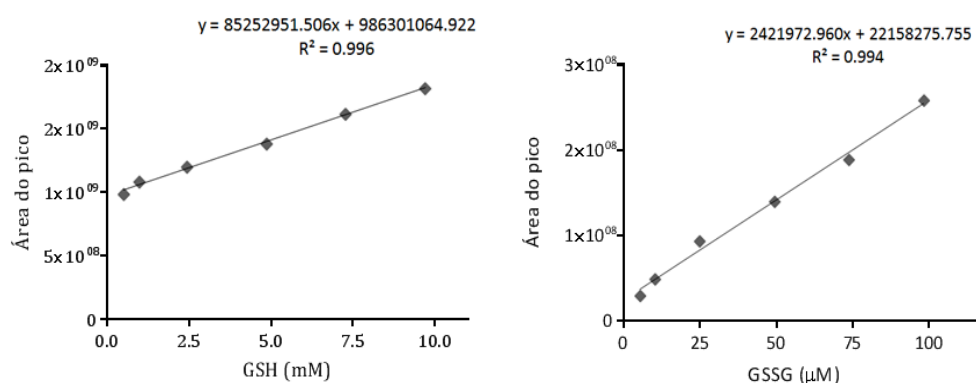


Figura 10. Curvas de calibração de GSH e GSSG obtidas por HPLC-ECD.

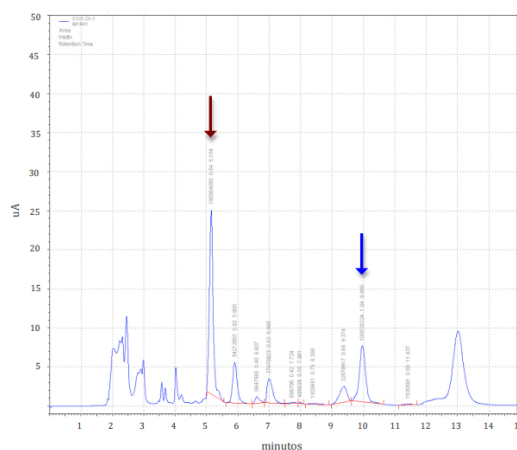


Figura 11. Cromatograma obtido por HPLC-ECD. A seta vermelha indica o pico relativo à GSH e a seta azul indica o pico relativo à GSSG.

2.2. Método da reciclagem enzimática

A determinação dos níveis de GSH e GSSG pelo método da reciclagem enzimática baseia-se na reação entre GSH e o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) resultando em 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB), que possui coloração amarela e é detectável a 412 nm, e GSSG. GSSG, por sua vez, pode ser reciclada a GSH pela enzima glutatona redutase (GR) na presença de NADPH. A **Figura 12** sumariza o processo.

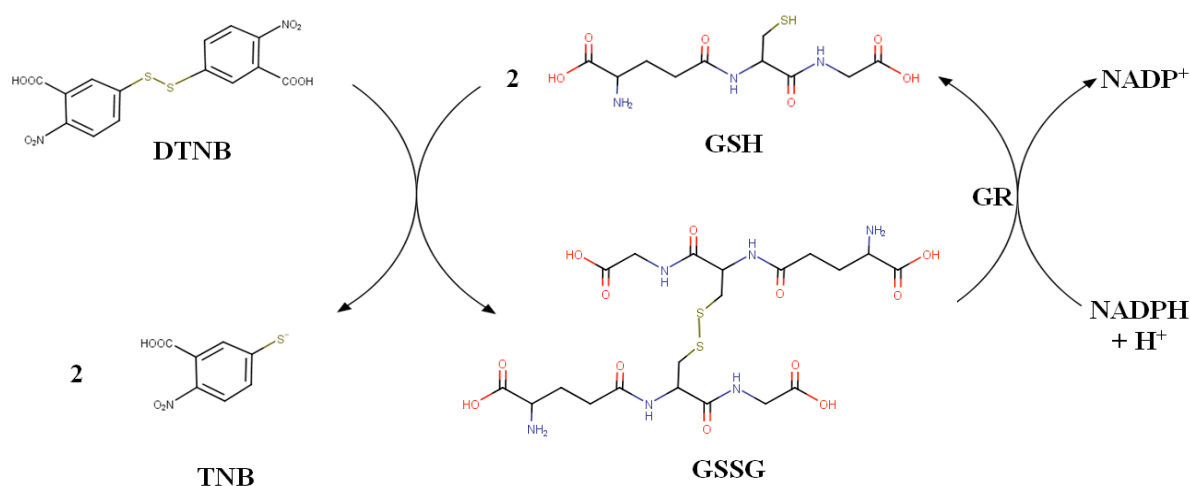


Figura 12. Sistema GSH-DTNB-GR. A reação entre GSH e o DTNB resulta em TNB, que possui coloração amarela e é detectável a 412 nm, e GSSG. A GSSG é, então, reciclada a GSH pela enzima glutatona redutase (GR) na presença de NADPH.

O experimento pode ser dividido em três fases: **(I)** quantificação da glutatona total; **(II)** quantificação de GSSG; **(III)** quantificação de GSH.

Para a quantificação de glutatona total, 10 μ L de cada amostra obtida após a lise celular foram incubados por 5 minutos com a solução para reação (100 mM de tampão fosfato (pH 7,0); 1 mM de EDTA; 0,25 mM de NADPH; 0,6 mM de DTNB e 1 U/mL de GR).

Para a determinação de GSSG, 50 μ L de cada amostra obtida após a lise celular foram incubados com 40 μ L de 2-vinilpiridina 0,5 M por uma hora. A 2-vinilpiridina é um alquilante que se liga ao grupo tiol de GSH e impede sua reação com o DTNB. Assim a reação entre GSH e DTNB só ocorre a partir da GSSG existente que foi reduzida pela ação da GR. Em seguida, o pH da reação foi ajustado (pH 7,0) e 10 μ L foram incubados por 5

minutos com a solução para reação (100 mM de tampão fosfato (pH 7,0); 1 mM de EDTA; 0,25 mM de NADPH; 0,6 mM de DTNB e 1 U/mL de GR).

Por fim, a quantificação da glutatona reduzida é possível pela diferença entre glutatona total e GSSG. Como no método anterior, foram feitas curvas de calibração para uso como padrões quantitativos.

3. MEDIÇÃO DOS NÍVEIS DE H₂O₂ EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS

3.1. Obtenção de mitocôndrias isoladas

Para verificar os níveis de H₂O₂ em mitocôndrias isoladas das linhagens BY4741 expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}, foi feito um crescimento inicial como descrito anteriormente (**Materiais e Métodos, Parte I, item 1.5**). Novo crescimento foi feito em 1 L de Meio Mínimo contendo galactose como fonte de carbono a 200 rpm por 24 horas a 30°C.

O isolamento de mitocôndrias foi feito com protocolo adaptado de GLICK & PON (1995). As células foram coletadas por centrifugação a 1000 x g por 5 min e 4 °C, lavadas com solução de sorbitol 1,2 M e novamente centrifugadas nas mesmas condições. Em seguida, o *pellet* celular foi pesado e ressuscitado com 3 mL/g de tampão de digestão (sorbitol 1,2 M; tampão fosfato de sódio pH 7,5 60 mM; EDTA 1 mM; 1% β-mercaptoetanol e 1 mg/mL de Zymoliase) e, após 2 horas de incubação a 37°C, os esferoplastos resultantes foram lavados com tampão A (sorbitol 1,2 M; tampão fosfato de sódio pH 7,5 20 mM) e centrifugados a 1000 x g por 10 minutos a 4°C. A etapa de lavagem foi feita duas vezes. Os esferoplastos foram ressuscitados com 3 mL/g de tampão SHE (sorbitol 0,6 M; HEPES pH 6,0 20 mM; EDTA 1 mM; PMSF 0,5 mM) e em seguida homogeneizados em agitador do tipo *potter* por 30 ciclos no gelo. A suspensão resultante (Extrato Total – ET) foi centrifugada a 1000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi submetido à centrifugação a 27000 x g por 10 minutos e a 4°C. O sobrenadante (S₂₇₀₀₀) foi reservado e o *pellet* resultante (P₂₇₀₀₀) contendo a fração de organelas membranosas foi ressuscitado em 20 mL de tampão SH (sorbitol 0,6 M; HEPES pH 6,0 20 mM), novamente centrifugado nas condições anteriores e ressuscitado com 500 µL de tampão SH. Os níveis proteicos das frações foram verificados por Bradford e os ajustes necessários foram feitos. Para verificar o correto isolamento da fração mitocondrial, foi feita uma corrida eletroforética das frações ET, P₂₇₀₀₀ e S₂₇₀₀₀. Em seguida foi feito um *Western blotting* utilizando anticorpo marcador para mitocôndrias, Por 1 (Porina) (Life Technologies) em diluição 1:5000.

3.2. Medição de H₂O₂ pela oxidação de Amplex Red™

A fração P₂₇₀₀₀ obtida foi monitorada por 10 minutos durante a oxidação de 50 µM de Amplex Red™ (Molecular Probes) na presença de 1,0 U/mL de HRP (peroxidase de raiz forte) (Sigma), com o uso de um fluorímetro (Cary 100 Bio, Varian), sob agitação constante, a 30°C. O produto formado, a resorufina, é resultado da oxidação do Amplex Red™ (**Figura 13**) e possui excitação a 563 nm e emissão a 587 nm. A reação era composta de suspensões de mitocôndrias (100 µg/mL) em tampão contendo 0,6 M de sorbitol, 20 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 0,5 mM de EDTA. Após a estabilização da reação com as mitocôndrias isoladas, Foi adicionado etanol 2% a fim de avaliar a produção de H₂O₂ em situação de incremento da taxa respiratória. Assim, a produção de H₂O₂ foi avaliada em duas situações diferentes.

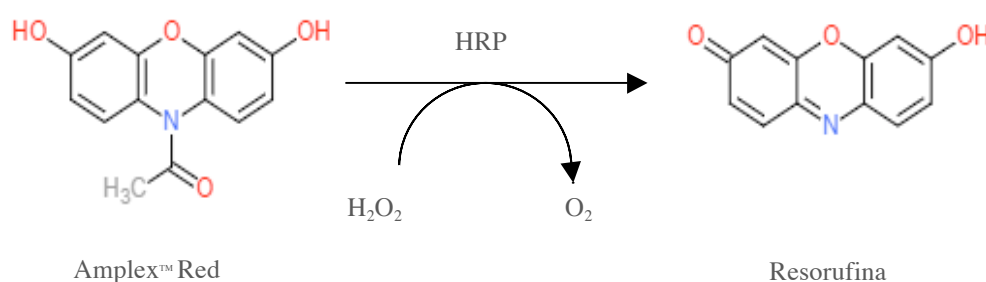


Figura 13. Oxidação do Amplex Red™. Na presença da enzima HRP e H₂O₂, o Amplex Red™ é oxidado a resorufina

Uma curva de calibração com quantidades conhecidas de H₂O₂ foi feita para uso como padrão quantitativo (**Figura 14**). Por fim, a partir das curvas obtidas calculou-se a quantidade de H₂O₂ produzido. A **Figura 15** exemplifica uma curva obtida.

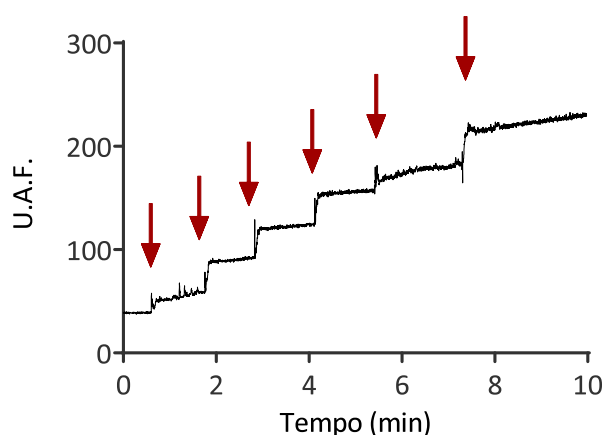


Figura 14. Curva de calibração com diferentes concentrações de H₂O₂. As setas indicam o ponto de acréscimo de H₂O₂. U.A.F.: unidades arbitrárias de fluorescência.

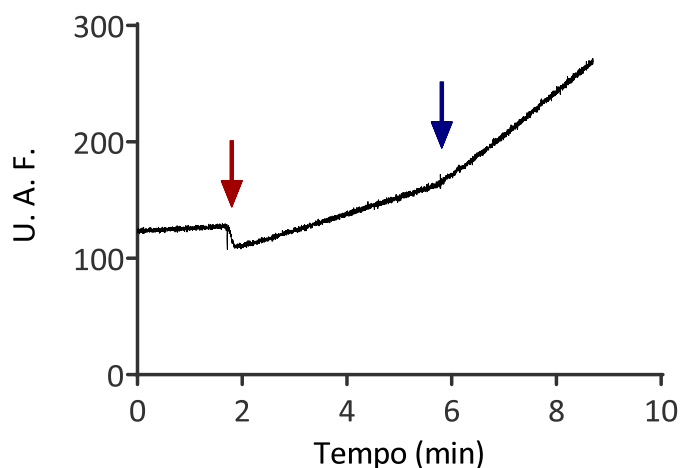


Figura 15. Curva de produção de H_2O_2 por mitocôndrias isoladas. A seta vermelha indica o momento de adição da suspensão contendo as mitocôndrias e a seta azul indica o momento da adição de etanol. U.A.F.: unidades arbitrárias de fluorescência.

4. VIABILIDADE E RAZÃO GSH/GSSG APÓS TRATAMENTO COM N-ACETIL-L-CISTEÍNA

Uma vez que a razão GSH/GSSG e os níveis de GSH se mostraram reduzidos nas linhagens expressando a proteína VAPB^{P56S}, procurou-se tratar as células com N-acetil-L-cisteína (NAC). Por ser um precursor de GSH, testou-se a viabilidade das células e a razão GSH/GSSG após o tratamento com NAC. Foram feitas diluições seriadas, curvas de crescimento e determinação de GSH/GSSG pelo método da reciclagem enzimática. As células tratadas NAC 5 mM e 10 mM.

PARTE III. AVALIAÇÃO DA PROTEOSTASE EM ELA8

1. ENSAIOS DE SENSIBILIDADE E VIABILIDADE APÓS INIBIÇÃO DO UPS E AUTOFAGIA

Inicialmente as linhagens $\Delta Pdr5$ e $\Delta Atg8$ foram transformadas com os plasmídeos contendo VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}. Pdr5 é um transportador que atua no efluxo de moléculas. Assim, linhagens nocaute para este gene são mais suscetíveis ao tratamento com drogas como o MG132, um inibidor do proteassomo (COLLINS *et al.*, 2010). Atg8 tem papel na autofagia, promovendo, uma vez lipídada por Atg7, a correta formação do autofagossomo. Linhagens nocaute para este gene não formam corretamente o autofagossomo e tem a macroautofagia inibida (XIE & KLIONSKY, 2007).

A expressão nas linhagens transformadas foi verificada em nível de RNA e proteína por RT-PCR e *Western blotting*, respectivamente, como descrito anteriormente.

Foram feitos ensaios com as linhagens transformadas a fim de verificar a viabilidade e a sensibilidade em situações de inibição do proteassomo, da autofagia e inibição conjunta. As linhagens $\Delta Pdr5$ e $\Delta Atg8$ expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} foram crescidas como descrito anteriormente (**Materiais e Métodos, Parte I, item 1.5**).

Para inibição somente do proteassomo, a linhagem $\Delta Pdr5$ foi tratada com 80 μ M de MG132 (Sigma Aldrich).

Para inibição somente da autofagia utilizou-se apenas a linhagem $\Delta Atg8$.

Para inibição conjunta do proteassomo e da autofagia, a linhagem $\Delta Pdr5$ foi tratada com 80 μ M de MG132 + 1 μ M de Bafilomicina A1 (Sigma Aldrich). A Bafilomicina A1 atua como inibidor da autofagia por impedir a fusão dos autofagossomos com lisossomos.

2. ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO PROTEICA (*CYCLOHEXIMIDE CHASE ASSAY*)

A Análise da degradação proteica foi feita com o protocolo adaptado de TRAN & BRODSKY (2012). O protocolo consiste em monitorar ao longo de tempos pré-definidos a degradação das proteínas avaliadas com o uso da cicloheximida, um bloqueador da tradução.

Foram testados os seguintes tratamentos:

1. Linhagens BY4741 expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S};

2. Linhagens $\Delta Pdr5$ expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S};
3. Linhagens $\Delta Pdr5$ expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} e tratamento com 80 μ M de MG132;
4. Linhagens $\Delta Atg8$ expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S};
5. Linhagens $\Delta Pdr5$ expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} e tratamento com 80 μ M de MG132 + 1 μ M de Bafilomicina A1.

As linhagens foram crescidas como descrito anteriormente (**Materiais e Métodos, Parte I, item 1.5**). Novo crescimento foi feito em Meio Mínimo com galactose como fonte de carbono a 200 rpm e 30°C por 8 horas.

Aproximadamente 5 OD₆₀₀ de células foram coletadas por centrifugação a 1000 x g por 5 minutos e ressuspendidas em Meio Mínimo com glicose a uma concentração final de 1 OD₆₀₀/mL. Para cada linhagem, alíquotas de 1 mL foram retiradas e tratadas com 30 μ L de Azida de Sódio 0,5 M e ao restante da suspensão foi acrescentada a cicloheximida para uma concentração final de 200 μ g/mL e os inibidores ou indutores desejados. A suspensão foi mantida sob agitação e temperatura constantes (200 rpm e 30°C). O uso combinado de cicloheximida e Meio Mínimo contendo glicose se deu para garantir que não houvesse síntese das proteínas VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}. As alíquotas retiradas foram centrifugadas a 15000 x g por 1 minuto a 4°C, seu sobrenadante foi removido e o *pellet* restante foi congelado ficou sob agitação contínua a 200 rpm e 30°C. Esta primeira alíquota constituiu o tempo zero de avaliação. O mesmo procedimento foi repetido 3, 6 e 12 horas após a adição da cicloheximida. A **Figura 16** sumariza o processo.

Os *pellets* congelados foram ressuspendidos em 100 mL de tampão de amostra Laemmli 5x. As amostras foram fervidas com 1 mM de DTT e aplicadas em géis de poliacrilamida. A corrida eletroforética e *Western blotting* foram feitos como descrito anteriormente. Foram utilizados os anticorpos anti-VAPB e anti-Pgk1 (*loading control*) para a detecção das proteínas de interesse. As imagens obtidas foram analisadas utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

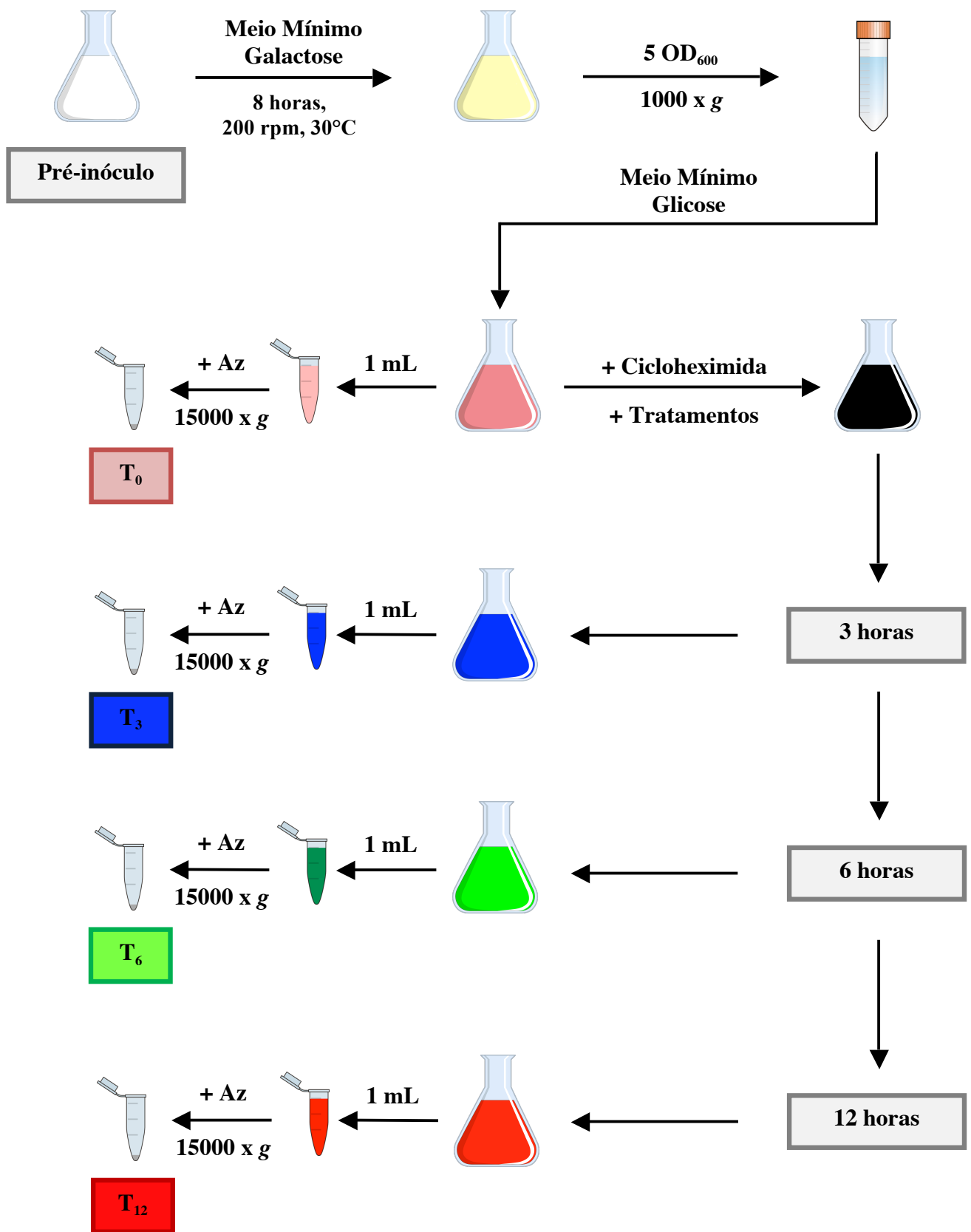


Figura 16. Análise da degradação proteica. O método foi adaptado de TRAN & BRODSKY (2012).

3. MEDIÇÃO DA ATIVIDADE DO PROTEASSOMO

A atividade do proteassomo foi medida a partir do extrato celular das linhagens BY4741 expressando VAPB^{WT} ou VAPB^{P56S} e $\Delta Pdr5$ expressando VAPB^{WT} ou VAPB^{P56S}, bem como nas linhagens controle. As células foram crescidas como descritos anteriormente (**Materiais e Métodos, Parte I, item 1.5**). Novo crescimento foi feito em Meio Mínimo em galactose como fonte de carbono a 200 rpm e 30°C por 8 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 1000 x g por 5 minutos. Os *pellets* formados receberam igual volume de tampão PBS 1X e *beads* de vidro e foram vortexadas por 20 minutos a 4°C, a fim de romper as células. O extrato foi centrifugado a 16000 x g por 40 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, a concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford e 25 µg de proteínas foram incubados com 120 mM do substrato Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha), específico para a atividade quimotripsina, que pode ser detectado nos comprimentos de onda 380 nm (excitação) e 460 nm (emissão). Este aumento na fluorescência ocorre devido a clivagem de AMC pelo proteassomo. A atividade foi monitorada por 45 minutos em fluorímetro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) a 37°C.

4. MARCAÇÃO DAS PROTEÍNAS UBIQUITINADAS E DAS SUBUNIDADES DO PROTEASSOMO

Para avaliar o *pool* de proteínas ubiquitinadas e a detecção das subunidades do proteassomo nas linhagens BY4741 expressando VAPB^{WT} ou VAPB^{P56S} e na linhagem controle, 50 µg de proteínas do extrato proteico obtido para a medição da atividade do proteassomo foram submetidos à corrida eletroforética em SDS-PAGE e *western blotting*, conforme descrito anteriormente. Foram utilizados os anticorpos anti-Ub K48 (Merk) (diluição 1:1000), que marca especificamente a ligação no resíduo de lisina 48, anti-Rpt4 (Merk) (diluição 1:1000), uma unidade regulatória do proteassomo 19S, anti- $\alpha 3$ e anti- $\alpha 4$ (Santa Cruz) (diluição 1:1000), duas subunidades do proteassomo 20S, anti- $\beta 1$ e anti- $\beta 7$ (Merk) (diluição 1:500), duas subunidades do proteassomo 20S e anti-Pgk1 (diluição 1:10000) como *loading control*. As imagens obtidas foram analisadas utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

5. MONITORAMENTO DA AUTOFAGIA PELA FUSÃO GFP-ATG8

Para monitorar os níveis de autofagia, as linhagens BY4741 expressando VAPB^{WT} ou VAPB^{P56S} e a linhagem controle receberam o plasmídeo centromérico pCuGFPATG8415, que está sob controle do promotor CUP1. Este plasmídeo contém os genes que codificam a proteína Atg8 fusionada à GFP. Assim, a expressão de Atg8 fusionada à GFP funciona como marcador para a autofagia porque a Atg8, no processo de formação do autofagossomo, é clivada no vacúolo da levedura. Quando fusionada à GFP esta clivagem libera apenas a proteína fluorescente, que é resistente à degradação pelas proteases vacuolares. Desta maneira, a presença de níveis maiores de GFP livre do que fusionada à Atg8 detectada por *Western blotting* indica aumento do processo autofágico.

O extrato proteico das linhagens avaliadas foi obtido como descrito anteriormente (**Materiais e Métodos, Parte I, item 2.3**). Foi feita uma corrida eletroforética do extrato e um *Western blotting* utilizando anticorpo anti-GFP (Sigma) em diluição de 1:2000. As imagens obtidas foram analisadas utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

6. AVALIAÇÃO DA UPR E ESTRESSE DO RE POR *SPLICING* ALTERNATIVO DE *HAC1*

A amplificação dos transcritos de *Hac1* é utilizada como um marcador de UPR e estresse do RE. O *splicing* de *Hac1* ocorre por intermédio de Ire1 de forma não canônica. Desta forma, é possível avaliar a presença da forma longa (^U*Hac1*) – 651 pb – e da forma processada (^S*Hac1*) – 450 pb – deste marcador.

Para verificar os níveis de transcritos de *Hac1* nas linhagens, foi feita a extração de RNA total e a síntese de cDNA, conforme descrito anteriormente, para as linhagens BY4741, $\Delta Scs2$, $\Delta Atg8$ e $\Delta Pdr5$ expressando as proteínas humanas selvagem ou mutante e seus controles. A reação de amplificação foi feita como descrito na **Tabela 09**. O programa utilizado para a amplificação consistiu de uma etapa inicial de desnaturação à 94°C por 2 minutos, seguidos de 22 ciclos de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (54°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 60 segundos). Para garantir a completa extensão do DNA sintetizado foi acrescentada uma etapa a 72°C por 10 minutos ao final do programa. Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% e as imagens obtidas foram analisadas utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

Tabela 09. Reagentes utilizados para a amplificação dos transcritos de *Hac1*

Reagentes	Vol (μ L)
cDNA (1 μ g/ μ L)	2
<i>primer</i> F (5'-TACAGGGATTTCAGAGCACG -3') - (10 μ M)	1
<i>primer</i> R (5'-TGAAGTGATGAAGAAATCATTCAATTC-3') - (10 μ M)	1
dNTP mix (10 mM)	1,5
10X PCR <i>Buffer</i>	5
MgCl ₂ 50mM	1,5
Taq DNA Polimerase (5 U/L)	0,5
Água ultrapura	37,5

7. ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES DE ESTRESSE DO RE POR qRT-PCR

Utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foram analisadas a expressão dos genes *Pdi1*, *Ero1*, *Lhs1* e *Kar2*. Os genes *Act1* e *Taf10* foram utilizados como *housekeeping genes*.

As enzimas *Pdi1* e *Ero1* atuam na formação de pontes dissulfeto nas proteínas no RE e os níveis de expressão destas proteínas são comumente utilizados como marcadores do estresse do RE e de UPR. De modo semelhante, *Lhs1* e *Kar2* são marcadores do estresse do RE e UPR. O primeiro por ser uma das chaperonas mais abundantes do RE e o segundo por ser um componente essencial da UPR.

A partir do cDNA obtido das linhagens BY4741 controle e expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} foram feitas as etapas de padronização do procedimento.

A concentração mínima ideal de *primer* para uma reação eficiente é aquela em que o gene de interesse obtém o menor valor de Ct (ciclo threshold), maior Δ Rn (variação de fluorescência) e não apresenta a formação de dímeros. Assim, foram testadas 3 concentrações diferentes para cada *primer* (*Forward* ou *Reverse*) (100 nM, 150 nM e 300 nM) através de uma análise de curva de dissociação.

As sequências dos *primers* utilizados estão descritas na **Tabela 10**.

As reações continham 6 μ L de SYBR *Fast Green Master mix* (Applied Biosystems), 3 μ L de mix de *primers* e 3 μ L de mix de cDNA e foram feitas no sistema de detecção Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems) em triplicata. Os resultados das amplificações e das curvas de dissociação foram analisados com o auxílio do *software* 7500 System SDS v. 1.2 (Applied Biosystems) e a concentração ideal de cada par de *primer* foi escolhida.

Tabela 10. *Primers* utilizados para qRT-PCR

Gene	Primers	Referência
<i>Pdi1</i>	F: 5'- AGTTATCGTCCAATCCGGTAAG -3' R: 5'- GCGGAGGGCAAGTAAATAGA -3'	Este trabalho
<i>Ero1</i>	F: 5'- AACGCCGTTCTGATTGATTT -3' R: 5'- GATTCACCAGTTTCGCCAAT -3'	De Souza <i>et al.</i> (2014)
<i>Lhs1</i>	F: 5'- TAACCACAGGAATCGAAGAG -3' R: 5'- TTGGTTGATTTTTGCTAAGG -3'	Este trabalho
<i>Kar2</i>	F: 5'- TGACAACCAACCAACCGTTA -3' R: 5'- TACACCTCTTGGTGCTGGTG -3'	De Souza <i>et al.</i> (2014)
<i>Act1</i>	F: 5'- TTCCCAGGTATTGCCGAAA -3' R: 5'- TTGTGGTGAACGATAGATGGA -3'	De Souza <i>et al.</i> (2014)
<i>Taf10</i>	F: 5'- ATATTCCAGGATCAGGTCTTCCGTAGC -3' R: 5'- TAGTCTTCTCATTCTGTTGATGTTGTTGTTG -3'	Teste <i>et al.</i> (2009)

Foi determinada, então, a eficiência da reação. Esta etapa da padronização tem por objetivo encontrar o ponto (Ct) em que a reação de qPCR é 100% eficiente. Para isso, foram feitas diferentes diluições dos cDNAs das amostras a fim de testar a eficiência da amplificação com estas quantidades conhecidas de cDNA. Foram construídos gráficos de dispersão log da quantidade X Ct das amostras e a partir das curvas obtidas determinou-se a eficiência da reação segundo a fórmula

$$\text{Eficiência} = 10^{(-1/\text{slope})}$$

onde o *slope* é o valor da inclinação da reta. Considera-se admissível uma variação de 10% deste valor, ou seja, a eficiência deve estar entre 1,8 e 2,2. As reações foram feitas como descrito anteriormente para a concentração de *primer* já definida.

Uma vez determinadas as concentrações mínimas de *primer* e cDNA e a eficiência da reação, foram feitas as quantificações dos transcritos de cada gene avaliado segundo as reações já descritas e utilizando os parâmetros definidos nas etapas de padronização. Os valores foram normalizados em relação à expressão dos *housekeeping genes*.

Foram calculados o ΔCt (Ct médio do gene avaliado – Ct médio do *housekeeping gene*), o $\Delta\Delta Ct$ (ΔCt obtido para um tratamento - ΔCt obtido no controle) e a expressão final relativa ao controle pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

8. VIABILIDADE APÓS AUMENTO NA EXPRESSÃO DE TSA1

A atividade chaperona de Tsa1 tem sido evidenciada no manutenção da proteostase celular (HAZÉN *et al.*, 2016; KAYA *et al.*, 2014; MACDIARMID *et al.*, 2013; IRAQUI *et al.*, 2009; WEIDS & GRANT, 2014). Assim, para avaliar um possível papel da enzima Tsa1 na proteostase no modelo construído, as linhagens BY4741 expressando VAPB^{WT} ou VAPB^{P56S} e a linhagem controle foram transformadas com o plasmídeo pCEV-G1-Ph expressando Tsa1 sob o controle do promotor constitutivo TEF1 e com seleção pela droga fleomicina (40 $\mu\text{g/ml}$) (KAYA *et al.*, 2014).

A expressão de Tsa1 foi verificada por *Western blotting*, como descrito anteriormente, utilizando o anticorpo anti-Tsa1 produzido no laboratório do Dr. Sue Goo Rhee (CHAE *et al.*, 1993) em diluição 1:1000. As imagens obtidas foram analisadas utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

Foram feitas curvas de crescimento e diluições seriadas a fim de avaliar a viabilidade das células após o aumento da expressão de Tsa1. Os experimentos foram feitos em triplicata.

Finalmente, para verificar o estado de oxidação de Tsa1, as linhagens foram crescidas como descritos anteriormente e a lise celular foi feita utilizando *beads* de vidro e Ácido Tricloroacético 50% com 50 mM do agente alquilante NEM e sem o uso DTT. O extrato obtido foi submetido à corrida eletroforética em SDS-PAGE e a detecção por *Western blotting* foi feita com o anticorpo anti-Tsa1.

IV. RESULTADOS

A seção Resultados, de maneira semelhante, foi dividida em três partes: Parte I, Construção do modelo de *S. cerevisiae* para ELA8, Parte II, Avaliação de parâmetros do estado redox em ELA8, e Parte III, Avaliação da proteostase em ELA8.

PARTE I. CONSTRUÇÃO DE UM MODELO DE *S. CEREVISIAE* PARA ELA8

1. Clonagem gênica, fusão à GFP e níveis de expressão de VAPB

A construção das linhagens BY4741 VAPB^{WT} e BY4741 VAPB^{P56S} foi realizada por Bruno Brasil Horta durante seu pós-doutoramento em nosso laboratório; enquanto as linhagens BY4741 GFP-VAPB^{WT} e BY4741 GFP-VAPB^{P56S} foram feitas por mim em colaboração com o aluno de iniciação científica Eduardo Tassoni Tsuchida. A verificação da correta clonagem dos genes *VAPB*^{WT} e *VAPB*^{P56S} e de sua fusão à GFP foi feita por sequenciamento gênico dos plasmídeos obtidos. Após confirmação, foi feita a transformação das linhagens BY4741 pelo método do Acetato de Lítio, adaptado de SCHIESTL & GIETZ. (1989). Assim, foram obtidas 6 linhagens de trabalho (**Tabela 11**).

Tabela 11. Linhagens de trabalho I

Nome da linhagem	Descrição
BY4741 pYES	Linhagem controle
BY4741 VAPB ^{WT}	Linhagem expressando VAPB ^{WT}
BY4741 VAPB ^{P56S}	Linhagem expressando VAPB ^{P56S}
BY4741 pYES-GFP	Linhagem expressando GFP
BY4741 GFP-VAPB ^{WT}	Linhagem expressando VAPB ^{WT} fusionada à GFP no N-terminal
BY4741 GFP-VAPB ^{P56S}	Linhagem expressando VAPB ^{P56S} fusionada à GFP no N-terminal

As linhagens obtidas foram estocadas a -80°C em solução de glicerol 20%. Para a realização dos experimentos, as linhagens foram transferidas para placas de Petri contendo Meio Mínimo com glicose como fonte de carbono e mantidas assim por até 1 mês a 4°C. Periodicamente novas placas foram feitas a partir do estoque.

A fim de verificar o nível de transcritos de *VAPB*^{WT} e *VAPB*^{P56S} na linhagem BY4741, foi feita a extração do RNA total das células após 8 horas de indução em galactose, a síntese de cDNA e amplificação com *primers* específicos para *VAPB* e *Act1* (*loading control*).

A **Figura 17** mostra que a linhagem BY4741 recebeu corretamente os plasmídeos contendo *VAPB*^{WT} ou *VAPB*^{P56S} e os níveis de transcritos são semelhantes, apontando não haver diferença de expressão de *VAPB*^{WT} e *VAPB*^{P56S} em nível de RNA.

A determinação da expressão em nível de proteína foi feita após a indução por 8 horas em meio de cultura contendo galactose como fonte de carbono após crescimento prévio em

glicose (**Figura 18**). O extrato celular total obtido após a lise alcalina foi normalizado pelo método de Bradford e foram aplicados 20 μ g de proteína no SDS-PAGE. Foram utilizados os anticorpos para a proteína VAPB, na diluição 1:5000, e para a proteína Pgk1 (*loading control*), na diluição 1:10000. Como esperado, observou-se a expressão de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} somente após tratamento com galactose.

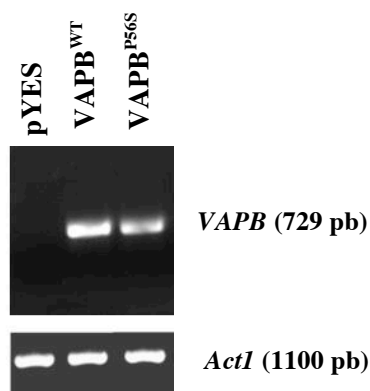


Figura 17. Níveis de transcritos de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} na linhagem BY4741. A amplificação foi feita utilizando *primers* específicos para VAPB e Actina, que foi utilizada como *loading control*.

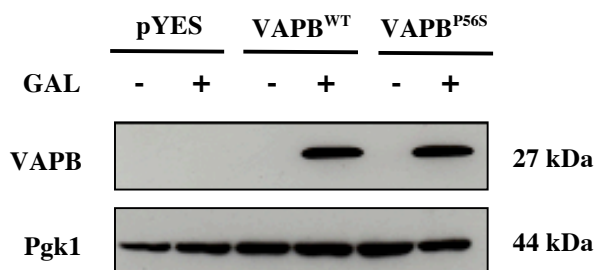


Figura 18. Expressão de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} na linhagem BY4741. A indução em galactose foi feita por 8 horas após crescimento prévio em glicose. Os anticorpos anti-VAPB e anti-Pgk1 foram utilizados nas diluições 1:5000 e 1:10000 respectivamente.

A determinação do tempo de indução ótimo para a expressão de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} foi feita por *Western blotting*. Foram testadas induções por 4, 8, 10 e 12 horas em meio de cultura contendo galactose como fonte de carbono (**Figura 19**). Foram aplicados 20 μ g de proteína no SDS-PAGE e os anticorpos utilizados, anti-VAPB e anti-Pgk1, foram incubados nas mesmas condições anteriores. A partir dos resultados obtidos por RT-PCR e *Western blotting* optou-se por padronizar a indução em galactose em 4 horas para experimentos de

microscopia e 8 horas para os demais experimentos.

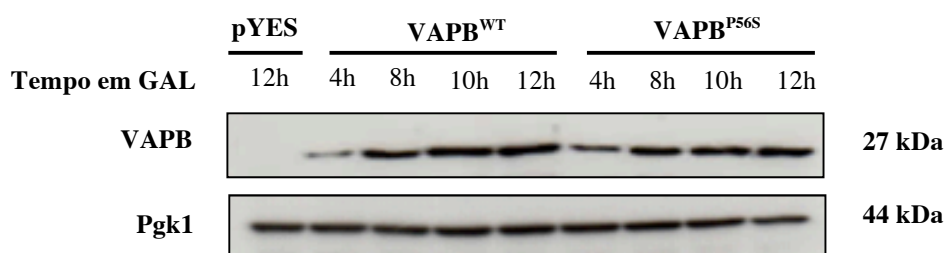


Figura 19. Tempo de indução ótimo para a expressão de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}. A expressão de VAPB foi testada após indução por 4, 8, 10 e 12 horas em meio de cultura contendo galactose como fonte de carbono. Os anticorpos anti-VAPB e anti-Pgk1 (*loading control*) foram utilizados nas diluições 1:5000 e 1:10000 respectivamente.

As determinações das expressões das proteínas VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} fusionadas à GFP foram feitas após a indução por 8 horas em meio de cultura contendo galactose como fonte de carbono após crescimento prévio em glicose (**Figura 20**). A partir de um mesmo extrato celular, foram feitas marcações com anticorpo anti-VAPB (**Figura 20 A**) e anti-GFP (**Figura 20 B**).

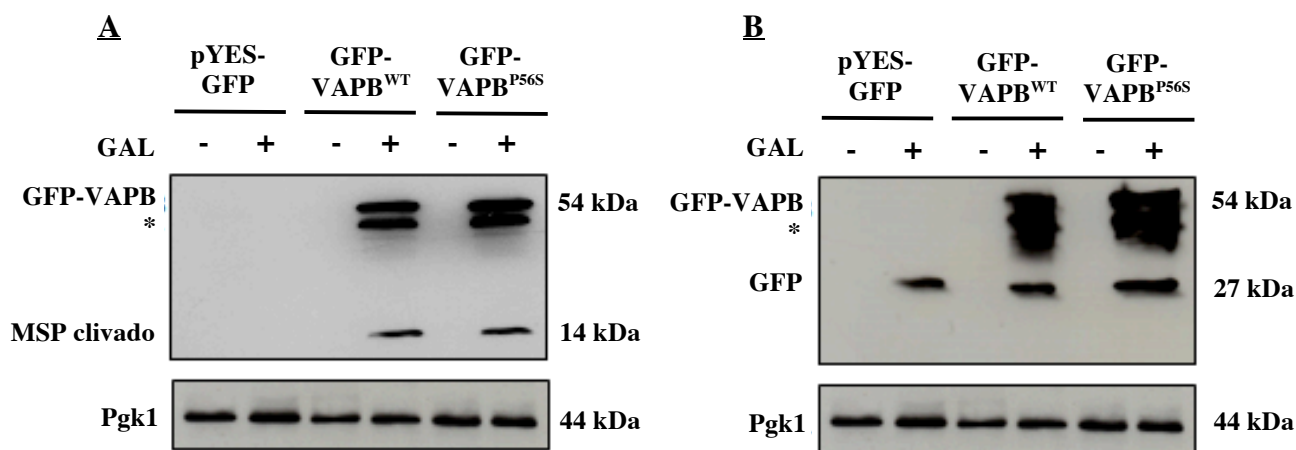


Figura 20. Expressão das proteínas fusionadas à GFP na linhagem BY 4741. A partir de um mesmo extrato foi feito o tratamento com anticorpo anti-VAPB (**A**) ou anti-GFP (**B**). O tamanho esperado da fusão, bem como GFP e domínio MSP livres estão indicados. Marcações inespecíficas (*) são possíveis produtos de clivagens parciais das fusões GFP-VAPB^{WT} e GFP-VAPB^{P56S}.

Observa-se, quando há tratamento com anti-VAPB, as bandas relativas à fusão GFP-

VAPB (54 kDa), ao domínio MSP (14 kDa) e, provavelmente, ao produto de uma clivagem parcial da fusão (simbolizado por “*”). Em 20 B, após incubação com anti-GFP, observam-se as fusões nas mesmas alturas (54 kDa) e a presença de GFP livre nas linhagens controle e expressando VAPB^{WT} ou VAPB^{P56S}. Nos dois últimos casos, a presença de GFP livre é um indicativo de haver algum mecanismo de degradação proteica ocorrendo em ambas as situações. GFP e MSP parecem ser resistentes a essa degradação proteica, enquanto a clivagem do domínio MSP parece inibida na linhagem que expressa VAPB^{P56S}.

2. Localização de VAPB e verificação da formação de agregados

A localização das proteínas VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} foi investigada por fracionamento celular (**Figura 21**) e microscopia de fluorescência (**Figuras 22, 23 e 24**).

Utilizando o fracionamento celular, adaptado de RIEDER & EMR (2001), foram obtidas 6 frações: ET, composta pelo extrato total, P₁₀₀₀, contendo células não lisadas, agregados e núcleos, S₁₀₀₀, contendo as organelas celulares, P₂₇₀₀₀, contendo organelas membranosas totais, S₂₇₀₀₀, contendo o citoplasma e F₁₀₀₀₀₀, contendo o RE isolado.

Observa-se na **Figura 21 A** que a proteína VAPB^{WT} íntegra está presente nas frações P₂₇₀₀₀ e F₁₀₀₀₀₀. Além disso, o domínio MSP livre está presente nas frações ET, P₁₀₀₀, S₁₀₀₀, P₂₇₀₀₀, S₂₇₀₀₀, mas não na fração reticular F₁₀₀₀₀₀. Os marcadores atestam que o fracionamento separou os compartimentos celulares como esperado, com um mínimo de contaminação entre as frações. Em **21 B** observa-se a proteína VAPB^{P56S} em todas as frações, com exceção de S₂₇₀₀₀, referente ao citoplasma, o que sugere uma distribuição diversa, preponderante em compartimentos com maior hidrofobicidade. A forte presença na fração contendo agregados, P₁₀₀₀, e a grande quantidade de bandas acima da marcação de 27 kDa, tamanho esperado para VAPB, são evidências de haver agregação proteica de VAPB^{P56S} em diferentes níveis.

Para a obtenção de imagens de microscopia de fluorescência, foram utilizadas as linhagens expressando as proteínas VAPB fusionadas à GFP (**Figuras 22, 23 e 24**). Os filtros FITC e DAPI foram utilizados para captar a fluorescência de GFP e do marcador *ER Tracker Blue-White DPX*, respectivamente. As linhagens foram crescidas em meio contendo glicose ou galactose como fonte de carbono. Na linhagem controle, pYES-GFP, não houve expressão de GFP nas células crescidas em meio contendo glicose como fonte de carbono, mas apenas a fluorescência intrínseca de *S. cerevisiae*. Quando houve indução por galactose, a expressão de GFP apresentou uma distribuição dispersa pelo citoplasma da célula (**Figura 22**).

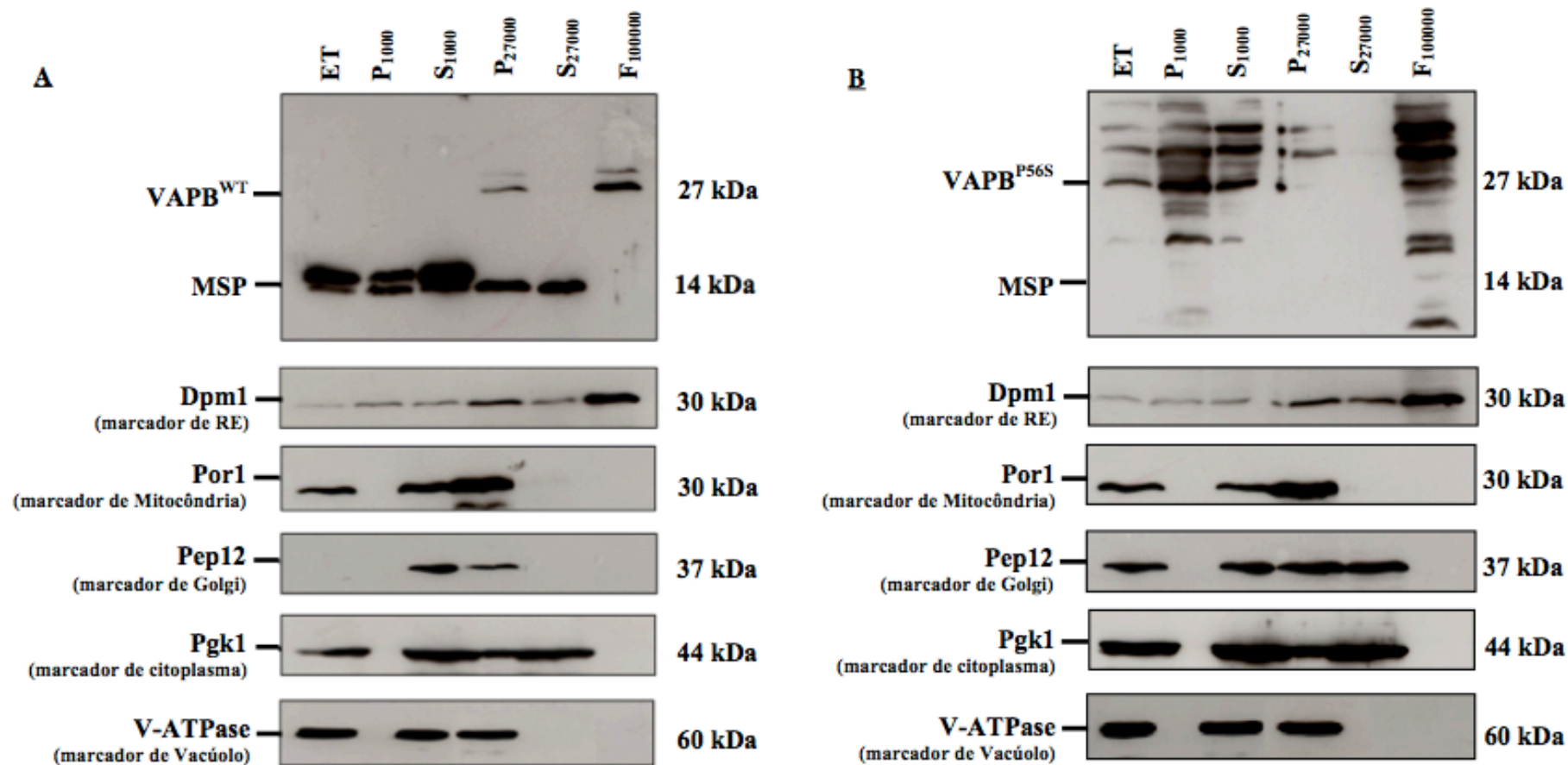


Figura 21. Fracionamento celular nas linhagens BY4741 VAPB^{WT} e BY4741 VAPB^{P56S}. Foram obtidas 6 frações: ET, composta pelo extrato total, P₁₀₀₀, contendo células não lisadas, agregados e núcleos, S₁₀₀₀, contendo as organelas celulares, P₂₇₀₀₀, contendo organelas membranosas totais, S₂₇₀₀₀, contendo o citoplasma e F₁₀₀₀₀₀, contendo o RE isolado. **(A)** Frações das linhagens BY4741 VAPB^{WT}. **(B)** Frações das linhagens BY4741 VAPB^{P56S}. Foram utilizados os anticorpos anti-VAPB, anti-porina (marcador de mitocôndria), anti-pep12 (marcador de aparelho de golgi), anti-Pgk1 (marcador de citoplasma) e anti-V-ATPase (marcador de vacúolo).

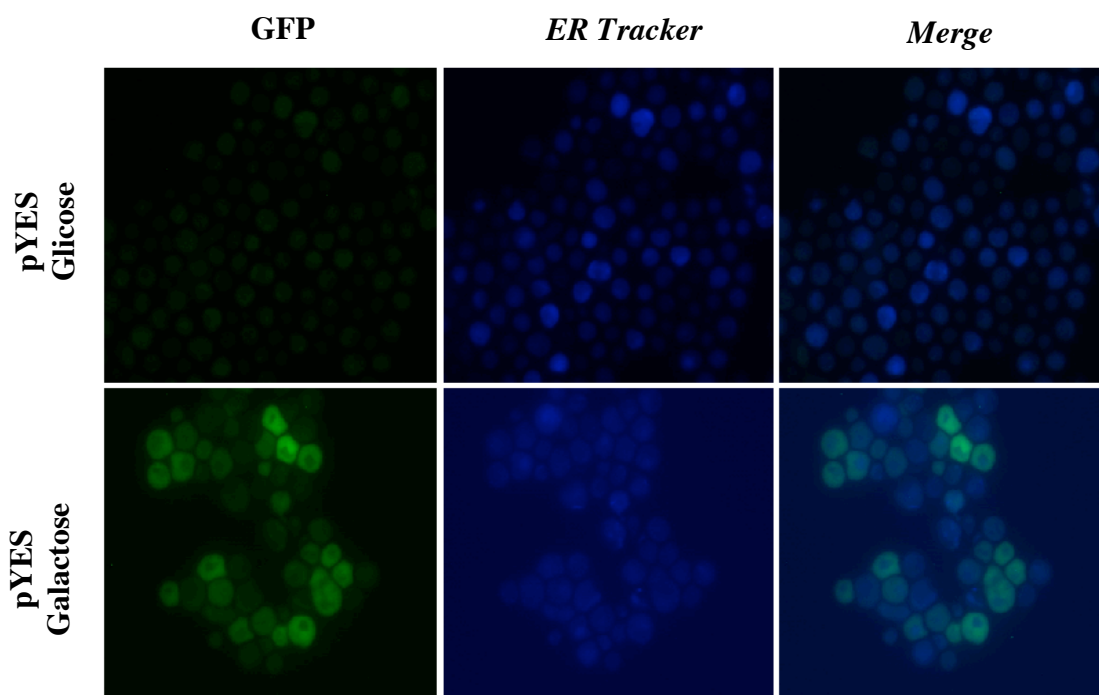


Figura 22. Microscopia de fluorescência da linhagem controle. Células controle expressando apenas GFP foram crescidas em meio contendo glicose ou galactose como fonte de carbono. As emissões das fluorescências de GFP e do *ER Tracker Blue-White DPX* foram detectadas a 510 nm e 450 nm respectivamente.

Nas linhagens expressando a fusão GFP-VAPB^{WT} ocorre provável colocalização da proteína humana com o marcador do RE (**Figura 23**). Em leveduras, o retículo endoplasmático possui, comumente, distribuições perinuclear e cortical (PREUSS *et al.*, 1991). Essas imagens são consistentes com uma distribuição celular mais específica e concentrada no RE, corroborando os dados obtidos por fracionamento celular (**Figura 21A**).

As células expressando a fusão GFP-VAPB^{P56S} apresentam, além da provável colocalização da proteína mutante com o marcador de RE, um grande número de grânulos, consistente com a formação de agregados distribuídos por toda a célula (**Figura 24**). Estes dados, aliados àqueles obtidos por fracionamento celular, sugerem fortemente a localização difusa de VAPB^{P56S} na levedura e, ainda, em diferentes estágios de agregação.

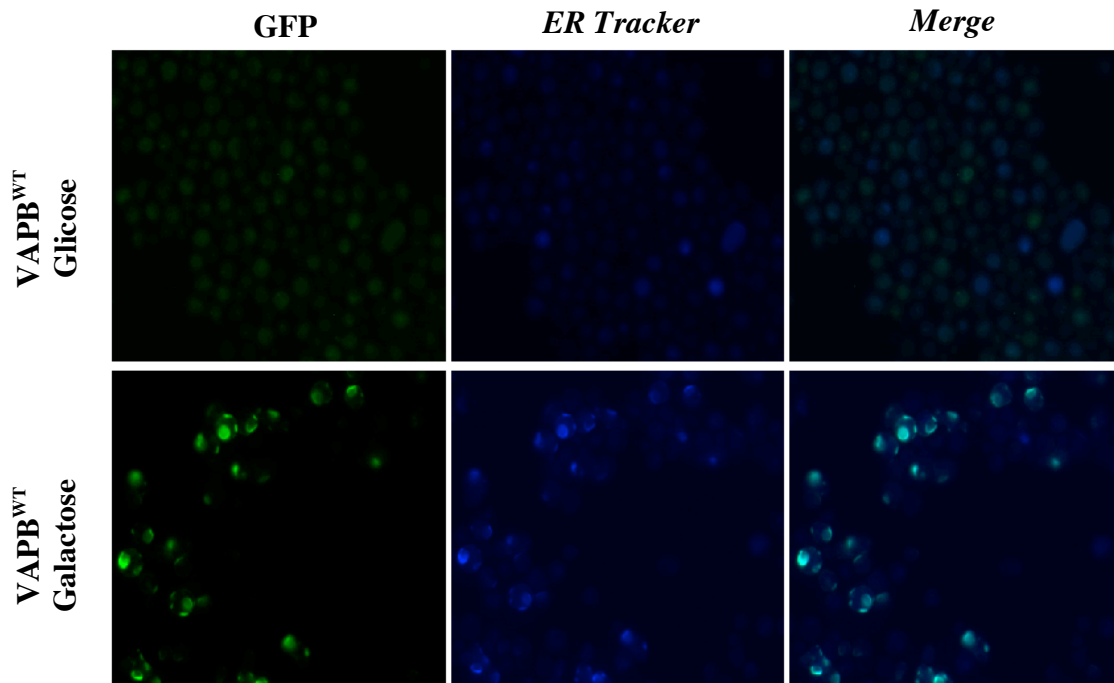


Figura 23. Microscopia de fluorescência da linhagem expressando GFP-VAPB^{WT}. Células expressando GFP-VAPB^{WT} foram crescidas em meio contendo glicose ou galactose como fonte de carbono. As emissões das fluorescências de GFP e do *ER Tracker Blue-White DPX* foram detectadas a 510 nm e 450 nm respectivamente.

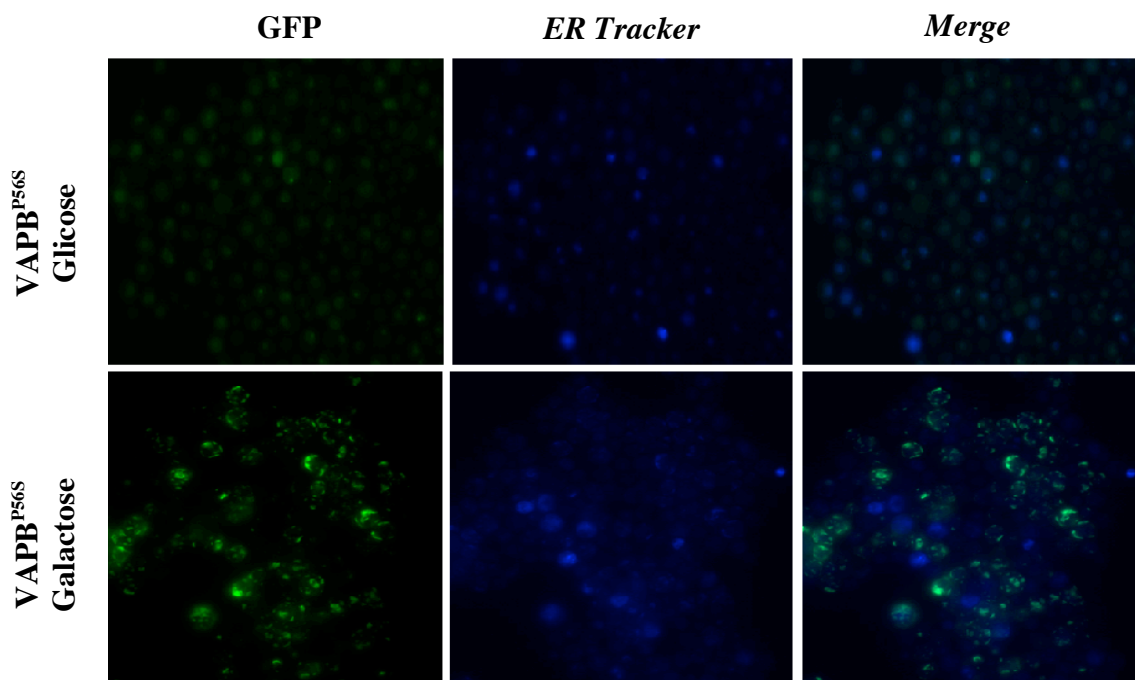


Figura 24. Microscopia de fluorescência da linhagem expressando GFP-VAPB^{P56S}. Células expressando GFP-VAPB^{P56S} foram crescidas em meio contendo glicose ou galactose como fonte de carbono. As emissões das fluorescências de GFP e do *ER Tracker Blue-White DPX* foram detectadas a 510 nm e 450 nm respectivamente.

2.5.3 Viabilidade das células expressando VAPB

A viabilidade das linhagens BY4741 expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} foi avaliada por meio de diluições seriadas e curvas de crescimento (**Figura 25**). Todos os experimentos foram conduzidos em triplicada e os valores apresentados nas curvas se referem às médias obtidas.

Nos ensaios de diluição seriada, alíquotas de 5 µL das diluições 1, 1/10, 1/100, 1/1000 e 1/10000, feitas a partir de um pré-inóculo com OD₆₀₀ = 1, foram crescidas em placas contendo Meio Mínimo com glicose (**Figura 25 A**) ou galactose (**Figura 25 B**) como fonte de carbono. Observa-se que as linhagens em glicose apresentaram crescimento semelhante, o que era esperado, uma vez que o promotor GAL1 é fortemente reprimido por glicose. No crescimento em galactose a linhagem expressando a proteína mutante apresentou menor viabilidade comparada com o controle e com a linhagem expressando a proteína selvagem. Nota-se, também, uma leve diminuição de viabilidade da linhagem expressando a proteína selvagem em relação ao controle. Isso pode ocorrer devido à própria natureza do promotor GAL1, que sendo um promotor forte que induz superexpressão, leve a uma sobrecarga da maquinaria celular, ou devido a uma toxicidade inerente a VAPB^{WT}.

Para o ensaio de curva de crescimento, a OD₆₀₀ foi medida nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas de crescimento em Meio Mínimo com glicose (**Figura 25 C**) ou galactose (**Figura 25 D**) como fonte de carbono. À semelhança dos resultados observados nos ensaios de diluição seriada, o crescimento em glicose reprime a expressão das proteínas humanas e, por consequência, não há fenótipo diferencial evidente, enquanto nas linhagens crescidas em galactose a expressão de VAPB^{P56S} leva à diminuição da viabilidade. A OD₆₀₀ final alcançada por cada linhagem foi expressa em relação ao controle (**Figuras 25 E e 25 F**) e, em galactose, a expressão da proteína mutante limita o crescimento da linhagem a aproximadamente 60% da OD₆₀₀ atingida pelo controle. Os dados estão expressos como média ± SEM de três experimentos diferentes. As análises estatísticas foram feitas usando ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey.

A partir dos dados obtidos, é possível afirmar que a expressão da proteína mutante altera a viabilidade do modelo e sugerem um possível ganho de função tóxica.

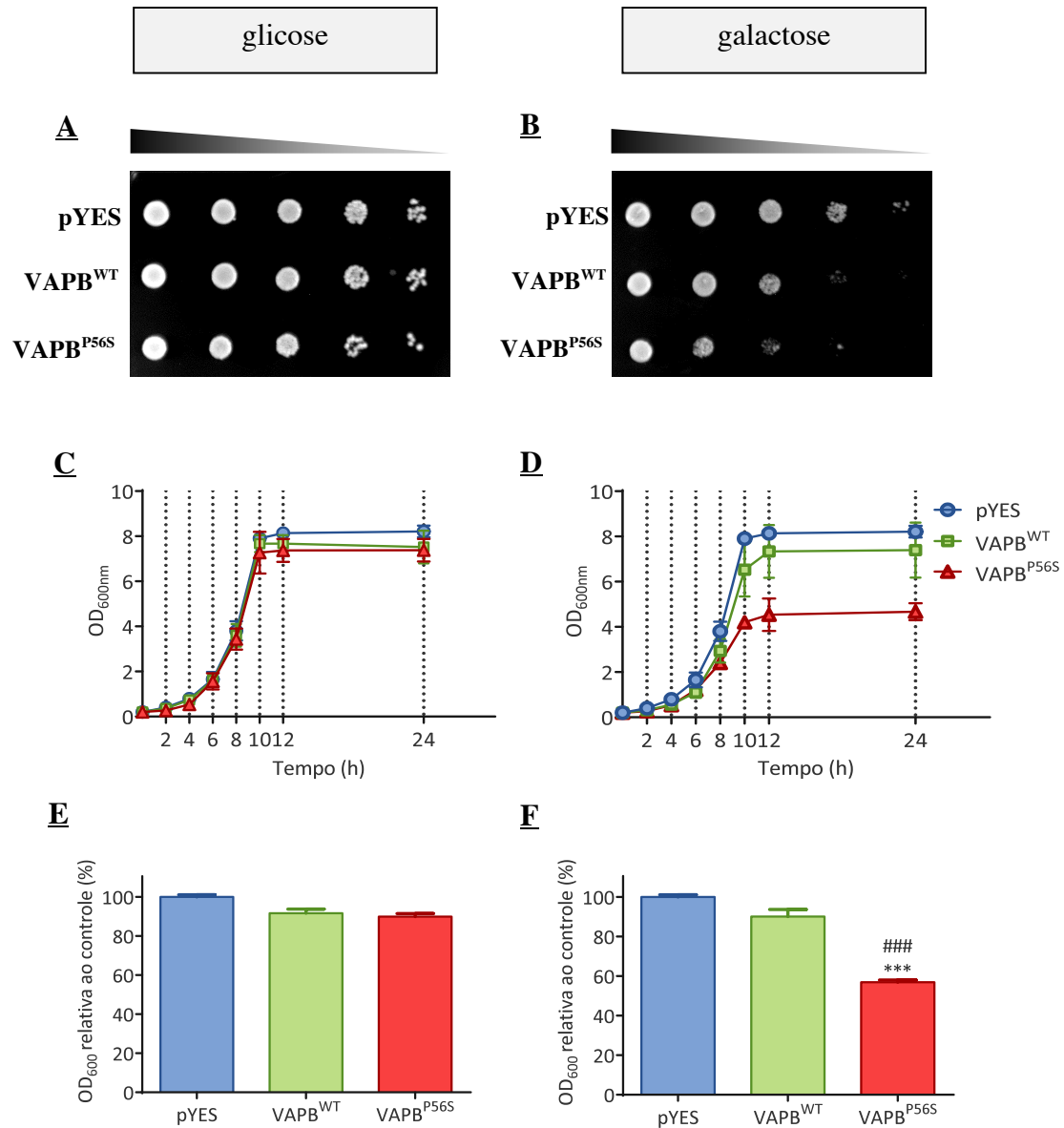


Figura 25. Viabilidade das linhagens BY4741 expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}. **A:** Diluição seriada das linhagens crescidas em glicose. **B:** Diluição seriada das linhagens crescidas em galactose. **C:** Curva de crescimento das linhagens crescidas em glicose. **D:** Curva de crescimento das linhagens crescidas em galactose. **E:** Porcentagem relativa ao controle da OD₆₀₀ máxima atingida em glicose. **F:** Porcentagem relativa ao controle da OD₆₀₀ máxima atingida em galactose. As análises foram feitas usando ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey. Os valores estão expressos como média ± SEM de três experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ relativo ao controle; #### $p \leq 0,001$ relativo às células expressando a proteína selvagem. Em **E** e **F** adotou-se a OD₆₀₀ final atingida pelo controle como 100%. Nas demais linhagens a porcentagem obtida é relativa ao controle.

2.5.4 Complementação heteróloga das linhagens Δ Scs2

A proteína Scs2 está envolvida no metabolismo de inositóis em *Saccharomyces*

cerevisiae. É uma proteína homóloga à VAPB humana e linhagens nocaute para este gene apresentam auxotrofia a inositol em temperaturas a partir de 34°C (KAGIWADA & ZEN, 2003). Desta forma, foram feitos ensaios de complementação heteróloga a fim de avaliar a capacidade das proteínas VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} de restaurar o fenótipo selvagem relativo à auxotrofia a inositol. As linhagens obtidas para estes experimentos estão descritas na **Tabela 12**.

Tabela 12. Linhagens de trabalho II.

Nome da linhagem	Descrição
BY4741 $\Delta Scs2$ pYES	Linhagem $\Delta Scs2$ contendo o plasmídeo pYES2.1 vazio
BY4741 $\Delta Scs2$ VAPB ^{WT}	Linhagem $\Delta Scs2$ expressando VAPB ^{WT}
BY4741 $\Delta Scs2$ VAPB ^{P56S}	Linhagem $\Delta Scs2$ expressando VAPB ^{P56S}

Como feito anteriormente, os níveis de transcritos de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} e os níveis das respectivas proteínas foram testados por RT-PCR e *Western blotting*, respectivamente (**Figura 26**) nas linhagens $\Delta Scs2$. Ambos os ensaios foram realizados após crescimento em galactose por 8 horas em meio de cultura sem inositol a 34°C, a fim de avaliar a expressão nas condições a serem utilizadas nos ensaios posteriores.

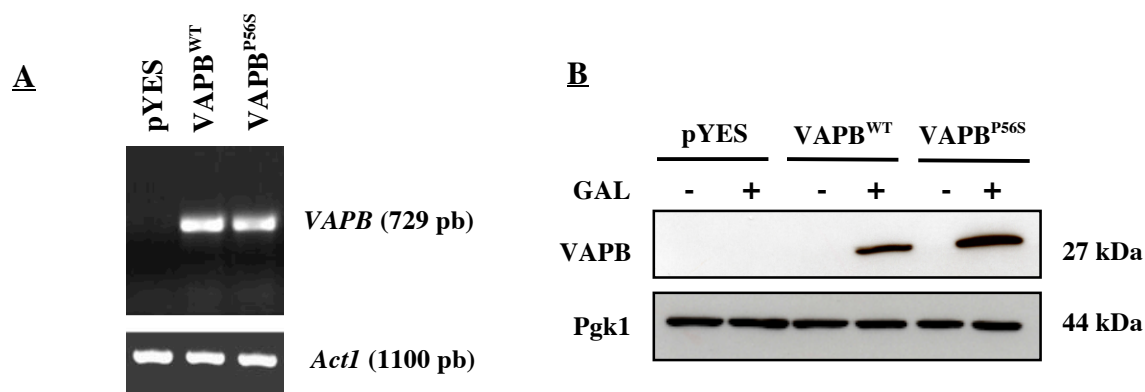


Figura 26. Expressão de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} na linhagem $\Delta Scs2$. **A:** Níveis de transcritos de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}. **B:** Expressão de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} após o tratamento com anticorpo anti-VAPB e anti-Pgk1 (*loading control*).

A complementação heteróloga foi avaliada por meio de ensaios de viabilidade conduzidos a 34°C com as linhagens $\Delta Scs2$ expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} (**Figura 27**).

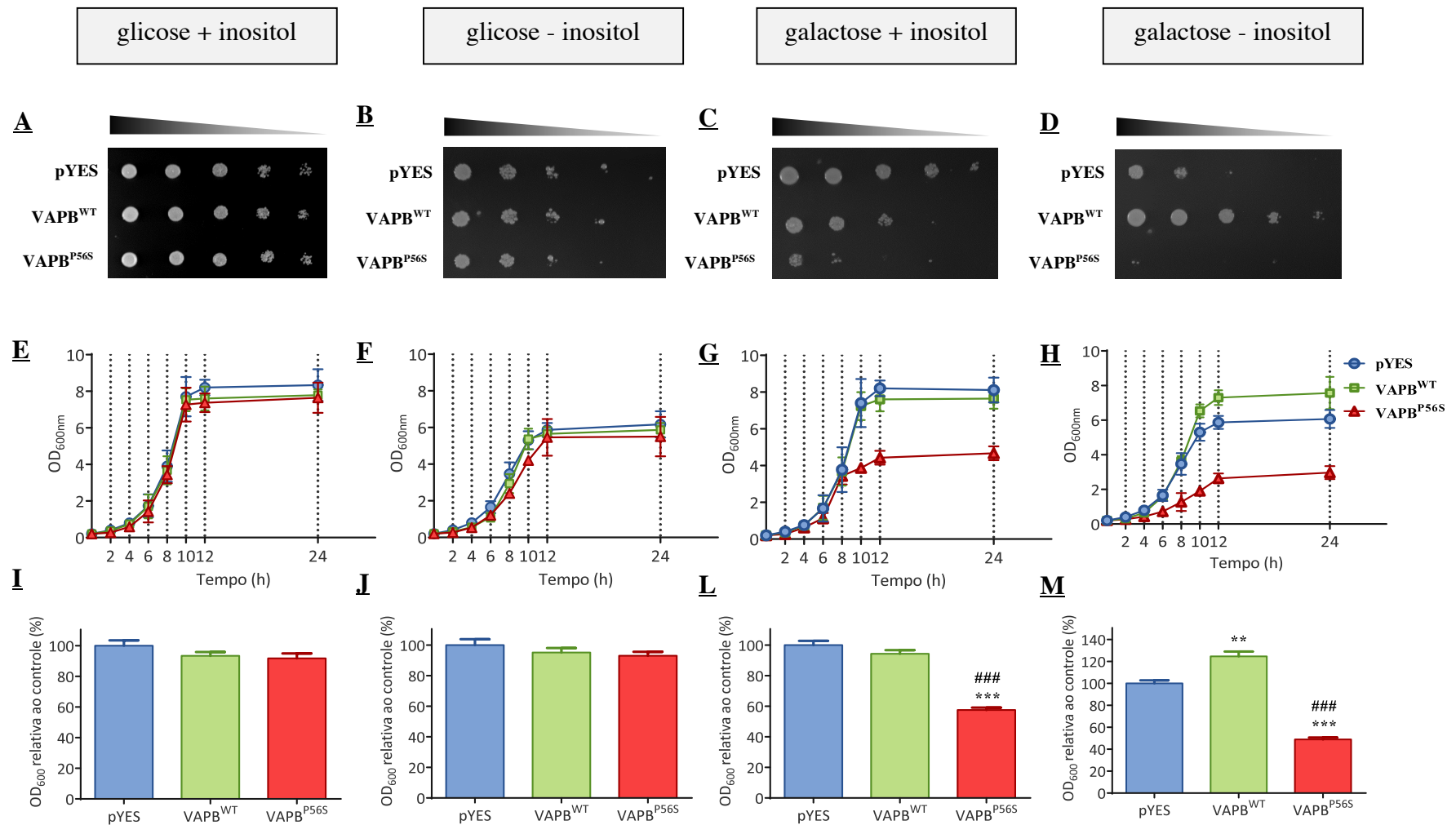


Figura 27. Viabilidade das linhagens $\Delta Scs2$ expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}. Diluições seriadas das linhagens crescidas em glicose com inositol (A), glicose e sem inositol (B), galactose com inositol (C) e galactose sem inositol (D). Curvas de crescimento das linhagens crescidas em glicose com inositol (E), glicose e sem inositol (F), galactose com inositol (G) e galactose sem inositol (H). Porcentagem relativa ao controle da OD₆₀₀ máxima atingida em glicose com inositol (I), glicose e sem inositol (J), galactose com inositol (L) e galactose sem inositol (M). As análises foram feitas usando ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey. Os valores estão expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes. ** $p \leq 0,01$ relativo ao controle; *** $p \leq 0,001$ relativo ao controle; ### $p \leq 0,001$ relativo às células expressando a proteína selvagem. Em I, J, L e M adotou-se a OD₆₀₀ final atingida pelo controle como 100%. Nas demais linhagens a porcentagem obtida é relativa ao controle.

Quatro situações foram avaliadas: (I) crescimento em Meio Mínimo contendo glicose e com inositol (**Figuras 27 A e 27 E**), (II) crescimento em Meio Mínimo contendo glicose e sem inositol (**Figuras 27 B e 27 F**), (III) crescimento em Meio Mínimo contendo galactose e com inositol (**Figuras 27 C e 27 G**) e (IV) crescimento em Meio Mínimo contendo galactose e sem inositol (**Figuras 27 D e 27 H**). Dessa forma, o crescimento das culturas poderia ser prejudicado por dois fatores: ausência de inositol e proteotoxicidade.

Em **27 A e 27 E**, as linhagens crescidas em Meio Mínimo com glicose e com inositol não apresentaram os fenótipos de auxotrofia e da toxicidade de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}, uma vez que o meio foi suplementado com o inositol e a glicose reprimiu a expressão das proteínas humanas. Em **27 B e 27 F**, a limitação de crescimento se deve ao efeito isolado da auxotrofia a inositol em todas as linhagens.

Em **27 C e 27 G**, as linhagens crescidas em Meio Mínimo com galactose e com inositol apresentaram o fenótipo resultante da toxicidade das proteínas humanas expressas heterologicamente, onde a viabilidade de células expressando VAPB^{P56S} é reduzida em comparação com o controle e com as células expressando VAPB^{WT}. Por fim, em **27 D e 27 H**, há a combinação dos efeitos de auxotrofia a inositol e toxicidade de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}. Observa-se que a linhagem expressando a proteína humana selvagem é capaz de restaurar o fenótipo selvagem relativo à auxotrofia a inositol, enquanto a proteína mutante não o é.

De modo similar, a OD₆₀₀ final alcançada por cada linhagem foi expressa em relação ao controle (**Figuras 27 I, 27 J, 27 L e 27 M**). No crescimento em galactose com inositol, a linhagem expressando VAPB^{P56S} atinge uma OD₆₀₀ final que é, aproximadamente, 60% da OD₆₀₀ final atingida pelo controle, enquanto no crescimento em galactose sem inositol, este valor não atinge 50%. A linhagem expressando a proteína humana selvagem apresentou um crescimento aproximado 25% maior que a linhagem controle, se aproximando, em valores absolutos, das OD₆₀₀ atingidas em meio suplementado com inositol. Os dados estão expressos como média ± SEM de três experimentos diferentes. As análises estatísticas foram feitas usando ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey.

A partir destes resultados sugere-se que a VAPB^{P56S} apresenta dois fenótipos distintos: (I) é incapaz de suprimir a auxotrofia a inositol, (II) apresenta uma toxicidade mesmo na presença de inositol que poderia ser devido a um mal-enovelamento.

PARTE II. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTADO REDOX EM ELA8.

1. ENSAIOS DE SENSIBILIDADE E VIABILIDADE APÓS TRATAMENTO COM H₂O₂

A viabilidade e a sensibilidade às diferentes concentrações de H₂O₂ das células expressando VAPB^{WT} ou VAPB^{P56S} estão apresentadas nas **Figuras 28 e 29**. De modo geral, as linhagens crescidas em glicose não apresentaram sensibilidade ou viabilidade diferentes entre si em qualquer uma das concentrações de H₂O₂ (0; 0,75 mM; 1,0 mM; 2,0 mM) (**Figura 28**). O fenótipo observado nas diluições seriadas foi semelhante entre as linhagens dentro de cada tratamento e nas curvas de crescimento não houve diferença significativa. Apenas é possível observar o efeito da concentração de H₂O₂ utilizada, o que era esperado uma vez que não há expressão de VAPB^{WT} ou VAPB^{P56S}.

As linhagens crescidas em galactose como fonte de carbono apresentaram fenótipo resultante da expressão das proteínas humanas e do tratamento com diferentes concentrações de H₂O₂. É possível observar nas diluições seriadas que, nos tratamentos com 0,75 mM e 1,0 mM de H₂O₂, as linhagens expressando as proteínas humanas apresentaram menor viabilidade que a linhagem controle (**Figuras 29 B e 29 C**). Nas curvas de crescimento, a diferença entre a linhagem expressando VAPB^{P56S} e o controle e entre a mesma linhagem e VAPB^{WT} foi estatisticamente mais significativa quando houve tratamento com 0,75 mM e 1 mM de H₂O₂ (**Figuras 29 I e 29 L**). Nos tratamentos com 2 mM de H₂O₂ não houve diferença significativa entre as amostras. Estes dados sugerem um discreto aumento na sensibilidade ao estresse oxidativo em células expressando a proteína mutante.

Todas as análises foram feitas usando ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey. Os valores estão expressos como média ± SEM de três experimentos independentes.

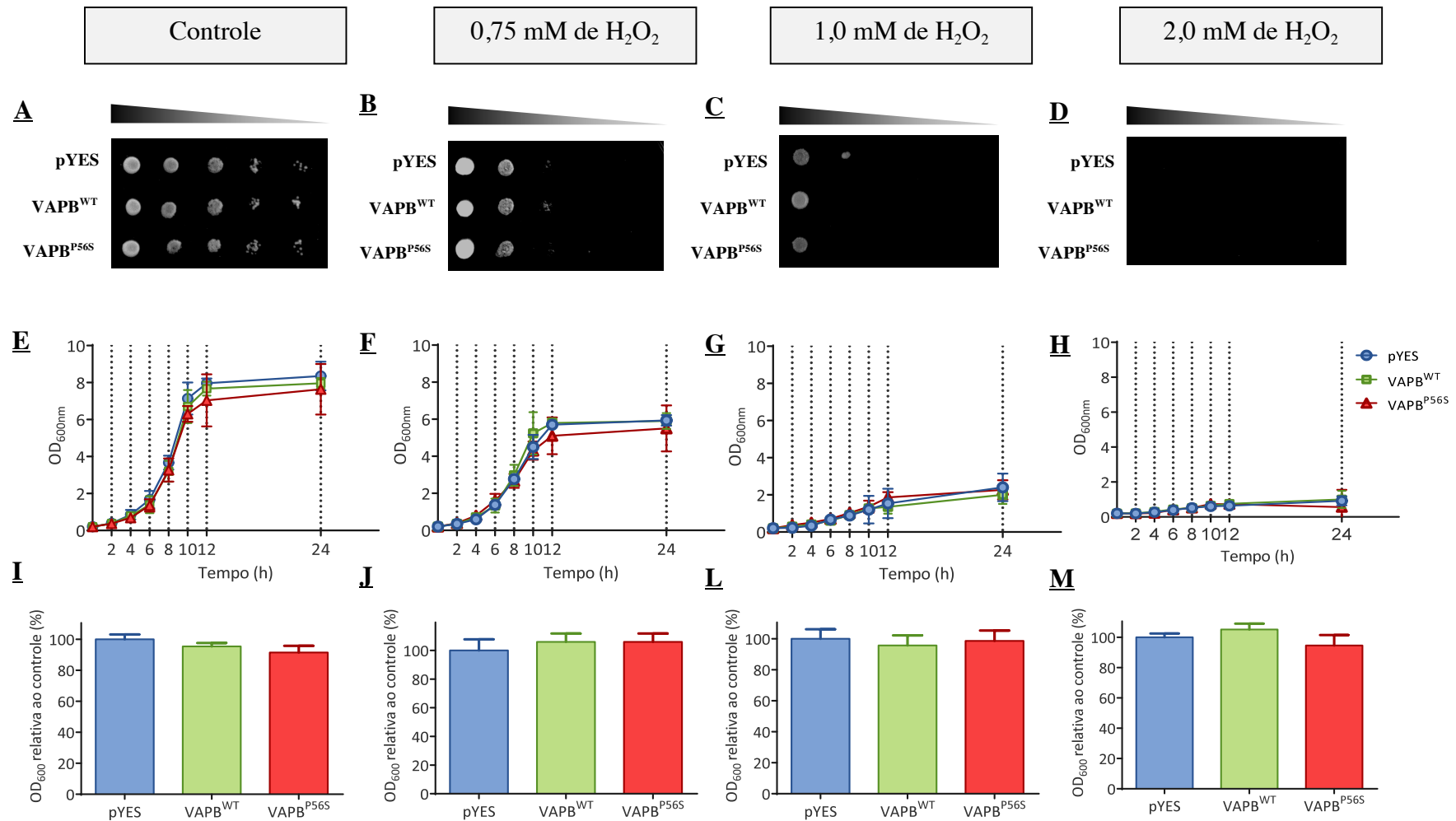


Figura 28. Viabilidade e sensibilidade das linhagens BY4741 em glicose em diferentes concentrações de H₂O₂. Diluições seriadas das linhagens crescidas em glicose sem H₂O₂ (A), com 0,75 mM de H₂O₂ (B), com 1,0 mM de H₂O₂ (C) e com 2,0 mM de H₂O₂ (D). Curvas de crescimento das linhagens crescidas em glicose sem H₂O₂ (E), com 0,75 mM de H₂O₂ (F), com 1,0 mM de H₂O₂ (G) e com 2,0 mM de H₂O₂ (H). Porcentagem relativa ao controle da OD₆₀₀ máxima atingida em glicose sem H₂O₂ (I), com 0,75 mM de H₂O₂ (J), com 1,0 mM de H₂O₂ (L) e com 2,0 mM de H₂O₂ (M). As análises foram feitas usando ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey. Os valores estão expressos como média ± SEM de três experimentos. Em I, J, L e M adotou-se a OD₆₀₀ final atingida pelo controle como 100%. Nas demais linhagens a porcentagem obtida é relativa ao controle.

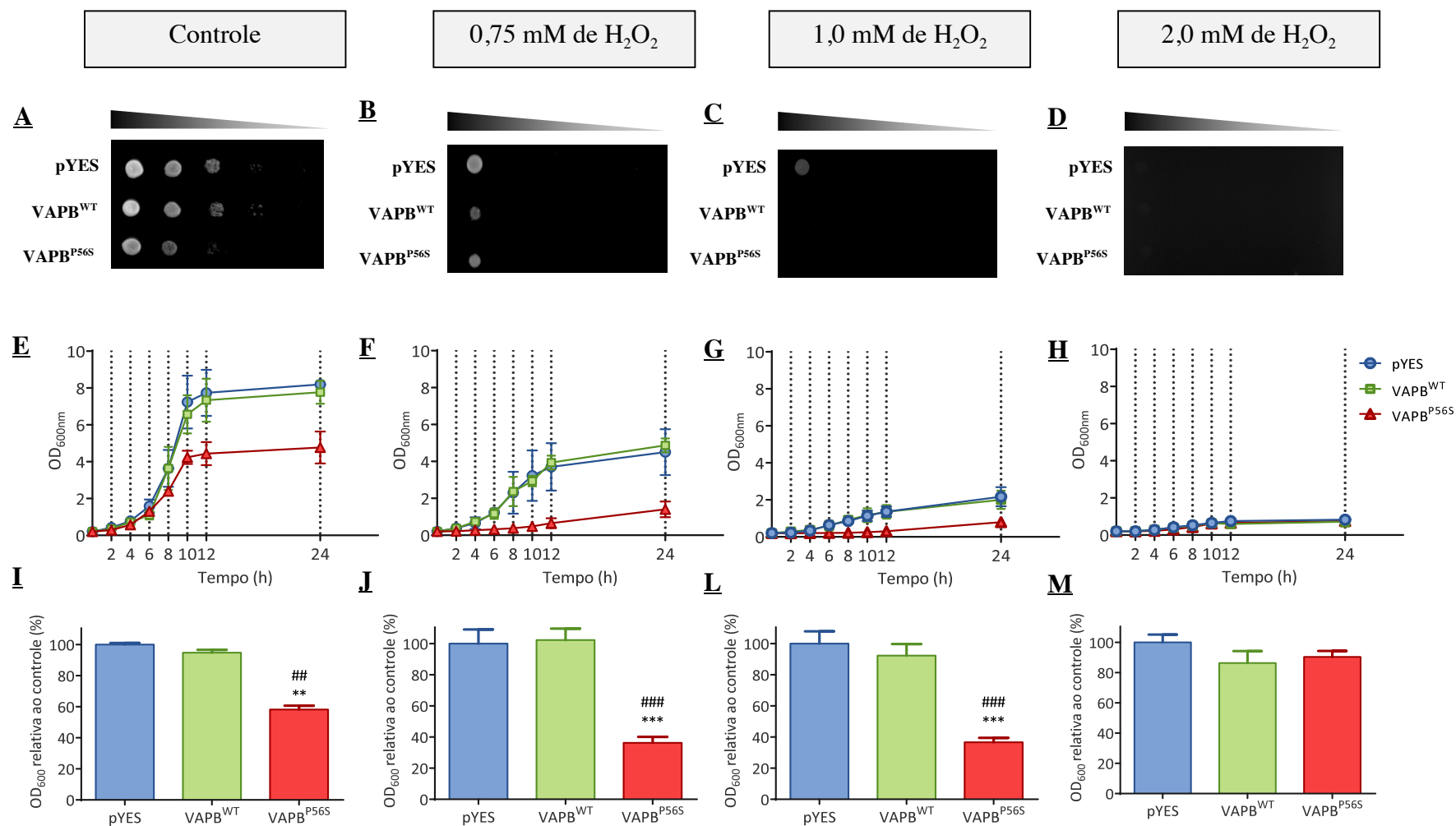


Figura 29. Viabilidade e sensibilidade das linhagens BY4741 em galactose em diferentes concentrações de H₂O₂. Diluições seriadas das linhagens crescidas em galactose sem H₂O₂ (A), com 0,75 mM de H₂O₂ (B), com 1,0 mM de H₂O₂ (C) e com 2,0 mM de H₂O₂ (D). Curvas de crescimento em galactose sem H₂O₂ (E), com 0,75 mM de H₂O₂ (F), com 1,0 mM de H₂O₂ (G) e com 2,0 mM de H₂O₂ (H). Porcentagem relativa ao controle da OD₆₀₀ máxima atingida em galactose sem H₂O₂ (I), com 0,75 mM de H₂O₂ (J), com 1,0 mM de H₂O₂ (L) e com 2,0 mM de H₂O₂ (M). As análises foram feitas usando ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey. Os valores estão expressos como média ± SEM de três experimentos. ** $p \leq 0,01$ relativo ao controle; *** $p \leq 0,001$ relativo ao controle; ## $p \leq 0,01$ relativo às células expressando a proteína selvagem; ### $p \leq 0,001$ relativo às células expressando a proteína selvagem. Em I, J, L e M adotou-se a OD₆₀₀ final atingida pelo controle como 100%. Nas demais linhagens a porcentagem obtida é relativa ao controle.

2. Razão GSH/GSSG

Os níveis de GSH, GSSG e a razão GSH/GSSG foram estimados nas linhagens BY4741 controle e expressando VAPB^{WT} ou VAPB^{P56S}. Foram utilizadas duas técnicas diferentes: a detecção por HPLC com detecção eletroquímica (HPLC-ECD) (**Figura 30**) e pela reciclagem enzimática (**Figura 31**).

Na determinação por HPLC-ECD, 50 µL do extrato celular foram injetados no sistema. Os picos contendo tióis e dissulfetos foram identificados e aqueles relativos à GSH e GSSG foram quantificados.

Os níveis de GSH (**Figura 30 A**), glutathiona total (**Figura 30 C**) e, de modo especial, da razão GSH/GSSG (**Figura 30 D**) nas linhagens expressando as proteínas VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} foram significativamente menores do que na linhagem controle, sendo que a expressão da proteína mutante resultou em um fenótipo mais acentuado. A diferença da razão GSH/GSSG entre as linhagens controle e expressando a proteína mutante chegou a aproximadamente 50%. Assim, é notável que o ambiente celular é mais oxidativo quando há presença de VAPB^{P56S}.

Pelo método da reciclagem enzimática, os resultados foram semelhantes: houve maior quantidade de GSSG nas linhagens expressando VAPB^{P56S} (**Figura 31 B**) e menores quantidades de GSH e glutathiona total nesta mesma linhagem (**Figuras 31 A e 31 C**). A razão GSH/GSSG também foi menor (**Figura 31 D**), corroborando os dados obtidos anteriormente. No entanto, observa-se uma pequena redução nos valores absolutos obtidos por este método em relação à detecção por HPLC-ECD, De qualquer forma, comparando-se os dois métodos (**Figura 32**) é possível notar que, apesar da pequena redução dos valores do ensaio enzimático, a proporção entre as diferentes linhagens permanece muito semelhante.

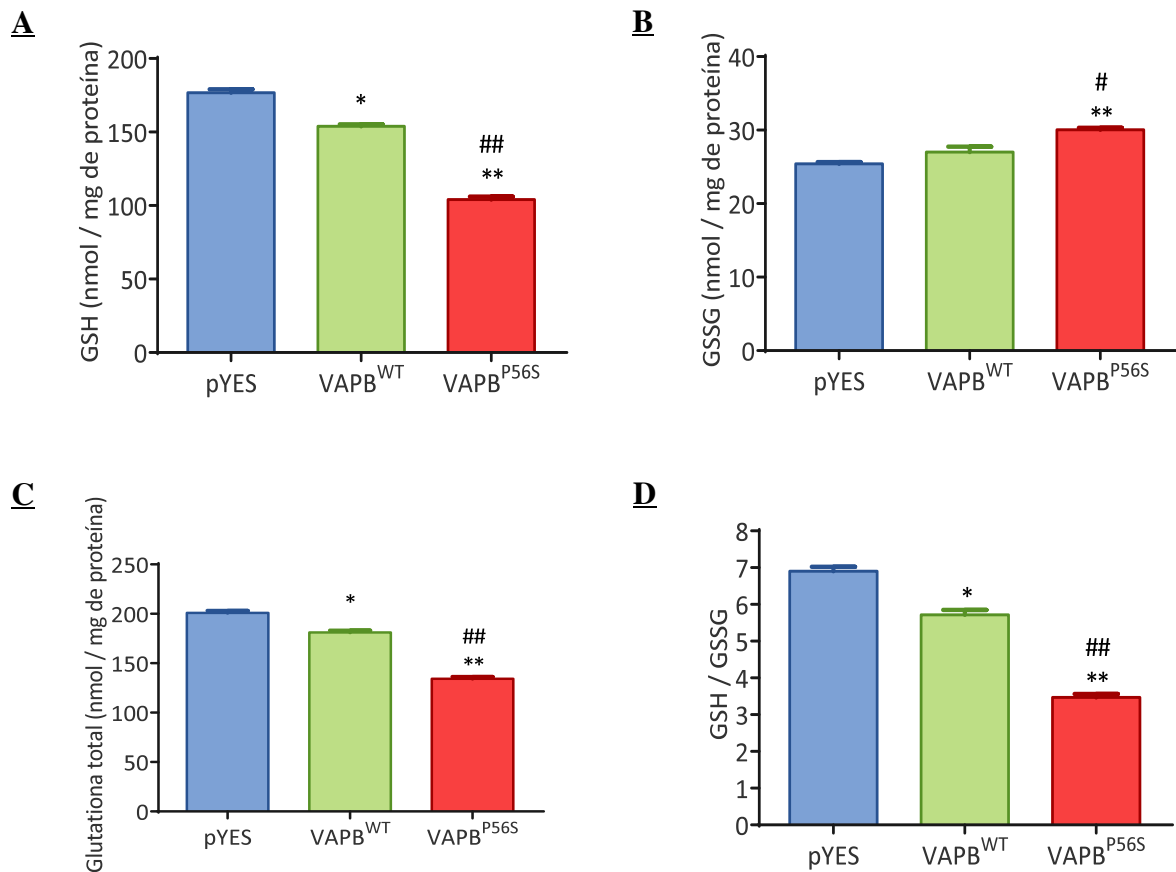


Figura 30. Quantificação dos níveis de glutatona por HPLC-ECD. As linhagens BY4741 controle e BY4741 expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} foram crescidas em Meio Mínimo com galactose como fonte de carbono e, após lise ácida, 50 μ L de uma suspensão contendo peptídeos de baixo peso molecular foram injetados no sistema. **A:** Quantidade de GSH. **B:** Quantidade de GSSG. **C:** Quantidade de glutatona total. **D:** Razão GSH/GSSG. As análises foram feitas usando ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey. Os valores estão expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes. * $p \leq 0,05$ relativo ao controle; ** $p \leq 0,01$ relativo ao controle; # $p \leq 0,05$ relativo às células expressando a proteína selvagem; ## $p \leq 0,01$ relativo às células expressando a proteína selvagem.

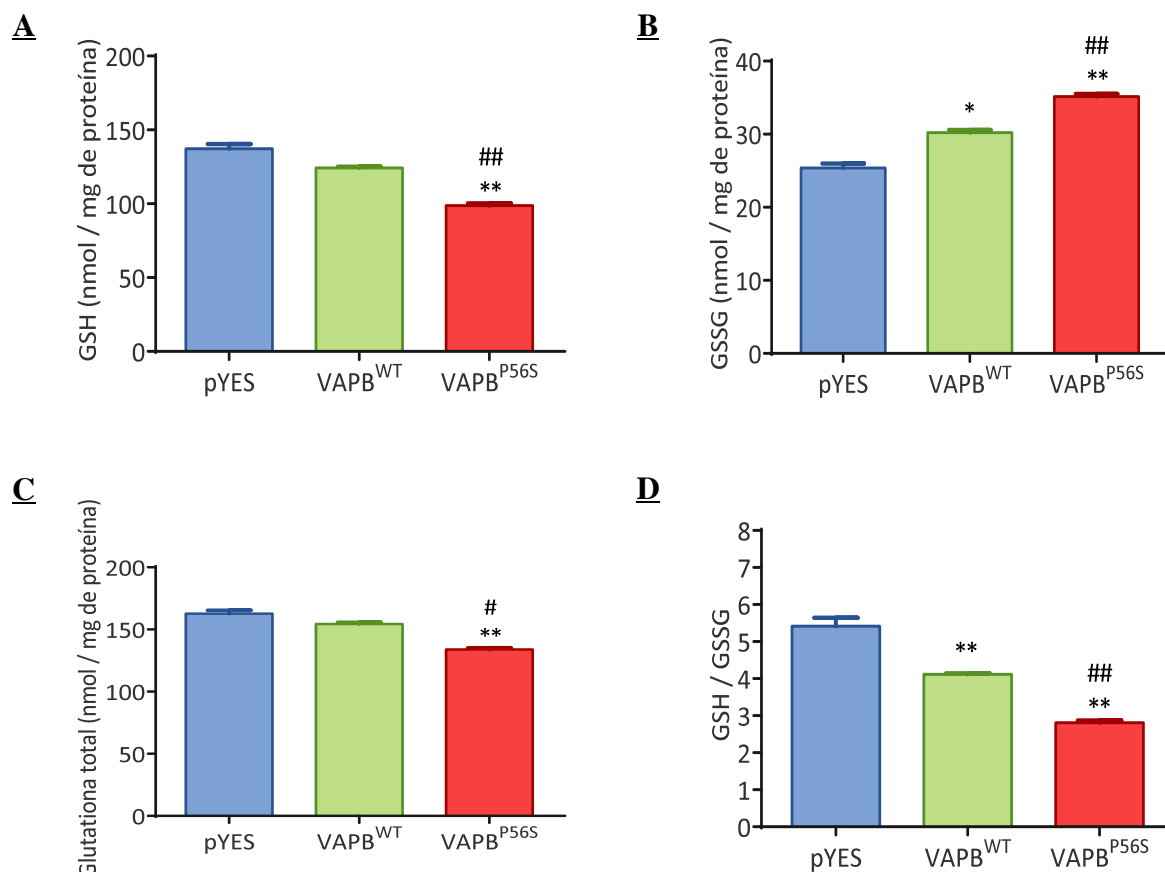


Figura 31. Quantificação dos níveis de glutathione pelo método de reciclagem enzimática. As linhagens BY4741 controle e BY4741 expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} foram crescidas em Meio Mínimo com galactose como fonte de carbono e, após lise ácida, 10 µL de uma suspensão contendo peptídeos de baixo peso molecular, alquilados ou não com 2-VP – conforme o caso -, foram introduzidos no sistema contendo DTNB, GR e NADPH. A reação foi avaliada por 5 minutos. **A:** Quantidade de GSH. **B:** Quantidade de GSSG. **C:** Quantidade de glutathione total. **D:** Razão GSH/GSSG. As análises foram feitas usando ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey. Os valores estão expressos como média ± SEM de três experimentos independentes. * $p \leq 0,05$ relativo ao controle; ** $p \leq 0,01$ relativo ao controle; # $p \leq 0,05$ relativo às células expressando a proteína selvagem; ## $p \leq 0,01$ relativo às células expressando a proteína selvagem.

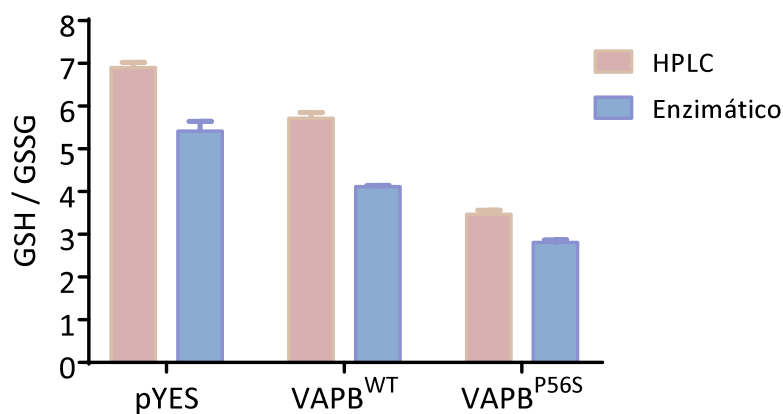


Figura 32. Comparação entre os métodos de detecção de glutathiona. Os dados se referem aos resultados apresentados nas Figuras 30 e 31.

3. Medição dos níveis de H₂O₂ em mitocôndrias isoladas

As frações obtidas por meio do protocolo adaptado de GLICK & PON (1995) foram testadas para seu conteúdo de mitocôndrias por *Western blotting* (Figura 33). As três frações, ET, contendo o extrato total, P₂₇₀₀₀, contendo a fração enriquecida com mitocôndrias e outras organelas membranosas, e S₂₇₀₀₀, contendo citoplasma e demais organelas, foram submetidas a uma corrida eletroforética em SDS-PAGE e incubadas com anticorpo anti-Porina (Life Technologies) em diluição 1:5000. A proteína Porina é usada como marcador da mitocôndria. Portanto, os resultados indicam que o fracionamento foi realizado com sucesso.

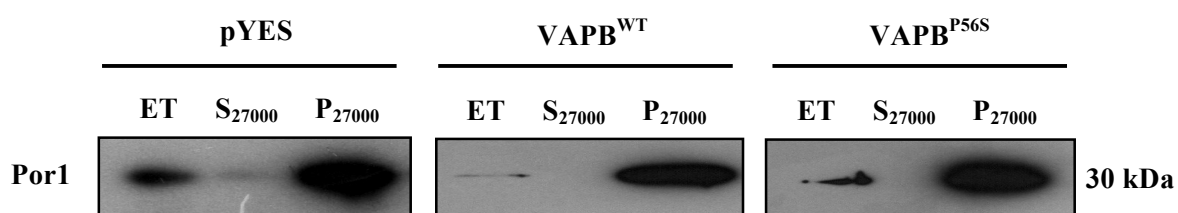


Figura 33. Marcação de mitocôndrias isoladas nas linhagens BY4741 controle e BY4741 expressando VAPB^{WT} ou VAPB^{P56S}. Foi utilizado o anticorpo anti-porina (marcador de mitocôndria) em diluição 1:5000.

A fração P₂₇₀₀₀ foi incubada por 10 minutos com Amplex RedTM na presença de 1,0 U/mL de HRP em tampão contendo 0,6 M de sorbitol, 20 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 0,5 mM de EDTA. O produto da oxidação do Amplex Red, a resorufina, foi detectado por fluorescência (excitação a 563 nm e emissão a 587 nm). Foi avaliada a produção de H₂O₂ em condições de respiração basal (controle) e de incremento na taxa respiratória por adição de

etanol 2%.

Em ambas as situações a produção de H_2O_2 foi maior em mitocôndrias isoladas da linhagem expressando a proteína mutante, chegando a ser, aproximadamente, 40% maior do que nas mitocôndrias isoladas da linhagem controle (**Figura 34**). O aumento da produção de H_2O_2 por meio do fornecimento do etanol como extrato respiratório foi praticamente proporcional em todas as linhagens, aumentando apenas o nível de diferença estatística entre as linhagens expressando $VAPB^{WT}$ e $VAPB^{P56S}$.

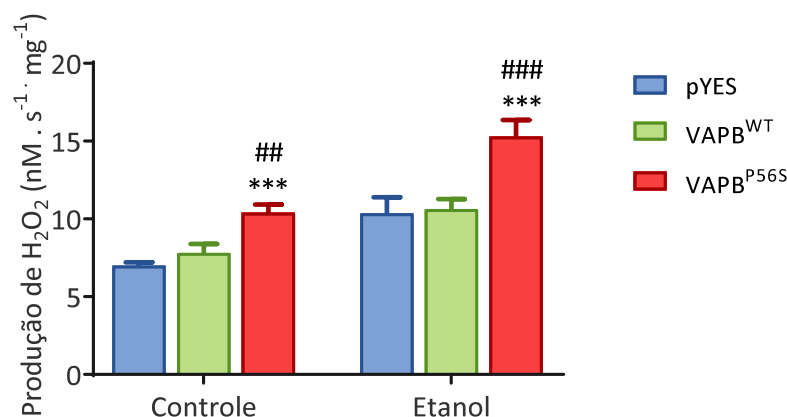


Figura 34. Produção de H_2O_2 em frações enriquecidas de mitocôndria. As mitocôndrias isoladas das linhagens BY4741 controle e BY4741 expressando $VAPB^{WT}$ ou $VAPB^{P56S}$ foram incubadas por 10 minutos com 50 μ M de Amplex Red na presença de 1,0 U/mL de HRP. O produto da oxidação do Amplex Red, a resorufina, foi detectado por fluorescência (excitação a 563 nm e emissão a 587 nm). Foram avaliadas duas situações: condições de taxa respiratória basal (controle) e condição de incremento na taxa respiratória por adição de etanol. As análises foram feitas usando ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Tukey. Os valores estão expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ relativo ao controle; ## $p \leq 0,01$ relativo às células expressando a proteína selvagem; ### $p \leq 0,001$ relativo às células expressando a proteína selvagem.

4. VIABILIDADE E RAZÃO GSH/GSSG APÓS TRATAMENTO COM N-ACETIL-L-CISTEÍNA

A NAC é um tiol de baixo peso molecular, considerado “antioxidante”, entre outros motivos, por poder atuar como precursor da síntese de GSH, o qual tem sido proposto frequentemente como agente na atenuação do estresse oxidativo. Como a razão GSH/GSSG nas linhagens expressando $VAPB^{P56S}$ estava reduzida em relação ao controle e à linhagem expressando a proteína selvagem, testou-se NAC em duas concentrações diferentes (5 mM e 10 mM) a fim de avaliar a viabilidade e a razão GSH/GSSG nas linhagens crescidas em galactose.

Observa-se que os tratamentos com 5 mM e 10 mM de NAC não alteraram consideravelmente a viabilidade das linhagens, mas melhoraram o seu desempenho de forma

geral (**Figura 35**). Também a razão GSH/GSSG não apresentou alterações diferenciais significativas.

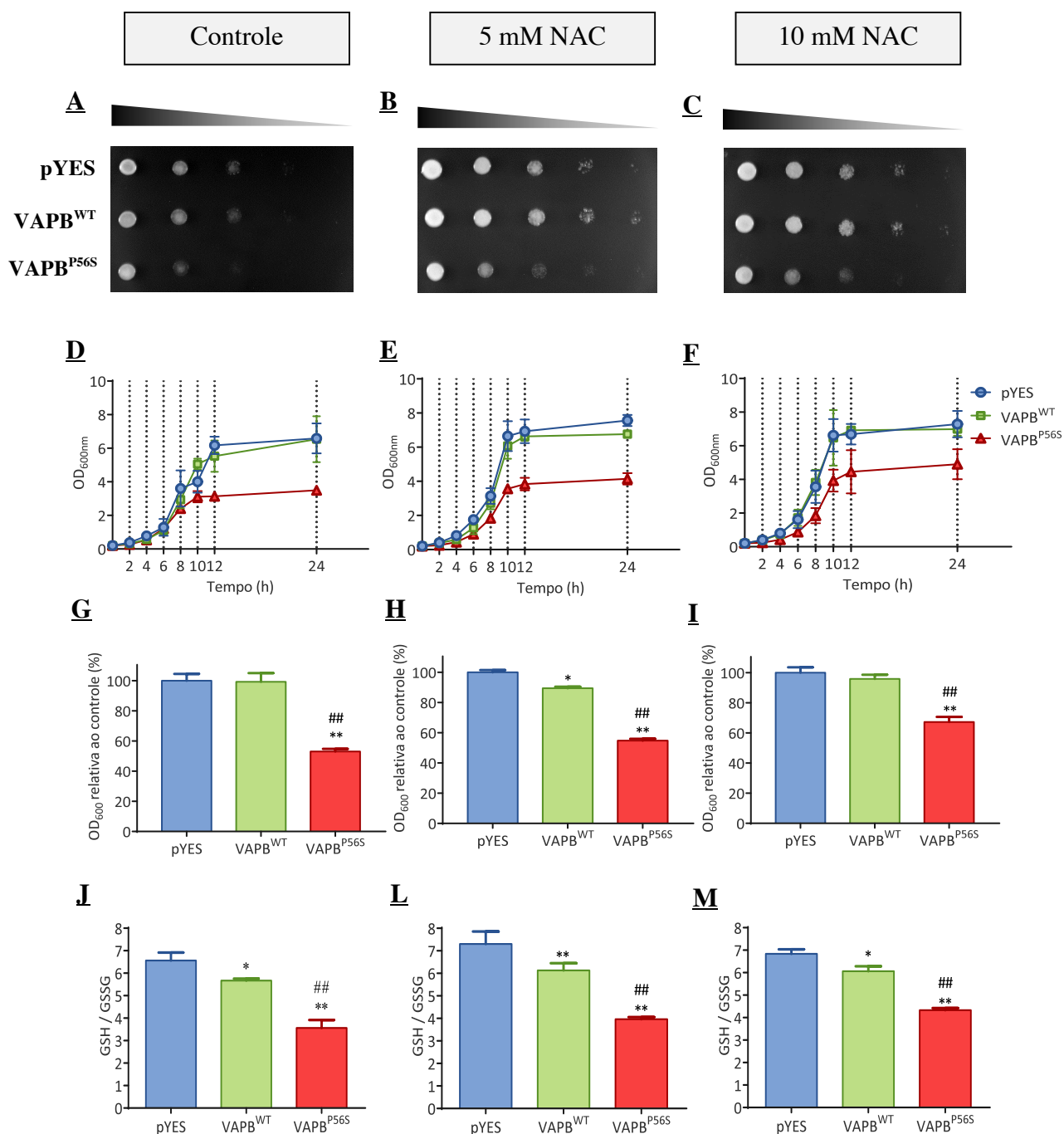


Figura 35. Viabilidade, sensibilidade e razão GSH/GSSG das linhagens BY4741 em galactose tratadas com NAC. Diluições seriadas das linhagens sem tratamento (A), com 5 mM de NAC (B) e com 10 mM de NAC (C). Curvas de crescimento das linhagens sem tratamento (D), com 5 mM de NAC (E) e com 10 mM de NAC (F). Porcentagem relativa ao controle da OD₆₀₀ máxima atingida das linhagens sem tratamento (G), com 5 mM de NAC (H) e com 10 mM de NAC (I). Razão GSH/GSSG das linhagens sem tratamento (J), com 5 mM de NAC (L) e com 10 mM de NAC (M). As análises foram feitas usando ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey. Os valores estão expressos como média ± SEM de três experimentos. ** $p \leq 0,01$ relativo ao controle; *** $p \leq 0,001$ relativo ao controle; ## $p \leq 0,01$ relativo às células expressando a proteína selvagem; ### $p \leq 0,001$ relativo às células expressando a proteína selvagem. Em G, H e I adotou-se a OD₆₀₀ final atingida pelo controle como 100%. Nas demais linhagens a porcentagem obtida é relativa ao controle.

A **Figura 36** compara as linhagens para a OD₆₀₀ máxima atingida relativa ao controle, pois apenas na curva de crescimento foi possível notar um discreto aumento da viabilidade da linhagem VAPB^{P56S}.

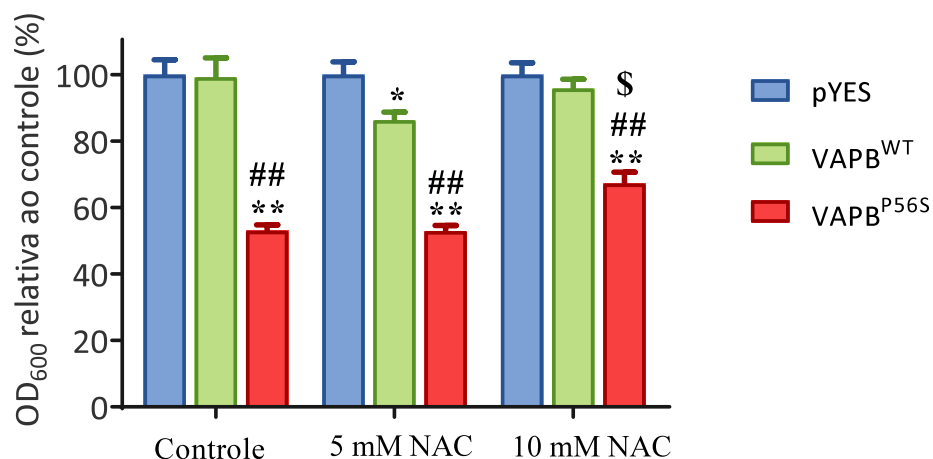


Figura 36. Comparação da OD₆₀₀ máxima atingida relativa ao controle nas linhagens tratadas com NAC. O gráfico sumariza os resultados das curvas de crescimento apresentados na Figura 35. Os valores representam o resultado da razão entre a expressão no tempo final sobre o tempo inicial. As análises foram feitas usando ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Tukey. Os valores estão expressos como média ± SEM de dois experimentos independentes. * $p \leq 0,01$ relativo ao controle; ** $p \leq 0,01$ relativo ao controle; ## $p \leq 0,01$ relativo à VAPB^{WT}; \$ $p \leq 0,05$ relativo à VAPB^{P56S} no tratamento sem NAC.

PARTE III. AVALIAÇÃO DA PROTEOSTASE EM ELA8

1. ENSAIOS DE SENSIBILIDADE E VIABILIDADE APÓS INIBIÇÃO DO UPS E AUTOFAGIA

Para avaliar o possível papel de UPS e autofagia na proteotoxicidade induzida pela expressão de VapB^{P56S}, linhagens nocaute para os genes das proteínas Pdr5 e Atg8 foram transformadas com os plasmídeos contendo os genes de *VAPB* selvagem ou mutante (**Tabela 13**).

Tabela 13. Linhagens de trabalho III

Nome da linhagem	Descrição
BY4741 $\Delta Pdr5$ pYES	Linhagem $\Delta Pdr5$ contendo o plasmídeo pYES2.1 vazio
BY4741 $\Delta Pdr5$ VAPB ^{WT}	Linhagem $\Delta Pdr5$ expressando VAPB ^{WT}
BY4741 $\Delta Pdr5$ VAPB ^{P56S}	Linhagem $\Delta Pdr5$ expressando VAPB ^{P56S}
BY4741 $\Delta Atg8$ pYES	Linhagem $\Delta Atg8$ contendo o plasmídeo pYES2.1 vazio
BY4741 $\Delta Atg8$ VAPB ^{WT}	Linhagem $\Delta Atg8$ expressando VAPB ^{WT}
BY4741 $\Delta Atg8$ VAPB ^{P56S}	Linhagem $\Delta Atg8$ expressando VAPB ^{P56S}

Pdr5 é um transportador que atua no efluxo de moléculas e o nocaute para este gene apresenta maior suscetibilidade ao tratamento com drogas, como MG132 (inibidor do proteassomo). A expressão das proteínas humanas na linhagem $\Delta Pdr5$ transformada foi verificada (**Figura 37**).

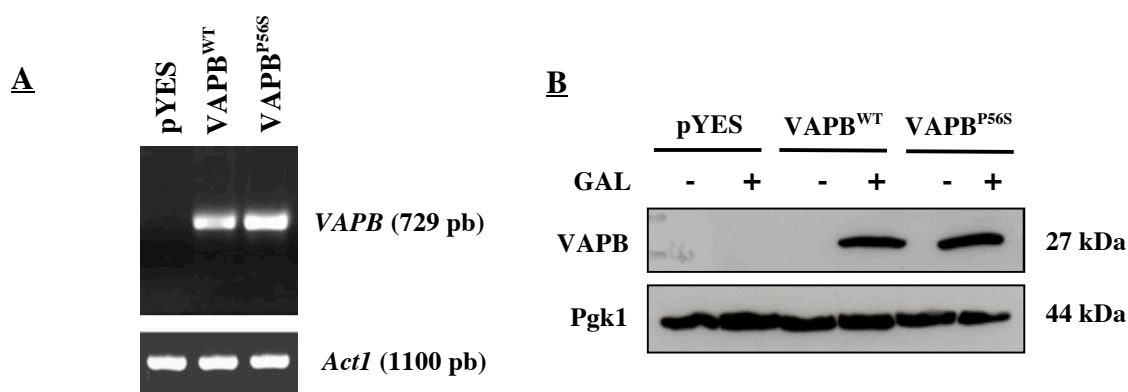


Figura 37. Expressão de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} na linhagem $\Delta Pdr5$. A: Níveis de transcritos de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}. B: Expressão de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} após o tratamento com anticorpo anti-VAPB e anti-Pgk1 (*loading control*).

Posteriormente, foram feitas diluições seriadas e curvas de crescimento para verificar a viabilidade e a sensibilidade da linhagem $\Delta Pdr5$ expressando as proteínas humanas em situação de inibição do proteassomo com 80 μM de MG132 (**Figura 38**).

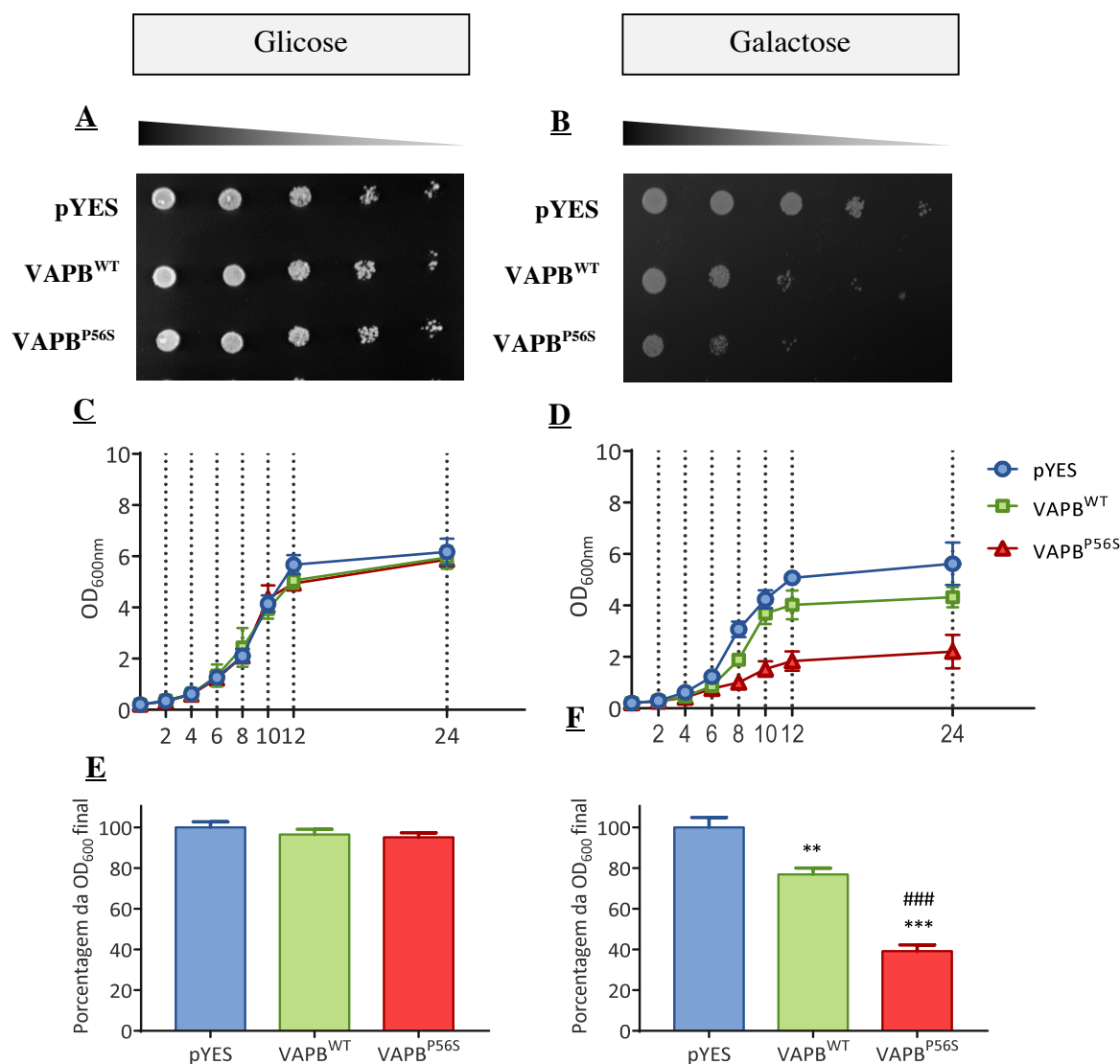


Figura 38. Viabilidade das linhagens $\Delta Pdr5$ expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} após tratamento com 80 μM de MG132. **A:** Diluição seriada da linhagem crescida em glicose. **B:** Diluição seriada da linhagem crescida em galactose. **C:** Curva de crescimento da linhagem crescida em glicose. **D:** Curva de crescimento da linhagem crescida em galactose. **E:** Porcentagem relativa ao controle da OD₆₀₀ máxima atingida em glicose. **F:** Porcentagem relativa ao controle da OD₆₀₀ máxima atingida em galactose. As análises foram feitas usando ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey. Os valores estão expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes. ** $p \leq 0,01$ relativo ao controle; *** $p \leq 0,001$ relativo ao controle; ### $p \leq 0,001$ relativo às células expressando a proteína selvagem. Em **E** e **F** adotou-se a OD₆₀₀ final atingida pelo controle como 100%. Nas demais linhagens a porcentagem obtida é relativa ao controle.

As linhagens $\Delta Pdr5$ tratadas com MG132 apresentaram, de maneira geral, menor viabilidade quando crescidas em galactose. Em glicose, o efeito da inibição foi pouco visível no ensaio de diluição seriada, mas nas curvas de crescimento as OD₆₀₀ máximas atingidas pelas linhagens foram menores do que aquelas atingidas quando não houve inibição do proteassomo (**Figuras 25 A, C e E**). Em galactose foi possível observar o efeito conjunto da expressão das proteínas humanas e da inibição proteassomo, onde a linhagem expressando VAPB^{P56S} apresentou menor viabilidade e maior sensibilidade ao tratamento. Este efeito, porém, em comparação com os resultados obtidos nas linhagens BY4741 (**Figura 25**), foi discreto. Em relação à linhagem expressando VAPB^{WT}, houve um desempenho menor (**Figura 38**) do que na situação controle (**Figura 25**), sugerindo a necessidade do sistema UPS para proteostase dessa proteína.

Para avaliar o efeito da inibição da autofagia, as linhagens $\Delta Atg8$ expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} (**Figura 39**) também foram analisadas por meio de diluições seriadas e curvas de crescimento (**Figura 40**).

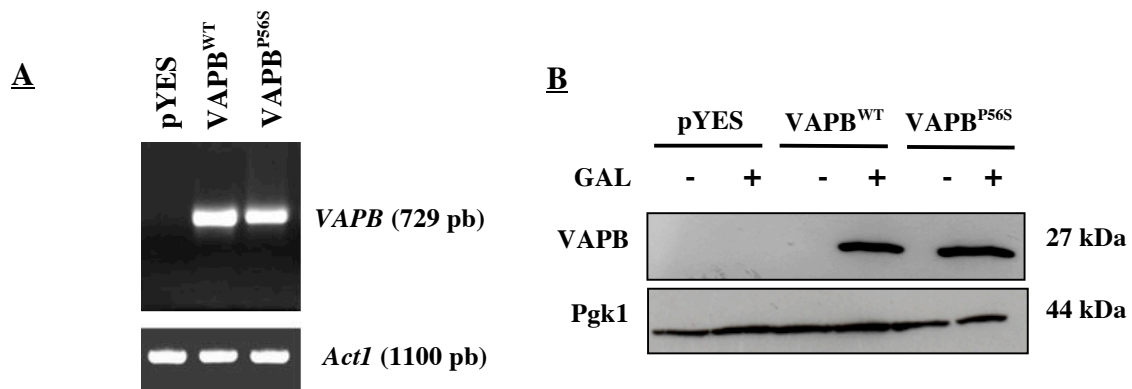


Figura 39. Expressão de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} na linhagem $\Delta Atg8$. **A:** Níveis de transcritos de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}. **B:** Expressão de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} após o tratamento com anticorpo anti-VAPB e anti-Pgk1 (*loading control*).

Assim como foi observado nas linhagens tratadas para inibição do proteassomo, o crescimento em glicose das linhagens em células deficientes em autofagia apenas diminui a OD₆₀₀ máxima atingida pelas linhagens em relação às avaliações anteriores.

Porém, a inibição da autofagia nas linhagens expressando VAPB^{P56S} leva à menor viabilidade em comparação com o controle e com a linhagem expressando VAPB^{WT}. A

resposta à inibição autofágica fica ainda mais evidente em comparação à linhagem BY4741 expressando VAPB^{P56S} (**Figuras 25 B, D e F**), onde o desempenho da linhagem foi cerca de 60% do desempenho do controle. Na linhagem $\Delta Atg8$ expressando VAPB^{P56S} o desempenho não chegou a 30% do desempenho do controle. A linhagem expressando a proteína selvagem não se mostrou mais suscetível à inibição.

A partir deste resultado, é possível sugerir que a autofagia tenha maior importância na degradação de VAPB^{P56S} e os agregados formados por esta proteína.

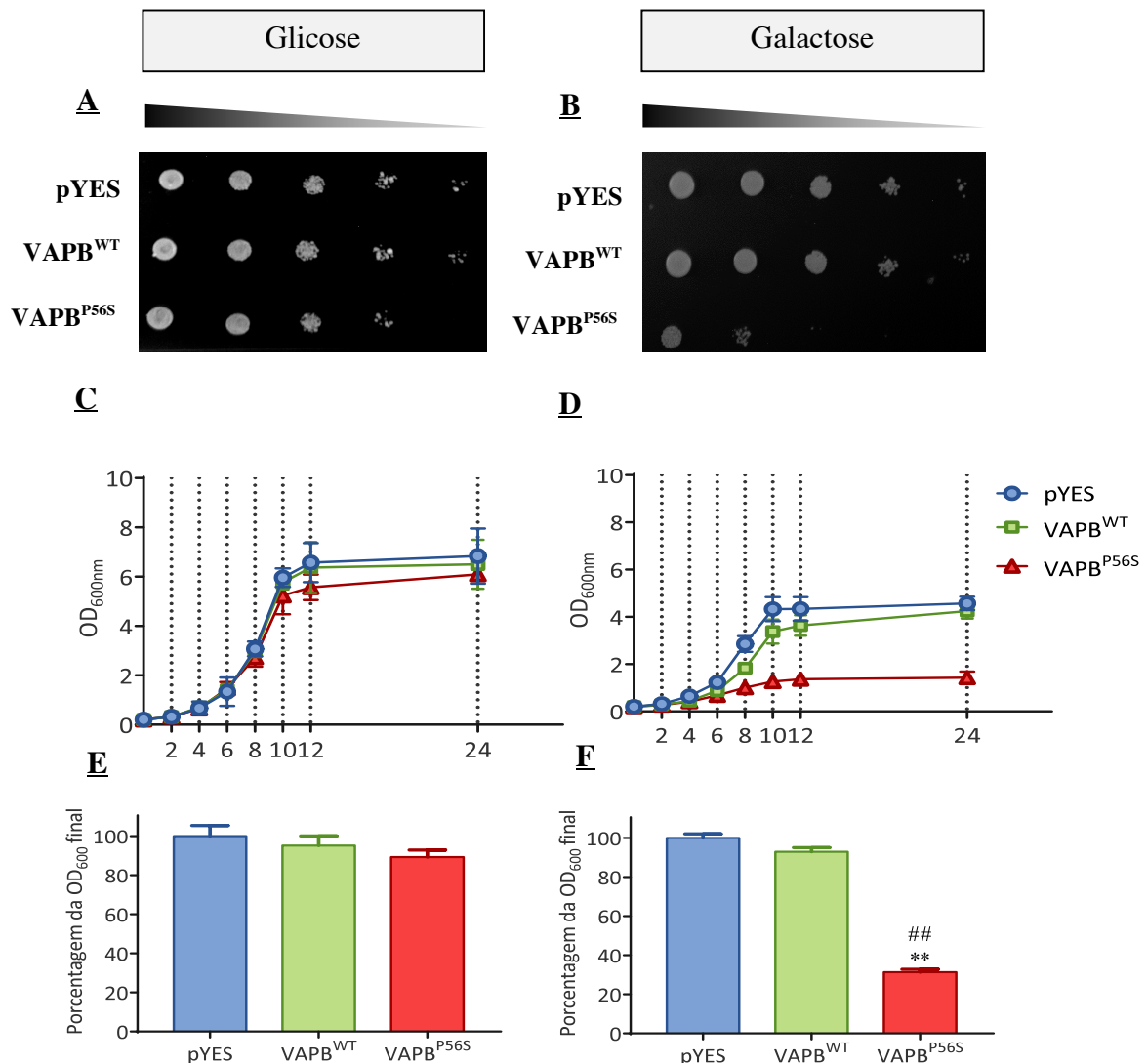


Figura 40. Viabilidade das linhagens $\Delta Atg8$ expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}. **A:** Diluição seriada das linhagem crescidas em glicose. **B:** Diluição seriada da linhagem crescida em galactose. **C:** Curva de crescimento da linhagem crescida em glicose. **D:** Curva de crescimento da linhagem crescida em galactose. **E:** Porcentagem relativa ao controle da OD₆₀₀ máxima atingida em glicose. **F:** Porcentagem relativa ao controle da OD₆₀₀ máxima atingida em galactose. As análises foram feitas usando ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey. Os valores estão expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes. ** $p \leq 0,01$ relativo ao controle; ## $p \leq 0,01$ relativo às células expressando a proteína selvagem. Em **E** e **F** adotou-se a OD₆₀₀ final atingida pelo controle como 100%. Nas demais linhagens a porcentagem obtida é relativa ao controle.

A inibição conjunta do proteassomo e da autofagia nas linhagens $\Delta Pdr5$ tratadas com MG132 e Bafilomicina não provocou efeito diferenciável entre as linhagens tanto em glicose quanto em galactose (**Figura 41**). Isto ocorre, provavelmente, porque a inibição dos dois principais sistemas de degradação celular ao mesmo tempo é um evento muito drástico para as células e diminui a viabilidade a níveis baixos o suficiente para não serem visíveis diferenças fenotípicas.

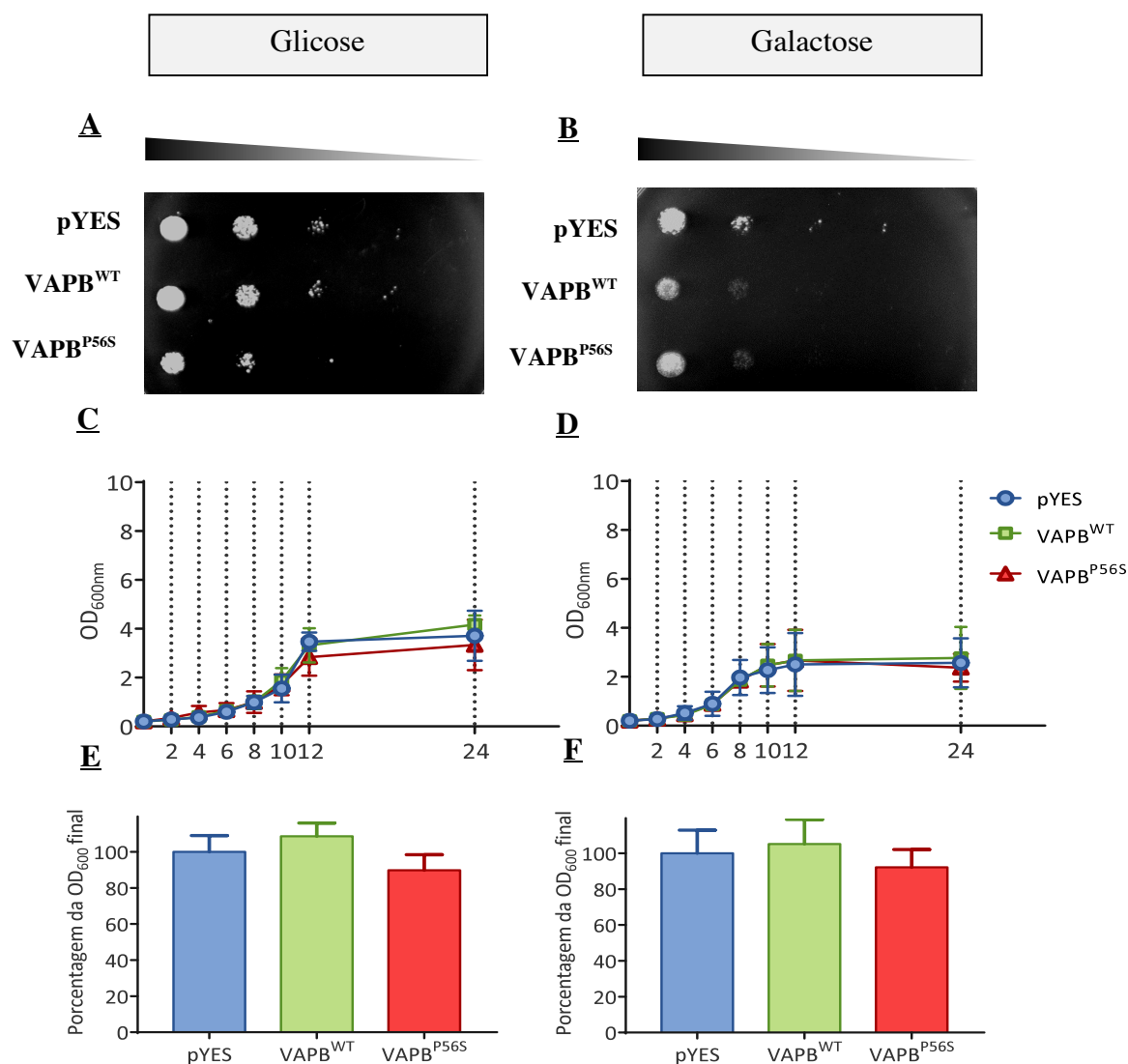


Figura 41. Viabilidade das linhagens $\Delta Pdr5$ expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} após tratamento com 80 μ M de MG132 e 1 μ M de Bafilomicina. **A:** Diluição seriada da linhagem crescida em glicose. **B:** Diluição seriada das linhagem crescidas em galactose. **C:** Curva de crescimento da linhagem crescida em glicose. **D:** Curva de crescimento da linhagem crescida em galactose. **E:** Porcentagem relativa ao controle da OD₆₀₀ máxima atingida em glicose. **F:** Porcentagem relativa ao controle da OD₆₀₀ máxima atingida em galactose. As análises foram feitas usando ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey. Os valores estão expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes. Em **E** e **F** adotou-se a OD₆₀₀ final atingida pelo controle como 100%. Nas demais linhagens a porcentagem obtida é relativa ao controle.

A **Figura 42** resume os resultados de viabilidade por curva de crescimento obtidos comparando-os à situação sem inibição. Assim, observa-se que a inibição do proteossomo afeta diferencialmente ambas linhagens e, de modo especial, a linhagem superexpressando VAPB^{WT}. A inibição da autofagia afeta principalmente a linhagem superexpressando VAPB^{P56S}.

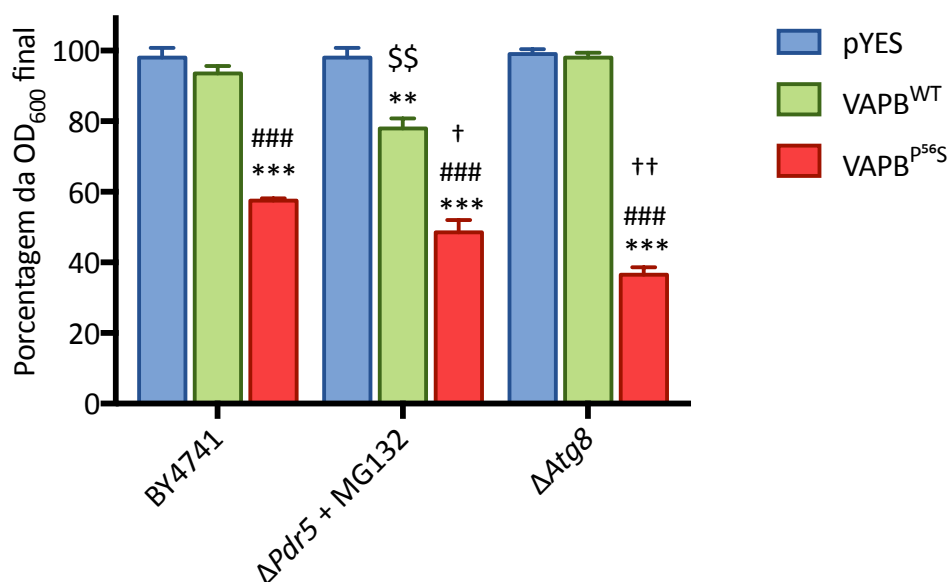


Figura 42. Porcentagem relativa ao controle da OD₆₀₀ máxima atingida em galactose. Os valores da OD₆₀₀ máxima atingida em galactose das linhagens BY4741, ΔPdr5 + MG132 e ΔAtg8. Os valores estão expressos como média ± SEM de três experimentos independentes. ** $p \leq 0,01$ relativo ao controle; * $p \leq 0,01$ relativo ao controle; ### $p \leq 0,001$ relativo às células expressando a proteína selvagem; \$\$\$ $p \leq 0,01$ relativo às células BY4741 expressando a proteína selvagem; † $p \leq 0,05$ relativo às células BY4741 expressando a proteína mutante; †† $p \leq 0,01$ relativo às células BY4741 expressando a proteína mutante.

2. ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO PROTEICA (CYCLOHEXIMIDE CHASE ASSAY)

A avaliação da estabilidade proteica nas linhagens expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} sob diferentes tratamentos foi feita por meio do acompanhamento, por 12 horas, da degradação das proteínas VAPB.

Para isso, após expressão por 8 horas em galactose, as células foram tratadas com cicloheximida e mantidas em Meio Mínimo contendo glicose a fim de garantir que não houvesse mais síntese das proteínas VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} e fosse possível avaliar sua degradação.

Seis situações diferentes foram testadas: (1) linhagens BY4741 expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}; (2) linhagens ΔPdr5 expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} sem inibição do

proteassomo; (3) linhagens $\Delta Pdr5$ expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} e tratamento com 80 μ M de MG132; (4) linhagens $\Delta Atg8$ expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}; (5) linhagens $\Delta Pdr5$ expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} e tratamento com 80 μ M de MG132 + 1 μ M de Bafilomicina A1.

Na linhagem BY4741 expressando VAPB^{WT}, a diminuição da proteína humana ocorre depois de 6 horas após tratamento com cicloheximida e após 12 horas já não há proteína detectável (**Figura 43 A**).

A degradação de VAPB^{P56S} na linhagem BY4741 foi, de modo geral, mais lenta em comparação à proteína selvagem, restando, após 12 horas de tratamento com CHX, grande quantidade de proteína (**Figura 43 B**).

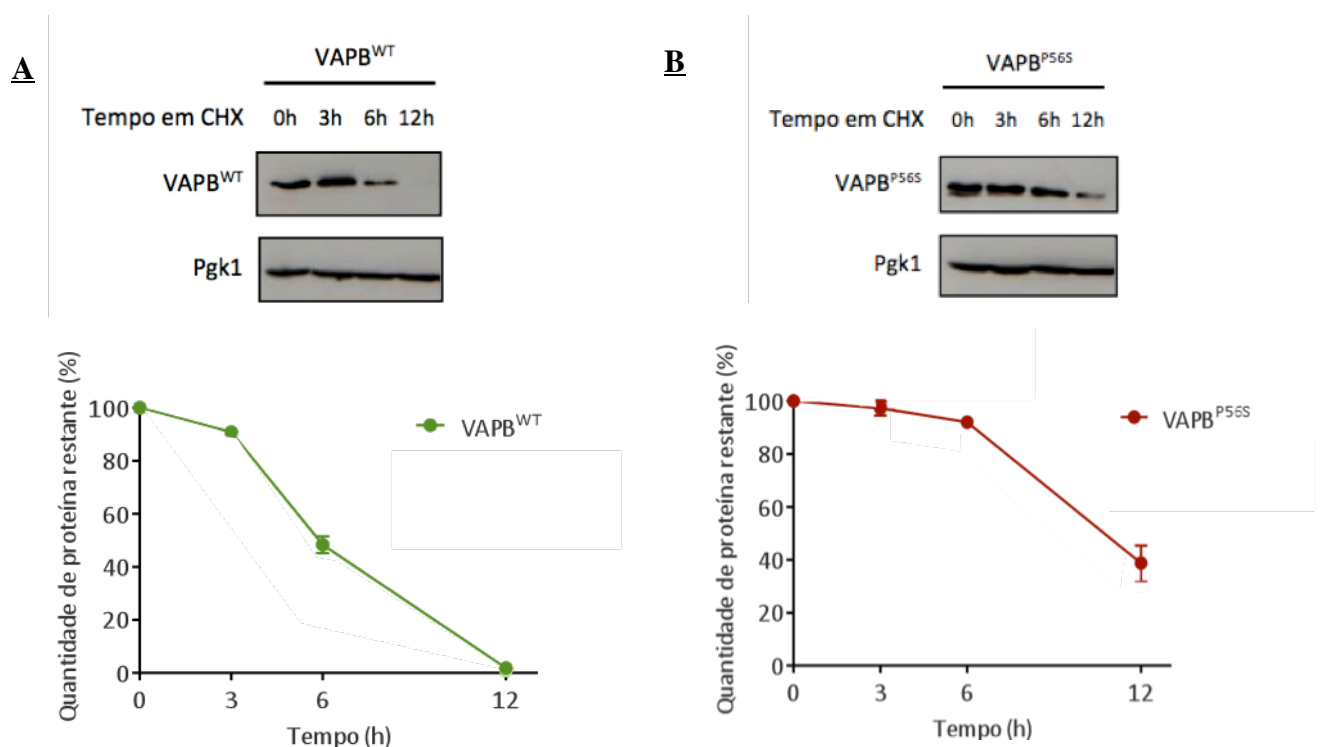


Figura 42. Degradação de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} na linhagem BY4741. A degradação das proteínas foi acompanhada por 12 horas. Todas as células foram tratadas com cicloheximida (CHX). **A:** Degradação de VAPB^{WT}. **B:** Degradação de VAPB^{P56S}. Os gráficos representam a razão obtida entre a expressão de VAPB e Pgk1. A intensidade do sinal foi quantificada utilizando o software ImageJ. Os valores estão expressos como média \pm SEM de dois experimentos independentes.

Nas linhagens $\Delta Pdr5$ expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} o efeito da inibição do proteassomo sobre a degradação proteica é evidente somente na linhagem expressando a proteína selvagem (**Figura 44**). Há acúmulo de VAPB^{WT} até 12 horas depois do tratamento com cicloheximida e MG132, evidenciando a importância do sistema UPS para a degradação

da proteína humana selvagem no modelo de levedura. A proteína mutante apresenta um padrão de degradação semelhante àquele observado nas linhagens BY4741. Possivelmente a degradação de VAPB^{P56S} ocorra por processos distintos de UPS.

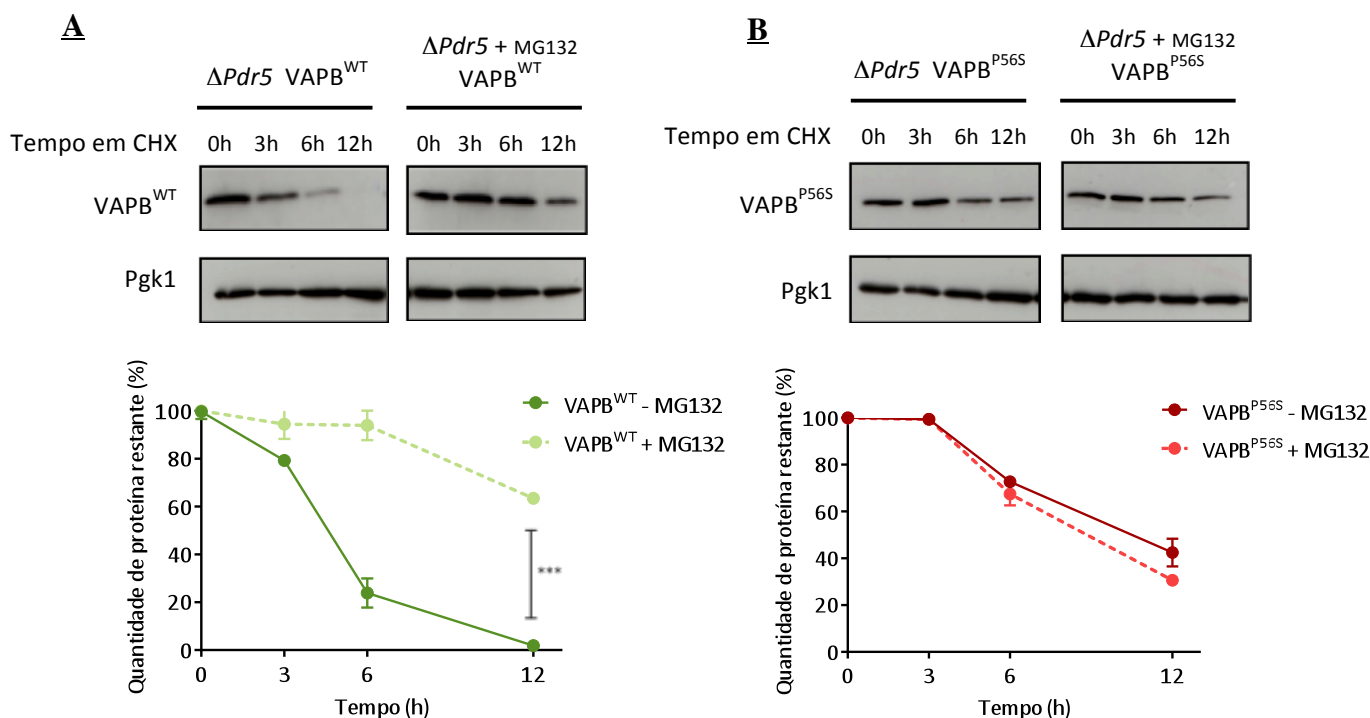


Figura 43. Degradação de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} na linhagem $\Delta Pdr5$. A degradação das proteínas foi acompanhada por 12 horas. Todas as células foram tratadas com cicloheximida (CHX) e o tratamento com 80 μ M de MG132 foi facultativo. **A:** Degradação de VAPB^{WT}. **B:** Degradação de VAPB^{P56S}. Os gráficos representam a razão obtida entre a expressão de VAPB e Pgc1. A intensidade do sinal foi quantificada utilizando o software ImageJ. Os valores estão expressos como média \pm SEM de dois experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ relativo à linhagem sem tratamento.

Em contraste, a inibição da autofagia nas linhagens $\Delta Atg8$ parece afetar mais a linhagem expressando VAPB^{P56S} (**Figura 45**). A linhagem expressando a proteína selvagem também apresentou maior acúmulo proteico em comparação com o tratamento sem qualquer inibição descrito anteriormente, porém, na proteína mutante este acúmulo foi cerca 30% maior, o que sugere que a autofagia é processo mais importante para a degradação de VAPB^{P56S} do que a degradação de VAPB^{WT}.

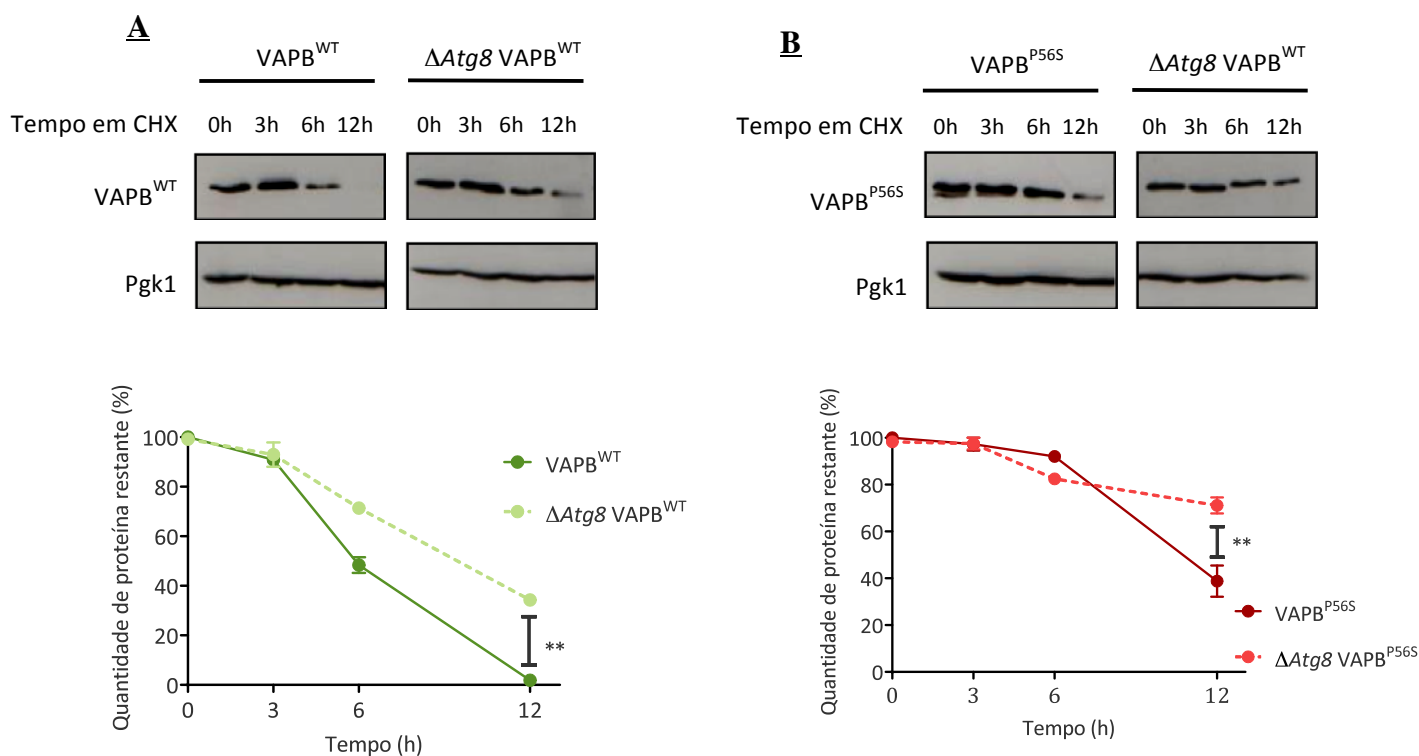


Figura 44. Degradação de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} na linhagem $\Delta Atg8$. A degradação de ambas as proteínas foi acompanhada por 12 horas. Todas as células foram tratadas com cicloheximida (CHX). Foi inserida, para fins de comparação, a curva de degradação das linhagens BY4741 expressando as proteínas humanas nos dois casos. **A:** Degradação de VAPB^{WT}. **B:** Degradação de VAPB^{P56S}. Os gráficos representam a razão obtida entre a expressão de VAPB e Pgk1. A intensidade do sinal foi quantificada utilizando o software ImageJ. Os valores estão expressos como média \pm SEM de dois experimentos independentes. ** $p \leq 0,01$ relativo à linhagem sem tratamento.

Por fim, a inibição conjunta do proteassomo e da autofagia, por meio de tratamento com MG132 e Bafilomicina, afetou de modo semelhante as linhagens $\Delta Pdr5$ expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} (**Figura 46**). Apenas a linhagem expressando a proteína selvagem apresentou decréscimo estatisticamente significativo após 12 horas de inibição.

A **Figura 47** compara os resultados obtidos, resumindo-os em um gráfico onde os níveis de proteína obtidos após 12 horas de tratamento com cicloheximida foram normalizados para o valor do tempo inicial para cada linhagem. Assim, pode-se comparar de maneira clara a relevância de cada tratamento na degradação das proteínas VAPB. A partir destes dados, acreditamos que a proteína selvagem seja degradada preferencialmente pelo UPS e a proteína mutante por autofagia.

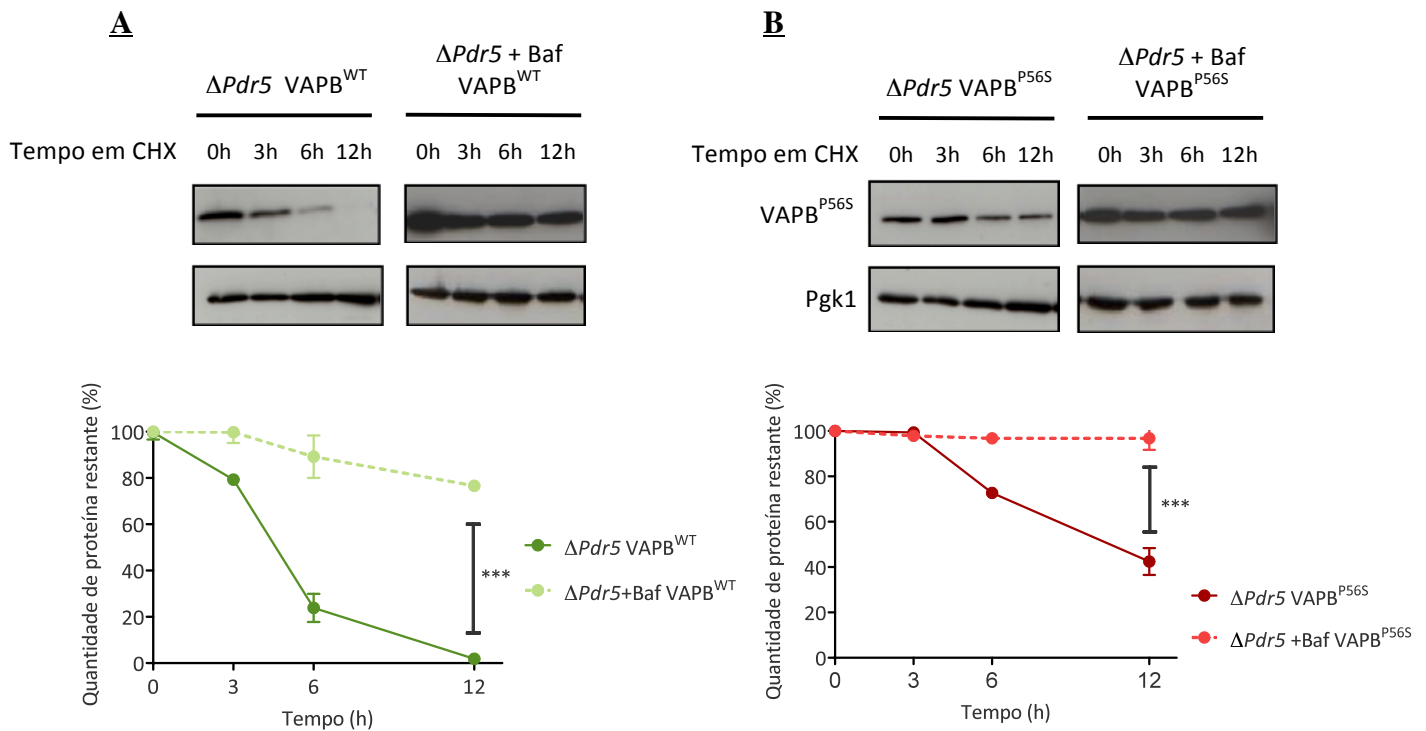


Figura 45. Degradação de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} na linhagem $\Delta Pdr5$ com inibição conjunta do proteassomo e autofagia. A degradação de ambas as proteínas foi acompanhada por 12 horas. Todas as células foram tratadas com cicloheximida (CHX), 80 μ M de MG132 e 1 μ M de Bafilomicina. Foi inserida, para fins de comparação, a curva de degradação das linhagens $\Delta Pdr5$ expressando as proteínas humanas nos dois casos. **A:** Degradação de VAPB^{WT}. **B:** Degradação de VAPB^{P56S}. Os gráficos representam a razão obtida entre a expressão de VAPB e Pgk1. A intensidade do sinal foi quantificada utilizando o software ImageJ. Os valores estão expressos como média \pm SEM de dois experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ relativo à linhagem sem tratamento.

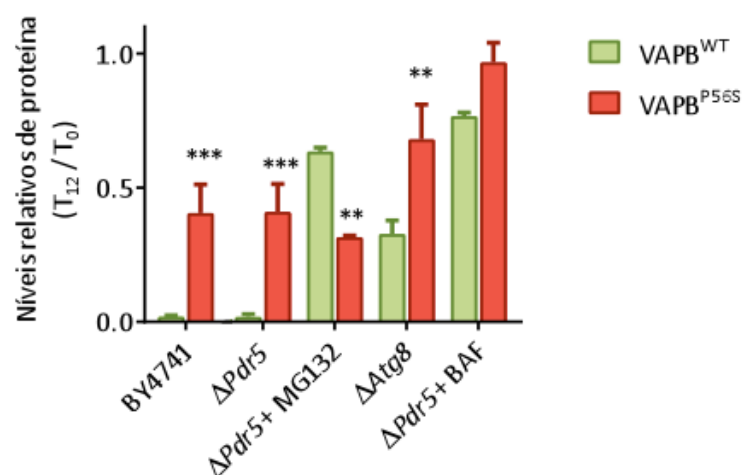


Figura 46. Comparação da degradação de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}. O gráfico sumariza os resultados dos ensaios de estabilidade proteica. Os valores representam o resultado da razão entre a expressão no tempo final sobre o tempo inicial. As análises foram feitas usando ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Tukey. Os valores estão expressos como média \pm SEM de dois experimentos independentes. ** $p \leq 0,01$ relativo à VAPB^{WT}; *** $p \leq 0,001$ relativo à VAPB^{WT}. Valores próximos a 1 indicam níveis estáveis da proteína ao longo do tempo.

3. MEDIÇÃO DA ATIVIDADE DO PROTEASSOMO

A atividade do proteassomo foi medida a partir do extrato celular das linhagens BY4741 expressando VAPB^{WT} ou VAPB^{P56S} e $\Delta Pdr5$ expressando VAPB^{WT} ou VAPB^{P56S} e seus controles.

Foram incubados 25 μ g de proteínas com 120 mM do substrato Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, específico para a atividade quimotripsina. Os resultados obtidos estão descritos na **Tabela 14**.

Observa-se que o uso do MG132 inibiu eficazmente o proteassomo (cerca de 85%), pois todas as linhagens tratadas com o inibidor apresentaram a atividade quimotripsina reduzida. Em ambos os casos, com ou sem inibição por MG132, a linhagem expressando VAPB^{P56S} apresentou a atividade do proteassomo reduzida (cerca de 70%) em relação ao controle e na linhagem expressando VAPB^{WT}, ao contrário, a atividade foi maior (cerca de 130%).

Tabela 14. Atividade do proteassomo. Os dados estão apresentados como média \pm SEM de três experimentos independentes.

Linhagem	Atividade (V_{\max}/min)
pYES	45,61 \pm 2,69
VAPB ^{WT}	58,86 \pm 3,64
VAPB ^{P56S}	33,94 \pm 1,96
pYES + 80 μ M de MG 132	7,23 \pm 0,08 (15.8%) *
VAPB ^{WT} + 80 μ M de MG 132	9,52 \pm 0,28 (16.2 %) *
VAPB ^{P56S} + 80 μ M de MG 132	5,02 \pm 0,23 (14.7%) *

*Os valores entre parênteses representam a porcentagem sobre as respectivas velocidades na ausência de tratamento por MG132.

A detecção dos peptídeos foi feita por fluorímetro nos comprimentos de onda 380 nm (excitação) e 460 nm (emissão).

4. MARCAÇÃO DAS PROTEÍNAS UBIQUITINADAS E DAS SUBUNIDADES DO PROTEASSOMO

Uma vez que a atividade do proteassomo estava alterada nas linhagens expressando proteínas humanas, o *pool* de proteínas ubiquitinadas e o nível das subunidades do proteassomo foram avaliados por *Western blotting*.

O mesmo extrato utilizado para a medição da atividade do proteassomo foi submetido à corrida eletroforética em SDS-PAGE e *Western blotting* com anticorpos anti-Ub K48, anti-Rpt4 (19S), anti- α 3, anti- α 4, anti- β 1 e anti- β 7 (20S), e anti-Pgk1. Interessantemente, a linhagem expressando VAPB^{P56S} apresenta um elevado nível de proteínas ubiquitinadas, apesar do aumento nos níveis de proteínas das subunidades dos complexos 19S e 20S, indicando forte inibição da atividade proteolítica do proteassomo (**Figura 48**). Por outro lado, na linhagem expressando VAPB^{WT} também foi observada indução de subunidades dos complexos 19S e 20S, mas nesse caso o nível de proteínas ubiquitinadas foi reduzido, não havendo, portanto, nenhuma evidencia de inibição do proteassomo. Essas evidências de inibição do proteassomo na linhagem expressando VAPB^{P56S} (mas não na linhagem expressando VAPB^{WT}) são consistente com a diminuição da atividade proteassomo descritos anteriormente (**Tabela 14**).

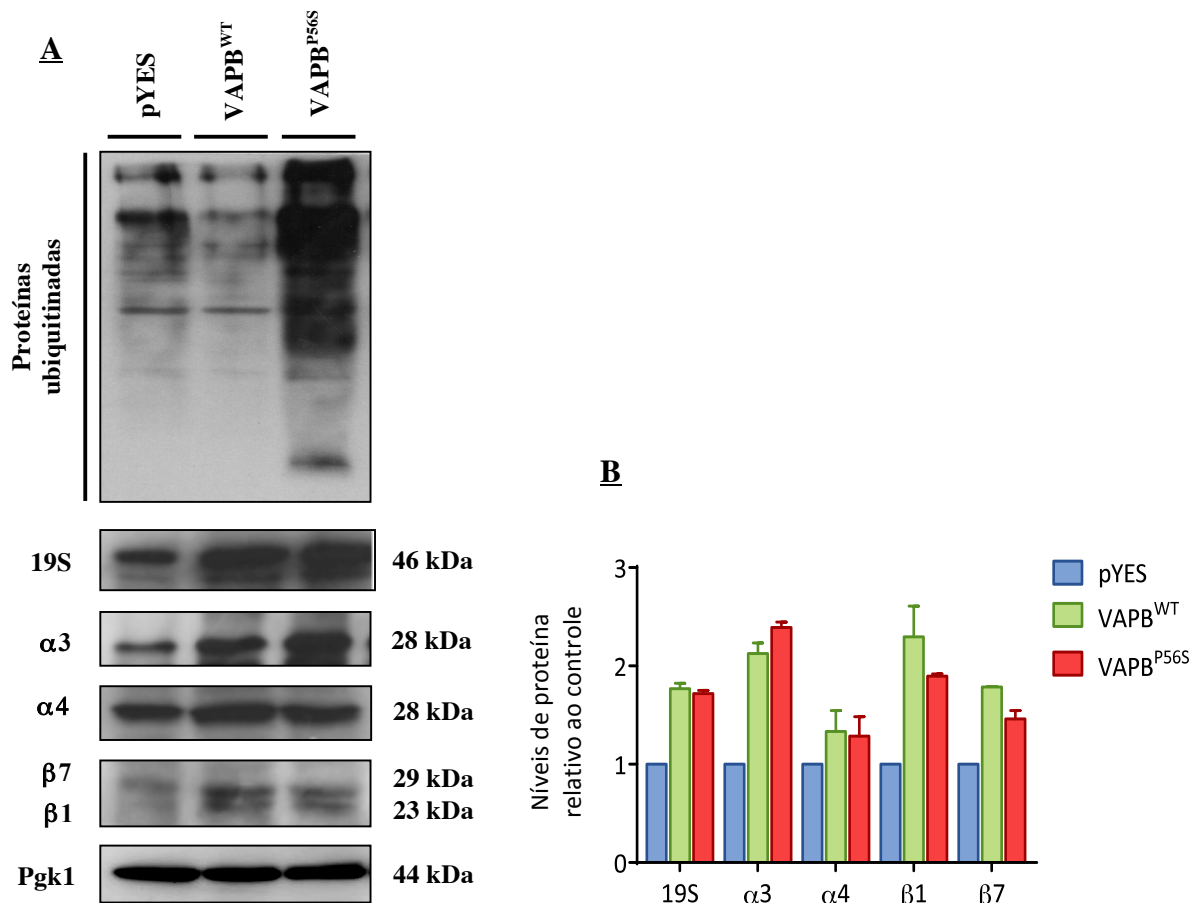


Figura 47. Marcação das proteínas ubiquitinadas e das subunidades do proteassomo. Os extratos utilizados para a medição da atividade do proteassomo foram submetidos à corrida eletroforética em SDS-PAGE e *Western blotting* com anticorpos anti-Ub K48 e relativos a diferentes subunidades do proteassomo. **A:** Marcação com anticorpos. **B:** Expressão relativa ao controle de cada subunidade do proteassomo.

5. MONITORAMENTO DA AUTOFAGIA PELA FUSÃO GFP-ATG8

Para monitorar os níveis de autofagia, as linhagens BY4741 expressando VAPB^{WT} ou VAPB^{P56S} e a linhagem controle receberam o plasmídeo centromérico pCuGFPATG8415 que contem os genes que codificam a proteína Atg8 fusionada à GFP. Na formação do autofagossomo, GFP é clivada no vacúolo da levedura e, por ser resistente à degradação pelas proteases vacuolares, permanece livre. Desta maneira, a detecção de GFP livre por *Western blotting* funciona como um marcador do processo autofágico.

A **Figura 49** mostra o resultado do *Western blotting* após marcação com anticorpo anti-GFP. Observa-se o surgimento das bandas referentes à GFP nas linhagens VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} crescidas em galactose, o que indica aumento no processo autofágico. Esta diferença é especialmente evidente quando há expressão da proteína mutante, chegando a ser cinco vezes maior que na situação de expressão da proteína selvagem. Os níveis de autofagia nas linhagens crescidas em glicose são mínimos em qualquer uma das linhagens avaliadas.

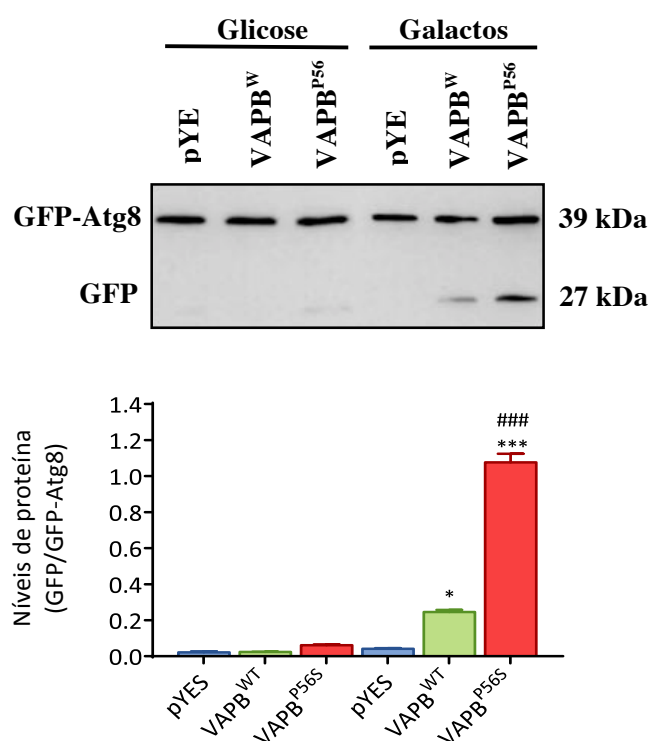


Figura 48. Monitoramento da autofagia em linhagens expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}. A detecção da autofagia ocorreu pela quantificação de GFP livre. Foi utilizado o anticorpo anti-GFP em diluição 1:2000 para marcação de GFP livre e da fusão GFP-Atg8. Os valores apresentados no gráfico representam a expressão relativa de GFP sobre a fusão. As análises foram feitas usando ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey. Os valores estão expressos como média \pm SEM de dois experimentos independentes. * $p \leq 0,05$ relativo ao controle; *** $p \leq 0,001$ relativo ao controle; ### $p \leq 0,001$ relativo à VAPB^{WT}.

6. AVALIAÇÃO DA UPR E ESTRESSE DO RE POR *SPLICING* ALTERNATIVO DE *HAC1*

A amplificação dos transcritos de *Hac1* na forma processada (*spliced*), um parâmetro bem estabelecido para a detecção de UPR, foi realizada nas linhagens BY4741, $\Delta Scs2$, $\Delta Pdr5$ + 80 μ M de MG132 e $\Delta Atg8$ expressando VAPB^{WT} ou VAPB^{P56S} crescidas em Meio Mínimo contendo galactose como fonte de carbono (**Figura 50**).

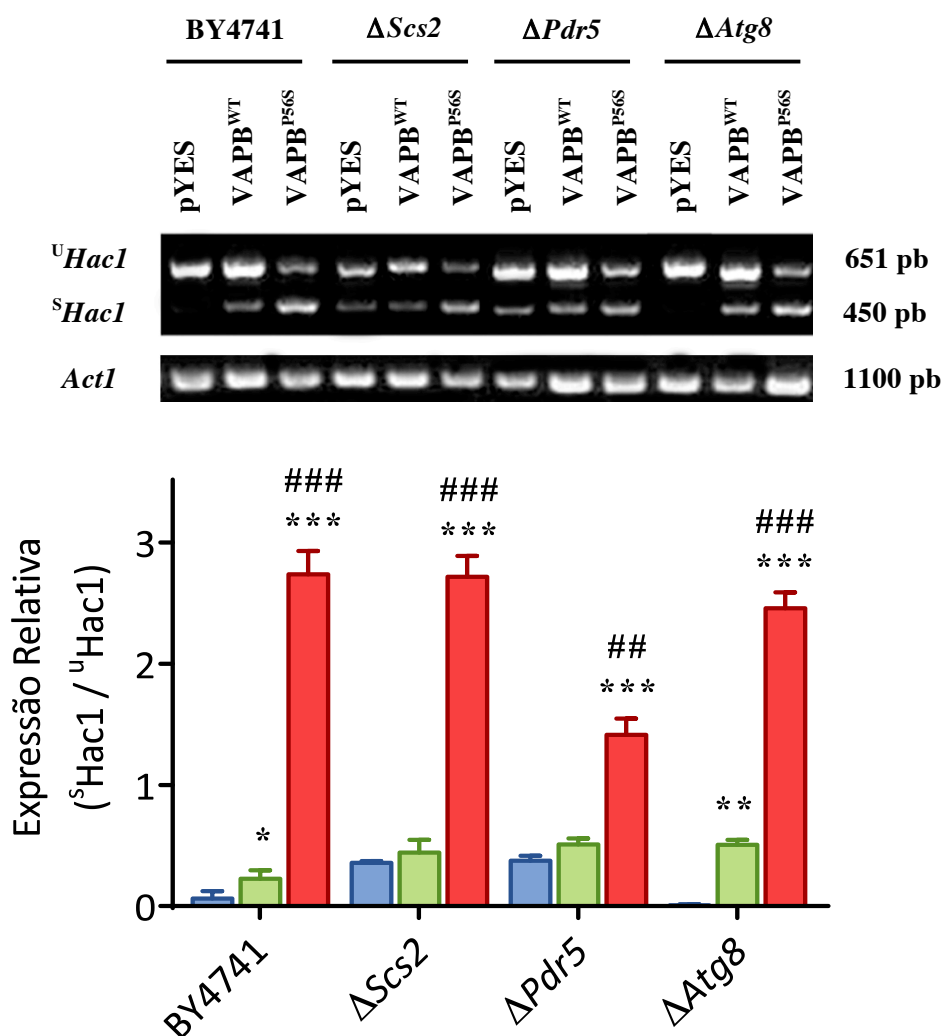


Figura 49. Níveis de transcritos de *Hac1*. O mRNA *Hac1* foi detectado usando *primers* específicos. O RNA foi isolado das linhagens BY4741, $\Delta Scs2$, $\Delta Pdr5$ + 80 μ M de MG132 e $\Delta Atg8$ expressando VAPB^{WT} ou VAPB^{P56S} crescidas em Meio Mínimo contendo galactose como fonte de carbono. A forma longa de *Hac1* (*5Hac1*) possui 651 pb e a forma processada (*5Hac1*) possui 450 pb. A amplificação de *Act1* foi utilizada como *loading control*. Os valores apresentados no gráfico representam a expressão relativa de *5Hac1* sobre *5Hac1*. As análises foram feitas usando ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey. Os valores estão expressos como média \pm SEM de dois experimentos independentes. * $p \leq 0,05$ relativo ao controle; ** $p \leq 0,01$ relativo ao controle; *** $p \leq 0,001$ relativo ao controle; ## $p \leq 0,01$ relativo à VAPB^{WT}; ### $p \leq 0,001$ relativo à VAPB^{WT}.

Como mostrado na **Figura 50**, a expressão das proteínas VAP aumenta a UPR, uma vez que há maiores níveis de ^S*Hac1* em relação a ^U*Hac1*. É possível notar maior quantidade da forma processada nas linhagens expressando VAPB^{P56S}, mesmo em comparação com as linhagens expressando VAPB^{WT}, o que sugere que a UPR está mais ativa quando há a expressão da proteína mutante. Situações de UPR prolongada podem levar ao estresse do RE e, em última análise, à apoptose. Desta forma, os resultados obtidos sugerem um importante papel da expressão da proteína mutante na desregulação da proteostase celular.

7. ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES DE ESTRESSE DO RE POR qRT-PCR

A expressão dos genes marcadores de estresse do RE *Pdi1*, *Ero1*, *Lhs1* e *Kar2* foi avaliada por qRT-PCR nas linhagens BY4741 expressando VAPB^{WT} ou VAPB^{P56S} e na linhagem controle (**Figura 51**). Os genes *Act1* e *Taf10* foram utilizados como *housekeeping genes*.

A expressão de *Pdi1* foi aproximadamente 1,5 vezes maior na linhagem BY4741 VAPB^{P56S} do que na linhagem controle na normalização por qualquer um dos dois *housekeeping genes* (**Figura 51 A**). De forma semelhante, a expressão de *Ero1* esteve aumentada na linhagem expressando a proteína VAPB^{P56S} (**Figura 51 B**). A abundância de *Pdi1* e *Ero1* pode ser o fator que justifique o aumento discreto observado na expressão de ambos os genes. Estas enzimas são marcadores de estresse do RE e atuam no metabolismo redox e no enovelamento de proteínas. Uma vez que os parâmetros de estresse oxidativo e a proteostase, de modo geral, estavam alterados na linhagem expressando VAPB^{P56S}, o aumento na expressão de *Pdi1* e *Ero1* ganha significado e relevância.

A expressão de *Kar2* só foi significativamente maior nas linhagens expressando VAPB^{P56S} do que no controle na normalização por qualquer um dos dois *housekeeping genes* (**Figura 51 C**). *Kar2* participa da UPR como um importante sensor para proteínas mal-enoveladas. Quando há acúmulo destas proteínas, *Kar2* se desassocia de *Ire1* ligando-se a elas. Trata-se, também, de uma proteína abundante no RE e de demanda contínua.

Por fim, observou-se que a expressão de *Lhs1* duplicou nas linhagens expressando a proteína mutante em comparação com o controle (**Figura 51 D**). Também nas linhagens BY4741 VAPB^{WT} houve aumento na expressão em relação ao controle. Assim como a proteína *Kar2*, *Lhs1* está associada à UPR, além de atuar como chaperona em processos de enovelamento no lúmen do RE.

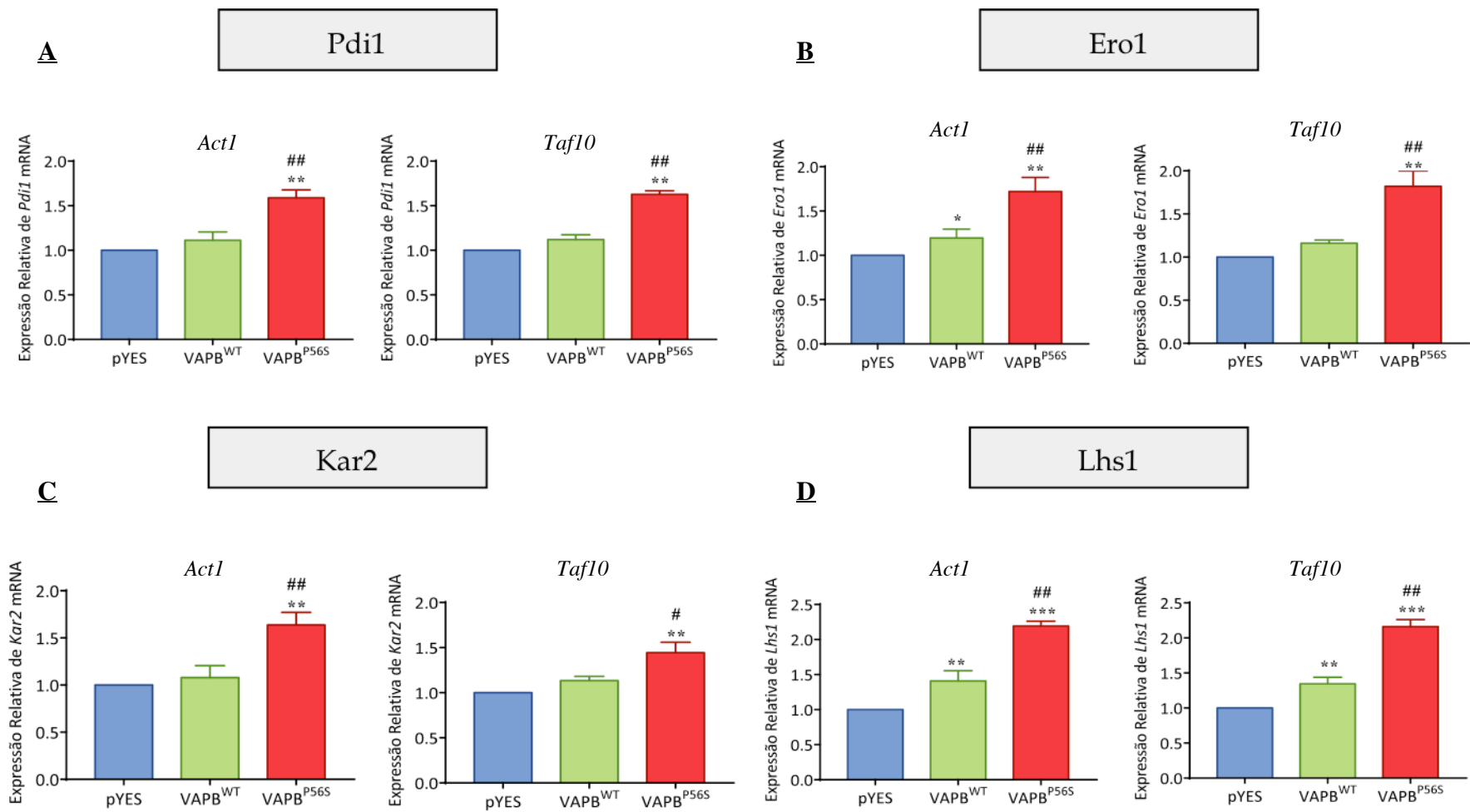


Figura 50. Expressão relativa de marcadores de estresse do RE. A expressão foi obtida por qRT-PCR. **A:** Expressão relativa de *Pdi1* utilizando os gene *Act1* e *Taf10* para a normalização. **B:** Expressão relativa de *Ero1* utilizando os gene *Act1* e *Taf10* para a normalização. **C:** Expressão relativa de *Kar2* utilizando os gene *Act1* e *Taf10* para a normalização. **D:** Expressão relativa de *Lhs1* utilizando os gene *Act1* e *Taf10* para a normalização. As análises foram feitas usando ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey. Os valores estão expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes. * $p \leq 0,01$ relativo ao controle; ** $p \leq 0,01$ relativo ao controle; ### $p \leq 0,01$ relativo à VAPB^{WT}.

Tomados em conjunto, esses dados sugerem que o estresse do RE pode estar relacionado com a falha na manutenção da proteostase celular e com os fenótipos observados de menor viabilidade das linhagens expressando a proteína mutante.

8. VIABILIDADE APÓS AUMENTO NA EXPRESSÃO DE Tsa1

Para avaliar a possíveis efeitos de Tsa1 nas linhagens BY4741 expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}, foi feita a transformação destas com o plasmídeo pCEV-G1-Ph contendo o gene de *Tsa1* sob o controle do promotor constitutivo TEF1 (KAYA *et al.*, 2014).

A expressão de Tsa1 foi verificada por *Western blotting* utilizando o anticorpo anti-Tsa1 em diluição 1:1000 (**Figura 52**). É possível observar que a expressão foi, aproximadamente duas vezes maior nas linhagens que receberam o plasmídeo. A seleção das linhagens que receberam o plasmídeo ocorreu pelo uso da droga fleomicina.

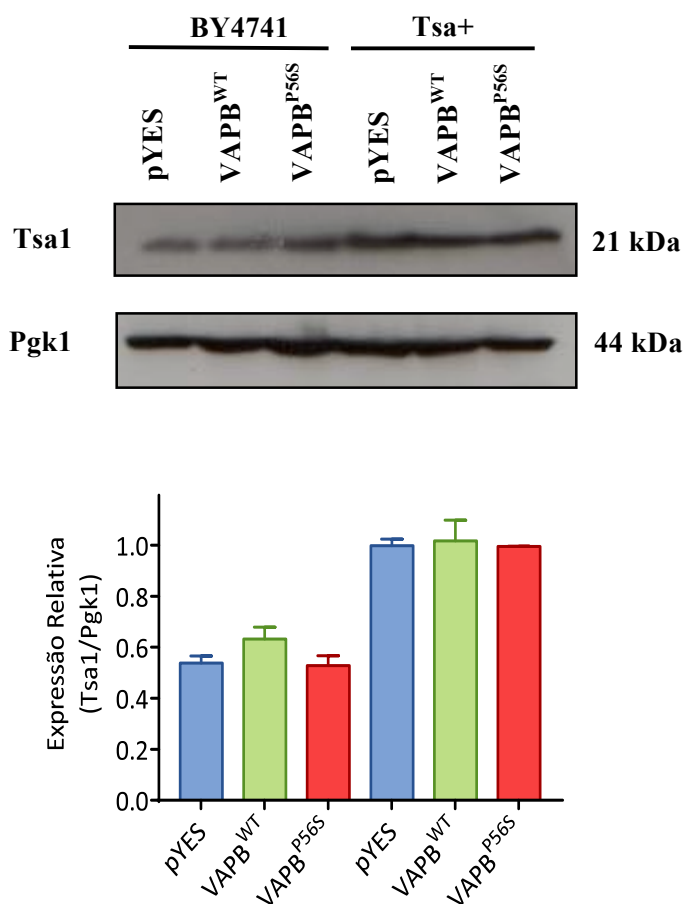


Figura 51. Expressão de Tsa1 nas linhagens BY4741. As linhagens BY4741 expressando VAPB^{WT} ou VAPB^{P56S} e a linhagem controle foram transformadas com plasmídeo contendo o gene *Tsa1*. A seleção foi feita pela droga fleomicina. Os valores apresentados no gráfico representam a expressão relativa de Tsa1 sobre Pgk1. Os valores estão expressos como média \pm SEM de dois experimentos independentes.

Verificada a expressão, foram feitas curvas de crescimento e diluições seriadas a fim de avaliar a viabilidade das células após a superexpressão de Tsa1 (**Figura 53**).

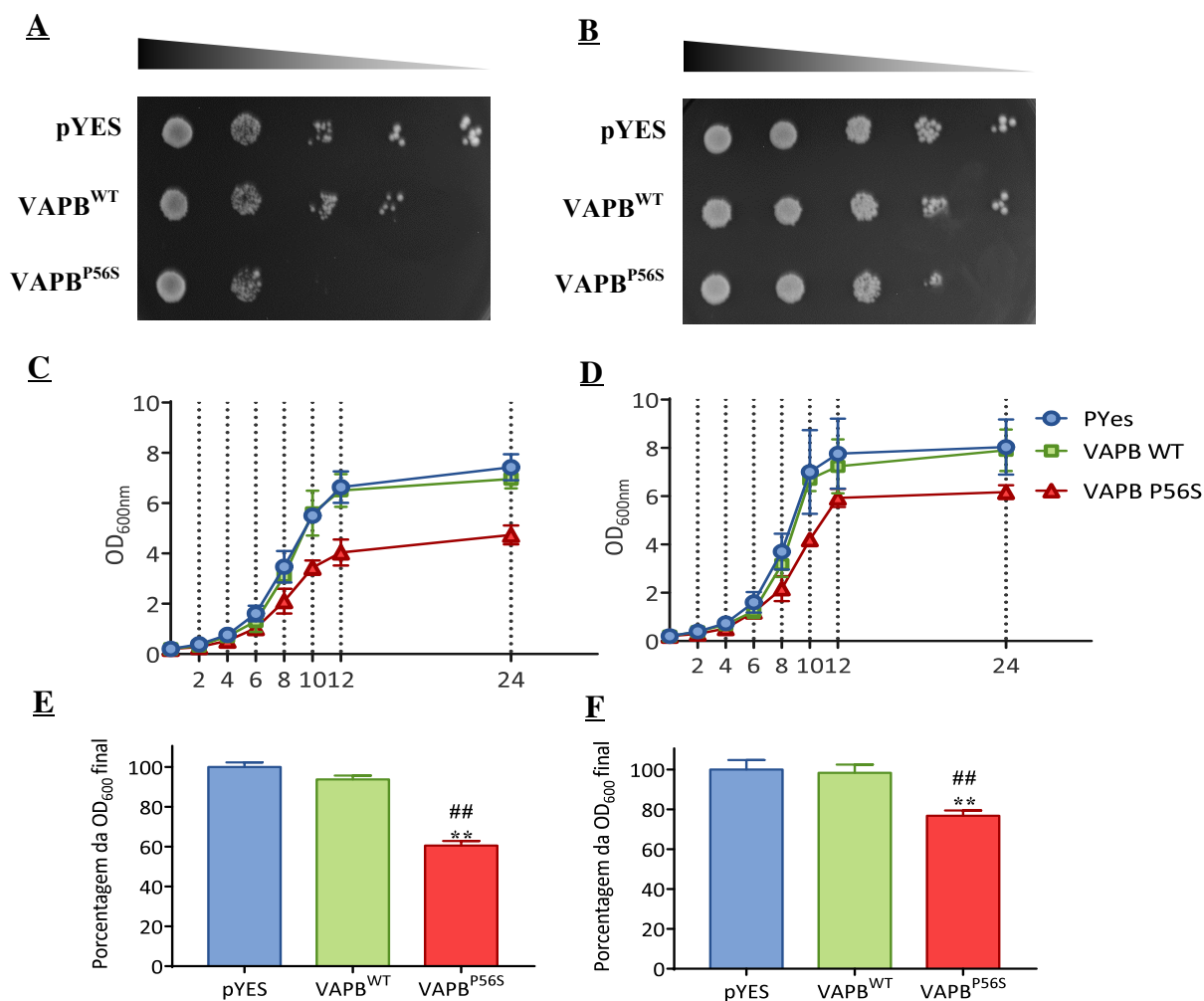


Figura 52. Viabilidade das linhagens BY4741 expressando Tsa1. As linhagens expressando VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} foram transformadas com o plasmídio contendo Tsa1. **A:** Diluição seriada da linhagem sem aumento na expressão de Tsa1. **B:** Diluição seriada da linhagem com aumento na expressão de Tsa1. **C:** Curva de crescimento da linhagem sem aumento na expressão de Tsa1. **D:** Curva de crescimento da linhagem com aumento na expressão de Tsa1. **E:** Porcentagem relativa ao controle da OD₆₀₀ máxima atingida da linhagem sem aumento na expressão de Tsa1. **F:** Porcentagem relativa ao controle da OD₆₀₀ máxima atingida da linhagem com aumento na expressão de Tsa1. As análises foram feitas usando ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey. Os valores estão expressos como média ± SEM de três experimentos independentes. ** $p \leq 0,01$ relativo ao controle; ## $p \leq 0,01$ relativo à VAPB^{WT}.

A expressão de Tsa1 levou, de modo geral, a um aumento na viabilidade de todas as

amostras. Porém, é possível observar que a expressão de Tsa1 é capaz de atenuar o fenótipo da expressão de VAPB^{P56S} de forma diferencial, pois a BY4741 VAPB^{P56S} sem aumento de expressão de Tsa1 atinge apenas 60% da OD₆₀₀ máxima atingida pelo controle, enquanto a BY4741 VAPB^{P56S}, com aumento de expressão de Tsa1, chega a 80%. Também no ensaio de diluição seriada a atenuação do fenótipo é evidente. Este melhora pode estar associada à possível atividade chaperona redox-dependente de Tsa1. Ela é, por meio da hiperoxidação por H₂O₂, capaz de recrutar para agregados proteicos chaperonas da família Hsp70 e Hsp104 que têm função na desagregação desses. De fato, como mostrado na **Figura 54** a proteína Tsa1 quando submetida a um gel não redutor, apresenta uma maior formação de Tsa1 em sua forma dimérica.

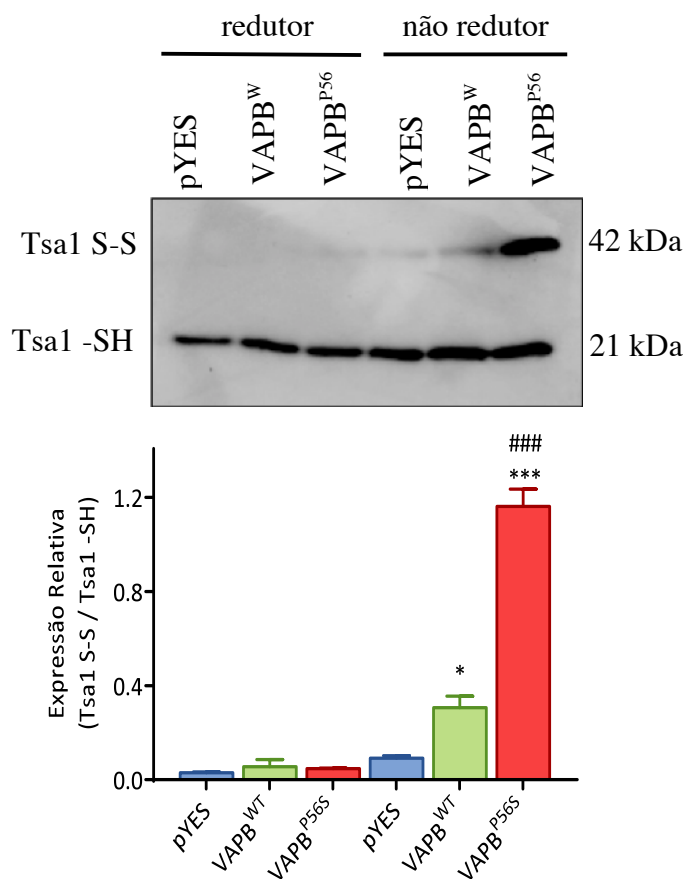


Figura 53. Expressão de dímeros de Tsa1 nas linhagens BY4741. As linhagens BY4741 expressando VAPB^{WT} ou VAPB^{P56S} e a linhagem controle foram transformadas com plasmídeo contendo o gene *Tsa1*. Foi feita uma lise ácida com o alquilante NEM a fim de manter os níveis de Tsa1 na sua forma oxidada. Os valores apresentados no gráfico representam a expressão relativa de Tsa1 sobre Pgk1. Os valores estão expressos como média \pm SEM de dois experimentos independentes. As análises foram feitas usando ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey. Os valores estão expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes. Os valores estão expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes. * $p \leq 0,01$ relativo ao controle; *** $p \leq 0,001$ relativo ao controle; ### $p \leq 0,001$ relativo à VAPB^{WT}.

V. DISCUSSÃO

A VAPB é uma proteína localizada na membrana do RE que está envolvida em diversos processos celulares, como o tráfego e sinalização intracelular, organização de microtúbulos, localização mitocondrial, homeostase de cálcio, metabolismo de lipídeos (fosfatidilinositol), UPR, entre outros. Sua forma mutante mais estudada, VAPB^{P56S}, está associada a uma forma de ELA de herança dominante e de progressão lenta (NISHIMURA *et al.*, 2004). Compreender como e quais desses processos se inter-relacionam para o desenvolvimento da neurodegeneração é um desafio.

Com o objetivo de investigar mecanismos subjacentes ao fenótipo resultante da expressão da proteína VAPB^{P56S} em um modelo simples e facilmente tratável, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi transformada com plasmídeos contendo os genes para as proteínas humanas VAPB selvagem e mutante e com o plasmídeo vazio, que foi utilizado como controle. A expressão foi verificada em nível de RNA, por RT-PCR, e em nível de proteína, por *Western blotting*. Uma vez que as proteínas estavam sendo expressas em quantidades semelhantes, procurou-se determinar a localização de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}. Em humanos esta proteína está ancorada no RE por um domínio transmembrana próximo à sua região C-terminal e o domínio MSP voltado para o citoplasma (LEV *et al.*, 2008). Foi mostrado, porém, que a superexpressão da proteína mutante leva à formação de inclusões associadas ao RE (FASANA *et al.*, 2010; KUIJPERS *et al.*, 2013). Neste trabalho verificou-se que ambas, VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}, estão presentes na fração do RE isolada (**Figura 21**). A linhagem expressando VAPB^{WT} apresentou a proteína íntegra apenas nas frações P₂₇₀₀₀ (contendo organelas membranosas) e F₁₀₀₀₀₀ (contendo o RE isolado) e o domínio MSP clivado em todas as frações, excetuando-se a fração F₁₀₀₀₀₀. Este resultado está de acordo com o que foi observado em modelo de *Drosophila*, onde TSUDA *et al.* (2008) verificaram que VAP-33, o homólogo de VAPB neste organismo, tem seu domínio MSP clivado e secretado. Assim, a forte marcação do domínio MSP obtida nas frações ET, P₁₀₀₀ (contendo células não lisadas, agregados e núcleos), S₁₀₀₀, P₂₇₀₀₀ e S₂₇₀₀₀, pode representar que, no modelo de levedura construído, a proteína selvagem também sofre essa clivagem.

Em relação VAPB^{P56S}, observou-se um padrão de marcação diferente, estando a proteína mutante presente em todas as frações, com exceção de S₂₇₀₀₀ (contendo o citoplasma) (**Figura 21**). A ausência de marcação correspondente ao domínio MSP chama à atenção, indicando que a mutação P56S dificulta a clivagem deste domínio, o que também foi

observado por TSUDA *et al.* (2008) em *Drosophila*. A frequente marcação de bandas com peso molecular acima do esperado para VAPB^{P56S} e a forte presença na fração P₁₀₀₀ (contendo células não lisadas, agregados e núcleos), são evidências de ocorrência de formação de inclusões da proteína mutante. Estas inclusões poderiam ser formadas por diferentes níveis de oligomerização de VAPB^{P56S} e conter outras proteínas ligadas a ela covalentemente, como, por exemplo, ubiquitina. De fato, PAPIANI *et al.* (2012) verificaram que inclusões formadas por VAPB^{P56S} são positivas para ubiquitina. Foram feitas tentativas de coimunoprecipitar as proteínas VAPB para posteriores verificações de interações proteína-proteína, porém não houve sucesso.

Também as imagens obtidas com as linhagens expressando as proteínas humanas fusionadas à GFP indicam diferença no padrão de distribuição das proteínas na célula. A VAPB^{WT} colocaliza com o marcador fluorescente utilizado, mostrando uma distribuição reticular perinuclear e cortical (**Figura 23**). A VAPB^{P56S} apresenta distribuição difusa e pode estar ou não colocalizada com o RE (**Figura 24**). Mesmo o quadro mostrando apenas o marcador do RE apresenta uma distribuição anormal, o que é esperado, uma vez que a expressão da proteína mutante promove uma reestruturação desta organela, como observado em células HeLa por PAPIANI *et al.* (2012). O grande número de *puncta* observado também sugere agregação e pode estar intimamente ligado aos efeitos tóxicos apresentados pela expressão da proteína nesta linhagem. Agregação semelhante foi observada por COUTHOUIS *et al.* (2011) superexpressando em levedura outras proteínas associadas a ELA, como FUS e TDP-43.

Os dados obtidos com curvas de crescimento e diluições seriadas das células superexpressando a proteína mutante mostram expressiva diminuição da viabilidade (**Figura 25**). O crescimento desta linhagem atingiu cerca de 60% do crescimento máximo observado no controle e na linhagem expressando a proteína selvagem. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar os fenótipos similares observados em diferentes modelos. MOUMEN *et al.* (2011) mostraram efeitos tóxicos da expressão de VAPB^{P56S} sobre a atividade do proteassomo em células COS-7, porém a superexpressão de VAPB^{WT} também apresentou tais efeitos. LARROQUETTE *et al.* (2015), com camundongos knock-in para VAPB^{P56S}, mostraram defeitos motores associados à expressão da proteína mutante. Ambos os trabalhos sugerem um ganho de função tóxica da proteína mutante.

Por outro lado, KABASHI *et al.* (2013) mostraram não haver defeitos motores associados à superexpressão da proteína mutante em *zebrafish* e MITNE-NETO *et al.* (2011), utilizando neurônios motores derivados de iPSCs de pacientes, não verificaram a formação de

inclusões de VAPB e mostraram redução nos níveis desta proteína nas células avaliadas. Dessa forma, hipótese de haploinsuficiência foi levantada como fator para o surgimento dos fenótipos relacionados à neurodegeneração. Em contrapartida, e suportando a hipótese de efeito dominante negativo, diversos trabalhos mostram que a superexpressão de VAPB^{P56S} levou à formação de inclusões positivas para a proteína selvagem e mesmo o seu parálogo, VAPA (KANEKURA *et al.*, 2006; TEULING *et al.*, 2007; FORREST *et al.*, 2013). Portanto, os resultados relacionados à formação de inclusões moleculares em distintos modelos ainda são discutíveis, sendo necessários mais estudos para entender as razões envolvidas nas diferenças observadas.

Para avaliar a hipótese de um efeito dominante negativo associado à expressão de VAPB^{P56S}, linhagens nocaute para *Scs2* foram transformadas com os plasmídeos superexpressando as proteínas VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}. Um fenótipo característico de linhagens nocauteadas para o gene *Scs2* é a auxotrofia ao inositol a temperatura elevadas. Como observado nos resultados (**Figura 27**), a expressão da proteína selvagem é capaz de restaurar o fenótipo de auxotrofia das células em meio sem inositol a 34°C, promovendo o crescimento da linhagem a níveis comparáveis àqueles onde houve suplementação com inositol. A proteína mutante, ao contrário, não restaurou o fenótipo e teve sua viabilidade ainda mais afetada, sugerindo que a mutação faz com que a proteína seja incapaz de desempenhar seu papel biológico e, ao mesmo tempo, tenha um efeito citotóxico associado. SUZUKI *et al.* (2009), expressando as proteínas VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}, sob controle do promotor ADH1, em linhagens duplo-mutantes de *S. cerevisiae* para *Scs2* e *Scs22*, seu parálogo, observaram a capacidade da proteína humana selvagem de restaurar o fenótipo de auxotrofia a 30°C, porém não foi visível efeito tóxico da expressão da proteína mutante com ou sem a complementação com inositol. O uso do promotor constitutivo e as condições experimentais podem explicar as diferenças observadas. De qualquer forma, nossos resultados indicam dois processos tóxicos independentes que são resultantes da expressão de VAPB^{P56S} em $\Delta scs2$: (i) incapacidade de crescer em meio sem inositol e (ii) proteotoxicidade. Na linhagem selvagem que tem os genes *Scs2* e *Scs22* selvagens o fator (i) não deve operar.

O efeito do tratamento com H₂O₂ foi danoso às células expressando ou não as proteínas selvagem e mutante, porém, um discreto aumento na sensibilidade a esse oxidante foi observada nas linhagens expressando a proteína mutante (**Figuras 28 e 29**). Deve-se considerar que na condição basal (sem tratamento com H₂O₂) a linhagem expressando VAPB^{P56S} já cresce menos que as outras linhagens. As duas concentrações, 0,75 mM e 1 mM de H₂O₂ diminuíram a viabilidade das linhagens em, aproximadamente, 20% em relação à

mesma linhagem crescida sem tratamento com o indutor de estresse oxidativo. Também a razão GSH/GSSG indica uma mudança no ambiente redox nestas células, uma vez que houve redução de cerca de 50% neste indicador (**Figuras 30, 31 e 32**). Em vista destas alterações buscou-se tratar as células com N-acetil-L-cisteína, um antioxidante que atua como precursor da síntese de glutathiona (**Figuras 35 e 36**). Este tratamento, porém, surtiu pequeno efeito na razão GSH/GSSG e um discreto aumento na viabilidade das células expressando VAPB^{P56S} tratadas com 10 mM do antioxidante. Uma contribuição importante desse trabalho é a alteração na razão GSH/GSSG como resultado da expressão das proteínas humanas, já que não havia indícios prévios do envolvimento da proteína VAPB no metabolismo redox.

Uma possibilidade para as alterações observadas é que a proteína VAPB^{P56S} interfira indiretamente no metabolismo redox da célula por causar outros tipos de estresse, como o estresse do RE (BHANDARY *et al.*, 2013). De fato, como verificado por qRT-PCR, marcadores do estresse do RE estavam alterados na linhagem expressando a proteína mutante. As expressões de *Pdi1* e *Ero1* foram cerca de 1,5 e 1,7 vezes maiores, respectivamente, nesta linhagem em comparação com a linhagem controle (**Figura 51**). A proteína Pdi1 promove o enovelamento de proteínas do RE por meio da formação de pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína. Após a formação *de novo* de pontes dissulfeto nas proteínas nascentes, e consequente redução de Pdi1, a enzima Ero1 ligada a seu cofator, FAD, oxida Pdi1, tornando-a disponível para novas reações. Os elétrons são, então, passados de Ero1 para FAD e, finalmente, para o oxigênio molecular, levando à formação de H₂O₂ (SEVIER & KAISER, 2008). Assim, o aumento na expressão de *Pdi1* e *Ero1* pode ser consequência do aumento de sua demanda neste ciclo, uma vez que há superexpressão das proteínas VAPB. Além disso, já foi descrito que a atividade de Ero1, e consequentemente de Pdi1, pode ser regulada de maneira redox-dependente e está associada à razão GSH/GSSG (APPENZELLER-HERZOG, 2011). A disponibilidade de GSH no RE é importante no processo de desenovelamento de proteínas por meio da redução de pontes dissulfeto. Como observado, há diminuição de GSH e aumento de GSSG na linhagem expressando VAPB^{P56S} e isto pode ser consequência da alta demanda de GSH – e maior formação de GSSG – para o desenovelamento das proteínas mutantes e subsequente encaminhamento para vias de degradação.

A produção de H₂O₂ aumentada nas frações enriquecidas de mitocôndrias da linhagem expressando a proteína mutante indica um mecanismo adicional de geração de oxidantes (**Figura 34**). A adição de etanol, aumentando a taxa respiratória na mitocôndria, elevou a produção de peróxido em todas as linhagens, porém não aumentou a diferença entre

elas. Levando-se em consideração que a cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa contribuem ativamente na geração de EROs – de modo especial pela formação do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), espécie que pode ser dismutada a H_2O_2 e O_2 pela ação da Cu/Zn-SOD1 – é possível que hajam danos estruturais na mitocôndria ou alterações nas vias e componentes que a relacionam com o RE. Os danos estruturais nas membranas da mitocôndria poderiam levar a um aumento na produção de H_2O_2 por interromper o fluxo de elétrons, formando o $O_2^{\cdot-}$. E este, como mencionado, é dismutado a H_2O_2 . Além disso, os dados obtidos com a razão GSH/GSSG também podem ser relacionados com falhas no sistema de transferência de elétrons na cadeia respiratória (CHEN *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2011). A respeito de possíveis efeitos de vias exteriores à mitocôndria, o estresse do RE pode ter um papel importante neste aumento de produção H_2O_2 . Uma vez que o enovelamento de proteínas no RE é um processo altamente dependente de energia, o uso contínuo de ATP pode estimular a fosforilação oxidativa mitocondrial e, por consequência, aumentar a produção de EROs. Além disso, a depleção de GSH no RE, ocasionada pela necessidade de reduzir pontes dissulfeto das proteínas mal-enoveladas, poderia também afetar processos na mitocôndria. Isto porque a glutatona é requerida, na mitocôndria, por enzimas como a Prx1 que reduzem o H_2O_2 formado e necessitam da GSH para a redução do ácido sulfênico formado (PEDRAJAS *et al.*, 2010). Em resumo, estes dados corroboram a ideia de que o estresse do RE pode ter grande relação com o estresse oxidativo.

Utilizando linhagens nocaute para o gene *Pdr5*, um transportador que atua no efluxo de drogas na levedura, foi possível avaliar o possível papel do proteassomo na degradação das proteínas VAPB (**Figura 44**). Inicialmente foi mostrado que a proteína mutante se acumula mesmo depois de 12 horas sem qualquer tipo de inibição e os níveis da proteína selvagem, ao contrário, já caem pela metade após 6 horas nas mesmas condições. A inibição do proteassomo por MG132 afeta a viabilidade de ambas as linhagens, VAPB^{WT} e VAPB^{P56S}. O acúmulo de VAPB^{WT} depois de 12 horas de tratamento com cicloheximida e MG132 evidencia a importância do proteassomo para a sua degradação. A degradação de VAPB^{P56S}, porém, não foi influenciada pelo inibidor. Assim, acredita-se que, neste modelo, a proteína selvagem seja degradada preferencialmente via sistema UPS, enquanto a proteína mutante não o seja. Este resultado diverge daqueles apresentados por PAPIANI *et al.* (2012) que, expressando estas proteínas em HeLa, verificaram que a degradação de VAPB^{P56S} ocorre mais rapidamente que a degradação de VAPB^{WT} e é dependente do proteassomo, e por BARON *et al.* (2014), que verificaram em células U2OS que a inibição do proteassomo não interfere na degradação VAPB^{WT}.

Em vista deste resultado, a atividade do proteassomo foi monitorada para sua função quimotripsina (**Tabela 14**). Foi observado um aumento na atividade do proteassomo na linhagem expressando VAPB^{WT} e uma diminuição na linhagem expressando VAPB^{P56S}. Esta observação foi corroborada pelo acúmulo de proteínas totais ubiquitinadas na linhagem contendo a proteína mutante (**Figura 48**). Resultado semelhante foi observado por CHEN *et al.* (2010) expressando a proteína VAPB com a mutação T46I em células NSC-34, onde a atividade do proteassomo estava diminuída. Além disso, MOUMEN *et al.* (2011) mostraram que a superexpressão de VAPB^{P56S} e VAPB^{WT} em células COS-7 compromete a atividade proteassomal e leva ao acúmulo de proteínas ubiquitinadas. Os mecanismos por trás deste comprometimento da atividade do proteassomo ainda não são claros, mas há trabalhos que mostram que situações prolongadas de estresse do RE podem ter ação inibitória sobre a atividade do proteassomo, o que pode explicar, inclusive, o acúmulo de proteínas mal-enoveladas em alguns casos (MENENDEZ-BENITO *et al.*, 2005; MOUMEN *et al.*, 2011). Deve-se considerar, no entanto, que tanto a expressão de VAPB^{WT} como a expressão de VAPB^{P56S} resultam no aumento nos níveis de diferentes componentes das duas subunidades do proteassomo 26S (**Figura 48**). Isto justificaria o aumento da atividade do proteassomo na linhagem expressando a proteína selvagem. Por outro lado, a linhagem expressando a proteína mutante foi menor mesmo havendo mais proteassomo disponível (**Tabela 14 e Figura 48**). É possível que a proteína VAPB^{P56S} comprometa de alguma forma a atividade do proteassomo, porém mais estudos são necessários para elucidar possíveis vias.

O efeito da inibição da autofagia nas linhagens $\Delta Atg8$ expressando VAPB^{P56S} é mais evidente do que nas linhagens expressando a proteína selvagem (**Figura 40**). A comparação entre BY4741 expressando VAPB^{P56S} e $\Delta Atg8$ expressando VAPB^{P56S} mostra que o crescimento desta última foi, aproximadamente, 30% menor do que da primeira. Além disso, o acúmulo da proteína mutante, observado no ensaio de estabilidade proteica, foi maior em comparação com a situação onde não havia inibição autofágica (**Figura 45**). Estes resultados sugerem que a autofagia é mais importante para degradação de VAPB^{P56S} do que a degradação de VAPB^{WT} no modelo de levedura. GENEVINI *et al.* (2014), porém, mostraram que a autofagia poderia atuar na degradação de VAPB^{P56S} apenas em condições de *starvation* em HeLa.

Os resultados obtidos a partir do uso do plasmídeo pCuGFPATG8415, codificando GFP-Atg8 corroboraram a necessidade da autofagia para a degradação da proteína mutante (**Figura 49**). Neste experimento, a presença de GFP livre indica aumento no processo

autofágico por maior formação de autofagossomos, uma vez que Atg8 é necessária nesta via. A linhagem expressando VAPB^{P56S} apresentou uma taxa desproporcionalmente maior de GFP livre, chegando a ser cinco vezes maior que na situação de expressão da proteína selvagem. Em outras palavras, VAPB^{P56S} promoveu fortemente a formação de autofagossomos. De modo similar, LARROQUETTE *et al.* (2015) mostraram que LC3, o homólogo de Atg8 em mamíferos, tem sua expressão aumentada em camundongos *knock-in* para VAPB^{P56S} e os níveis de p62, outro marcador de autofagia em mamíferos, era quatro vezes maior do que em camundongos expressando VAPB^{WT}.

Tomando os ensaios de viabilidade e de degradação proteica em conjunto, é possível sugerir que, no modelo de levedura, a degradação de VAPB^{WT} depende preferencialmente do sistema UPS, enquanto a degradação de VAPB^{P56S} depende preferencialmente de vias de autofagia.

Avaliando a formação de ^S*Hac1*, forma processada de *Hac1*, foram observadas diferenças significativas entre as linhagens expressando a proteína mutante e os controles (**Figura 50**). ^S*Hac1* é um marcador bem estabelecido para UPR, uma vez que é formado a partir da atividade endorribonuclease de Ire1, um componente da via em leveduras. O resultado obtido corrobora a hipótese de que VAPB^{P56S} pode modular positivamente outros componentes da UPR em mamíferos (GKOGKAS *et al.*, 2008). ^S*Hac1* pode promover a expressão de *Kar2*, proteína associada à própria via UPR e ao estresse do RE (KANEKURA *et al.*, 2009). De fato, foi demonstrado por qRT-PCR que há aumento da expressão deste gene nas linhagens expressando a proteína mutante (**Figura 51**). Além disso, *Lhs1*, uma chaperona moduladora da atividade de *Kar2* e importante componente de vias de estresse do RE, também estava mais expressa na linhagem mutante (**Figura 51**). Assim, o modelo sugere uma íntima ligação entre a UPR e estresse do RE que é modulada pela expressão de VAPB^{P56S}.

Finalmente, verificou-se que o aumento na expressão de *Tsa1* atenuou o efeito tóxico de VAPB^{P56S} (**Figura 53**). Esta enzima, além de ser uma das mais abundantes peroxirredoxinas em levedura, possui atividade chaperona evidenciada por diferentes grupos (KAYA *et al.*, 2014; MACDIARMID *et al.*, 2013; IRAQUI *et al.*, 2009; WEIDS & GRANT, 2014). O mecanismo sugerido por HANZÉN *et al.* (2016) indica que *Tsa1* recruta chaperonas como *Hsp70* e *Hsp104* para agregados proteicos, levando à desagregação desses agregados de uma maneira redox-dependente. Mais experimentos podem ser feitos para avaliar esclarecer se este mecanismo explica o fenótipo observado.

O conjunto dos dados apresentados nessa tese aponta para alterações no metabolismo

redox e na proteostase celular como mecanismos subjacente a toxicidade de VAPB^{P56S} em leveduras. Assim, as perspectivas para o avanço do projeto incluem o estudo mais aprofundado de vias do metabolismo redox e a investigação da possível atuação de proteínas como a Tsa1 e de peroxirredoxinas humanas. Além disso, verificar o estado de oxidação de proteínas marcadoras, como Pdi1 e Ero1, além de Tsa1, pode fornecer maiores evidências do papel do estresse oxidativo e do estresse do RE, contribuindo, inclusive, para a descrição de possíveis mecanismos que associem estes eventos.

VI. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos conclui-se que:

1. A proteína VAPB^{WT} no modelo de levedura é corretamente direcionada ao RE, enquanto a proteína VAPB^{P56S} apresenta distribuição diversa, formando agregados em diferentes frações celulares;
2. A superexpressão da proteína mutante é tóxica à levedura e diminui sua viabilidade, enquanto a expressão da proteína mutante não afeta as células;
3. A proteína VAPB^{WT} é capaz de restaurar o fenótipo de auxotrofia ao inositol em linhagens $\Delta Scs2$, ao contrário de VAPB^{P56S};
4. A expressão da proteína mutante torna as células mais sensíveis ao tratamento com H₂O₂, agente indutor de estresse oxidativo, e apresenta alterações na razão GSH/GSSG, sugerindo haver um ambiente celular mais oxidativo. Além disso há maior produção de H₂O₂ pelas mitocôndrias. Tomados em conjunto, sugere-se que haja associação de mecanismos causadores de estresse oxidativo e a expressão de VAPB^{P56S} e isto deve ocorrer de forma indireta, uma vez que VAPB^{P56S} não faz parte das vias do metabolismo redox da célula;
5. O tratamento com o antioxidante NAC não é capaz de melhorar substancialmente a viabilidade das células expressando VAPB^{P56S};
6. Há alterações nos marcadores de estresse do RE Pdi1 e Ero1, enzimas que participam ativamente de vias do metabolismo redox. Isto sugere que haja uma forte relação entre o estresse do RE e o estresse oxidativo neste modelo;
7. A inibição do proteassomo afeta diferencialmente a viabilidade da linhagem expressando a proteína VAPB^{WT} e a estabilidade da proteína selvagem, sugerindo que o UPS seja o principal responsável por sua degradação;
8. A inibição da autofagia leva a um maior acúmulo de VAPB^{P56S} e diminui a viabilidade das linhagens expressando esta proteína. Além disso, o uso de GFP-Atg8 revelou haver maior formação de autofagossomos nesta linhagem, sugerindo ser o principal mecanismo de degradação no modelo estudado;
9. A superexpressão de VAPB^{WT} e VAPB^{P56S} leva a um aumento na expressão de diferentes componentes das subunidades do proteassomo, o que favorece o aumento de atividade do proteassomo na linhagem expressando VAPB^{WT} e uma diminuição do

total de proteínas ubiquitinadas. Na linhagem expressando VAPB^{P56S} a atividade do proteassomo está diminuída e há acúmulo de proteínas ubiquitinadas. O aumento no estresse do RE é sugerido como possível causa na diminuição da atividade nesta linhagem;

10. Marcadores da UPR e do estresse do RE estão alterados nas linhagens expressando a proteína mutante, sugerindo, em conjunto com os dados de degradação proteica, uma grande alteração na proteostase celular;
11. O aumento da expressão de Tsa1 é capaz de atenuar o fenótipo de toxicidade apresentado pela proteína mutante devido, provavelmente, a uma atividade chaperona que facilite a desagregação e encaminhamento das proteínas para a degradação.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Chalabi, A.; Andersen, P. M.; Nilsson, P.; Chioza, B.; Andersson, J. L.; Russ, *et al.* (1999). **Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis.** *Human Molecular Genetics* 8: 157-64.
- Aliaga, L.; Lai, C.; Yu, J.; Chub, N.; Shim, H.; Sun, L.; *et al.* (2013). **Amyotrophic lateral sclerosis-related VAPB P56S mutation differentially affects the function and survival of corticospinal and spinal motor neurons.** *Human Molecular Genetics*, 22 (21): 4293-4305.
- Amarilio, R.; Ramachandran, S.; Sabanay, H.; Lev, S. (2005). **Differential regulation of endoplasmic reticulum structure through VAP-Nir protein interaction.** *Journal of Biological Chemistry* 280: 5934-5944.
- Andersen, P. M.; Al-Chalabi, A. (2011). **Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know?** *Nature Reviews Neurology* 7: 603-15.
- Appenzeller-Herzog, C. (2011). **Glutathione- and non-glutathione-based oxidant control in the endoplasmic reticulum.** *J. Cell Sci.* 124: 847–855.
- Armakola, M.; Higgins, M. J.; Figley, M. D.; Barmada, S. J.; Scarborough, E. A.; Diaz, Z.; *et al.* (2012). **Inhibition of RNA lariat debranching enzyme suppresses TDP-43 toxicity in ALS disease models.** *Nature Genetics* 44(12): 1302-1309.
- Armon, C. (2003). **An evidence-based medicine approach to the evaluation of the role of exogenous risk factors in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.** *Neuroepidemiology* 22: 217-228.
- Armon, C. (2009). **Smoking may be considered an established risk factor for sporadic ALS.** *Neurology* 73(20): 1693-1698.
- Atkin, J. D.; Farg, M. A.; Walker, A. K.; McLean, C.; Tomas, D.; Horne, M. K. (2008). **Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis.** *Neurobiol. Dis.* 30: 400–407.
- Balaban, R. S.; Nemoto, S.; Finkel, T. (2005). **Mitochondria, oxidants, and aging.** *Cell* 120: 483-495.
- Barber S. C.; Mead, R. J.; Shaw P. J. (2006). **Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target.** *Biochim. Biophys. Acta* 1762: 1051–1067.
- Barber, S. C.; Shaw, P. J. (2010). **Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target.** *Free Radical Biology and Medicine* 48: 629-641.
- Barnham, K. J.; Masters, C. L.; Bush, A. I. (2004). **Neurodegenerative diseases and oxidative stress.** *Nat. Rev. Drug Discov.* 3: 205–214.
- Baron, Y.; Pedrioli, P. G.; Tyagi, K.; Johnson, C.; Wood, N. T.; Fountaine, D.; Alexandru, G. (2014). **VAPB/ALS8 interacts with FFAT-like proteins including the p97 cofactor FAF1 and the**

- ASNA1 ATPase.** BMC Biology 12: 39.
- Bartoszewski, R.; Rab, A.; Jurkuvenaite, A.; Mazur, M.; Wakefield, J.; Collawn, J. F.; Bebok, Z. (2008). **Activation of the unfolded protein response by F508 CFTR.** Am J Respir Cell Mol Biol 39: 448–457.
- Bayne, A.-C. V.; Mockett, R. J.; Orr, W. C.; Sohal, R. S. (2005). **Enhanced catabolism of mitochondrial superoxide/hydrogen peroxide and aging in transgenic Drosophila.** Biochemical Journal 391: 277–284.
- Belzil, V. V.; Daoud, H.; Camu, W.; Strong, M. J.; Dion, P. A.; Rouleau, G. A. (2013). **Genetic analysis of SIGMAR1 as a cause of familial ALS with dementia.** European Journal of Human Genetics. 21(2): 237-239.
- Berthod, F.; Gros-Louis, F. (2012). **In Vivo and In Vitro Models to Study Amyotrophic Lateral Sclerosis.** Amyotrophic Lateral Sclerosis, Prof. Martin Maurer (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/39076.
- Bhandary, B.; Marahatta, A.; Kim, H.-R.; Chae, H.-J. (2013). **An Involvement of Oxidative Stress in Endoplasmic Reticulum Stress and Its Associated Diseases.** International Journal of Molecular Sciences 14(1): 434–456.
- Bonnefoy, M.; Draï, J.; Kostka, T. (2002). **Antioxidants to slow aging, facts and perspectives.** Presse Med. 31: 174–184.
- Borella, M. L. L.; Varela, Q. D. (2004). **Antioxidantes enzimáticos. In-Radicaís livres e a resposta celular ao estresse oxidativo.** ed. Salvador, M.; Henrique, J.A.P. da Ulbra, Canoas, pp. 35-50.
- Boylan, K. (2015). **Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis.** Neurology Clinic 33: 807-30.
- Braun, R. J.; Sommer, C.; Carmona-Gutierrez, D.; Khoury, C. M.; Ring, J.; Büttner, S.; Madeo, F. (2011). **Neurotoxic 43-kDa TAR DNA-binding Protein (TDP-43) Triggers Mitochondrion-dependent Programmed Cell Death in Yeast.** Journal of Biological Chemistry 286(22): 19958-19972.
- Bryson, H. M.; Fulton, B.; Benfield, P. (1996). **Riluzole: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in amyotrophic lateral sclerosis.** Drugs 52(4): 549-63.
- Cai, H.; Lin, X.; Xie, C.; Laird, F. M.; Lai, C.; Wen, H.; *et al.* (2005). **Loss of ALS2 function is insufficient to trigger motor neuron degeneration in knock-out mice but predisposes neurons to oxidative stress.** Journal of Neuroscience 25: 7567-7574.
- Calini, D.; Corrado, L.; Del Bo, R.; Gagliardi, S.; Pensato, V.; Verde, F.; *et al.* (2013). **Analysis of hnRNPA1, A2/B1, and A3 genes in patients with amyotrophic lateral sclerosis.** Neurobiology of Aging 34: 2695.e11-2.
- Cebollero, E.; van der Vaart, A.; Zhao, M.; Rieter, E.; Klionsky, D. J.; Helms, J. B.; Reggiori, F. (2012). **Phosphatidylinositol-3-Phosphate Clearance Plays a Key Role in Autophagosome Completion.** Current Biology : CB, 22(17), 1545–1553.

- Chae, H.; Kim, I.; Kim, K.; Rhee, S. (1993). **Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae***. *Journal of Biological Chemistry* 268(22): 16815–16821.
- Chau, V.; Tobias, J. W.; Bachmair, A.; Marriott, D.; Ecker, D. J.; Gonda, D.K.; Varshavsky, A. (1989). **A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein**. *Science* 243: 1576–1583.
- Chen, G.; Chen, Z.; Hu, Y.; Huang, P. (2011). **Inhibition of mitochondrial respiration and rapid depletion of mitochondrial glutathione by beta-phenethyl isothiocyanate: mechanisms for anti-leukemia activity**. *Antioxid. Redox Signal.* 15: 2911–2921.
- Chen, H.-J.; Anagnostou, G.; Chai, A.; Withers, J.; Morris, A.; Adhikaree, J.; Pennetta, G.; de Belleruche, J. S. (2010). **Characterization of the properties of a novel mutation in VAPB in familial amyotrophic lateral sclerosis**. *Journal of Biological Chemistry* 285: 40266-40281
- Chen, Y. A.; Scheller, R. H. (2001). **SNARE-mediated membrane fusion**. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology* 2: 98-106.
- Chen, Y. Z.; Bennett, C. L.; Huynh, H. M.; Blair, I. P.; Puls, I.; Irobi, J.; *et al.* (2004). **DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS4)**. *American Journal of Human Genetics* 74(6): 1128-1135.
- Chieia, M. A. T. (2005). **Doenças do neurônio motor**. *Neurociências* 13(3): 26-30.
- Chiò, A.; Logroscino, G.; Traynor, B. J.; Collins, J.; Simeone, J. C.; Goldstein, L. A.; Whitef, L. A. (2013). **Global Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: a Systematic Review of the Published Literature**. *Neuroepidemiology* 41(2): 118-130.
- Chow, C. Y.; Landers, J. E.; Bergren, S. K.; Sapp, P. C.; Grant, A. E.; Jones, J. M.; *et al.* (2009). **Deleterious Variants of *FIG4*, a Phosphoinositide Phosphatase, in Patients with ALS**. *American Journal of Human Genetics* 84(1): 85-88.
- Coatti, G. C.; Beccari, M. S.; Olavio, T. R.; Mitne-Neto, M.; Okamoto, O. K.; Zatz, M. (2015). **Stem cells for amyotrophic lateral sclerosis modeling and therapy: myth or fact?** *Cytometry A* 87: 197-211.
- Collins, G. A.; Gomez, T. A.; Deshaies, R. J.; Tansey, W. P. (2010). **Combined chemical and genetic approach to inhibit proteolysis by the proteasome**. *Yeast* 27(11): 965–974.
- Coppedè, F. (2011). **An Overview of DNA Repair in Amyotrophic Lateral Sclerosis**. *The Scientific World Journal* 11: 1679-1691.
- Couthouis, J.; Hart, M. P.; Shorter, J.; De Jesus-Hernandez, M.; Erion, R.; Oristano, R., Gitler, A. D. (2011). **A yeast functional screen predicts new candidate ALS disease genes**. *PNAS* 108(52): 20881–20890.
- Cox, L. E.; Ferraiuolo, L.; Goodall, E. F.; Heath, P. R.; Higginbottom, A.; Mortiboys, H.; *et al.* (2010). **Mutations in *CHMP2B* in lower motor neuron predominant Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)**. *PLoS One* 5(3): e9872.

- Cudkowicz, M.; Qureshi, M.; Shefner, J. (2004). **Measures and markers in amyotrophic lateral sclerosis.** *Neuro Rx* 1: 273-283.
- D'Amico, E.; Factor-Litvak, P.; Santella, R. M.; Mitsumoto, H. (2013). **Clinical perspective of oxidative stress in sporadic ALS.** *Free radical biology & medicine* 65: 10.1016.
- De Vos, K. J.; Mórotz, G. M.; Stoica, R.; Tudor, E. L.; Lau, K. F.; Ackerley, S.; *et al.* (2012). **VAPB interacts with the mitochondrial protein PTPIP51 to regulate calcium homeostasis.** *Human Molecular Genetics* 21(6): 1299-1311.
- Deffieu, M.; Bhatia-Kiššová, I.; Salin, B.; Galinier, A.; Manon, S.; Camougrand, N. (2009). **Glutathione Participates in the Regulation of Mitophagy in Yeast.** *The Journal of Biological Chemistry* 284(22): 14828–14837.
- Deng, H. X.; Chen, W.; Hong, S. T.; Boycott, K. M.; Gorrie, G. H.; Siddique, N.; *et al.* (2011) **Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia.** *Nature* 477: 211-215.
- Dickinson, D. A.; Forman, H. J. (2002). **Glutathione in defense and signaling: Lessons from a small thiol.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 973: 488–504.
- Dringen, R. (2000). **Metabolism and functions of glutathione in brain.** *Prog. Neurobiol* 62: 649–671.
- Duennwald, M. L.; Lindquist, S. (2008). **Impaired ERAD and ER stress are early and specific events in polyglutamine toxicity.** *Genes & Development*,22(23): 3308–3319.
- Dunn, W. A.; Jr Cregg, J. M.; Kiel, J. A.; van der Klei, I. J.; Oku, M.; Sakai, Y.; Sibirny, A. A.; Stasyk, O. V.; Veenhuis, M. (2005). **Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes.** *Autophagy* 1: 75–83.
- Elden, A. C.; Kim, H.-J.; Hart, M. P.; Chen-Plotkin, A. S.; Johnson, B. S.; Fang, X.; *et al.* (2010). **Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS.** *Nature*, 466 (7310): 1069-1075.
- Escusa-Toret, S.; Vonk, W. I.; Frydman, J. (2013). **Spatial sequestration of misfolded proteins by a dynamic chaperone pathway enhances cellular fitness during stress.** *Nat. Cell Biol.* 15: 1231–1243.
- Farg, M. A.; Soo, K. Y.; Walker, A. K.; Pham, H.; Orian, J.; Horne, M. K.; *et al.* (2012). **Mutant FUS induces endoplasmic reticulum stress in amyotrophic lateral sclerosis and interacts with protein disulfide-isomerase.** *Neurobiol. Aging* 33, 2855–2868.
- Farg, M. A.; Sundaramoorthy, V.; Sultana, J. M.; Yang, S.; Atkinson, R. A. K.; Levina, V.; *et al.* (2014). **C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking.** *Human Molecular Genetics* 23(13): 3579-3595.
- Fasana, E.; Fossati, M.; Ruggiano, A.; Brambillasca, S.; Hoogenraad, C. C.; Navone, F.; *et al.* (2010). **A VAPB mutant linked to amyotrophic lateral sclerosis generates a novel form of organized smooth endoplasmic reticulum.** *FASEB J.* 24: 1419–1430.

- Feissner, R. F.; Skalska, J.; Gaum, W. E.; Sheu, S.-S. (2009). **Crosstalk signaling between mitochondrial Ca²⁺ and ROS**. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 14, 1197–1218.
- Feldman, D. E.; Chauhan, V.; Koong, A. C. (2005). **The unfolded protein response: a novel component of the hypoxic stress response in tumors**. *Mol Cancer Res* 3: 597–605.
- Ferraiuolo, L.; Kirby, J.; Grierson, A. J.; Sendtner, M.; Shaw, P. J. (2011). **Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis**. *Nature Reviews Neurology* 7: 616–30.
- Finley, D. (2009). **Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome**. *Annual Review of Biochemistry* 78: 477–513.
- Forrest, S.; Chai, A.; Sanhueza, M.; Marescotti, M.; Parry, K.; Georgiev, A.; Sahota, V.; Mendez-Castro, R.; Pennetta, G. (2013). **Increased levels of phosphoinositides cause neurodegeneration in a Drosophila model of amyotrophic lateral sclerosis**. *Hum. Mol. Genet.* 22: 2689–2704.
- Foster, L. J.; Weir, M. L.; Lim, D. Y.; Liu, Z.; Trimble, W. S.; Klip, A. (2000). **A functional role for VAP-33 in insulin-stimulated GLUT4 traffic**. *Traffic* 1: 512–521.
- Funke, A.; Esser, M.; Krüttgen, A.; Weis, J.; Mitne-Neto, M.; Lazar, M.; *et al.* (2010). **The p.P56S mutation in the VAPB gene is not due to a single founder: the first European case**. *Clinical Genetics*, 77(3), 302–303.
- Gass, J. N.; Gifford, N. M.; Brewer, J. W. (2002). **Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells**. *J Biol Chem* 277(50): 49047–49054.
- Genevini, P.; Papiiani, G.; Ruggiano, A.; Cantoni, L.; Navone, F.; Borgese, N. (2014). **Amyotrophic Lateral Sclerosis-Linked Mutant VAPB Inclusions Do Not Interfere with Protein Degradation Pathways or Intracellular Transport in a Cultured Cell Model**. *PLoS One* 9(11): e113416.
- Gilgun-Sherki, Y.; Melamed, E.; Offen, D. (2001). **Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: The need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier**. *Neuropharmacology* 40: 959–975.
- Gkogkas, C.; Middleton, S.; Kremer, A. M.; Wardrope, C.; Hannah, M.; Gillingwater, T. H.; Skehel, P. (2008). **VAPB interacts with and modulates the activity of ATF6**. *Hum Mol Genet* 17: 1517–1526.
- Glick, B. S.; Pon, L. A. (1995). **Isolation of highly purified mitochondria from Saccharomyces cerevisiae**. *Methods in Enzymology* 260: 213–223.
- Goffeau, A.; Barrell, B. G.; Bussey, H.; Davis, R. W.; Dujon, B.; Feldmann.; *et al.* (1996). **Life with 6000 genes**. *Science* 274: 546–567.
- Greenway, M. J.; Andersen, P. M.; Russ, C.; Ennis, S.; Cashman, S.; Donaghy, C.; *et al.* (2006). **ANG mutations segregate with familial and ‘sporadic’ amyotrophic lateral**

- sclerosis.** *Nature Genetics* 38: 411-413.
- Griffith, O. W. (1999). **Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis.** *Free Radic Biol Med.* 27: 922–935.
- Gunther M. R.; Vangilder R.; Fang J.; Beattie D. S. (2004). **Expression of a familial amyotrophic lateral sclerosis-associated mutant human superoxide dismutase in yeast leads to decreased mitochondrial electron transport.** *Arch. Biochem. Biophys.* 431: 207-214.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (2006). In: Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (eds). **Free Radicals in Biology and Medicine**, Third Ed., Oxford University Press, Oxford
- Han, S. M.; Tsuda, H.; Yang, Y.; Vibbert, J.; Cottee, P.; Lee S. J.; *et al.* (2012). **Secreted VAPB/ALS8 major sperm protein domains modulate mitochondrial localization and morphology via growth cone guidance receptors.** *Dev. Cell.* 22: 348-362.
- Hansen, J. M.; Zhang, H.; Jones, D. P. (2006). **Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions.** *Free Radic. Biol. Med.* 40: 138–145.
- Hanzén, S.; Vielfort, K.; Yang, J.; Roger, F.; Andersson, V.; *et al.* (2016). **Lifespan Control by Redox-Dependent Recruitment of Chaperones to Misfolded Proteins.** *Cell* 166: 1–12.
- Harding, H. P.; Novoa, I.; Zhang, Y.; Zeng, H.; Wek, R.; Schapira, M. (2000). **Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells.** *Molecular Cell.* 6: 1099-1108.
- Harding, H. P.; Zhang, Y.; Ron, D. (1999). **Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase.** *Nature* 397: 271-274.
- Harding, H. P.; Zhang, Y.; Zeng, H.; Novoa, I.; Lu, P. D.; Calton, M. (2003). **An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress.** *Molecular Cell* 11: 619-633.
- Haynes, C. M.; Titus, E. A.; Cooper, A. A. (2004). **Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death.** *Mol. Cell.* 15: 767–776.
- Haze, K.; Yoshida, H.; Yanagi, H.; Yura, T.; Mori, K. (1999). **Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress.** *Molecular Biology of the Cell* 10: 3787-3799.
- Hensman Moss, D. J.; Poulter, M.; Beck, J.; Hehir, J.; Polke, J. M.; Campbell, T.; *et al.* (2014). **C9orf72 expansions are the most common genetic cause of Huntington disease phenocopies.** *Neurology* 82: 292-9.
- Hirano, M.; Nakamura, Y.; Saigoh, K.; Sakamoto, H.; Ueno, S.; Isono, C.; *et al.* (2014). **VCP gene analyses in Japanese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis identify a new mutation.** *Neurobiol. Aging* 10.1016/j.neurobiolaging.2014.10.012
- Honjo Y.; Kaneko S.; Ito H.; Horibe T.; Nagashima M.; Nakamura M.; *et al.* (2011). **Protein disulfide isomerase-immunopositive inclusions in patients with amyotrophic lateral sclerosis.** *Amyotroph. Lateral. Scler.* 12, 444–450.

- Iraqui, I.; Kienda, G.; Soeur, J.; Faye, G.; Baldacci, G.; Kolodner, R. D.; Huang, M. E. (2009). **Peroxiredoxin Tsa1 is the key peroxidase suppressing genome instability and protecting against cell death in *Saccharomyces cerevisiae***. *PLoS Genet.* 5 e1000524.
- Isler, J. A.; Skalet, A. H.; Alwine, J. C. (2005). **Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response**. *J Virol* 79.
- Ito, D.; Suzuki, N. (2009). **Seipinopathy: a novel endoplasmic reticulum stress-associated disease**. *Brain* 132(1): 8-15.
- Jang, H. H.; Lee, K. O.; Chi, Y. H.; Jung, B. G.; Park, S. K.; Park, J. H.; *et al.* (2004). **Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function**. *Cell* 117: 625–635.
- Jiang, Y.; Rumble, J. L.; Gleixner, A. M.; Unnithan, A. S.; Pulugulla, S. H.; Posimo, J. M.; *et al.* (2013). **N-Acetyl cysteine blunts proteotoxicity in a heat shock protein-dependent manner**. *Neuroscience*. 255: 19–32.
- Jin, C.; Reed, J. C. (2002). **Yeast and apoptosis**. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology* 3: 453-459.
- 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**. *PNAS* 105 (17): 6439–6444.
- Johnson, J. O.; Mandrioli, J.; Benatar, M.; Abramzon, Y.; Van Deerlin, V. M.; Trojanowski, J. Q.; *et al.* (2010) **Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS**. *Neuron* 68: 857-864.
- Johnson, J. O.; Pioro, E. P.; Boehringer, A.; Chia, R.; Feit, H.; Renton, A.; *et al.* (2014). **Mutations in the Matrin 3 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis**. *Nature Neuroscience* 17(5): 664-666.
- Johnston, J. A.; Ward, C. L.; Kopito, R. R. (1998). **Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins**. *J Cell Biol* 143: 1883-1898.
- Jones, D. P. (2006). **Redefining oxidative stress**. *Antioxid Redox Signal* 8: 1865–1879.
- Ju, S.; Tardiff, D. F.; Han, H.; Divya, K.; Zhong, Q.; Maquat, L. E.; *et al.* (2011). **A yeast model of FUS/TLS-dependent cytotoxicity**. *PLoS Biol.* 9: e1001052
- Kabashi, E.; El Oussini, H.; Bercier, V.; Gros-Louis, F.; Valdmanis, P. N.; McDearmid, J.; *et al.* (2013). **Investigating the contribution of VAPB/ALS8 loss of function in amyotrophic lateral sclerosis**. *Human Molecular Genetics* 22: 2350-2360.
- Kabashi, E.; Valdmanis, P. N.; Dion, P.; Spiegelman, D.; McConkey, B. J.; Vande Velde, C.; *et al.* (2008). **TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis**. *Nature Genetics* 40: 572-574.
- Kaganovich, D.; Kopito, R.; Frydman, J. (2008). **Misfolded proteins partition between two distinct**

- quality control compartments.** *Nature* 454: 1088-1095.
- Kagiwada, S. ; Zen, R. (2003) **Role of the yeast VAP homolog, Scs2p, in INO1 expression and phospholipid metabolism.** *Journal of Biochemistry* 133: 515-522.
- Kamel, F.; Umbach, D. M.; Bedlack, R. S.; Richards, M.; Watson, M.; Alavanja, M. C.; *et al.* (2012). **Pesticide exposure and amyotrophic lateral sclerosis.** *Neurotoxicology* 33(3) 457-462.
- Kamel, F.; Umbach, D. M.; Munsat, T. L.; Shefner, J. M.; Hu, H.; Sandler, D. P. (2003). **Lead exposure and amyotrophic lateral sclerosis.** *Epidemiology* 13(3): 311-319.
- Kanekura, K.; Nishimoto, I.; Aiso, S.; Matsuoka, M. (2006). **Characterization of amyotrophic lateral sclerosis-linked P56S mutation of vesicle-associated membrane protein-associated protein B (VAPB/ALS8).** *Journal of Biological Chemistry* 281: 30223-30233.
- Kaya, A.; Lobanov, A. V.; Gerashchenko, M. V.; Koren, A.; Fomenko, D. E.; Koc, A.; Gladyshev, V. N. (2014). **Thiol Peroxidase Deficiency Leads to Increased Mutational Load and Decreased Fitness in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genetics* 198(3): 905–917.
- Khurana, V.; Lindquist, S. (2010). **Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker’s yeast?** *Nature Review in Neuroscience* 11(6): 436-9.
- Klionsky, D. J. (2005). **The molecular machinery of autophagy: unanswered questions.** *Journal of Cell Science* 118 (Pt 1): 7–18.
- Knott, A. B.; Perkins, G.; Schwarzenbacher, R.; Bossy-Wetzel, E. (2008). **Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration.** *Nature Reviews in Neuroscience* 9: 505-518.
- Kraft, C.; Reggiori, F.; Peter, M. (2009). **Selective types of autophagy in yeast.** *Biochim. Biophys. Acta* 1793: 1404–1412.
- Krick, R.; Muehe, Y.; Prick, T.; Bremer, S.; Schlotterhose, P.; Eskelinen, E.-L.; Thumm, M. (2008). **Piecemeal Microautophagy of the Nucleus Requires the Core Macroautophagy Genes.** *Molecular Biology of the Cell* 19(10): 4492–4505.
- Kuijpers, M.; Yu, K. L.; Teuling, E.; Akhmanova, A.; Jaarsma, D.; Hoogenraad, C. C. (2013). **The ALS8 protein VAPB interacts with the ER–Golgi recycling protein YIF1A and regulates membrane delivery into dendrites.** *The EMBO Journal* 32(14): 2056-2072.
- Kuzuhara, S.; Kokubo, Y.; Sasaki, R.; Narita, Y.; Yabana, T.; Hasegawa, M.; Iwatsubo, T. (2001). **Familial amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of the Kii Peninsula of Japan: clinical and neuropathological study and tau analysis.** *Annual Neurology* 49(4): 501-511.
- Kwan, J. Y.; Jeong, S. Y.; Van Gelderen, P.; Deng, H.-X.; Quezado, M. M.; Danielian, L. E.; *et al.* (2012). **Iron Accumulation in Deep Cortical Layers Accounts for MRI Signal Abnormalities in ALS: Correlating 7 Tesla MRI and Pathology.** *PLoS ONE* 7(4): e35241.
- Labbadia, J.; Morimoto, R. I. (2015). **The Biology of Proteostasis in Aging and Disease.** *Annual Review of Biochemistry* 84: 435–464.
- Lacomblez, L.; Bensimon, G.; Leigh, P. N.; Guillet, P.; Meininger, V. (1996). **Dose-ranging study of**

- riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II.** *Lancet*. 347 (9013): 1425-31.
- Lai, C.; Xie, C.; Shim, H.; Chandran, J.; Howell, B. W.; Cai, H. (2009). **Regulation of endosomal motility and degradation by amyotrophic lateral sclerosis 2/alsin.** *Molecular Brain* 2: 23.
- Larroquette. F.; Seto, L.; Gaub, P. L.; Kamal, B.; Wallis, D.; Larivière, R.; *et al.* (2015). **Vapb/Amyotrophic lateral sclerosis 8 knock-in mice display slowly progressive motor behavior defects accompanying ER stress and autophagic response.** *Hum. Mol. Genet.* 24: 6515–6529.
- Lee, A. S. (1992). **Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family.** *Curr Opin Cell Biol* 4: 267–273.
- Lee, S.; Tak, E.; Lee, J.; Rashid, M.; Murphy, M. P.; Ha, J.; Kim, S. S. (2011). **Mitochondrial H₂O₂ generated from electron transport chain complex I stimulates muscle differentiation.** *Cell Research* 21(5): 817–834.
- Lefebvre, S. Burglen, L.; Reboullet, S.; Clermont, O.; Burlet, P.; Viollet L.; *et al.* (1995). **Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene.** *Cell* 80: 155-165.
- Lehman, E. J.; Hein, M. J.; Baron, S. L.; Gersic, C. M. (2012). **Neurodegenerative causes of death among retired National Football League players.** *Neurology* 79(19): 1970-1974.
- Lesage, S.; Le Ber, I.; Condroyer, C.; Broussolle, E.; Gabelle, A.; Thobois, S.; *et al.* (2013). **C9orf72 repeat expansions are a rare genetic cause of parkinsonism.** *Brain* 136: 385-91.
- Lev, S.; Ben Halevy, D.; Peretti, D.; Dahan, N. (2008). **The VAP protein family: from cellular functions to motor neuron disease.** *Trends Cell Biol.* 18: 282-290.
- Li, H-F.; Wu, Z-Y. (2016). **Genotype-phenotype correlations of amyotrophic lateral sclerosis.** *Translational Neurodegeneration* 5: 3.
- Lipson, K. L.; Fonseca, S. G.; Ishigaki, S.; Nguyen, L. X.; Foss, E.; Bortell, R.; Rossini, A. A.; Urano, F. (2006). **Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1.** *Cell Metab* 4: 245–254.
- Loewen, C. J.R.; Roy, A.; Levine, T. P. (2003). **A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP.** *EMBO Journal* 22(9): 2025-2035.
- Ma, Y.; Brewer, J. W.; Diehl, J. A.; Hendershot, L. M. (2002). **Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response.** *Journal of Molecular Biology* 318: 1351-1365.
- MacDiarmid, C. W.; Taggart, J.; Kerdsomboon, K.; Kubisiak, M.; Panascharoen, S.; Schelble, K.; Eide, D. J. (2013). **Peroxisredoxin Chaperone Activity Is Critical for Protein Homeostasis in Zinc-deficient Yeast.** *The Journal of Biological Chemistry* 288(43): 31313–31327.
- Majounie, E.; Abramzon, Y.; Renton, A. E.; Perry, R.; Bassett, S. S.; Pletnikova, O.; *et al.* (2012). **Repeat expansion in C9ORF72 in Alzheimer’s disease.** *New England Journal of Medicine*

366: 283-4.

- Malhotra, J. D.; Kaufman, R. J. (2007). **The Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response**. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18(6): 716–731.
- Malinowska, L.; Kroschwald, S.; Murder, M. C.; Richter, D.; Alberti, S. (2012). **Molecular chaperones and stress-inducible protein-sorting factors coordinate the spatiotemporal distribution of protein aggregates**. *Mol Cell Biol* 23: 3041-3056.
- Mancuso, R.; Navarro, X. (2015). **Amyotrophic lateral sclerosis: current perspectives from basic research to the clinic**. *Progress in Neurobiology* 133: 1-26.
- Marangi, G; Traynor, B. J. (2014). **Genetic causes of amyotrophic lateral sclerosis: new genetic analysis methodologies entailing new opportunities and challenges**. *Brain Research*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.009>.
- Martens, S.; Bachmair, A. (2015). **How cells coordinate waste removal through their major proteolytic pathways**. *Nature Cell Biology* 17: 841–842.
- Maruyama, H.; Morino, H.; Ito, H.; Izumi, Y.; Kato, H.; Watanabe, Y.; *et al.* (2010). **Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis**. *Nature* 465: 223-226.
- Menendez-Benito, V.; Verhoef, L. G.; Masucci, M. G.; Dantuma N. P. (2005). **Endoplasmic reticulum stress compromises the ubiquitin-proteasome system**. *Hum Mol Genet* 14: 2787–2799.
- Michell, R. H.; Dove, S. K. (2009). **A protein complex that regulates PtdIns(3,5)P₂ levels**. *EMBO J*. 28: 86-87 (2009).
- Millecamps, S.; Salachas, F.; Cazeneuve, C.; Gordon, P.; Bricka, B.; Camuzat, A.; *et al.* (2010). **SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype-phenotype correlations**. *Journal of Medical Genetics* 47: 554-560.
- Mitchell, J.; Paul, P.; Chen, H. J.; Morris, A.; Payling, M.; Falchi, M.; *et al.* (2010). **Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase**. *PNAS* 107: 7556–7561.
- Mitne-Neto, M.; Machado-Costa, M.; Marchetto, M. C. N.; Bengtson, M. H.; Joazeiro, C. A.; Tsuda, H.; *et al.* (2011). **Downregulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS8 patients**. *Human Molecular Genetics* 20(18): 3642-3652.
- Mori, K. (2009). **Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals**. *J. Biochem.* 146: 743–750.
- Morotz, G. M.; De Vos, K. J.; Vagnoni, A.; Ackerley, S.; Shaw, C. E.; Miller, C. C. J. (2012). **Amyotrophic lateral sclerosis-associated mutant VAPBP56S perturbs calcium homeostasis to disrupt axonal transport of mitochondria**. *Human Molecular Genetics* 21: 1979-1988.

- Moumen, A.; Virard, I.; Raoul, C. (2011). **Accumulation of Wildtype and ALS-Linked Mutated VAPB Impairs Activity of the Proteasome.** PLoS ONE 6(10): e26066.
- Moustaqim-Barrette, A., Lin, Y. Q., Pradhan, S., Neely, G. G., Bellen, H. J., & Tsuda, H. (2014). **The amyotrophic lateral sclerosis 8 protein, VAP, is required for ER protein quality control.** Human Molecular Genetics 23(8), 1975-1989.
- Muyderman, H.; Chen, T. (2014). **Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis - a valid pharmacological target?** British Journal of Pharmacology 171(8): 2191-2205.
- Nakatogawa, H.; Suzuki, K.; Kamada, Y.; Ohsumi, Y. (2009). **Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast.** Nature Rev. Mol. Cell Biol. 10: 458-467.
- Nakatsukasa, K.; Kamura, T.; Brodsky, J. L. (2014). **Recent technical developments in the study of ER-associated degradation.** Current Opinion in Cell Biology 0: 82-91.
- Nazıroğlu, M.; Senol, N.; Ghazizadeh, V.; Yürüker, V. (2014). **Neuroprotection induced by N-acetylcysteine and selenium against traumatic brain injury-induced apoptosis and calcium entry in hippocampus of rat.** Cell. Mol. Neurobiol. 34(6): 895-903.
- Nikawa, J.; Akiyoshi, M.; Hirata, S.; Fukuda, T. (1996). **Saccharomyces cerevisiae IRE2/HAC1 is involved in IRE1-mediated KAR2 expression.** Nucleic Acids Res 24: 4222-4226.
- Nishimura, A. L.; Al-Chalabi, A.; Zatz, M. (2005). **A common founder for amyotrophic lateral sclerosis type 8 (ALS8) in the Brazilian population.** Human Genetics 118: 499-500.
- Nishimura, A. L.; Mitne-Neto, M.; Silva, H. C.; Richieri-Costa, A.; Middleton, S.; Cascio, D.; Kok, F.; Oliveira, J. R.; Gillingwater, T.; Webb, J.; Skehel, P.; Zatz, M. (2004). **A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis.** American journal of human genetics 75: 822-831.
- Nishimura, Y.; Hayashi, M.; Inada, H.; Tanaka, T. (1999). **Molecular cloning and characterization of mammalian homologues of vesicle-associated membrane protein-associated (VAMP-associated) proteins.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 254: 21-26.
- Oikawa, D.; Kimata, Y.; Kohno, K.; Iwawaki, T. (2009). **Activation of mammalian IRE1alpha upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins.** Exp Cell Res 315(15): 2496-2504.
- Panov, A.; Kubalik, N.; Zinchenko, N.; Hemendinger, R.; Dikalov, S.; Bonkovsky, H.L. (2011). **Respiration and ROS production in brain and spinal cord mitochondria of transgenic rats with mutant G93A Cu/Zn-Superoxide dismutase gene.** Neurobiol. Dis. 44: 53-62
- Papiani, G.; Ruggiano, A.; Fossati, M.; Raimondi, A.; Bertoni, G.; Francolini, M.; *et al.* (2012). **Restructured endoplasmic reticulum generated by mutant amyotrophic lateral sclerosis-linked VAPB is cleared by the proteasome.** J. Cell Sci. 125: 3601-3611.
- Parkinson, N.; Ince, P. G.; Smith, M. O.; Highley, R.; Skibinski, G.; Andersen, P. M.; *et al.* (2006). **ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B).** Neurology 67: 1074-1077.

- Pasinelli, P.; Brown, R. H. (2006). **Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics.** *Nature Reviews of Neuroscience* 7: 710-723.
- Pedrajas, J. R.; Padilla, C.; McDonagh, B.; Barcena, J. A. (2010). **Glutaredoxin participates in the reduction of peroxides by the mitochondrial 1-CYS peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Antioxid Redox Signal*. 13: 249–258.
- Pennetta, G.; Hiesinger, P. R.; Fabian-Fine, R.; Meinertzhagen, I. A.; Bellen, H. J. (2002). ***Drosophila* VAP-33A directs bouton formation at neuromuscular junctions in a dosage-dependent manner.** *Neuron* 35, 291–306.
- Pereira, C.; Coutinho, I.; Soares, J.; Bessa, C.; Leão, M.; Saraiva, L. (2012). **New insights into cancer-related proteins provided by the yeast model.** *FEBS Journal* 279(5): 697-712.
- Plato, C. C.; Garruto, R. M.; Galasko, D.; Craig, U. K.; Plato, M.; Gamst, A.; *et al.* (2003). **Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of Guam: changing incidence rates during the past 60 years.** *American Journal of Epidemiology* 57: 149-57.
- Powers, E. T.; Morimoto, R. I.; Dillin, A.; Kelly, J. W.; Balch, W. E. (2009). **Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency.** *Annu Rev Biochem* 78: 959–91.
- Preuss, D.; Mulholland, J.; Kaiser, C. A.; Orlean, P.; Albright, C.; Rose, M. D.; Robbins, P. W.; Botstein, D. (1991). **Structure of the yeast endoplasmic reticulum: localization of ER proteins using immunofluorescence and immunoelectron microscopy.** *Yeast* 7: 891-911.
- Rabizadeh, S.; Gralla, E. B.; Borchelt, D. R.; Gwinn, R.; Valentine, J. S.; Sisodia, S.; *et al.* (1995). **Mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis convert superoxide dismutase from an antiapoptotic gene to a proapoptotic gene: studies in yeast and neural cells.** *PNAS* 92 (7), 3024-3028.
- Rao, M.; Song, W.; Jiang, A.; Shyr, Y.; Lev, S.; Greenstein, D.; *et al.* (2012). **VAMP-Associated Protein B (VAPB) Promotes Breast Tumor Growth by Modulation of Akt Activity.** *PLoS ONE* 7(10): e46281.
- Ratnaparkhi, A.; Lawless, G. M.; Schweizer, F. E.; Golshani, P.; Jackson, G. R. (2008). **A *Drosophila* Model of ALS: Human ALS-Associated Mutation in VAP33A Suggests a Dominant Negative Mechanism.** *PLoS ONE* 3(6): e2334.
- Renton, A. E.; Chiò, A.; Traynor, B. J. (2014). **State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics.** *Nature neuroscience*. 17(1): 17-23.
- Renton, A. E.; Majounie, E.; Waite, A. (2012). **A hexanucleotide repeat expansion in *C9ORF72* is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD.** *Neuron* 72(2): 257-268.
- Rieder, S. E.; Emr, S. D. (2001). **Isolation of subcellular fractions from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Curr Protoc Cell Biol*. Unit 3.7.
- Ringholz, G. M.; Appel, S. H.; Bradshaw, M.; Cooke, N. A.; Mosnik, D. M.; Schulz, P. E. (2005). **Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS.** *Neurology* 65: 586-590.
- Robberecht, W.; Philips, T. (2013). **The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis.** *Nature*

- Reviews Neuroscience 14: 248-64.
- Ron, D. (2002). **Translational control in the endoplasmic reticulum stress response**. The Journal of Clinical Investigation 110: 1383-1388.
- Roos, P. M.; Lierhagen, S.; Flaten, T. P.; Syversen, T.; Vesterberg, O.; Nordberg, M. (2012). **Manganese in cerebrospinal fluid and blood plasma of patients with amyotrophic lateral sclerosis**. Exp Biol Med 237(7): 803-810.
- Rosen, D. R.; Siddique, T.; Patterson, D.; Figlewicz, D. A. Sapp, P.; Hentati, A.; *et al.* (1993). **Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis**. Nature 362: 59-62.
- Ruggiano, A.; Foresti, O.; Carvalho, P. (2014). **ER-associated degradation: Protein quality control and beyond**. The Journal of Cell Biology, 204(6), 869–879.
- Russ, W. P.; Engelman, D. M. (2000). **The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association**. Journal of Molecular Biology 296: 911-919.
- Sasaki, S.; Iwata, M. (2007). **Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis**. Journal of Neuropathology 66: 10-16.
- Scherrer, K. Darnell, J. E. (1962). **Sedimentation characteristics of rapidly labelled RNA from HeLa cells**. Biochem Biophys Res Commun. 47: 486–490.
- Schiestl, R. H.; Gietz, R. D. (1989). **High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier**. Curr Genet. 16(5–6): 339–46.
- Schröder, M. (2008). **Endoplasmic reticulum stress responses**. Cell Mol. Life Sci. 65: 862–894.
- Sevier, C. S.; Kaiser, C. A. (2008). **Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum**. Biochim Biophys Acta. 1783: 549–556.
- Sharma, N.; Brandis, K. A.; Herrera, S. K.; Johnson, B. E.; Vaidya, T.; Shrestha, R. (2006). **Alpha-synuclein budding yeast model: Toxicity enhanced by impaired proteasome and oxidative stress**. Journal of molecular neuroscience 28: 161-178.
- Shetty, P.; Pradhan, S.; Viswanathan, C. (2015). **Stem Cell strategy for the treatment of Motor Neuron Diseases**. Journal of Stem Cells Regeneration Medicine 2(1): 002.
- Sidrauski, C.; Walter, P. (1997). **The transmembranekinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response**. Cell 90: 1031–1039.
- Skehel, P. A.; Martin, K. C.; Kandel, E. R.; Bartsch, D. A. (1995). **VAMP-binding protein from Aplysia required for neurotransmitter release**. Science 269: 1580-1583.
- Smith, B. N.; Newhouse, S.; Shatunov, A.; Vance, C.; Topp, S.; Johnson, L.; *et al.* (2013). **The C9ORF72 expansion mutation is a common cause of ALS+/-FTD in Europe and has a single founder**. European Journal of Humam Genetics 21: 102-8.
- Smith, M. G.; Snyder, M. (2006). **Yeast as a model for human disease**. Curr Protoc Hum Genet. doi: 10.1002/0471142905.hg1506s48.
- Sontag, E. M.; Vonk, W. I. M.; Frydman, J. (2014). **Sorting out the trash: the spatial nature of**

- eukaryotic protein quality control.** *Cell Biol* 26: 139-146.
- Soto, C.; Estrada, L.D. (2008). **Protein misfolding and neurodegeneration.** *Arch Neurol* 65: 184-189.
- Specht, S.; Miller, S. B.; Mogk, A.; Bukau, B. (2011). **Hsp42 is required for sequestration of protein aggregates into deposition sites in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Cell Biol* 195: 617-629.
- Sullivan P.G.; Rabchevsky, A.G.; Keller, J.Y.N.; Lovell, M.; Sodhi, A.; Hart, R.P.; Scheffer, S.W. (2004). **Intrinsic differences in brain and spinal cord mitochondria: implication for therapeutic interventions.** *J. Comparative Neurol.* 474: 524–534
- Sun, Z.; Diaz, Z.; Fang, X.; Hart, M. P.; Chesi, A.; Shorter, J.; Gitler, A. D. (2011). **Molecular Determinants and Genetic Modifiers of Aggregation and toxicity for the ALS Disease Protein FUS/TLS.** *PLoS Biology* 9(4): e1000614.
- Suzuki, H.; Kanekura, K.; Levine, T. P.; Kohno, K.; Olkkonen, V. M.; Aiso, S.; Matsuoka, M. (2009). **ALS linked P56S-VAPB, an aggregated loss-of-function mutant of VAPB, predisposes motor neurons to ER stress-related death by inducing aggregation of co-expressed wild-type VAPB.** *J Neurochim* 108: 973-985.
- Szegezdi, E.; Logue, S. E.; Gorman, A. M.; Samali, A. (2006). **Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis.** *EMBO reports* 7: 880-885.
- Teuling, E.; Ahmed, S.; Haasdijk, E.; Demmers, J.; Steinmetz, M. O.; Akhmanova, A.; *et al.* (2007). **Motor neuron disease-associated mutant vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) B recruits wild-type VAPs into endoplasmic reticulum-derived tubular aggregates.** *Journal of Neuroscience* 27: 9801-9815.
- Tran, J. R.; Brodsky, J. L. (2012). **Assays to Measure ER-Associated Degradation in Yeast.** *Methods in Molecular Biology* 832: 505–518.
- Tsuda, H.; Han, S.M.; Yang, Y.; Tong, C.; Lin, Y. Q.; Mohan, K.; *et al.* (2008). **The amyotrophic lateral sclerosis 8 protein VAPB is cleaved, secreted, and acts as a ligand for Eph receptors.** *Cell* 133: 963-977.
- Tu, B. P.; Weissman, J. S. (2004). **Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences.** *The Journal of Cell Biology*, 164(3), 341–346.
- Tudor, E. L.; Galtrey, C.M.; Perkinson, M. S.; Lau, K. F.; De Vos, K. J.; Mitchell, J. C. *et al.* (2010). **Amyotrophic lateral sclerosis mutant vesicle associated membrane protein-associated protein-B transgenic mice develop TAR DNA-binding protein-43 pathology.** *Neuroscience.* 167: 774-785.
- Turner, M. R. (2013). **Increased premorbid physical activity and amyotrophic lateral sclerosis: born to run rather than run to death, or a seductive myth?** *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 84(9): 947.
- Tyedmers, J.; Mogk, A.; Bukau, B. (2010). **Cellular strategies for controlling protein aggregation.**

- Nat Rev Mol Cell Biol, 11: 777-788.
- Unnithan, A. S.; Choi, H. J.; Titler, A. M.; Posimo, J. M.; Leak, R. K. (2012). **Rescue from a two hit, high-throughput model of neurodegeneration with N-acetyl cysteine.** *Neurochem. Int.* 61: 356–368.
- Van Blitterswijk, M.; Van Es, M. A.; Koppers, M.; Van Rheenen, W.; Medic, J.; Schelhaas, H. J.; *et al.* (2012). **VAPB and C9orf72 mutations in 1 familial amyotrophic lateral sclerosis patient.** *Neurobiology of Aging* 33: e1-e4.
- Van Damme, P.; Dewil, M.; Robberecht, W.; Van den Bosch, L. (2005). **Excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis.** *Neurodegenerative Diseases* 2: 147-159.
- Vance, C.; Rogelj, B.; Hortobágyi, T.; De Vos, K. J.; Nishimura, A. L.; Sreedharan, J.; *et al.* (2009). **Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 6.** *Science* (5918): 1208-1211.
- Vande Velde, C.; Miller, T. M.; Cashman, N. R.; Cleveland, D. W. (2008). **Selective association of misfolded ALS-linked mutant SOD1 with the cytoplasmic face of mitochondria.** *Proc. Natl Acad. Sci.* 105: 4022-4027.
- Vembar, S. S.; Brodsky, J. L. (2008). **One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation.** *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9(12): 944–957.
- Vilariño-Güell, C.; Wider, C.; Soto-Ortolazza, A. I.; Cobb, S. A.; Kachergus, J. M.; Keeling, B. H.; *et al.* (2009). **Characterization of DCTN1 genetic variability in neurodegeneration.** *Nurology* 72: 2024-2028.
- Walberg, M. W. (2000). **Applicability of yeast genetics to neurologic disease.** *Archives in Neurolog* 57(8): 1129-1134.
- Walker, A. K.; Soo, K. Y.; Sundaramoorthy, V.; Parakh, S.; Ma, Y.; Farg, M. A.; *et al.* (2013). **ALS-associated TDP-43 induces endoplasmic reticulum stress, which drives cytoplasmic TDP-43 accumulation and stress granule formation.** *PLoS One* 8:e81170. 10.1371/journal.pone.0081170
- Walsh, M. J.; Cooper-Knock, J.; Dodd, J. E.; Stopford, M. J.; Mihaylov, S. R.; Kirby, J.; *et al.* (2015). **Decoding the pathophysiological mechanisms that underlie RNA dysregulation in neurodegenerative disorders: a review of the current state of the art.** *Neuropathology and Applied Neurobiology* 41(2): 109-134.
- Weids, A. J.; Grant, C. M. (2014). **The yeast peroxiredoxin Tsa1 protects against protein-aggregate-induced oxidative stress.** *Journal of Cell Science* 127(6): 1327–1335.
- Weir, M. L.; Xie, H.; Klip, A.; Trimble, W. S. (2001). **VAP-A binds promiscuously to both v- and tSNAREs.** *Biochem Biophys Res Commun.* 286(3): 616–21.
- Wijesekera, L. C.; Leigh, P. N. (2009). **Amyotrophic lateral sclerosis.** *Orphanet J Rare Diseases* 4 (3): 3.
- Wu, H.; Ng, B. S. H.; Thibault, G. (2014). **Endoplasmic reticulum stress response in yeast and**

- humans.** Bioscience Reports 34(4) e00118.
- Xie, Z.; Klionsky, D. J. (2007). **Autophagosome formation: Core machinery and adaptations.** Nat Cell Biol. 9: 1102–1109.
- Yang, Z.; Klionsky, D. J. (2010). **Eaten alive: a history of macroautophagy.** Nature Cell Biology 12(9): 814–822.
- Yen, A. A.; Simpson, E. P.; Henkel, J. S.; Beers, D. R.; Appel, S. H. (2004). **HFE mutations are not strongly associated with sporadic ALS.** Neurology 2004; 62: 1611-1612
- Yoshida, H.; Matsui, T.; Yamamoto, A.; Okada, T.; Mori, K. (2001). **XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor.** Cell 107: 881–891.
- Zaldivar, T.; Gutierrez, J.; Lara, G.; Carbonara, M.; Logroscino, G.; Hardiman, O. (2009). **Reduced frequency of ALS in an ethnically mixed population: a population-based mortality study.** Neurology 72(19): 1640-1645.
- Zhan, L.; Xie, Q.; Tibbetts, R. S. (2015). **Opposing roles of p38 and JNK in a Drosophila model of TDP-43 proteinopathy reveal oxidative stress and innate immunity as pathogenic components of neurodegeneration.** Hum. Mol. Genet. 24: 757–772.

VIII. ANEXOS

ANEXO I. SEQUÊNCIAS DOS GENES CLONADOS

Sequências dos genes clonados no vetor pYES2.1 (em negrito estão indicados os códons que sofreram mutação e sublinhado o nucleotídeo substituído).

VAPB^{WT} (*Homo sapiens* VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein B and C; 732 pb; GeneID: 9217; GI: 40806212)

ATG GCG AAG GTG GAG CAG GTC CTG AGC CTC GAG CCG CAG CAC GAG CTC AAA TTC CGA
GGT CCC TTC ACC GAT GTT GTC ACC ACC AAC CTA AAG CTT GGC AAC CCG ACA GAC CGA
AAT GTG TGT TTT AAG GTG AAG ACT ACA GCA CCA CGT AGG TAC TGT GTG AGG CCC AAC
AGC GGA ATC ATC GAT GCA GGG GCC TCA ATT AAT GTA TCT GTG ATG TTA CAG CCT TTC
GAT TAT GAT CCC AAT GAG AAA AGT AAA CAC AAG TTT ATG GTT CAG TCT ATG TTT GCT
CCA ACT GAC ACT TCA GAT ATG GAA GCA GTA TGG AAG GAG GCA AAA CCG GAA GAC CTT
ATG GAT TCA AAA CTT AGA TGT GTG TTT GAA TTG CCA GCA GAG AAT GAT AAA CCA CAT
GAT GTA GAA ATA AAT AAA ATT ATA TCC ACA ACT GCA TCA AAG ACA GAA ACA CCA ATA
GTG TCT AAG TCT CTG AGT TCT TCT TTG GAT GAC ACC GAA GTT AAG AAG GTT ATG GAA
GAA TGT AAG AGG CTG CAA GGT GAA GTT CAG AGG CTA CGG GAG GAG AAC AAG CAG TTC
AAG GAA GAA GAT GGA CTG CGG ATG AGG AAG ACA GTG CAG AGC AAC AGC CCC ATT TCA
GCA TTA GCC CCA ACT GGG AAG GAA GAA GGC CTT AGC ACC CGG CTC TTG GCT CTG GTG
GTT TTG TTC TTT ATC GTT GGT GTA ATT ATT GGG AAG ATT GCC TTG TAG

VAPB^{P56S}

ATG GCG AAG GTG GAG CAG GTC CTG AGC CTC GAG CCG CAG CAC GAG CTC AAA TTC CGA
GGT CCC TTC ACC GAT GTT GTC ACC ACC AAC CTA AAG CTT GGC AAC CCG ACA GAC CGA
AAT GTG TGT TTT AAG GTG AAG ACT ACA GCA CCA CGT AGG TAC TGT GTG AGG **TCC** AAC
AGC GGA ATC ATC GAT GCA GGG GCC TCA ATT AAT GTA TCT GTG ATG TTA CAG CCT TTC
GAT TAT GAT CCC AAT GAG AAA AGT AAA CAC AAG TTT ATG GTT CAG TCT ATG TTT GCT
CCA ACT GAC ACT TCA GAT ATG GAA GCA GTA TGG AAG GAG GCA AAA CCG GAA GAC CTT
ATG GAT TCA AAA CTT AGA TGT GTG TTT GAA TTG CCA GCA GAG AAT GAT AAA CCA CAT
GAT GTA GAA ATA AAT AAA ATT ATA TCC ACA ACT GCA TCA AAG ACA GAA ACA CCA ATA
GTG TCT AAG TCT CTG AGT TCT TCT TTG GAT GAC ACC GAA GTT AAG AAG GTT ATG GAA
GAA TGT AAG AGG CTG CAA GGT GAA GTT CAG AGG CTA CGG GAG GAG AAC AAG CAG TTC
AAG GAA GAA GAT GGA CTG CGG ATG AGG AAG ACA GTG CAG AGC AAC AGC CCC ATT TCA
GCA TTA GCC CCA ACT GGG AAG GAA GAA GGC CTT AGC ACC CGG CTC TTG GCT CTG GTG
GTT TTG TTC TTT ATC GTT GGT GTA ATT ATT GGG AAG ATT GCC TTG TAG

ANEXO II. LINHAGENS DE *S. CEREVISIAE* E PLASMÍDEOS UTILIZADOS

Tabela 15. Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas.

Linhagem	Genótipo	Referência
BY4741	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0;	Invitrogen
BY4741 Δ Scs2	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; Scs2::kanMX4	Invitrogen
BY4741 Δ Pdr5	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; Pdr5::kanMX4	Invitrogen
BY4741 Δ Atg8	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; Atg8::kanMX4	Invitrogen

Tabela 16. Plasmídeos utilizados.

Plasmídeo	Tipo	Promotor	Seleção	Referência
pYES2.1	Epissomal	GAL1	Ura3	Invitrogen
pYES2.1 VAPB ^{WT}	Epissomal	GAL1	Ura3	Invitrogen/este estudo
pYES2.1 VAPB ^{P56S}	Epissomal	GAL1	Ura3	Invitrogen/este estudo
pYES2.1 GFP	Epissomal	GAL1	Ura3	Invitrogen/este estudo
pYES2.1 GFP-VAPB ^{WT}	Epissomal	GAL1	Ura3	Invitrogen/este estudo
pYES2.1 GFP-VAPB ^{P56S}	Epissomal	GAL2	Ura3	Invitrogen/este estudo
pCuGFP-ATG8415	Centromérico	CUP1	Leu2	Kim <i>et al.</i> (2002)
pCEV-TSA1-Ph	Epissomal	TEF1	Phleo	Vickers <i>et al.</i> (2013)

ANEXO III. MEIOS DE CULTURA DE MICROORGANISMOS

Os meios de cultura utilizados para o crescimento de microorganismos foram:

Meio YPD (1 L): 20 g de glicose; 20 g de peptona e 10 g de extrato de levedura.

Meio Mínimo (1 L): 20 g de glicose ou galactose; 1,7 g de base nitrogenada; 5 g de sulfato de amônio; 1,3 g de *dropout* (1,25 g de adenina; 1,2 g de alanina; 0,9 g de arginina; 1,2 g de asparagina; 3 g de aspartato; 1,2 g de cisteína; 1,5 g de fenilalanina; 1,2 g de glicina; 3 g de glutamato; 1,2 g de glutamina; 1,2 g de isoleucina; 0,9 g de lisina; 0,6 g de metionina; 1,2 g de prolina; 11,25 g de serina; 0,9 g de tirosina; 6 g de treonina; 4,5 g de valina), suplementado, quando necessário, com os requerimentos auxotróficos: histidina, triptofano e leucina.

Meio Mínimo sem Inositol (1 L): 20 g de glicose ou galactose; 5 g sulfato de amônio; 1 g de fosfato de potássio; 0,5 g de sulfato de magnésio; 0,1 g de cloreto de sódio; 0,1 g de cloreto de cálcio; 0,5 mg de ácido bórico; 0,04 mg de sulfato de cobre; 0,1 mg de iodeto de potássio; 0,2 mg de cloreto de ferro; 0,4 mg de sulfato de manganês; 0,2 mg de molibdato de sódio; 0,4 mg de sulfato de zinco; 2 µg de biotina; 400 µg de pantotenato de cálcio; 2 µg de ácido fólico; 400 µg de niacina; 200 µg de ácido *p*-aminobenzóico; 400 µg de hidrocloreto de piridoxina; 200 µg de riboflavina; 400 µg de hidrocloreto de tiamina; 20 mg sulfato de adenina; 20 mg de arginina; 20 mg de histidina; 60 mg de leucina; 230 mg de lisina; 20 mg de metionina; 20 mg de triptofano.

Meio LB(1 L): 5 g de extrato de levedura; 10 g de tripton e 10 g de cloreto de sódio

Os meios de cultura sólidos foram feitos adicionando 2% de ágar às soluções e vertidos 25 mL por placa.

ANEXO IV. ANTICORPOS UTILIZADOS

Os anticorpos utilizados para marcação específica por *Western blotting* foram:

Tabela 17. Anticorpos utilizados.

Anticorpo	Diluição	Referência
Anti-Dmp1	1:1000 em leite 5%	Life Technologies
Anti-GFP	1:2000 em leite 5%	Sigma Aldrich
Anti-Pep12	1:1000 em leite 5%	Life Technologies
Anti-Pgk1	1:10000 em leite 5%	Nordic Immunology
Anti-Porina	1:10000 em leite 5%	Life Technologies
Anti-Rpt4	1:1000 em TBS-T 1X	Merk
Anti-Tsa1	1:1000 em TBS-T 1X	Chae <i>et al.</i> (1993)
Anti-Ub K48	1:1000 em TBS-T 1X	Merk
Anti-VAPB	1:5000 em TBS-T 1X	Mitne-Neto <i>et al.</i> (2011)
Anti-V-ATPase	1:1000 em leite 5%	Life Technologies
Anti- α 3	1:1000 em TBS-T 1X	Santa Cruz
Anti- α 4	1:1000 em TBS-T 1X	Santa Cruz
Anti- β 1 e β 7	1:500 em TBS-T 1X	Merk
Anti-rabbit IgG HRP-linked	1:10000 em TBS-T 1X	Life Technologies
Anti-mouse IgG HRP-linked	1:10000 em TBS-T 1X	Life Technologies

IX. RESUMO

A Esclerose Lateral Amiotrófica é uma doença neurodegenerativa que afeta seletivamente neurônios motores. A maior parte dos casos de ELA (90%) é esporádica. Para os casos familiares, mais de vinte genes já foram associados. Diversos mecanismos estão envolvidos na patogênese, entre eles o estresse oxidativo, proteostase e agregação, excitotoxicidade, tráfego intracelular, entre outros. A mutação P56S na proteína VAPB está associada à ELA8. A VAPB é uma proteína de membrana do retículo endoplasmático e está possivelmente envolvida em diversas funções celulares, dentre elas tráfego intracelular, interação retículo endoplasmático-aparelho de Golgi e UPR. Sabendo que mutações no gene que codifica VAPB resultam em ELA e que indivíduos com a mesma mutação neste gene podem apresentar quadros clínicos bastante diferentes, propõe-se estudar a suscetibilidade ao estresse oxidativo e ao estresse do retículo endoplasmático e as possíveis vias de degradação das proteínas mutantes como fatores subjacentes a essa heterogeneidade clínica. Desta forma, objetivou-se realizar uma análise integrada de ELA8, buscando compreender os mecanismos moleculares envolvidos na doença, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para estudo. Foram obtidas diferentes linhagens BY4741 de *S. cerevisiae*, expressando os genes de *VAPB^{WT}* e *VAPB^{P56S}* ou o plasmídeo vazio (que foi utilizado como controle em todos os experimentos) sob controle do promotor *GALI*. Foram avaliadas as viabilidades das células expressando as proteínas humanas, a sua localização celular e possível formação de agregados. Os resultados mostram que a expressão da proteína *VAPB^{P56S}* é tóxica e leva à formação de agregados dispersos nas células, enquanto a expressão da proteína selvagem se concentra no retículo endoplasmático e não altera significativamente a viabilidade das células. *Scs2* é a proteína de levedura homóloga a VAPB, e a deleção do gene correspondente gera linhagens auxotróficas para inositol. *VAPB^{WT}* e *VAPB^{P56S}* foram expressas em linhagem nocaute para o gene *Scs2*, a fim de analisar se os homólogos humanos complementam a auxotrofia a inositol. Observou-se que a linhagem expressando a proteína selvagem é capaz de restaurar o fenótipo selvagem e a linhagem expressando a proteína mutante não. Para avaliar os efeitos de estresse oxidativo nas linhagens BY4741, foram determinados: a viabilidade e sensibilidade das linhagens sob condições de estresse induzido por H₂O₂, a razão GSH/GSSG e a produção de H₂O₂ por mitocôndrias, além da viabilidade após tratamento com o antioxidante N-acetil-L-cisteína. De modo geral foi verificado que a linhagem expressando a proteína mutante é discretamente mais sensível ao tratamento com H₂O₂, possui menor razão GSH/GSSG, e produz mais H₂O₂

em mitocôndrias isoladas. Em conjunto, estes dados sugerem alteração no metabolismo redox a partir da expressão de VAPB^{P56S}. Os efeitos da inibição do proteassomo ($\Delta Pdr5$ + MG132) e da autofagia ($\Delta Atg8$) foram avaliados em ensaios de viabilidade e degradação proteica. Verificou-se que a inibição do proteassomo tem maior efeito sobre a viabilidade das linhagens expressando VAPB^{WT} e diminui a degradação desta proteína. A inibição da autofagia, ao contrário, afeta mais a linhagem expressando VAPB^{P56S}. A atividade do proteassomo, a ubiquitinação de proteínas e os níveis de autofagia também foram avaliados, sendo verificado que há maior expressão de subunidades do proteassomo nas linhagens expressando ambas as proteínas. Na linhagem expressando VAPB^{WT}, observou-se maior atividade do proteassomo e uma diminuição no *pool* de proteínas ubiquitinadas, de acordo com a maior expressão de subunidades do proteassomo. Na linhagem expressando VAPB^{P56S}, ao contrário, há diminuição da atividade do proteassomo e acúmulo de proteínas ubiquitinadas, sugerindo uma inibição do proteassomo. Por meio do monitoramento da fusão GFP-Atg8 foi verificada a maior formação de autofagossomos nas linhagens expressando VAPB^{P56S}, o que sugere maiores níveis de autofagia. Foi avaliada a viabilidade das células sob o efeito do aumento da expressão de Tsa1, uma peroxirredoxina com capacidade de recrutar chaperonas para agregados de forma redox dependente. Observou-se que esta proteína é capaz de atenuar a toxicidade de VAPB^{P56S}, especialmente no ensaio de diluição seriada. Por fim foram verificados os níveis de marcadores de estresse do retículo endoplasmático, Pdi1, Ero1, Lhs1 e Kar2, e de UPR, ^SHac1, e foi visto que a expressão da proteína mutante alterou todos estes indicadores. Os dados em conjunto sugerem alterações no metabolismo redox e na proteostase resultantes da expressão de VAPB^{P56S}.

X. ABSTRACT

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that affects motor neurons. The majority of ALS cases (90%) are sporadic. More than twenty genes have been associated with familial cases. Several mechanisms are involved in ALS pathogenesis, including oxidative stress, proteostasis and aggregation, excitotoxicity, intracellular trafficking, and others. The P56S mutation in the protein VAPB is associated with ALS8. VAPB is a membrane protein of the endoplasmic reticulum that is possibly involved in diverse cellular functions, including intracellular trafficking, interaction endoplasmic reticulum-Golgi and UPR. Knowing that mutations in the gene encoding VAPB result in ALS and that individuals with the same mutation in this gene can show different clinical conditions, we aimed to analyze the susceptibility to oxidative and endoplasmic reticulum stresses and protein degradation pathways as factors underlying this clinical heterogeneity. Thus, the objective was to perform an integrated analysis of ALS8, trying to understand the molecular mechanisms involved in the disease using, for this purpose, budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* was employed as a model for this study. Different strains of *S. cerevisiae* containing the gene VAPB^{WT} or VAPB^{P56S} or the empty plasmid were obtained. BY4741 strains were evaluated for their viability when expressing human proteins, the subcellular localization of these proteins and the ability to form aggregates. The results show that the expression of the mutant protein is toxic and leads to the formation of disperse aggregates in the cell, while the expression of the wild-type protein is concentrated in the endoplasmic reticulum and does not alter cell viability. Scs2 is the yeast homologue of VAPB and deletion of the corresponding gene renders cells auxotrophic for inositol. Therefore, VAPB^{WT} and VAPB^{P56S} genes were expressed in $\Delta scs2$ cells to evaluate their ability to complement the inositol auxotrophy. The strain expressing the wild-type protein was able to restore the wild type phenotype, while the strain expressing the mutant protein was not. To evaluate oxidative stress in BY4741 strains expressing human proteins, it was determined: viabilities and sensitivities to stress induced by H₂O₂; GSH /GSSG ratio and H₂O₂ production in the mitochondria, as well as viabilities after treatment of cells with N-acetyl-L-cysteine. In general, it was found that the strain expressing the mutant protein is slightly sensitive to treatment with H₂O₂, had minor GSH/GSSG ratio, which indicates more oxidative cellular environment, and has a major production of H₂O₂ in isolated mitochondria. Together, these data suggest important changes in the redox metabolism associated with VAPB^{P56S} expression. The effects of inhibition of the proteasome ($\Delta Pdr5$ + MG132) and autophagy

($\Delta Atg8$) were evaluated through viability assays and protein degradation. Inhibition of the proteasome had a greater effect on the viability of strains expressing VAPB^{WT} and decreased the degradation of this protein. Inhibition of autophagy, in contrast, mainly affected the strain expressing VAPB^{P56S}. The activity of the proteasome, protein ubiquitilation and autophagy levels were evaluated in BY4741 strains expressing human proteins. We found an increased expression of proteasome subunits in the strains expressing both proteins, which lead to an increased activity of proteasome in VAPB^{WT} strain and a decrease in the pool of ubiquitilated proteins. In strain expressing VAPB^{P56S} instead, there is a reduced proteasome activity and accumulation of ubiquitilated proteins. By monitoring the GFP-Atg8 fusion, it was verified that the formation of autophagosomes was increased in strains expressing VAPB^{P56S}, suggesting higher levels of autophagy. The effect of Tsa1 expression, a peroxiredoxin capable to recruit chaperone to aggregates, on cell viability was evaluated and it was observed that this protein was able to attenuate the toxicity of VAPB^{P56S}. Finally the levels of endoplasmic reticulum stress markers, Pdi1, Ero1, Lhs1 and Kar2, and the UPR marker, *S*Hac1, were checked and it was found that the expression of the mutant protein is able to change all these indicators. Taken together, our data suggest changes in the redox metabolism and proteostasis linked to VAPB^{P56S} expression.