Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

Aline Françoise de Camargo Reydon

Investigação das defesas contra oxidantes
provenientes do peroxissomo em *Saccharomyces*
cerevisiae

Investigation of the defense against oxidants derived from the peroxisome in
Saccharomyces cerevisiae

São Paulo
2012

Aline Françoise de Camargo Reydon

Investigação das defesas contra oxidantes provenientes
do peroxissomo em *Saccharomyces cerevisiae*

Investigation of the defense against oxidants derived from the peroxisome in
Saccharomyces cerevisiae

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Mestre em Ciências Biológicas, na Área de Genética.

Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto

São Paulo

2012

Reydon, Aline Françoise de Camargo

Investigação das defesas contra oxidantes provenientes do peroxissomo em *Saccharomyces cerevisiae*

105 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. *Saccharomyces cerevisiae* 2. Peroxissomo 3. Resposta antioxidante 4. Peroxirredoxina
I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Gisele Monteiro

Profa. Dra. Merari de Fátima Ramires Ferrari

Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto
Orientador

I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not a mere technician: he is also a child confronting natural phenomena that impress him as though they were fairy tales.

-Marie Curie

(citada em *Madame Curie: A Biography* por Eve Curie Labouisse)

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto, que me ensinou as bases da ciência durante a iniciação e me aceitou de volta 10 anos mais tarde, me ajudando a criar uma vida nova e pensante, por repartir idéias, me apoiar e orientar.

À Prof. Dra. Gisele Monteiro, por ter lembrado de mim após 10 anos, ter me ajudado na rotina do laboratório, pelas inúmeras explicações, conversas, almoços e ajudas e pela “doação” de sua bancada.

Ao Prof. Dr. Mário Henrique Barros, por me ajudar em partes cruciais do projeto, abrindo as portas de seu laboratório e sala, solucionando minhas dúvidas e me ensinando a amar ainda mais as leveduras. Ao Dr. José Ribamar dos Santos Ferreira Júnior, Dr. Cleverson Busso, Fernando Gomes e demais membros do laboratório do Prof. Mário, pelo apoio, pelas explicações pacientes e pela ajuda a todo e qualquer momento.

Aos amigos e colegas do laboratório, sempre prontos a ajudar, explicar, conversar e compartilhar o horário do almoço. Obrigada às amigas Marcela e Tati, que compartilharam o mestrado comigo; ao Eduardo, que compartilha interesses, cafés e barrinhas de cereais; ao Thiago, José Renato e José Freire por tirarem minhas dúvidas e me auxiliarem; à Simone, por ser a mãe de todos, onisciente e onipotente no laboratório; à Karen pelas consultorias químicas; ao Bruno pela ajuda e por ser minha ligação com o laboratório que eu havia conhecido há tantos anos.

À minha mãe, que insiste em acreditar no meu potencial, apóia minhas decisões e empresta sua casa, seu sofá e sua televisão nos momentos em que eu preciso descansar. Obrigada por toda a ajuda, apoio e cuidados.

Ao meu pai, que mesmo de longe me apóia quando preciso e acredita em mim. À minha família e aos meus amigos, que me acompanham desde sempre, me aceitam e me ajudam a ser eu.

Ao Adriano, meu marido, amigo e companheiro, que me apóia a todo o momento e me ajudou a fazer mudanças radicais na vida. Obrigada por estar ao meu lado sempre.

À Fapesp, CNPq e INCT Redoxoma pelo apoio financeiro indispensável.

Abreviaturas

A_{600nm}: absorvância medida à densidade ótica de 600nm;

Ahp1: alquil hidroperóxido redutase 1 de *Saccharomyces cerevisiae*;

ATZ: 3-amino 1,2,4-triazol;

BSA: *Bovine Serum Albumin*;

Ccp1: citocromo-c peroxidase, localizada na mitocôndria;

Cta1: catalase peroxissomal de *S. cerevisiae*;

Ctt1: catalase citossólica de *S. cerevisiae*;

Dot5: peroxirredoxina nuclear;

GSH: glutationa reduzida;

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência;

NGS: *Normal Goat Serum*;

OD₆₀₀: densidade ótica em 600nm;

PBS: phosphate-buffered saline;

Prx: peroxirredoxina;

Prx1: peroxirredoxina mitocondrial de *S. cerevisiae*;

PTS: *Peroxisome Targeting Signal*;

ROS: *Reactive Oxygen Species* (Espécies Reativas de Oxigênio)

SD: *synthetic dextrose* – meio de cultura sintético com dextrose como fonte de carbono;

SOD: superóxido dismutase;

tBHP: hidroperóxido de *terc*-butila;

Tsa1: *thiol specific antioxidant 1* de *S. cerevisiae*;

Tsa2: *thiol specific antioxidant 2* de *S. cerevisiae*;

Trr: tiorredoxina redutase

Trx: tiorredoxina

WT: *Wild type* (linhagem selvagem)

YNB: *Yeast Nitrogen Base medium*;

YPD: *Yeast extract- Peptone-Dextrose*.

Sumário

INTRODUÇÃO.....	9
<i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	9
O PEROXISSOMO.....	11
<i>Biogênese peroxissomal</i>	12
ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DEFESAS ANTIOXIDANTES	13
REAÇÕES OXIDANTES E ANTIOXIDANTES NO PEROXISSOMO.....	16
<i>Catalase A de Saccharomyces cerevisiae</i>	18
PEROXIRREDOXINAS.....	19
<i>Classificação de peroxirredoxinas</i>	21
<i>Tsa1 de Saccharomyces cerevisiae</i>	24
<i>Tsa2 de Saccharomyces cerevisiae</i>	24
<i>Prx1 de Saccharomyces cerevisiae</i>	25
<i>Dot5 de Saccharomyces cerevisiae</i>	25
<i>Ahp1 de Saccharomyces cerevisiae</i>	26
REGULAÇÃO GÊNICA DE PEROXIRREDOXINAS EM SITUAÇÃO DE ALTA ATIVIDADE PEROXISSOMAL.....	28
OBJETIVOS	34
METODOLOGIA.....	35
<i>Linhagens de Saccharomyces cerevisiae</i>	35
<i>Linhagem de E. coli</i>	35
MEIOS DE CULTURA	36
SOLUÇÕES	36
OLIGONUCLEOTÍDEOS.....	37
PLASMÍDEO	37
LOCALIZAÇÃO DE AHP1 POR SUBFRACIONAMENTO CELULAR	37
Subfracionamento celular	37
<i>SDS-Page e Western blot</i>	38
LOCALIZAÇÃO DE AHP1 POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA (IMUNO-OURO).....	39
Cultivo de células	39
Obtenção de esferoblastos	39
Fixação	40
Corte.....	40
Imunomarcagem.....	41
Coloração com metais pesados	41
Exame	41

CULTIVO DE CÉLULAS E TRATAMENTO COM PERÓXIDO PARA ENSAIOS BIOQUÍMICOS	42
QUANTIFICAÇÃO DO ESTADO REDOX POR RAZÃO ENTRE GLUTATIONA REDUZIDA E OXIDADA	42
DETECÇÃO DE PROTEÍNAS CARBONILADAS	43
Ensaio de ligação de DNPH às proteínas carboniladas.....	43
Detecção das proteínas ligadas a DNP por Western Blot.....	44
ENSAIO DE VIABILIDADE POR DILUIÇÃO SERIADA.....	44
CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS DUPLO-MUTANTES	45
ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>TSA2</i>	48
Preparação de RNA de levedura por extração com fenol ácido quente.....	48
Gel de separação das amostras.....	49
<i>Northern blot</i>	49
RESULTADOS	51
LOCALIZAÇÃO CELULAR DE AHP1	51
<i>Subfracionamento celular</i>	51
<i>Microscopia eletrônica: imuno-ouro</i>	53
O FENÓTIPO DAS DELEÇÕES: VIABILIDADE DE DIFERENTES LINHAGENS DE <i>SACCHAROMYCES</i>	
<i>CEREVISIAE</i>	57
<i>Ensaio de viabilidade por diluição seriada</i>	57
O FENÓTIPO DAS DELEÇÕES: COMPARAÇÃO DO ESTADO REDOX DE DIFERENTES LINHAGENS DE	
<i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	65
<i>Quantificação de estado redox por razão entre glutathione reduzida e oxidada</i>	65
<i>Detecção de proteínas carboniladas</i>	70
CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS DUPLO-MUTANTES	72
O FENÓTIPO DAS DELEÇÕES: COMPARAÇÃO DA VIABILIDADE DAS LINHAGENS DUPLO-MUTANTES	77
O FENÓTIPO DAS DELEÇÕES: CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS DAS LINHAGENS DUPLO-MUTANTES.....	79
ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>TSA2</i>	84
DISCUSSÃO GERAL	88
CONCLUSÕES.....	93
RESUMO.....	94
ABSTRACT	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

Introdução

Saccharomyces cerevisiae

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo unicelular, de fácil cultivo e manipulação gênica. É amplamente utilizada como modelo eucarioto, já que compartilha ciclo de vida e organização celular com eucariotos mais complexos, possibilitando levantamento de hipóteses através de estudos moleculares e celulares relevantes, por exemplo, à biologia humana (Castrillo e Oliver, 2004). Seu genoma foi totalmente sequenciado (Goffeau *et al.*, 1996) e coleções de mutantes contendo deleções estão amplamente disponíveis (Invitrogen, cat. 95401.H2).

Saccharomyces cerevisiae apresenta estados haplóides e diplóides estáveis, possibilitando a análise dos fenótipos dos mutantes com deleção total de genes não essenciais no estado haplóide e estudos de complementariedade. Para genes essenciais, estudos de complementariedade podem ser realizados após transformações de nocautes no estado diplóide, seguido de indução de meiose (esporulação). A integração de DNA no genoma da levedura ocorre por recombinação homóloga (Sherman, 2002), um sistema altamente eficiente, conferindo uma facilidade na transformação gênica desse organismo (Ausubel *et al.*, 2003).

Saccharomyces cerevisiae consegue utilizar uma grande variedade de fontes de carbono, apresentando preferência por glicose, quando tem metabolismo principalmente fermentativo. O crescimento em meio contendo altas concentrações de glicose causa a redução de atividade de várias proteínas dispensáveis nessa condição, o que pode ocorrer por inativação (inibição da função de algumas proteínas através da modificação ou degradação) e repressão (redução da expressão gênica). A inativação por glicose ocorre rapidamente através da proteólise de enzimas envolvidas na gliconeogênese, no ciclo do glioxilato e em sistemas de transporte de açúcares. Várias das proteínas inativadas têm também a expressão gênica reprimida por glicose. A repressão por glicose inclui vários genes que codificam proteínas referentes à

utilização de outras fontes de carbono, proteínas pouco necessárias durante a fermentação, proteínas mitocondriais da cadeia respiratória e enzimas responsáveis pela gliconeogênese (Johnston e Carlson, 1992). A repressão por glicose também causa a diminuição de mitocôndrias e peroxissomos (Gurvitz e Rottensteiner, 2006).

O crescimento em diferentes meios de cultura confere alterações metabólicas que podem ser utilizadas experimentalmente. Por exemplo, meios de cultura contendo glicerol e/ou etanol são utilizados por permitir somente o crescimento não-fermentativo (metabolismo respiratório), não possibilitando o crescimento de células *petite* (células deficientes em mitocôndrias funcionais); galactose é utilizada como fonte de carbono para induzir a transcrição de sequências ligadas a promotores como o *GAL 1*; meios de cultura contendo acetato de potássio são utilizados para induzir a esporulação de células diplóides (Ausubel *et al.*, 2003).

Em meios de cultura contendo ácidos graxos como única fonte de carbono, especialmente oleato, há uma regulação positiva da transcrição dos genes codificadores de enzimas responsáveis pelo processo de β -oxidação, que é acompanhada de uma significativa proliferação de peroxissomos. Essa indução gênica pode ser mediada pelo sensor Pip2-Oaf1, ativado por ácidos graxos. No entanto, as transcrições de Oaf1 e Pip2 são reprimidas por glicose, sendo essa repressão dominante sobre a indução por oleato (Gurvitz e Rottensteiner, 2006). Esse mecanismo é semelhante ao de eucariotos superiores, onde receptores PPAR (*peroxisome proliferator activated receptor*) se ligam a diversos tipos de lipídeos, gerando alterações transcricionais (Hiltunen *et al.*, 2003). Também estão envolvidos na indução de biogênese peroxissomal por ácidos graxos o regulador Adr1, que modula principalmente genes que codificam proteínas envolvidas na produção de acetil-CoA e Snf1, uma quinase essencial para a desrepressão gênica e para a utilização de ácidos graxos pela célula (Gurvitz e Rottensteiner, 2006).

A pesquisa na era pós-genômica confere novas possibilidades de emprego de *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo na elucidação de mecanismos regulatórios, biologia celular e no desenvolvimento de técnicas de obtenção e análise de informação genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica. As informações obtidas, além das metodologias práticas e conceituais desenvolvidas em leveduras,

podem ser aplicadas no estudo de organismos mais complexos (Castrillo e Oliver, 2004).

O peroxissomo

Em animais, as primeiras reações da biossíntese de plasmalogênios – a classe de fosfolipídios mais abundante na mielina – são dependentes do peroxissomo. Deficiências na biossíntese de plasmalogênios podem afetar a mielinização de células nervosas, explicando porque muitas deficiências peroxissomais estão relacionadas com doenças neurológicas (Alberts *et al.*, 2008).

O processo de importação proteica ao peroxissomo é distinto do mitocondrial e similar ao nuclear, necessitando de proteínas receptoras no citosol e proteínas de ancoragem na superfície citossólica do peroxissomo e é dependente de ATP. Esse processo é de extrema importância, como demonstrado pela síndrome hereditária de Zellweger, na qual a importação proteica peroxissomal é severamente deficiente, levando a um quadro clínico de anormalidades cerebrais, hepáticas e renais, culminando em morte logo após o nascimento. Uma das formas dessa síndrome é causada por uma mutação no gene que codifica a peroxina Pex2, envolvida na biogênese peroxissomal e na importação proteica (Shimozawa *et al.*, 1992). Outros distúrbios humanos relacionados ao peroxissomo incluem: adrenoleucodistrofia neonatal, pseudo-neonatal e ligada ao X, doença de Refsum, condrodysplasia punctata rizomélica, hiperoxalúria do tipo 1 e acatalasemia (devido à deficiência de catalase), entre outros (Schrader e Fahimi, 2008).

No contexto dessa tese, cabe destacar que a acatalasemia é uma doença relativamente branda, sendo lesões orais o único sintoma notável na variante mais grave. Além disso, pode estar ligada ao desenvolvimento de diabetes, arteroesclerose e outras condições relacionadas à idade, devido a um aumento de danos oxidativos (Terlecky *et al.*, 2006).

Biogênese peroxissomal

O peroxissomo é envolvido por uma única membrana - diferentemente das mitocôndrias e dos cloroplastos que têm duas - e não contém DNA nem ribossomos. Organelas autônomas e de origem simbiótica, como mitocôndrias e cloroplastos, são formadas a partir de organelas pré-existentes. Organelas do sistema endomembrana, consideradas integrantes do eucarioto primitivo - como o complexo de Golgi, lisossomos e a membrana plasmática - têm formação e importação proteica dependentes do retículo endoplasmático e têm comunicação através de vesículas de transporte. Já a biogênese peroxissomal depende de uma combinação de vias: lipídeos e proteínas de membrana são provenientes do retículo endoplasmático e outras proteínas são importadas seletivamente do citosol através de um sistema denominado *translocon* peroxissomal (van der Zand *et al.*, 2012).

Recentemente, a biogênese peroxissomal foi observada em detalhe, tendo sido descrita como um processo no qual primeiramente são formados dois subcomplexos no retículo endoplasmático, que são transportados separadamente e se fundem. A fusão permite a montagem do *translocon* peroxissomal e o início da importação de enzimas do citossol, formando a nova organela. O peroxissomo pode posteriormente sofrer fissão (van der Zand *et al.*, 2012).

O *translocon* peroxissomal transloca enzimas contendo um sinal de importação para a matriz da organela. Nesse processo, proteínas são reconhecidas por receptores de importação no citossol. O complexo formado pelo receptor e pela proteína reconhecida é então direcionado para o complexo de ancoragem na membrana peroxissomal. A proteína é levada à matriz da organela através de um poro de translocação, enquanto o receptor é liberado da membrana e pode ser reciclado ou degradado pelo proteassomo (Rucktäschel *et al.*, 2011).

O sinal de importação PTS1 (*peroxisome targeting signal 1*) é reconhecido pela peroxina Pex5, no citossol. PTS1 é uma sequência específica e conservada de aminoácidos próxima à região C-terminal da proteína; é tipicamente formada pelos aminoácidos Serina-Lisina-Leucina (SKL), podendo compreender aminoácidos

similares, sendo as combinações possíveis (S/A/C)-(K/H/R)-(L/M) (Rucktäschel *et al.*, 2011).

Algumas proteínas peroxissomais apresentam um sinal de importação composto por nove aminoácidos na região N-terminal, denominado PTS2, cujo receptor citossólico é a peroxina Pex7 (Petriv *et al.*, 2004). O transporte mediado por Pex7 necessita de proteínas auxiliares (co-receptores) espécie-específicas – Pex18 e Pex21 em *Saccharomyces cerevisiae* (Rucktäschel *et al.*, 2011).

Poucas proteínas da matriz peroxissomal apresentam vias de importação alternativas; um exemplo é a acil-CoA oxidase em *Saccharomyces cerevisiae*. As proteínas sem os sinais de importação conhecidos (PTS1 ou PTS2) podem se ligar a proteínas que contêm PTS, sendo transportadas à matriz peroxissomal nesse complexo. Alternativamente, podem conter um sinal de importação interno ainda desconhecido, reconhecido pela Pex5 (Rucktäschel *et al.*, 2011).

Espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes

Com o aumento da concentração de oxigênio na atmosfera na era Pré-Cambriana, foi possível o desenvolvimento de metabolismo respiratório e a geração eficiente de energia. No entanto, essa mudança acarretou um aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células. A detecção e a neutralização de ROS se tornaram importantes para a manutenção da viabilidade celular, levando a uma pressão seletiva para o desenvolvimento sistemas de defesas antioxidantes.

Entre os mecanismos de defesa antioxidante se encontram quelantes de metais, que previnem reações como a de Fenton e, portanto, a formação de ROS; antioxidantes de baixo peso molecular - como a glutathione e as vitaminas C e E - e enzimas antioxidantes, como superóxido dismutases, catalases, glutathione peroxidases e peroxirredoxinas. Há também vias de reparo de lesões causadas por oxidantes, como a 8-oxoguanina glicosilase - que contribui para o reparo de lesões no DNA -, glutathione reductases e thioredoxinas - que agem no reparo de proteínas - e glutathione peroxidases, que atuam no reparo de lipídios (Halliwell e Gutteridge, 2008).

Assim como outros organismos, leveduras desenvolveram sistemas de resposta a oxidantes que diferem de acordo com o tipo de oxidante e a magnitude do estresse. Baixas doses de ROS levam a um aumento de resistência a oxidantes, concentrações mais altas atrasam a divisão celular e induzem sistemas de reparo e quantidades muito altas iniciam a morte celular (Temple *et al.*, 2005). A detecção de estresse oxidativo em leveduras se dá através do estado redox de algumas proteínas, como a Gpx3 (Delaunay *et al.*, 2002), levando à ativação de vias antioxidantes através da modulação de diversos genes por fatores de transcrição.

Uma grande parte dos genes da célula é necessária para a manutenção de resistência e resposta a ROS. Em *Saccharomyces cerevisiae*, a expressão de aproximadamente 15% dos genes responde a oxidantes, indicando a existência de “várias vias paralelas, independentes e parcialmente interconectadas de resposta a, e defesa contra, ROS” (Temple *et al.*, 2005).

Os genes de defesa antioxidante podem ser co-regulados devido a vários tipos de estresse, podendo ser induzidos por diversas combinações de fatores de transcrição, incluindo Msn2/Msn4 (em resposta geral a estresse), Yap1 (em resposta a oxidantes), Skn7 (em resposta a estresse, induz genes *heat-shock*) (Temple *et al.*, 2005) e Cad1 (em resposta a oxidantes, controla genes referentes à estabilização de proteínas).

Os fatores de transcrição Msn2 e Msn4, por exemplo, são muito semelhantes e parcialmente redundantes. Regulam a resposta geral a estresse, modulando a expressão de aproximadamente 200 genes em resposta a diversos estímulos, como choque por calor ou osmótico, estresse oxidativo, baixo pH, depleção de glicose e altas concentrações de etanol (Martínez-Pastor *et al.*, 1996).

O mecanismo de detecção e sinalização da presença de níveis elevados de peróxido mais conhecido em *Saccharomyces cerevisiae* é o controle realizado pelo fator de transcrição Yap1. Nesse processo, a glutathione peroxidase Gpx3 é o receptor de peróxido, tendo sua cisteína catalítica diretamente oxidada a ácido sulfênico. A seguir, é formada uma ligação dissulfeto intermolecular temporária entre a Gpx3 oxidada e o fator de transcrição Yap1, resultando na formação de uma ligação dissulfeto intramolecular em Yap1, ativando o fator de transcrição (Delaunay *et al.*

2002; Iwai *et al.*, 2010). A ativação do fator de transcrição Yap1 leva a uma regulação positiva de diversos genes referentes à defesa antioxidante.

Assim como a Gpx3, peroxirredoxinas são diretamente oxidadas por peróxidos, formando dissulfetos intra ou intermoluculares. Peroxirredoxinas podem, portanto, apresentar função de receptores de peróxido, além de agir como peroxidases. Os detalhes desses processos ainda não são conhecidos, mas há indicações de que a Tsa1 ao ser oxidada por peróxido de hidrogênio em linhagens com mutações no gene para Ybp1 (*Yap1-binding protein 1*) pode formar ligações dissulfeto mistas com Yap1, iniciando uma cascata de sinalização (Tachibana *et al.*, 2009). Outro possível mecanismo de sinalização em resposta a peróxidos (nesse caso, peróxidos orgânicos) envolve o fator de transcrição Cad1 (Yap2). Nesse caso, a peroxirredoxina Ahp1 é responsável pela formação de ligações dissulfeto misto com Cad1, em resposta a hidroperóxido orgânico. A resposta a peróxidos orgânicos é devida tanto à ativação da via dependente de Yap1 por Gpx3 quanto da via dependente de Cad1 por Ahp1 (figura1), sendo que a via de Yap1 é a mais importante a essa defesa (Iwai *et al.*, 2010).

Figura 1: A ativação de Cad1 e Yap1 medeia a resposta de leveduras a peróxidos. O sistema Gpx3/Yap1 funciona como resposta a peróxidos em geral. A via Ahp1/Cad1 é importante na resposta a alquil-hidroperóxidos e peróxidos de lipídeo. Tsa1 pode ativar Yap1, especialmente quando o alelo *ybp1-1* de Ybp1 está presente (como ocorre na linhagem w303). Além de regular genes em comum, Yap1 e Cad1 têm alvos específicos. Gpx3 pode também agir na detoxificação de peróxidos de lipídeos. (Figura traduzida de Iwai *et al.*, 2010).

Essas vias regulatórias, dentre outras, devem estar envolvidas em fenômenos de interação e compensação de diferentes enzimas antioxidantes que foram observadas em diversas ocasiões. Por exemplo, a enzima Sod1 tem expressão e atividade peroxidásica aumentada em leveduras duplo-mutantes $\Delta tsa1/\Delta tsa2$ (Ogusucu *et al.*, 2009); catalases e Tsa2 cooperam com Tsa1 na defesa contra peróxido de hidrogênio (Munhoz e Netto, 2004); a deficiência de Tsa1 leva a uma ativação transcricional de vários genes, como *SOD1*, *PRX1* e *AHP1* (Demasi *et al.*, 2006); a deficiência de Cta1 leva a um aumento de expressão de Ahp1, Prx1 e Tsa2 (Genu, 2007). Mais abaixo é apresentada uma descrição de enzimas e vias antioxidantes de *Saccharomyces cerevisiae* relacionadas a essa tese.

Reações oxidantes e antioxidantes no peroxissomo

Os peroxissomos são organelas responsáveis pelo metabolismo de ácidos graxos, convertendo-os a acetyl CoA, que é exportado ao citossol. Em leveduras, a β -oxidação ocorre exclusivamente nos peroxissomos (Hiltunen *et al.*, 2003).

Figura 2: β -oxidação de ácidos graxos no peroxissomo. As setas sólidas indicam os passos metabólicos da β -oxidação em leveduras. As setas pontilhadas indicam os passos da β -oxidação dependentes de (3S)-hidroxiacil-CoA, que não ocorre em leveduras (Hiltunen *et al.*, 2003).

As reações oxidativas que ocorrem no peroxissomo utilizam oxigênio e produzem peróxido de hidrogênio: $RH_2 + O_2 \rightarrow R + H_2O_2$ (figura 2). Enzimas peroxissomais que geram espécies reativas de oxigênio, além da Acyl-CoA oxidase, incluem: urato oxidase, xantina oxidase, D-aminoácido oxidases, ácido pipecólico oxidase, sarcosina oxidase, poliamina oxidase e, em fungos, álcool oxidase (Aksam *et al.*, 2009). Dessa forma, as oxidações dos vários substratos que ocorre no peroxissomo geram peróxido de hidrogênio, que pode levar a uma situação de estresse oxidativo

caso não seja degradado por vias de defesa antioxidante. Em leveduras, a catalase A (Cta1) é classicamente considerada a principal via de decomposição de H_2O_2 no peroxissomo.

Catalase A de *Saccharomyces cerevisiae*

As catalases podem apresentar duas atividades enzimáticas: catalásica e peroxidásica. Assim, a catalase - e possivelmente outras enzimas – utilizam o peróxido de hidrogênio para oxidar substratos como fenois, ácido fórmico, formaldeído e alcoóis, segundo a reação: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{R}'\text{H}_2 \rightarrow \text{R}' + 2\text{H}_2\text{O}$. A atividade peroxidásica é, portanto, muito importante para a detoxificação do sangue de animais, realizada pelos rins e fígado. Quando há um excesso de peróxido de hidrogênio, essas enzimas também convertem o peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular pela sua atividade catalásica: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

Em leveduras, a catalase peroxissomal sofre repressão por glicose (Hörtlner *et al.*, 1982), sendo expressa preferencialmente em condições de metabolismo respiratório e sofrendo indução em meio de cultura contendo ácidos graxos como fonte de carbono (Gurvitz e Rottensteiner, 2006). Tem sido proposto que a função fisiológica principal da catalase peroxissomal, denominada catalase A (Cta1) é a remoção do peróxido de hidrogênio formado durante a β -oxidação. Todavia, linhagens deficientes em Cta1 não apresentam problemas de crescimento em oleato e são igualmente resistentes ao estresse oxidativo (Hiltunen *et al.*, 2003), sugerindo a existência de mecanismos compensatórios de defesa a oxidantes provenientes do metabolismo de ácidos graxos. De fato, resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa indicam que, em condições respiratórias, células deficientes em catalase A exibem uma expressão aumentada de genes que codificam outras enzimas antioxidantes - mais especificamente Ahp1, Prx1 e Tsa2, pertencentes à família das peroxirredoxinas (Genu, 2007).

Peroxirredoxinas

Em *Saccharomyces cerevisiae*, a resposta a hidroperóxidos envolve a indução de pelo menos 115 proteínas (Lee *et al.*, 1999b), entre elas as peroxirredoxinas. As peroxirredoxinas constituem uma família de peroxidases presentes em procariotos e eucariotos que contêm a sequência do sítio ativo altamente conservada com o motivo PXXXTXXC (Nelson *et al.*, 2011). Além disso, a estrutura do sítio catalítico também é altamente conservada, contendo um resíduo de arginina que, assim como a treonina, auxilia na estabilização do tiolato (RS^-) (figura 3).

Figura 3: Característica estrutural das peroxirredoxinas. Sítio ativo da tiól peroxidase de *S. pneumoniae*, indicando a cadeia lateral dos principais aminoácidos envolvidos no sítio ativo. Figura gerada pelo programa PyMOL (Horta, 2009).

As peroxirredoxinas podem reduzir hidroperóxidos – tanto orgânicos como de hidrogênio - utilizando elétrons doados por NADPH através de tiorredoxina redutase e tiorredoxina ou de outros intermediários que contêm tiois (Lee *et al.*, 1999b). Excepcionalmente, peroxirredoxinas pertencentes a uma classe (as 1-Cys Prx) podem também serem reduzidas por ascorbato (Monteiro *et al.*, 2007).

O mecanismo catalítico dessas enzimas envolve a clivagem heterolítica de uma ligação peróxido através de uma cisteína reativa. A redução de peróxidos pelas cisteínas reativas gera um derivado de ácido sulfênico (R-SOH) (figura 4; Netto *et al.*, 2007). Se os níveis de peróxido encontram-se muito elevados, o ácido sulfênico da cisteína peroxidásica pode reagir com outra molécula de peróxido, gerando ácido sulfínico (R-SO₂H⁻). O ácido sulfínico não pode ser reduzido por agentes redutores clássicos como DTT e tioredoxina. Porém, especificamente no caso das 2-Cys Prx típicas (ver a seguir), ácidos sulfínicos podem ser reduzidos por enzimas (sulfirredoxinas) à custa de ATP (revisado por Lowther e Haynes, 2011). Em contrapartida, o ácido sulfínico pode ser novamente oxidado, formando ácido sulfônico (R-SO₃H⁻), o que inativa irreversivelmente a atividade peroxidásica da peroxirredoxina. As peroxirredoxinas inativadas agem então como moléculas sinalizadoras ou chaperonas nas situações de concentrações de peróxido mais elevadas (Lian *et al.*, 2012).

Figura 4: O mecanismo catalítico das peroxirredoxinas gera um derivado de ácido sulfênico e libera um álcool (Netto *et al.*, 2007).

Peroxirredoxinas também atuam no controle de sinalização celular através da regulação de níveis de peróxido envolvidos na transdução de sinal (Poole *et al.* 2011). Corroborando a importância de peroxidases dependentes de tiól na sinalização a peróxido de hidrogênio, estudos recentes utilizando a linhagem $\Delta 8$ (uma linhagem de levedura apresentando deficiência das oito peroxidases dependentes de tiól - as cinco peroxirredoxinas e três glutathione peroxidases, desenvolvida por Fomenko *et al.*, 2011 e utilizada no presente trabalho) verificaram uma sensível perda de atividade transcricional. Além disso, como já foi mencionado, o fator de transcrição de resposta a oxidantes Cad1 de *Saccharomyces cerevisiae* apresenta ativação dependente de

Ahp1, uma peroxirredoxina que atua como sensor de alquil-hidroperóxidos e peróxidos de lipídeo (Iwai *et al.*, 2010), enquanto Yap1 é um fator de transcrição ativado pela peroxidase Gpx3 (Delaunay *et al.*, 2002).

Assim, peroxirredoxinas podem ser importantes para a sinalização, feita diretamente pela forma oxidada da enzima (ácido sulfinico ou sulfônico) ou através do aumento localizado de oxidantes (Poole *et al.* 2011). Além disso, a hiperoxidação de 2-Cys peroxirredoxinas pode promover a função chaperona de complexos de alto peso molecular dessa enzima (Jang *et al.*, 2004) e peroxirredoxinas podem ser responsáveis pela detecção e transdução de sinais oxidantes através da modulação de ligações dissulfeto de fatores de transcrição, como ocorre com Ahp1 e Cad1 (Iwai *et al.*, 2010).

Classificação de peroxirredoxinas

As peroxirredoxinas são classificadas usando diferentes critérios. Uma classificação frequentemente utilizada é baseada na presença ou ausência de cisteínas conservadas e no seu mecanismo catalítico. Peroxirredoxinas que contêm apenas uma cisteína conservada são as 1-Cys Prx e as que contêm duas cisteínas conservadas são chamadas de 2-Cys Prx; essas últimas podem ser consideradas típicas ou atípicas, dependendo se o dissulfeto formado em seu ciclo catalítico é intra ou intermolecular (figura 5).

Como citado acima (figura 4), em qualquer dos casos, a cisteína reativa oxida o hidroperóxido, formando um ácido sulfênico (Cys-SOH) e liberando um álcool derivado do peróxido (Netto *et al.*, 2007). Mais detalhadamente, o ciclo catalítico pode ser dividido em três passos: (1) A peroxidação, quando o peróxido é reduzido ao álcool correspondente e a cisteína peroxidásica é oxidada a ácido sulfênico. (2) A resolução (passo inexistente nas 1-Cys Prx), quando é formado um dissulfeto entre a cisteína peroxidásica e a cisteína de resolução. (3) A redução, quando a peroxirredoxina é reduzida por doadores de elétron contendo tiol, como a tiorredoxina.

Figura 5: Mecanismos catalíticos das diferentes classes de peroxirredoxinas. (A) 1-Cys Prx; (B) 2-Cys Prx típicas; (C) 2-Cys Prx atípicas (Netto et al., 2007).

As peroxirredoxinas também podem ser classificadas segundo similaridades estruturais e de sequência de aminoácidos, como descrito em Nelson *et al.* (2011), quando técnicas de bioinformática foram utilizadas para analisar a estrutura próxima ao sítio ativo (*active site profiling*), gerando uma categorização que alia informações estruturais e funcionais, com implicações evolutivas. Assim, as peroxirredoxinas foram divididas em 6 subfamílias: BCP/PrxQ, AhpC/Prx1, Prx6, Prx5, Tpx e AhpE (figura 6).

Tsa1 de *Saccharomyces cerevisiae*

A Tsa1 é uma peroxirredoxina codificada pelo gene YML028W, tem peso molecular de 21,6 kDa e ocorre no citossol (Park *et al.*, 2000). É classificada na subfamília AhpC/Prx1 de peroxirredoxinas (Nelson *et al.*, 2011) e apresenta mecanismo catalítico de Prx 2-Cys típica. As cisteínas catalíticas são a Cys47 (reativa) e Cys170 (de resolução) (Chae *et al.*, 1994).

A análise de atividade de transcrição mostra que a Tsa1 é a peroxirredoxina mais abundante na célula (Park *et al.*, 2000), podendo atingir até 90% dos níveis de peroxidases dependentes de tiól quando os níveis proteicos são considerados (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Tsa1 tem papel central na proteção a processos genotóxicos (Huang *et al.*, 2003; Iraqui *et al.*, 2009), sendo particularmente importante na defesa de leveduras com mitocôndria não funcional (Demasi *et al.*, 2006). A Tsa1 exibe altos níveis de atividade peroxidásica (Ogusucu *et al.*, 2007) e age tanto como antioxidante associado ao ribossomo quanto livre no citoplasma (Trotter *et al.*, 2008). Em situações de estresse oxidativo, essa peroxirredoxina forma um complexo chaperona de alto peso molecular (Demasi *et al.*, 2006; Jang *et al.*, 2004).

Há evidências de cooperação e compensação de Tsa1, Tsa2 e catalases na defesa a hidroperóxidos (Munhoz e Netto, 2004).

Tsa2 de *Saccharomyces cerevisiae*

A Tsa2 é codificada pelo gene YDR453C e foi localizada no citosol (Park *et al.*, 2000). Mais recentemente, foi observada sua localização nos ribossomos, indicando um papel de Tsa2 na síntese proteica (Sideri *et al.*, 2010). Diferentemente de Tsa1, a expressão de Tsa2 é altamente induzida por peróxidos (Munhoz e Netto, 2004; Wong *et al.*, 2002), e também usa o sistema tiorredoxina como doador de elétrons. Essa peroxirredoxina apresenta grande similaridade à Tsa1 (86% de identidade pela sequência de aminoácidos), porém diferentemente de Tsa1, é altamente induzível. Assim como a Tsa1, é classificada na subfamília AhpC/Prx1 de peroxirredoxinas

(Nelson *et al.*, 2011) e apresenta mecanismo catalítico de Prx 2-Cys típica. Linhagens $\Delta tsa2$ apresentam aumento de sensibilidade a hidroperóxido de *tert*-butila (tBHP), mas não a peróxido de hidrogênio, pois ocorre um aumento de atividade de catalases na ausência de Tsa2 (Munhoz e Netto, 2004).

Prx1 de *Saccharomyces cerevisiae*

A Prx1 é codificada pelo locus YBL064C e tem massa de 29 kDa, tendo sido a única peroxirredoxina 1-Cys encontrada em levedura (Pedrajas *et al.*, 2000). A Prx1 pertence à subfamília Prx6 de peroxirredoxinas (Nelson *et al.*, 2011). Apresenta um sinal de localização mitocondrial em sua região N-terminal, tendo sido localizada na mitocôndria por Park *et al.* (2000). A Prx1 é induzida durante o crescimento respiratório e em condições de estresse oxidativo (Monteiro *et al.*, 2002; Monteiro e Netto, 2004). Essa enzima tem atividade de tiorredoxina peroxidase, podendo utilizar o sistema tiorredoxina mitocondrial (Grant, 2001) ou ascorbato (Monteiro *et al.*, 2007) como doador de elétrons.

Dot5 de *Saccharomyces cerevisiae*

A Dot5 é uma peroxirredoxina nuclear de massa correspondente a 24kDa, codificada pelo gene YIL010W. Ela foi inicialmente descrita como interruptor de silenciamento telomérico (Singer *et al.*, 1998) e posteriormente identificada como uma redutase de alquil-hidroperóxidos (Cha *et al.*, 2003). A Dot5 pertence à subfamília BCP/PrxQ de peroxirredoxinas, segundo a classificação de Nelson *et al.* (2011). Células $\Delta dot5$ apresentam resistência reduzida ao estresse oxidativo (Park *et al.*, 2000).

Ahp1 de *Saccharomyces cerevisiae*

A Ahp1 é uma peroxirredoxina de aproximadamente 19kDa de massa, codificada pelo locus YLR109W (Lee *et al.* 1999b) e ocorre como homodímero. A Ahp1 foi classificada como membro da subfamília Prx5 por Nelson *et al.* (2011). Interessantemente, a análise estrutural de Ahp1 a coloca mais próxima de peroxirredoxinas 2-Cys atípicas e 1-Cys, apesar de seu mecanismo catalítico corresponder ao de peroxirredoxinas 2-Cys típicas (Lian *et al.*, 2012). O ciclo catalítico dessa enzima ainda está sendo esclarecido. Entre as três cisteínas presentes, sabe-se que a Cys62 é peroxidásica, porém as cisteínas 120 (Jeong *et al.*, 1999) e 31 (Lian *et al.*, 2012) foram descritas como sendo a cisteína de resolução, o que sugere uma possível maior complexidade no mecanismo de resolução e a necessidade de estudos adicionais sobre a Ahp1.

Essa proteína antioxidante apresenta propriedade de defesa a alquil-hidroperóxidos; linhagens com seu gene nocauteado (Δ *ahp1*) têm maior sensibilidade a hidroperóxidos orgânicos, como o hidroperóxido de *tert*-butila (*t*BHP).

A Ahp1 degrada hidroperóxido de *tert*-butila, um hidroperóxido orgânico não fisiológico, com aproximadamente o dobro da eficiência com a qual degrada peróxido de hidrogênio (Jeong *et al.*, 1999; Genu, 2007). Também apresenta atividade na redução de hidroperóxidos de ácido oléico, indicando a possibilidade de hidroperóxidos de lipídeos serem substratos fisiológicos dessa enzima (Genu, 2007). A capacidade de Ahp1 remover hidroperóxidos de ácidos graxos já havia sido sugerida anteriormente (Jeong *et al.*, 1999; Lee *et al.* 1999b). Recentemente, foi descrita uma cooperatividade positiva devido à ligação de *t*BHP ao dímero de Ahp1, o que aumentaria a eficiência na eliminação de hidroperóxidos em situação de estresse oxidativo (Lian *et al.*, 2012).

A Ahp1 pode agir como sensor de alquil-hidroperóxidos, resultando na ativação do fator de transcrição Cad1 (homólogo ao Yap1), que possivelmente funciona como sistema de defesa contra estresse induzido por alquil-hidroperóxidos, incluindo peróxidos lipídicos (Iwai *et al.*, 2010). É importante salientar que esse sensor putativo (Ahp1) tem uma função antioxidante independente de glutatona (GSH), porém

depende do sistema tioredoxina (Lee *et al.* 1999b). Diferentemente, o sensor de peróxido de hidrogênio em leveduras seria a glutathiona peroxidase 3 (Gpx3), que transfere equivalentes oxidantes para o fator de transcrição Yap1, o principal regulador da resposta celular a estresse oxidativo (Delaunay *et al.*, 2002).

Em leveduras crescidas em meio contendo glicose como fonte de carbono, condição na qual apresenta metabolismo fermentativo, a Ahp1 em fusão com proteína fluorescente verde (GFP) se localiza no citosol (Park *et al.*, 2000). Em princípio, é possível que em condições respiratórias – como leveduras crescidas em um meio de cultura com glicerol ou oleato como fonte de carbono -, essa enzima pode também localizar-se em compartimentos como o peroxissomo, como sugerido por Lee *et al.* (1999b).

A sugestão de localização peroxissomal de Ahp1 é devida, principalmente, ao fato de Ahp1 apresentar a seqüência C-terminal AHL, semelhante à (S/A/C)-(K/H/R)-(L/M) que caracteriza o sinal de importação ao peroxissomo PTS1. Além disso, a proteína apresenta uma similaridade de 57% à Pmp20A de *Candida bondinii* (Horiguchi *et al.*, 2001), uma proteína de membrana peroxissomal localizada no interior dessa organela (figura 7).

Figura 7: Comparação de seqüência de aminoácidos de Ahp1 (*Saccharomyces cerevisiae*) e PMP20A (*Candida bondinii*). O alinhamento foi feito com o programa MegAlign, DNASTAR. Similaridade: 57%; identidade: 39%. As cisteínas de Ahp1 estão destacadas em amarelo. As seqüências destacadas em rosa podem direcionar proteínas ao peroxissomo.

Regulação gênica de peroxirredoxinas em situação de alta atividade peroxissomal

A resposta celular de leveduras ao estresse oxidativo é complexa. De fato, existem diversas proteínas num mesmo compartimento celular capazes de remover hidroperóxidos. Por exemplo, no citosol há a catalase citosólica (Ctt1), glutathione peroxidases (Gpx1, Gpx2 e Gpx3) e peroxirredoxinas (Tsa1, Tsa2 e Ahp1), capazes de remover peróxido de hidrogênio, indicando a possibilidade de compensação à ausência de uma enzima por outras com papel semelhante.

Apesar de apresentarem certa redundância de função, as peroxirredoxinas apresentam diferenças de eficiência no combate aos peróxidos. Ahp1 e Dot5 apresentam maiores eficiências catalíticas na redução de peróxidos orgânicos (Jeong *et al.*, 1999; Cha *et al.*, 2003), enquanto Tsa1 e Prx1 exibem preferência por peróxido de hidrogênio como substrato (Chae *et al.*, 1994; Pedrajas *et al.*, 2000). Já Tsa2 é eficiente tanto na redução de hidroperóxidos orgânicos como de peróxido de hidrogênio (Munhoz e Netto, 2004). Nesse sentido, é relevante quantificar as reatividades dessas enzimas frente aos diferentes peróxidos, identificar padrões de expressão em diferentes condições e determinar a localização sub-celular.

A regulação gênica de Ahp1 em diferentes condições fisiológicas foi investigada em nosso laboratório, bem como a sua relação com outras enzimas do sistema antioxidante de *Saccharomyces cerevisiae* (Genu, 2007). A expressão do gene *AHP1* apresentou indução sob tratamento com hidroperóxidos em células cultivadas em glicose, em glicerol ou em ácido oléico como fontes de carbono (figura 8). Em condições respiratórias (células crescidas em ácido oleico e em glicerol), a indução da expressão de *AHP1* é mais expressiva na linhagem deficiente em catalase A ($\Delta cta1$), se comparada com a linhagem selvagem (figura 8). Esses resultados indicam uma compensação da ausência de catalase peroxissomal por Ahp1 em situação de metabolismo respiratório (Genu, 2007).

Em glicose, situação na qual a expressão de *CTA1* encontra-se reprimida e na qual há uma menor produção de ROS pela mitocôndria e peroxissomo, *PRX1* e *AHP1*

também apresentam níveis menores de expressão, indicando que as duas peroxirredoxinas têm maior importância em condições respiratórias.

Figura 8: Expressão de *AHP1* em diferentes condições metabólicas em células selvagens ou Δ *cta1*. **(A)** Condição fermentativa: Células das linhagens WT (YPH250) e Δ *cta1* (YIT2) foram crescidas em meio contendo 2% de glicose como fonte de carbono. **(B)** Condição respiratória, grande atividade peroxissomal: Células das linhagens WT e Δ *cta1* foram crescidas em meios contendo 0,1% ácido oléico como fonte de carbono. Os tratamentos foram os mesmos de **A**. **(C)** Condição respiratória: Células das linhagens WT e Δ *cta1* foram crescidas em meio contendo 2% de glicose até OD₆₀₀ = 0,8, depois transferidas para meio contendo 2% glicerol por 6 horas. Todos os tratamentos foram de 30 minutos. As amostras de RNA foram hibridadas com sonda específica para o gene *AHP1*. Amostras de rRNA em gel de agarose/formaldeído antes da transferência são apresentados como controle de carregamento (Genu, 2007).

Com o intuito de observar a compensação da ausência de catalase por Ahp1 em condição respiratória com alta atividade peroxissomal, foram realizados experimentos utilizando as linhagens $\Delta ctt1$ (deficiente em catalase citosólica) e $\Delta cta1/\Delta ctt1$ (que não possui as catalases citosólica ou peroxissomal), em meio contendo oleato como fonte de carbono e sob tratamento com diferentes hidroperóxidos. Foi observada uma pequena indução da expressão de *AHP1* em células $\Delta ctt1$ sob tratamento com peróxido de hidrogênio. No entanto, maiores efeitos foram observados nas linhagens $\Delta cta1$ e $\Delta cta1/\Delta ctt1$ sob tratamento de peróxido de hidrogênio e hidroperóxido de *tert*-butila, sendo o efeito da dupla mutação similar ao efeito da mutação simples $\Delta cta1$ (figura 9). Esses resultados estabelecem, portanto, uma relação entre a presença da catalase A (peroxissomal) e a expressão de *AHP1* em metabolismo respiratório, sugerindo um vínculo entre Ahp1 e os processos oxidativos do peroxisomo e mitocôndria de leveduras (Genu, 2007).

Figura 9: Expressão de *AHP1* em células selvagens, $\Delta cta1$, $\Delta ctt1$, $\Delta cta1/ctt1$, em meio de cultura contendo oleato como fonte de carbono. Células das linhagens WT (YPH250) das derivadas $\Delta cta1$, $\Delta ctt1$, $\Delta cta1/ctt1$ foram crescidas em meios contendo 2% de glicose até OD₆₀₀ = 0,8 e depois transferidas para meio contendo 0,1% oleato por 6 horas. As amostras de RNA foram hibridadas com sonda específica para o gene *AHP1*. Todos os tratamentos foram de 30 minutos e estão explicitados na figura. Amostras de rRNA em gel de agarose/formaldeído antes da transferência são apresentados como controle de carregamento (Genu, 2007).

Experimentos de *Northern blot* demonstraram que também ocorre maior indução da expressão de *PRX1* e *TSA2* na linhagem $\Delta cta1$ crescida em oleato, se comparada com a linhagem selvagem, assim como ocorreu com *AHP1* (Genu 2007). No entanto, os níveis de expressão de *TSA1* se mantiveram inalterados. Esses resultados indicam

que as enzimas Prx1 e Tsa2 podem também estar envolvidas na compensação à ausência de Cta1 em situação de alta atividade peroxissomal, sugerindo um complexo sistema antioxidante compensatório.

Por outro lado, linhagens $\Delta tsa2$ e $\Delta prx1$ crescidas em meio de cultura contendo oleato como fonte de carbono apresentaram uma indução considerável de *AHP1*, se comparadas com a linhagem selvagem correspondente, tanto sob tratamento com peróxidos (peróxido de hidrogênio e hidroperóxido de *tert*-butila) quanto em condições basais (figura 10 B). Células da linhagem $\Delta tsa1$ apresentaram uma maior indução da expressão de *AHP1* somente sob tratamento com peróxidos. Em células crescidas em meio contendo glicose como fonte de carbono, os níveis de expressão de *AHP1* são equivalentes nas linhagens selvagem e mutantes (figura 10 A). Esses resultados sugerem que há uma compensação da ausência de Tsa2 e Prx1 por Ahp1, em situação de metabolismo respiratório e alta atividade peroxissomal (meio de cultura contendo oleato como fonte de carbono), o que também ocorre, com menor intensidade, na ausência de Tsa1 (Genu, 2007).

Figura 10: Expressão de *AHP1* em células selvagens, Δ *tsa1*, Δ *tsa2*, Δ *prx1*, em meio de cultura contendo glicose (A) ou oleato (B) como fonte de carbono. Células das linhagens WT (BY4741) e das derivadas Δ *tsa1*, Δ *tsa2*, Δ *prx1* foram crescidas em meios contendo 2% de glicose (A) ou 0,1% ácido oléico (B); as amostras de RNA foram hibridadas com sonda específica para o gene *AHP1*. Todos os tratamentos foram de 30 minutos. Amostras de rRNA em gel de agarose/formaldeído antes da transferência são apresentados como controle de carregamento (Genu, 2007).

Os resultados acima demonstram que há uma regulação positiva da expressão de *AHP1*, *PRX1* e *TSA2* em células Δ *cta1* crescidas em meio de cultura contendo oleato como fonte de carbono. Além disso, células Δ *prx1* e Δ *tsa2* apresentam uma maior expressão basal de *AHP1* quando crescidas em oleato, se comparadas com a linhagem selvagem correspondente, indicando uma compensação da ausência de Prx1 e de Tsa2 por Ahp1 (Genu, 2007).

O trabalho realizado por Genu (2007) demonstra que (1) a expressão de *AHP1* em metabolismo respiratório se correlaciona com processos oxidativos da mitocôndria e peroxissomos, (2) esse sistema de proteção antioxidante envolve Tsa2 e Prx1 e (3) em situação de metabolismo respiratório, sob estresse oxidativo, há a compensação da ausência de catalase A por Ahp1, Tsa2 e Prx1, além de outras possíveis proteínas.

O gene *TSA1* apresenta grande expressão na célula, mesmo em condições basais e em glicose, sendo Tsa1 uma proteína abundante no citosol (Park *et al.*, 2000). Já *TSA2* apresenta baixa expressão em condições basais, tanto em células crescidas em glicose quanto em glicerol, porém é altamente induzível, apresentando comportamento compensatório e complementar a Tsa1 (Munhoz e Netto, 2004). Tsa2 representa, portanto, uma defesa adicional contra oxidantes em situação de estresse, além de compensar a ausência de outras enzimas antioxidantes, como a Tsa1. Já a Prx1, enzima de localização mitocondrial, sofre repressão em altas concentrações de glicose, sendo desreprimida em baixas concentrações de glicose e induzida por peróxido (Monteiro *et al.*, 2002), sendo, portanto, uma peroxirredoxina regulável de atividade importante durante o metabolismo respiratório.

Recentemente, foram demonstradas a importância de peroxirredoxinas na resposta ao estresse oxidativo e a compensação das peroxirredoxinas por outras enzimas antioxidantes, através de estudos realizados com uma linhagem de levedura deficiente nas cinco peroxirredoxinas, que se mostrou viável (Wong *et al.*, 2004). Essa linhagem *prxΔ*, que foi construída pelo grupo do Dr. Dong-Yan Jin (Wong *et al.*, 2004) e utilizada no presente trabalho, apresenta hipersensibilidade a tratamentos com oxidantes, particularmente com hidroperóxido de *tert*-butila (tBHP). Também exibiu indução, mesmo em condições basais, de *CTT1* e *GPX2*, que codificam enzimas de defesa antioxidante presentes no citosol. Esses resultados indicam a cooperação e compensação entre peroxirredoxinas, catalases e glutatona peroxidases na defesa a peróxidos.

Os dados de expressão gênica citados acima demonstram a existência de um sistema de defesa antioxidante complexo. No presente trabalho, visamos esclarecer uma possível via alternativa de defesa antioxidante, na situação específica de grande atividade peroxissomal.

Objetivos

O objetivo principal desse projeto foi investigar o possível papel das peroxirredoxinas na defesa antioxidante do peroxissomo, uma vez que linhagens de levedura deficientes em catalase peroxissomal apresentam fenótipo similar à respectiva linhagem selvagem. Para isso, foram propostas as seguintes metas:

- Investigação da sensibilidade a peróxidos de linhagens deficientes em diferentes peroxirredoxinas, em condições de grande atividade peroxissomal (crescimento em oleato), com o intuito de verificar a importância de cada peroxirredoxina na defesa contra oxidantes produzidos nessa organela. Linhagens deficientes nas catalases peroxissomal (Cta1) e citossólica (Ctt1) também foram analisadas.
- Quantificação e comparação do estado redox das linhagens nocauteadas em diferentes genes.
- Construção de mutantes duplos para verificar a cooperação entre enzimas oxidantes.
- Análise de sensibilidade dos mutantes duplos a diferentes oxidantes.
- Quantificação e comparação do estado redox dos mutantes duplos.
- Estabelecimento da localização celular de Ahp1 em condições respiratórias e, mais especificamente, com alta atividade peroxissomal (meio de cultura contendo oleato como fonte de carbono).

Metodologia

Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

- BY4741 (WT): (MATa *his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) (Invitrogen)
- $\Delta ahp1$: (BY4741 YLR109W :: *kanMX4*) (Invitrogen)
- $\Delta ccp1$: (BY4741 YKR066C) :: *kanMX4*) (Invitrogen)
- $\Delta cta1$: (BY4741 YDR256C :: *kanMX4*) (Invitrogen)
- $\Delta ctt1$: (BY4741 YGR088W :: *kanMX4*) (Invitrogen)
- $\Delta tsa1$: (BY4741 YML028W :: *kanMX4*) (Invitrogen)
- $\Delta tsa2$: (BY4741 YDR453C :: *kanMX4*) (Invitrogen)
- $\Delta prx1$: (BY4741 YBL064C :: *kanMX4*) (Invitrogen)
- $\Delta dot5$: (BY4741 YIL010W :: *kanMX4*) (Invitrogen)
- *prxΔ*: quíntuplo mutante (YML028W :: *kan*; YDR453C :: *leu2*; YBL064C :: *ura3*; YLR109W :: *his3*; YIL010W :: *met15*) (desenvolvido por Wong *et al.*, 2004)
- $\delta\Delta$: (BY4741 $\Delta tsa1/tsa2/ahp1/dot5/prx1/gpx1/gpx2/gpx3$) (desenvolvido por Fomenko *et al.*, 2011)
- BY4742 (WT): (MATa *his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*) (Invitrogen)
- KL14 (MATa *his1, trp2, p^o*) (Dr. Alexander Tzagoloff, Columbia University)

Linhagem de *E. coli*

- RR1: (*gpt-proA*)⁶², *leuB6*, *thi-1*, *lacY1*, *hsdSB20*, *rpsL20* (*Strr*), *ara-14*, *galk2*, *xyl-5*, *mtl-1*, *supE44*, *mcrBB*. (Hanahan, 1983).

Meios de cultura

- YPD: 1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% glicose.
- YNB (meio mínimo): 0,67% YNB-AA (Yeast Nitrogen Base without aminoacids) (Difco); 0,12% drop-out (Ausubel *et al.*, 2003; aminoácidos específicos de seleção de cada linhagem; fonte de carbono: 2% glicose; 2% glicerol + 2% etanol; 0,1% ácido oléico (Sigma) + 0,1% TWEEN 40 (Sigma).
- Meio de esporulação (KAc): 1% acetato de potássio, 2% ágar.
- Meios sólidos: preparados com a adição de 2% de ágar. Em meios com glicerol/etanol ou oleato como fontes de carbono, é adicionado 0,1% de glicose.
- LA: 1% triptona; 1% NaCl; 0,5% extrato de levedura. Meios sólidos preparados com adição de 2% de ágar; 100µg/ml de ampicilina.
- LB: 1% triptona; 1% NaCl; 0,5% extrato de levedura. Meios sólidos preparados com adição de 2% de ágar

Soluções

- LR White: 10ml LR White, 0,09g Peróxido de benzoíla
- PBS 1X: 10mM fosfato de sódio, 0,9% NaCl
- PBS-T: 0,05% Tween 20 em PBS 1X.
- Solução de bloqueio (Western blot): 5% leite em pó (BioRad) em PBS-T.
- Solução de DNPH (A): DNPH 20mM, HCl 10%
- Solução de neutralização do ensaio de proteínas carboniladas (B): Tris 2M, glicerol 30%, β -mercaptoetanol 19%
- Tampão Borato 0,1M + 0,15M NaCl, pH 8,5: ácido bórico 0,1M; bórax 0,1M; NaCl 0,15M
- Tampão citrato 0,15M pH 5,5: ácido cítrico 0,15M; citrato de sódio 0,15M
- Tampão glicina/HCl 0,2M pH 2,8 com 0,15M NaCl: glicina 0,2M; NaCl 0,15M
- Tampão de digestão para preparação de esferoblastos: sorbitol 1,2M; NaPR 75mM; EDTA 1mM; β -mercapto etanol 1%; zimoliase 1mg/ml
- Tampão de amostra para *Western blot*: Tris-HCl (pH 6,8) 60mM; glicerol 25%; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1%.

Oligonucleotídeos

- CTA1-1: GGC GAATTC GCTGCAAGTTTGTGAAG (EcoRI)
- CTA1-2: GGC AAGCTT GAAGACACACTTATCTCA (HindIII)
- CTA1-3: GGC AGATCT TGCAAAAGCAAAGGGCC (BglII)
- CTA1-4: GGC AGATCT CAAATACAGCAGCGCGTT (BglII)
- HIS3-11: GGG ATTGCTCTCGGTCAAGCTT
- HIS3-12: GGA AGCTTGACCGAGAGCAATCC

Plasmídeo

- pUC18 (University of California)

Localização de Ahp1 por subfracionamento celular

Subfracionamento celular

Esse método para determinação da localização celular da Ahp1 foi realizado com o auxílio do Prof. Dr. Mário H. Barros do Departamento de Microbiologia, ICB-USP, segundo o método descrito em Petrova *et al.* (2004).

Células da linhagem selvagem de *Saccharomyces cerevisiae* foram inoculadas nos meios de cultura desejados e crescidas ao longo da noite em agitação contínua a 30°C até atingir a razão de 2×10^7 células/ml (fase *mid-log*). Foram então preparados os esferoblastos através do método de digestão das paredes celulares com tampão de digestão contendo a enzima zimoliase (Sigma) a 37°C, por 2 horas, sob agitação de aproximadamente 80rpm. Foi adicionado sorbitol (1,2M) e as células foram centrifugadas a 7000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, foi

novamente adicionado sorbitol 1,2M e as células foram novamente centrifugadas a 7000 rpm por 10 minutos. Foi adicionado tampão (0,6M sorbitol; 10mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA) e PMSF 100mM. As células foram homogeneizadas por Potter e centrifugadas a 3500 rpm por 5 minutos para a retirada de células não lisadas, núcleos e *debris* celulares (presentes no *pellet*). O sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente a 3500 rpm por 5 minutos e o *pellet* foi descartado. O sobrenadante foi então centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi então centrifugado 3 vezes a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante contendo a fração citossólica foi coletado, assim como o *pellet* contendo mitocôndrias e peroxissomos. A fração organelar foi ressuspensa com 200µl de tampão de lise com 1:100 PMSF.

SDS-Page e Western blot

A concentração proteica das amostras foi medida por Bradford (Bollag *et al.*, 1996) e as amostras foram diluídas de modo a terem concentração proteica equivalente. Foram então adicionados DTT 1M e tampão de amostra; as amostras foram fervidas a 95°C por 5 minutos antes de serem aplicadas no gel.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Page 10% (gel de 1mm de espessura), montados utilizando o sistema Mini Protean™ (Bio-Rad, cat. 165-8001). A eletroforese foi realizada por aproximadamente 90 minutos a 150 - 200V.

As amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (0,45µm, Bio-Rad, cat. 162-0115) por 80 minutos a 250mA, utilizando o sistema de transferência Mini Trans-Blot™ (Bio-Rad, cat. 170-3930). A transferência foi confirmada corando a membrana com Ponceau Red (Sigma), que foi subsequentemente retirado através de 2 lavagens com água. A membrana foi então lavada com PBS 1X e submersa em solução de bloqueio - leite em pó (BioRad) diluído a 5% em tampão PBS-Tween (PBS 1X com 0,1% Tween 20, Sigma) por pelo menos 1 hora.

A membrana foi lavada com PBS-Tween e incubada com o anticorpo primário (contra Ahp1) diluído na proporção 1:1000 em PBS-Tween, à temperatura ambiente, por 2 horas, em agitação.

A membrana foi lavada novamente com PBS-Tween e incubada com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina, Kirkegaard & Perry Laboratories) diluído na proporção 1:1000 em PBS-Tween à temperatura ambiente, por 1 hora, em agitação. O substrato de fosfatase alcalina do kit (BCIP/NBT, Kirkegaard & Perry Laboratories, cat. 55-11-50) foi utilizado para revelar a membrana. A membrana foi lavada rapidamente com PBS 1X e fotografada.

Localização de Ahp1 por microscopia eletrônica (imuno-ouro)

Cultivo de células

Foram feitos pré-inóculos em YPD das linhagens desejadas e deixados em agitação contínua (150 rpm) a 30°C até o dia seguinte. As células foram centrifugadas (5000 rpm, 8 minutos) e lavadas duas vezes com água milli-Q estéril para a remoção do meio de cultura, ressuspensas em 100ml do meio desejado (meio com oleato como fonte de carbono) e deixadas por aproximadamente 40 horas em agitação contínua a 30°C. As amostras foram centrifugadas (5000 rpm, 8 minutos) e lavadas com água milli-Q estéril para a remoção do meio de cultura.

Obtenção de esferoblastos

Os *pellets* obtidos acima foram ressuspensos em 5ml de tampão 40mM KPO₄ pH 6,5/ 500μM MgCl₂ com 0,5ml de formaldeído e incubados a 30°C por 1 hora. As células foram lavadas duas vezes no tampão anterior sem formaldeído e uma vez no mesmo tampão contendo sorbitol 1,2M. As células foram ressuspensas em 0,5ml do tampão com sorbitol e tratadas com 30μl de zimoliase (100T) 10 mg/ml por

aproximadamente 60 minutos para a obtenção de esferoblastos. As células foram então lavadas uma vez com o tampão com sorbitol e ressuspendidas em 0,5ml do mesmo.

Após a lavagem com tampão 40mM KPO₄ pH 6,5/ 500μM MgCl₂/ 1,2M sorbitol, as amostras foram centrifugadas e o pellet levado ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da USP, supervisionado pelo Prof. Dr. Alberto de Freitas Ribeiro, para a realização dos passos seguintes, padronizados neste laboratório.

Fixação

Os *pellets* foram cobertos com tampão - glutaraldeído 0,3% em tampão fosfato (Sorensen) 0,1M + paraformaldeído 4% - e incubados por 2 horas a 4°C. Foram feitas 5 lavagens de 20 minutos com tampão fosfato 0,1M a 4°C. Em seguida, foi feita a desidratação, à temperatura ambiente, que consiste em sucessivas incubações em diferentes concentrações de álcool etílico: álcool 70% por 10 minutos, álcool 95% por 15 minutos e duas vezes em álcool 100% por 10 minutos. Posteriormente, foi feita a embebição, também à temperatura ambiente, quando a amostra foi incubada em álcool 100% e LR White em iguais proporções por duas vezes de 10 minutos, seguida de incubação em LR White puro a 4°C até o dia seguinte. Foram então feitas três incubações sucessivas de 10 minutos em LR White recém preparado e foi realizada a emblocagem em cápsula de gelatina por 72 horas numa estufa de 58°C.

Corte

Grades de níquel específicas para microscopia eletrônica foram previamente preparadas com uma lavagem em freon 113 por 1 minuto, após a qual foram colocadas em papel de filtro dentro de uma placa de Petri. Foram feitos cortes de menos de 0,1mm do material, utilizando o ultramicrotomo Leica modelo Ultracut UCT. As seções foram coletadas nas grades de níquel (Guthrie e Fink, 1991).

Imunomarcção

As amostras foram lavadas com água bidestilada duas vezes por 5 minutos, à temperatura ambiente. Foram então lavadas por 5 minutos com uma solução de TBS, 1% BSA e 0,05% NaN_3 (pH 7,2). As amostras foram incubadas em uma diluição 1:30 de NGS (Normal Goat Serum) na solução de TBS, 1% BSA e 0,05% NaN_3 por 30 minutos, a 4°C. Posteriormente, as amostras foram incubadas na solução descrita acima, mas contendo o anticorpo primário (contra Ahp1) diluído e deixadas até o dia seguinte a 4°C.

As amostras foram lavadas 4 vezes com a solução TBS, 0,2% BSA, 0,05% NaN_3 , 0,1% Tween 20 (pH 7,2) e então incubadas por 30 minutos na solução TBS, 1% BSA, 0,05% NaN_3 (pH 8,2), à temperatura ambiente.

As amostras foram incubadas em solução TBS, 1% BSA, 0,05% NaN_3 (pH 8,2) contendo o anticorpo secundário (de cabra, anti-coelho, conjugado com ouro 15nm) em diluição 1:15, por 1 hora, à temperatura ambiente. Foram feitas quatro lavagens sucessivas de 5 minutos cada, com TBS, 0,2% BSA, 0,05% NaN_3 , 0,1% Tween 20 (pH 7,2), seguidas de duas lavagens com uma solução de TBS e 0,1% Tween 20.

As amostras foram então fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 10 minutos e posteriormente lavadas 3 vezes com água bidestilada.

Coloração com metais pesados

A contrastação foi realizada através da incubação das amostras em acetato de uranila 1% em solução aquosa por 10 minutos, seguida da incubação em citrato de chumbo também por 10 minutos.

Exame

A observação das amostras foi feita ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss, modelo EM900, com o auxílio do biólogo Waldir Caldeira.

Cultivo de células e tratamento com peróxido para ensaios bioquímicos

Foi feito um pré-inóculo em 7,5ml de YPD, deixado a 30°C, em agitação, até o dia seguinte. As células foram então lavadas e diluídas a $OD_{600} = 0,8$ em 50ml de meio contendo oleato como fonte de carbono e deixadas a 30°C, em agitação, até o dia seguinte para que ocorresse a adaptação ao novo meio.

O tratamento (adição de peróxido) foi realizado e a cultura deixada a 30°C, em agitação, por 30 minutos. O meio de cultura foi retirado por centrifugação, as células foram lavadas e ressuspensas com um volume de ácido orto-fosfórico 15mM, para minimizar a oxidação proteica após o tratamento.

A lise celular foi feita no homogeneizador Precellys 24. Às células ressuspensas em um volume de ácido orto-fosfórico foi adicionado um volume de beads de vidro em tubo plástico específico para o aparelho (kit VK05, cat. 03961-1-004). Foram realizados 3 ciclos de 10 segundos a 6500 rpm. As amostras foram centrifugadas (10 minutos, velocidade máxima) e o sobrenadante coletado.

A concentração proteica das amostras foi medida por Bradford (Bollag *et al.*, 1996) e as amostras foram diluídas de modo a terem concentração proteica equivalente.

Quantificação do estado redox por razão entre glutathiona reduzida e oxidada

Para a verificação da razão tiól/ dissulfeto (glutathiona reduzida/ oxidada) foi realizada detecção eletroquímica a 1400mV (eletrodo BDD, “boron doped diamond electrode,” Coulochem III detector; ESA Biosciences), utilizando o método HPLC com coluna C18 (Shisiedo).

Para esse ensaio, o cultivo, o tratamento com peróxido, a lise de células e a equalização das concentrações proteicas das amostras foram feitos de acordo com o protocolo para ensaios bioquímicos descrito acima.

Alíquotas de 30µl de cada amostra (72,5 µg de proteína) foram injetadas no aparelho, a um fluxo constante de 0,7ml/minuto da fase móvel (acetonitrila 6%, fosfato de sódio dihidrogênio monohidratado 25mM, 1-octanesulfonic acid sodium salt 1,4mM, ácido fosfórico para acertar o pH a 2,65).

Diferentes concentrações de glutathione reduzida e oxidada foram preparadas através de diluições com ácido fosfórico 15mM para serem utilizadas como padrões quantitativos. Com esses dados foram feitas curvas de calibração, a partir das quais foi possível quantificar a GSH e GSSG das amostras.

Deteção de proteínas carboniladas

O cultivo, o tratamento com peróxido, a lise de células e a equalização das concentrações proteicas das amostras foram feitos de acordo com o protocolo para ensaios bioquímicos descrito acima.

Ensaio de ligação de DNPH às proteínas carboniladas

A cada amostra, adicionou-se um volume de SDS 24% e dois volumes de solução de DNPH 20mM (solução A). As amostras foram então homogeneizadas por vórtex e deixadas no escuro, à temperatura ambiente, por 30 minutos.

Foram adicionados 3 volumes da solução de neutralização (solução B) e o tubo foi invertido até que a solução assumisse a cor laranja (pH 7 a 8).

Deteção das proteínas ligadas a DNP por Western Blot

O procedimento foi realizado como descrito por Bollag *et al.* (1996). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Page 14% (gel de 1mm de espessura), montados utilizando o sistema Mini Protean™ (Bio-Rad, cat. 165-8001). A eletroforese foi realizada por aproximadamente 90 minutos a 150 - 200V.

As amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (0,45µm, Bio-Rad, cat. 162-0115) por 80 minutos a 250mA, utilizando o sistema de transferência Mini Trans-Blot™ (Bio-Rad, cat. 170-3930). A transferência foi confirmada corando a membrana com Ponceau Red (Sigma), que foi subsequentemente retirado através de 2 lavagens com água. A membrana foi então lavada com PBS 1X e submersa em solução de bloqueio - leite em pó (BioRad) diluído a 5% em tampão PBS-Tween (PBS 1X com 0,1% Tween 20, Sigma) por pelo menos 1 hora.

A membrana foi lavada com PBS-Tween e incubada com o anticorpo primário (anti-DNP, Sigma) diluído na proporção 1:1000 em PBS-Tween, à temperatura ambiente, em agitação, até o dia seguinte.

A membrana foi lavada novamente com PBS-Tween e incubada com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina, Kirkegaard & Perry Laboratories) diluído na proporção 1:1000 em PBS-Tween à temperatura ambiente, por 1 hora, em agitação. O substrato de fosfatase alcalina do kit (BCIP/NBT, Kirkegaard & Perry Laboratories, cat. 55-11-50) foi utilizado para revelar a membrana. A membrana foi lavada rapidamente com PBS 1X e fotografada.

Ensaio de viabilidade por diluição seriada

O método, adaptado a partir de Munhoz e Netto (2004), foi usado para a comparação de sensibilidade das linhagens a diferentes tratamentos. O protocolo foi padronizado em nosso laboratório e modificado especificamente para a análise de crescimento em meio com oleato/etanol como fonte de carbono.

Foram feitos pré-inóculos das linhagens de levedura em 5ml de YPD e deixados a 30°C, em agitação contínua, até o dia seguinte. A absorbância (A_{600nm}) foi medida. As células foram lavadas com água milli-Q autoclavada e diluídas à $OD_{600} = 0,2$ em 7,5ml de meio de cultura. Foram deixadas a 30°C, em agitação contínua até o dia seguinte (aproximadamente 22 horas). O meio de cultura foi removido por centrifugação e lavagem com água milli-Q autoclavada. As células foram ressuspensas em água milli-Q autoclavada e a A_{600nm} foi medida. As amostras foram diluídas à $OD_{600} = 0,2$ em água milli-Q autoclavada. Foram feitas diluições seriadas (1/5, 1/25, 1/125, 1/325) e plaqueadas gotas de 5 µl de cada.

As placas de Petri com meios de cultura foram previamente preparadas com o tratamento desejado. Por exemplo, placas de Petri com volume conhecido de meio de cultura preparadas com a concentração desejada de peróxido espalhado sobre a placa. Esperou-se o peróxido secar antes de plaquear.

Construção de linhagens duplo-mutantes

Após diversas tentativas de obter linhagens duplo-mutantes utilizando técnicas de cruzamentos (método descrito resumidamente por Vizeacoumar *et al.*, 2004), a abordagem foi alterada. Foi utilizada a estratégia de deleção de gene baseada em PCR (Eberhardt e Hohmann, 1995), que constitui uma interrupção por passo simples. Todos os procedimentos de construção de linhagens duplo-mutantes foram realizados no laboratório do prof. Dr. Mário Henrique de Barros, no Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP.

O objetivo desse método foi criar linhagens duplo-mutantes através da interrupção do gene *CTA1* nas linhagens deficientes nas cinco peroxirredoxinas, resultando nas linhagens duplo-mutantes $\Delta ahp1/\Delta cta1$, $\Delta tsa1/\Delta cta1$, $\Delta tsa2/\Delta cta1$, $\Delta prx1/\Delta cta1$, $\Delta dot5/\Delta cta1$. Para a seleção das linhagens duplo-mutantes, foi utilizado o gene *HIS3* para marcação auxotrófica.

Os oligonucleotídeos CTA1-1 e CTA1-2 foram utilizados para amplificar o gene *CTA1* a partir de DNA nuclear de levedura, inserindo no produto sítios de restrição para as enzimas EcoRI e HindIII, respectivamente. O gene foi amplificado a partir de 500bp antes da metionina inicial até 100bp após o stop codon. A seguir, foi feita a purificação do produto de PCR por extração de DNA por fenol/clorofórmio, seguida do isolamento do gene *CTA1* por digestão com as enzimas de restrição EcoRI e HindIII. Concomitantemente, foi realizada a digestão do plasmídeo pUC18 pelas mesmas enzimas.

Os produtos de digestão foram aplicados em um gel de agarose 1%. As bandas desejadas foram cortadas do gel e o DNA contido nelas foi extraído por eletroiluição seguida de extração por fenol/clorofórmio.

Foi feita a ligação do gene *CTA1* amplificado ao plasmídeo pUC18. Concomitantemente, foi realizada a preparação de bactérias competentes pelo método de CaCl₂, seguida da transformação de *E. coli* RR1 com DNA exógeno (Sambrook *et al.*, 1989). Colônias de bactérias transformadas foram inoculadas em placas de seleção (LA) e posteriormente utilizadas na realização de ensaio de mini-preparação de DNA plasmidial (Birboim e Dolly, 1979). Alíquotas de DNA plasmidial (resultante da mini preparação) foram digeridos com as enzimas BamHI e HindIII, para a verificação da correta inserção do gene no plasmídeo. Duas colônias foram escolhidas e inoculadas em nova placa de Petri com meio de cultura LA para posterior realização de extração de DNA plasmidial de bactéria em média escala por método de lise com Triton.

O DNA plasmidial resultante do ensaio acima foi amplificado por técnica de PCR, utilizando os oligonucleotídeos CTA1-3 e CTA1-4, que contêm sítios de restrição da enzima BglII. Esse ensaio resultou em uma linearização do plasmídeo e na retirada de 1294bp do gene *CTA1*. O produto de PCR foi purificado por extração por fenol/clorofórmio e foi realizada uma digestão preparativa com a enzima de restrição BglII. O produto foi aplicado em um gel de agarose 1%. A banda desejada foi cortada do gel e o DNA foi extraído por eletroiluição seguida de extração por fenol/clorofórmio.

Foi realizada a ligação do plasmídeo contendo as regiões flanqueadoras do gene *CTA1* (obtido no ensaio acima) com o gene *HIS3* contendo sítios de restrição da enzima BamHI nas suas extremidades. A ligação entre sítios de restrição de BglII e

BamHI resulta na obliteração de ambos os sítios, resultando em uma ligação permanente, gerando o plasmídeo pUC18-CTA1-HIS3 (ver adiante figura 24). Bactérias *E. coli* RR1 foram transformadas com o plasmídeo contendo o gene *CTA1* interrompido pelo gene *HIS3* e plaqueadas em meio sólido LA para seleção.

Colônias resultantes foram utilizadas na realização de ensaio de mini preparação de DNA plasmidial. Alíquotas de DNA foram então digeridas com enzima de restrição HindIII para a seleção de colônias contendo plasmídeo com a inserção correta. Estas foram inoculadas em nova placa de Petri com meio de cultura LA para posterior realização de extração de DNA plasmidial de bactéria em média escala por método de lise com Triton.

O DNA plasmidial resultante da extração foi submetido a amplificação por PCR, sendo utilizados os oligonucleotídeos CTA1-1 e CTA1-2. O produto de PCR foi purificado por extração por fenol/clorofórmio e submetido à digestão com a enzima EcoRI. O produto foi aplicado em um gel de agarose e o DNA foi extraído por eletroiluição seguida de extração por fenol/clorofórmio.

Leveduras das linhagens $\Delta ahp1$, $\Delta tsa1$, $\Delta tsa2$, $\Delta prx1$, $\Delta dot5$ foram transformadas com o produto de PCR purificado, segundo o método descrito por Schiestl e Gietz (1989). As leveduras transformadas foram inoculadas em placas contendo meio de cultura seletivo (meio mínimo suplementado com os aminoácidos leucina, metionina e uracila).

Colônias isoladas foram selecionadas e transferidas para outra placa com meio seletivo e posteriormente transferidas para placa contendo meio sólido YPD, para crescimento de colônias isoladas.

Uma colônia de cada linhagem foi inoculada em meio YPD líquido para posterior realização de ensaio de mini preparação de DNA total. O DNA resultante foi amplificado em reações de PCR com o oligonucleotídeo CTA1-1 e oligonucleotídeos correspondentes ao gene *HIS3* (uma reação com o oligonucleotídeo HIS3-11 e outra com o HIS3-12). Foram utilizados dois oligonucleotídeos referentes ao gene *HIS3*, pois este poderia ter sido inserido em qualquer dos dois sentidos ao interromper o gene *CTA1*.

Alíquotas dos produtos de PCR foram digeridas com a enzima BstXI e posteriormente com a enzima BstBI para a confirmação da presença do gene *CTA1* interrompido por *HIS3* nas linhagens utilizadas.

As linhagens resultantes foram inoculadas em YPD e adicionadas ao estoque.

Análise de expressão gênica de *TSA2*

Preparação de RNA de levedura por extração com fenol ácido quente

(Ausubel et al., 2003)

Foram feitos pré-inóculos das linhagens utilizadas em meio de cultura YPD e deixados em agitação a 30°C até o dia seguinte. As células foram então inoculadas em meio contendo oleato como fonte de carbono e deixadas crescer nas mesmas condições até a fase exponencial tardia ($OD_{600} = 1,0$). Foram então realizados os tratamentos com peróxido, por 30 minutos, nas mesmas condições de cultivo. As culturas foram centrifugadas para a remoção do meio e ressuspensas em água gelada. Foram então centrifugadas novamente; a seguir foi realizada a remoção do sobrenadante. Os *pellets* foram imediatamente congelados e guardados em freezer a -70°C.

As células foram descongeladas em gelo. Foi adicionado TES (Tris-HCl 10mM, EDTA 10mM, SDS 0,5%) e o mesmo volume de fenol ácido (aquecido a aproximadamente 37°C) e as células foram ressuspensas no agitador orbital (vortex) por 10 segundos. Foram então incubadas por 30 a 60 minutos a 65°C, com agitação ocasional; em seguida foram colocadas no gelo por 5 minutos e centrifugadas em velocidade máxima por 5 minutos a 4°C.

A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo, foi adicionado fenol ácido (400µl) e misturado no agitador orbital. As amostras foram novamente colocadas no gelo por 5 minutos e centrifugadas em velocidade máxima por 5 minutos a 4°C. O processo foi repetido, com a adição de clorofórmio.

A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde foi adicionado 40µl de acetato de sódio 3M, pH 5,3 e 1ml de etanol absoluto gelado para que ocorresse a precipitação do RNA.

As amostras foram então centrifugadas por 20 minutos em velocidade máxima, a 4°C. Os *pellets* de RNA foram então lavados com etanol 70% gelado e centrifugados por 5 minutos, nas mesmas condições. Os *pellets* foram ressuspensos em 50 µl água milli-Q estéril e a concentração de RNA foi determinada espectrofotometricamente (Nanodrop) através de medidas a A_{260} .

Gel de separação das amostras

Em gel de agarose 1,5% com formaldeído, foram aplicados 10µg de RNA de cada amostra. Foi realizada a eletroforese por 1h30 a 100V. O gel foi observado no transiluminador e fotografado para a confirmação da equivalência quantitativa das amostras. O gel é então lavado com água 3 vezes por 7 minutos cada, em agitação, e em seguida incubado com SSC 10X por 45 minutos.

Northern blot

As amostras de RNA, com concentrações equivalentes, foram transferidas para membrana de nylon (Hybond-N, Amersham) por capilaridade, com solução SSC (NaCl 3M, citrato de sódio 0,3M). A membrana foi então seca por 2 horas a 80°C. A pré-hibridação foi realizada em forno Hybridiser HB-2D (Techne) a 40°C por 6 horas, com solução de hibridação 5X SSPE (20X: NaCl 3,6M, fosfato de sódio 0,2M, EDTA 0,02M), solução Denhardt's 5X (100X: BSA 2%, Ficoll 2%, PVP 2%), SDS 0,5%, formamida 50% e excesso de DNA de salmão denaturado.

A hibridação com fragmentos marcados previamente desenvolvidos em nosso laboratório (Munhoz e Netto, 2004) foi realizada através da adição das sondas previamente denaturadas à membrana, que foi então incubada a 40°C por pelo menos

12 horas. A membrana foi então lavada com soluções contendo SDS e SSPE em concentrações decrescentes e exposta a filme de raio X.

Para a verificação de que as quantidades de RNA das diferentes amostras foram equivalentes, foram comparadas as intensidades das bandas de RNA ribossomal coradas com brometo de etídeo.

Resultados

Localização celular de Ahp1

Subfracionamento celular

Para a localização da Ahp1, foi realizada a metodologia de subfracionamento celular, que resultou na obtenção de três frações: a primeira contendo debris celular e núcleo, a segunda contendo citossol e a terceira, organelar, contendo mitocôndria e peroxissomo. O *Western blot* realizado com as frações citossólica e organelar indicou a presença de Ahp1 no citossol em condições respiratórias e apresentou fracas bandas da proteína na fração organelar da linhagem selvagem (figura 11).

Figura 11: Western blot utilizando anticorpo polyclonal para Ahp1. A linhagem selvagem (WT) foi crescida em meio contendo oleato (O) ou glicerol/etanol (G/E) como fonte de carbono. A linhagem $\Delta ahp1$ (controle negativo) foi crescida em meio contendo oleato (O) como fonte de carbono.

A Ahp1 parece estar presente tanto na fração citossólica quanto na organelar, porém parece ser mais abundante no citossol. A presença organelar dessa proteína foi sugerida anteriormente em células crescidas em condições respiratórias ou sob

proliferação peroxissomal (Lee et al. 1999b). Infelizmente, o nosso anticorpo gradualmente perdeu a especificidade, impossibilitando a repetição do ensaio e a análise de frações separadas de mitocôndria e peroxissomo, bem como o uso de marcadores para as diferentes frações como tinha sido planejado.

Através de estudos de microscopia de fluorescência, foi sugerido que Ahp1 em fusão com GFP em células crescidas em oleato se localiza em mitocôndrias (Farcanasu et al., 1999). Ahp1 também poderia apresentar localização peroxissomal já que mitocôndrias e peroxissomos estão intimamente associados (Thoms et al., 2009). Porém, a deleção da sequência C-terminal da molécula, referente ao PTS1, não alterou os resultados obtidos, sugerindo que os dados de microscopia correspondiam a uma localização mitocondrial. Não compreendemos as razões pelas quais os resultados descritos por Farcanasu et al (1999) terem sido pouco citados.

Por outro lado, como mencionado na introdução, existem evidências da localização peroxissomal de Ahp1. A extremidade C-terminal da sequência de aminoácidos da proteína Ahp1 contém o motivo AHL, semelhante ao sinal de importação peroxissomal PTS1, caracterizado como (S/A/C)-(K/H/R)-(L/M) (Rucktäschel et al., 2011) e a proteína apresenta localização peroxissomal em estudos *in silico* (PeroxisomeDB: Schluter et al., 2010). Além disso, Ahp1 apresenta semelhança na sequência de amino ácidos com proteínas reconhecidamente peroxissomais, como a PMP20 de *Candida bonidinii* ou PrxV humana (Wood et al., 2003).

O resultado do experimento descrito na figura 11 parece indicar que a Ahp1 está presente tanto no citossol como encapsulada em organelas. Levando em consideração as evidências de localização peroxissomal encontradas na literatura e a maior eficiência de Ahp1 na redução de peróxidos orgânicos e de lipídeos, se comparado com H₂O₂ (Genu, 2007), é possível adicionar o resultado desse experimento às evidências de localização peroxissomal (concomitante à citosólica) da proteína Ahp1. Seria importante repetir esse experimento realizando análises com proteínas com localização bem estabelecida como actina (citossol) e Pex11 ou Pot1 (peroxissomo). Outra possibilidade é a possível presença de Ahp1 nas proximidades do peroxissomo, porém ainda no citossol, onde poderia atuar na defesa contra oxidantes que

atravessam a membrana peroxissomal ou contra moléculas oxidadas, como, por exemplo, oxidação de lipídeos da membrana peroxissomal. No entanto, apesar de ser uma possibilidade, não há evidências concretas de que isso ocorra.

Microscopia eletrônica: imuno-ouro

Outra abordagem que tentamos para estudar a localização de Ahp1 em condições de proliferação peroxissomal, foi a comparação da localização de Ahp1 nas linhagens $\Delta ahp1$, selvagem (WT) e $\Delta cta1$, utilizando a técnica de marcação por anticorpo secundário acoplado a uma partícula de ouro e visualização por microscopia eletrônica. O anticorpo primário contra Ahp1 foi usado numa diluição de 1:500 e 1:1000, tendo sido selecionadas imagens correspondentes à diluição de 1:500. Os pontos pretos indicam a presença de Ahp1 (figura 12).

Figura 12: Microscopia eletrônica de células das linhagens $\Delta ahp1$ (A), selvagem (B) e $\Delta cta1$ (C) crescidas em meio contendo oleato como fonte de carbono. Os pontos pretos indicados por setas mostram a marcação por ouro da enzima Ahp1. Os asteriscos (*) indicam as setas apontando possíveis localizações peroxissomais. A letra N indica o núcleo da célula, onde visível. Foi utilizada uma diluição de 1:500 do anticorpo policlonal contra Ahp1 desenvolvido em nosso laboratório.

A linhagem $\Delta ahp1$ (figura 12 A) foi utilizada como controle negativo e apresentou pouca marcação por ouro. A linhagem selvagem (figura 12 B) apresentou algumas marcações, principalmente no citossol e em uma estrutura que parece ser o

peroxissomo. A linhagem $\Delta cta1$ (figura 12 C) apresentou aproximadamente 2 a 3 vezes mais marcação por ouro do que a linhagem selvagem. Parte das partículas de ouro se encontra encapsulada nas estruturas que parecem ser peroxissomos, além de marcações no núcleo. O aumento da marcação por ouro na linhagem $\Delta cta1$, quando comparada à linhagem selvagem sugere um efeito compensatório de Ahp1 na falta de Cta1, o que está de acordo com os resultados de expressão gênica obtidos por Genu (2007).

Para confirmar esses resultados, aumentamos a concentração do anticorpo primário anti-Ahp1 para 1:200, o que acarretou em marcações inespecíficas e inconclusivas. Com a intenção de evitar a inespecificidade observada, purificamos o anticorpo, isolando IgG através da técnica de cromatografia de afinidade com proteína A sefarose, realizada pela Dra. Marilene Demasi em seu laboratório, no Instituto Butantan. Após a purificação, o ensaio foi repetido utilizando-se uma diluição de 1:50 do anticorpo purificado.

Com a utilização do anticorpo purificado, houve uma repetição do resultado de aumento da marcação de Ahp1 nas células $\Delta cta1$, se comparadas com células selvagens (figura 13 B e C). Também houve ausência de marcação inespecífica nas células da linhagem $\Delta ahp1$ (figura 13 A). Por outro lado, a ocorrência de poucas marcações apesar do anticorpo primário estar bem concentrado, além de consistentes marcações no núcleo da célula, sugeriram marcações inespecíficas, de acordo com discussões científicas com o Prof. Dr. Alberto de Freitas Ribeiro (Departamento de Genética e Biologia Evolutiva – IB-USP).

Figura 13: Microscopia eletrônica de células das linhagens $\Delta ahp1$ (A), selvagem (B) e $\Delta cta1$ (C) crescidas em meio contendo oleato como fonte de carbono. Os pontos pretos indicados por setas mostram a marcação por ouro da enzima Ahp1, a letra N indica o núcleo da célula. Foi utilizada uma diluição de 1:50 do anticorpo contra Ahp1, purificado.

É possível, portanto, considerar os resultados indicativos do aumento da quantidade de moléculas de Ahp1 em células deficientes em Cta1, se comparada com a selvagem, sugerindo uma compensação da ausência da catalase A pela Ahp1, como

proposto anteriormente. No entanto, os resultados de localização celular da Ahp1 não podem ser considerados conclusivos. A técnica de marcação proteica por imuno-ouro não parece funcionar adequadamente com o anticorpo utilizado. Alternativamente, é possível que o anticorpo tenha apresentado perda de especificidade durante o decorrer da pesquisa.

O fenótipo das deleções: viabilidade de diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Ensaio de viabilidade por diluição seriada

Com o intuito de caracterizar a resposta de leveduras a estresse em condições de proliferação peroxissomal, inicialmente, foi comparada a viabilidade das linhagens selvagem (WT) e $\Delta ahp1$ em diferentes fontes de carbono: glicose (condição fermentativa), glicerol (condição respiratória) ou oleato (condição respiratória com elevada atividade peroxissomal).

Diferentemente do observado anteriormente (Munhoz e Netto, 2004), ambas as linhagens exibiram grande sensibilidade a hidroperóxido de *tert*-butila (*t*BHP) quando crescidas em meio contendo glicerol como fonte de carbono do que quando crescidas em glicose ou oleato. Alterações em detalhes do protocolo experimental como densidade celular e tempo de exposição a peróxidos poderiam explicar essa diferença. No presente trabalho, em meio com glicerol contendo 0,25mM de *t*BHP, não houve crescimento (figura 14). Portanto, para efeito de comparação, a concentração de *t*BHP foi reduzida a 0,1mM exclusivamente nas placas contendo essa fonte de carbono (figura 15, abaixo).

Figura 14: Ensaio de viabilidade por diluição seriada comparando a tolerância das linhagens BY4741 (WT) e $\Delta ahp1$ a diferentes concentrações de tBHP em meio de cultura contendo glicerol como fonte de carbono.

Comparando a tolerância das linhagens selvagem (BY4741) e $\Delta ahp1$ ao estresse oxidativo induzido por tBHP, foi verificado que a linhagem mutante é significativamente mais sensível a esse hidropéroxido orgânico do que a selvagem em todos os meios de cultura testados (figura 15), confirmando resultados encontrados na literatura (Park *et al.*, 2000). No entanto, verificou-se uma maior sensibilidade da linhagem $\Delta ahp1$ à hidropéroxido de *terc*-butila em condições respiratórias (figura 15 A e B).

Figura 15: Ensaio de viabilidade por diluição seriada comparando a tolerância de linhagens de levedura a hidroperóxido de *terc*-butila em meios com diferentes fontes de carbono (glicose, glicerol ou oleato), na presença ou ausência de ATZ. ATZ: 5mM; tBHP em glicerol: 0,1mM; tBHP em glicose e oleato: 0,25mM.

Como tínhamos observado anteriormente efeito compensatório de Ahp1 na ausência de catalase, decidimos empregar ATZ (3-amino 1,2,4-triazol), composto que inibe a atividade das catalases. No entanto, de forma surpreendente, ao adicionar ATZ ao meio de cultura, foi verificado um aumento da resistência da linhagem $\Delta ahp1$ a tBHP em meio de cultura com oleato (figura 15 C). Uma possível explicação para esse resultado seria a indução de sistemas antioxidantes alternativos que compensariam à ausência de catalase e Ahp1 em condição de grande atividade peroxissomal, o que é corroborada por resultados anteriores do nosso grupo, que demonstraram um aumento de expressão de Tsa2, Prx1 e Ahp1 em células $\Delta cta1$ crescidas em oleato (Genu, 2007).

O mecanismo de regulação da expressão gênica do proposto sistema antioxidante alternativo é desconhecida, mas aparenta ser dependente da atividade peroxissomal. Isso porque o efeito protetor de ATZ a $\Delta ahp1$ em estresse induzido por tBHP foi somente observado em células crescidas em meio de cultura contendo oleato,

e não em glicose ou em glicerol. Portanto, é possível supor que esse sistema atue na compensação à ausência de catalase A, somente em condições de alta atividade peroxissomal. A compensação à ausência de catalase peroxissomal aparenta ser mais intensa quando há a ausência concomitante de Ahp1, o que sugere a possível influência deste fator na modulação da via antioxidante alternativa.

Ao comparar a viabilidade das linhagens de leveduras deficientes em diferentes catalases e peroxirredoxinas, verificou-se uma maior sensibilidade a *t*BHP das linhagens $\Delta ahp1$, $\Delta tsa1$ e $prx\Delta$ (figura 16). Isso sugere que, das enzimas abaixo, a Ahp1 e a Tsa1 estão envolvidas na defesa celular ao peróxido orgânico em questão. Essas análises de fenótipos têm que ser interpretadas com cautela, considerando que efeitos compensatórios de outros genes podem mascarar o efeito da deleção do gene em questão.

Figura 16: Ensaio de viabilidade comparando a tolerância de linhagens de levedura a *t*BHP em meio contendo oleato como fonte de carbono. A linhagem $prx\Delta$ refere-se ao quádruplo mutante, deficiente nas cinco peroxirredoxinas.

O resultado acima se correlaciona com a abundância das respectivas peroxirredoxinas. Por outro lado, tanto Tsa1 como a Ahp1 já haviam sido implicadas na defesa de leveduras a peróxidos orgânicos. A Tsa1 é uma enzima antioxidante abundante no citossol e um componente importante na defesa contra estresse oxidativo devido a peróxidos orgânicos (Munhoz e Netto, 2004). A linhagem $\Delta ahp1$ já havia sido caracterizada como sensível ao estresse devido a hidroperóxidos orgânicos e especificamente a *t*BHP em condições fermentativas (Jeong et al., 1999; Lee et al., 1999b; Park et al., 2000). Além de $\Delta ahp1$ e $\Delta tsa1$, a linhagem $prx\Delta$ (que é deficiente nas cinco peroxirredoxinas), também apresentou alta sensibilidade a *t*BHP (Wong et al., 2004).

Ao comparar a sensibilidade a peróxido de hidrogênio das diferentes linhagens, agora incluindo a linhagem deficiente na peroxirredoxina nuclear Dot5, verificamos que a linhagem $prx\Delta$ (quíntuplo-mutante para as cinco peroxirredoxinas) é a menos tolerante ao estresse oxidativo (figura 17). No entanto, não houve diferença significativa entre as outras linhagens testadas sob tratamento com peróxido de hidrogênio a 0,25mM (figura 17 B).

Figura 17: Ensaio de viabilidade comparando a tolerância de linhagens de levedura a peróxido de hidrogênio em meio contendo oleato como fonte de carbono. A linhagem *prxΔ* refere-se ao quádruplo mutante, deficiente nas cinco peroxirredoxinas.

O tratamento das mesmas linhagens com o dobro da concentração de peróxido de hidrogênio (0,5mM) demonstrou que, além da *prxΔ*, a linhagem *Δtsa1* apresenta uma leve sensibilidade ao estresse oxidativo (figura 17 C), o que era esperado, já que a Tsa1 é a peroxidase mais abundante e ubíqua em leveduras (Ghaemmaghami *et al.* 2003; Park *et al.*, 2000) e conhecidamente sensível ao estresse induzido por peróxido de hidrogênio (Munhoz e Netto, 2004). A linhagem *Δtsa2* aparentemente não teve sua

viabilidade alterada, se comparada com as outras linhagens, o que corrobora os dados descritos por Munhoz e Netto (2004) e Ogusucu *et al.* (2009).

As linhagens apresentam, em geral, maior sensibilidade a hidroperóxido de *terc*-butila, se comparado com peróxido de hidrogênio. A maior eficiência na defesa a este insulto nas diferentes linhagens sugere um maior repertório de vias antioxidantes, o que é apoiado pela existência de enzimas específicas para a redução do peróxido de hidrogênio, como as catalases e citocromo c peroxidase (Munhoz e Netto, 2004).

Peróxidos, tanto de hidrogênio quanto tBHP, podem se difundir passivamente pela célula através de membranas organelares (Halliwell e Gutteridge, 2008). Portanto, a ação antioxidante de enzimas com localização subcelular distinta da fonte de geração do oxidante deve ser considerada. Em princípio, portanto, peróxidos produzidos no peroxissomo, por exemplo, podem ser decompostos no citoplasma por Tsa1, uma proteína ativa e abundante (Ogusucu *et al.*, 2007). Portanto, a viabilidade celular na ausência de catalase A (linhagem $\Delta cta1$) em situação de alta atividade peroxissomal (meio de cultura contendo oleato como fonte de carbono) e sob estresse oxidativo devido a peróxido de hidrogênio pode ter sido semelhante à selvagem devido à ação compensatória de enzimas antioxidantes citosólicas, como a Tsa1 ou a catalase citosólica Ctt1.

Na presença de 5mM de ATZ (figura 18, abaixo), que inibe a atividade das catalases, nenhuma das linhagens mutantes simples apresenta um fenótipo claro de aumento de sensibilidade. As linhagens *prxΔ* (deficiente nas cinco peroxirredoxinas) e $\Delta 8$ (deficiente nas cinco peroxirredoxinas e três glutationala peroxidases) apresentaram uma pequena diminuição de sua viabilidade na presença de ATZ, se comparadas à situação controle, indicando que, na ausência dessas enzimas, as catalases apresentam uma maior importância na defesa antioxidante celular. De qualquer forma, é interessante observar que leveduras ainda são viáveis na ausência de cinco Prxs (Tsa1, Tsa2, Ahp1, Prx1 e Dot5), três Gpxs e duas catalases e citocromo c peroxidase, estas últimas heme-peroxidases que devem ser inibidas por ATZ. Dessa forma, esses resultados sugerem outras vias relevantes para a decomposição de peróxido de hidrogênio gerado endogenamente.

É possível observar novamente um ligeiro aumento de viabilidade da linhagem $\Delta ahp1$ a hidroperóxido de *terc*-butila na ausência de atividade das catalases (figura 18).

Figura 18: Ensaio de viabilidade: tolerância de linhagens de levedura a hidroperóxido de *terc*-butila 0,25mM e na presença de ATZ 5mM, em meio contendo oleato como fonte de carbono.

No entanto, a linhagem $\Delta ahp1$ apresentou maior resistência a hidroperóxido de *terc*-butila, se comparado aos ensaios anteriores (figuras 15 e 16), indicando uma aquisição de resistência da linhagem. Isso pode ter ocorrido devido ao grande número de passagens realizadas, o que levou à incorporação de um mecanismo de compensação à ausência de Ahp1.

A linhagem $\Delta 8$ é notavelmente mais sensível a estresse oxidativo por hidroperóxido de *terc*-butila, mesmo comparando-a com a linhagem $prx\Delta$, demonstrando a importância das glutatona peroxidases no amplo repertório de defesas ao hidroperóxido orgânico (figura 18, acima e figura 19, abaixo).

Figura 19: Ensaio de viabilidade: tolerância de linhagens selvagem e $\Delta 8$ de levedura a hidroperóxido de *terc*-butila 0,1mM, em meio de cultura contendo oleato como fonte de carbono.

O fenótipo das deleções: comparação do estado redox de diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Quantificação de estado redox por razão entre glutathiona reduzida e oxidada

O estado redox da célula constitui um equilíbrio dinâmico entre moléculas oxidadas e reduzidas. Por ocorrer em altas concentrações, a glutathiona é considerada um fator importante para o estabelecimento do estado redox da célula (Halliwell e Gutteridge, 2008). A razão entre glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) é considerada um confiável indicador de estresse oxidativo, já que a glutathiona - um tripeptídeo ubíquo e abundante - age direta ou indiretamente na proteção contra agentes oxidantes, sofrendo oxidação no processo (Asensi *et al.*, 1999).

Foram realizados experimentos comparando a razão GSH/GSSG das linhagens selvagem (WT), $\Delta cta1$, $\Delta ctt1$ e $prx\Delta$, com e sem tratamento de peróxido de hidrogênio 2mM por 30 minutos.

A. WT

B. WT + H₂O₂

C. $\Delta cta1$

D. $\Delta cta1 + H_2O_2$

E. *prxΔ*

F. *prxΔ* + H_2O_2

Figura 20: Cromatogramas representativos da análise de tióis e dissulfetos por detecção eletroquímica. As setas verdes indicam os picos referentes à glutathiona reduzida (GSH) e as setas rosas indicam os picos referentes à glutathiona oxidada (GSSG). As linhagens foram crescidas em meio de cultura contendo oleato como fonte de carbono e tratadas com peróxido de hidrogênio 2mM por 30 minutos. (A) Linhagem selvagem (WT), sem tratamento; (B) linhagem selvagem, com tratamento de H_2O_2 2mM por 30 minutos; (C) linhagem $\Delta cta1$, sem tratamento; (D) linhagem $\Delta cta1$, com tratamento de H_2O_2 2mM por 30 minutos; (E) linhagem *prxΔ*, sem tratamento; (F) linhagem *prxΔ*, com tratamento de H_2O_2 2mM por 30 minutos.

Tabela 1: Concentrações de GSH e GSSG medidas por detecção eletroquímica e razão tiól/dissulfeto de linhagens de levedura com e sem tratamento oxidante.

Linhagem	Controle			Tratamento com H ₂ O ₂ 2mM		
	GSH (μM)	GSSG (μM)	GSH/GSSG	GSH (μM)	GSSG (μM)	GSH/GSSG
WT	386,5	26,9	14,4	251,8	12,3	20,5
<i>Δcta1</i>	303,2	9,4	32,4	247,5	8,1	30,8
<i>Δctt1</i>	205,0	31,2	6,6	171,1	14,9	11,5
<i>prxΔ</i>	180,6	42,5	4,3	148,9	55,3	2,7

Figura 21: Gráfico referente aos valores da tabela 1, demonstrando concentrações de GSH e GSSG medidas por detecção eletroquímica e razão tiól/dissulfeto de linhagens de levedura com e sem tratamento oxidante. Resultados preliminares, derivados de um único experimento e que precisam repetidos.

Os resultados preliminares apresentados acima (tabela 1 e figura 21) sugerem que, na ausência de catalase A, o poder redutor intracelular é maior, podendo ser uma via compensatória de proteção antioxidante. Uma possibilidade seria indução de glutathiona redutase. A linhagem deficiente nas cinco peroxirredoxinas (*prxΔ*) parece ter

a menor proteção contra oxidantes, tendo, portanto, maior quantidade relativa de glutathiona oxidada.

O experimento não foi repetido, pois o aparelho utilizado apresentou problemas repetidamente e estava em fase de padronização em nosso laboratório. De qualquer forma, pretendemos expandir esses experimentos, pois parecem bastante promissores para caracterizar os fenótipos.

Ao repetir esse experimento, será necessário alterar a metodologia de normalização das amostras, quantificando a concentração de proteína total precipitada após a retirada do sobrenadante contendo glutathiona. Com esse procedimento, será possível comparar os níveis de glutathiona total (GSH + GSSG) das diferentes amostras, além de comparar a razão GSH/GSSG.

Deteção de proteínas carboniladas

A detecção de proteínas carboniladas é um índice global de estresse oxidativo celular. O princípio é baseado no fato do nível de grupos carbonilas ser aumentado quando proteínas de um extrato são oxidadas. A detecção de grupos carbonilas se dá após sua reação com DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina). Portanto, durante o tratamento, há a derivatização da carbonila pelo DNPH, resultando em proteínas marcadas com DNP. O DNP é então detectado através do anticorpo anti-DNP (Sigma), que pode ser revelado com fosfatase alcalina.

É importante comparar o resultado final à imagem da membrana corada com Ponceau Red, para certificar-se de que a coloração mais escura não se deve ao fato de ter sido aplicada maior quantidade de proteína total. Isso não era esperado, pois a mesma quantidade de proteína foi em princípio aplicada, como determinado pelo ensaio de Bradford. Problemas na transferência do gel a membrana também poderiam ocorrer e justificam a análise da membrana corada com Ponceau Red.

O resultado apresentado na figura 22 sugere que a linhagem deficiente nas cinco peroxirredonas (*prxΔ*) sofreu mais carbonilação, sob condição controle (crescimento em oleato), se comparada com as linhagens selvagem, *Δahp1* e *Δcta1*. A

linhagem deficiente em catalase A (*Δcta1*) parece ter sido a menos afetada pelo tratamento com peróxido de hidrogênio 1mM por 30 minutos.

Figura 22: Ensaio de detecção de proteínas carboniladas por Western blot com anticorpo anti-DNP. Amostras das linhagens selvagem, *Δahp1*, *Δcta1* e *prxΔ* crescidas em meio de cultura contendo oleato como fonte de carbono. Tratamento de peróxido de hidrogênio 1mM por 30 minutos, a 30°C, em agitação. Padrão de corrida: Full Range Rainbow (GE Healthcare).

A maior carbonilação proteica observada na linhagem *prxΔ* condiz com o esperado - já que essa linhagem é deficiente nas cinco peroxirredoxinas e, portanto, apresenta um sistema antioxidante bastante deficiente. Também corrobora os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade. A maior sensibilidade a oxidantes da linhagem *prxΔ*, apesar da presença de catalases e glutathione peroxidases, demonstra a importância de peroxirredoxinas para a defesa antioxidante.

A peroxirredoxina Ahp1 é mais eficiente na remoção de peróxidos orgânicos, mas também auxilia na defesa a peróxido de hidrogênio, sendo então esperado que a linhagem *Δahp1* apresente um pequeno aumento de carbonilação proteica, se comparada com a linhagem selvagem.

A linhagem *Δcta1* apresentou menor carbonilação proteica, o que está de acordo com a hipótese levantada anteriormente da existência de sistemas compensatórios nessa linhagem. Os resultados indicam a importância das peroxirredoxinas na defesa a

oxidantes - mais especificamente a peróxido de hidrogênio -, assim como na aparente compensação à ausência de catalase A, tornando o organismo mais resistente ao estresse oxidativo.

Construção de linhagens duplo-mutantes

Para compreender vias compensatórias, decidimos tentar obter duplos mutantes de catalase A com peroxirredoxinas. Diversas tentativas de obter linhagens duplo-mutantes utilizando técnicas de cruzamento não foram bem sucedidas devido a dificuldades de esporulação inerentes às linhagens utilizadas (Deutschbauer e Davis, 2005; Ben-Ari *et al.*, 2006). A metodologia foi então alterada, sendo utilizada a deleção de gene baseada em PCR, o que resultou na obtenção primeiramente das linhagens $\Delta ct a1/ahp1$, $\Delta ct a1/tsa1$, $\Delta ct a1/tsa2$ e $\Delta ct a1/dot5$. Após a mini-preparação de DNA total das linhagens construídas, o mesmo foi amplificado por PCR, utilizando primers apropriados, ou seja, um ancorado no gene *HIS3* e outro no gene *CTA1* (figura 23).

Figura 23: Amplificação de DNA por técnica de PCR, em gel de agarose 0,8% demonstra a inserção do gene CTA1 interrompido com HIS3 nas linhagens $\Delta ahp1$, $\Delta tsa1$, $\Delta tsa2$ e $\Delta dot5$. Os oligonucleotídeos utilizados foram CTA1-1 e HIS3-11 e CTA1-1 e HIS3-12. Padrão de corrida: 1Kb ladder (Biotools).

A amplificação ocorreu com os oligonucleotídeos HIS3-12 e CTA1-1, indicando que a inserção do gene *HIS3* no gene *CTA1* no DNA nuclear ocorreu da maneira equivalente à orientação de ilustrada na figura 24.

Figura 24: Mapeamento do plasmídeo (pUC18-CTA1-HIS3) resultante da clonagem do gene *CTA1*, seguido de interrupção pelo gene *HIS3*. O mapeamento foi realizado com o programa Clone Manager. Esse plasmídeo foi utilizado para interromper o gene *CTA1* no DNA genômico de levedura. As setas pretas indicam os oligonucleotídeos utilizados.

Para a confirmação da inserção correta do gene interrompido no genoma da levedura, o produto de PCR foi digerido com as enzimas *BstXI* (figura 25 A) e *BstBI* (figura 25 B).

Figura 25: Produtos de PCR de DNA das linhagens duplo-mutantes obtidas (mostrados na figura 23) digeridos com as enzimas BstXI (A) e BstBI (B), demonstrando a correta inserção do gene interrompido. Padrão de corrida: 1Kb ladder (Biotools).

Concomitantemente aos ensaios de digestão de DNA das linhagens $\Delta cta1/ahp1$, $\Delta cta1/tsa1$, $\Delta cta1/tsa2$ e $\Delta cta1/dot5$, ilustrados acima, foram selecionadas novas colônias das leveduras $\Delta prx1$ transformadas com o plasmídeo pUC18-CTA1-HIS3. Após a realização de mini-preparação de DNA total e subsequente amplificação do DNA por reação de PCR, foi confirmada a obtenção da linhagem $\Delta cta1/prx1$ (figura 26). Para a confirmação da inserção correta do gene interrompido no genoma da levedura, o produto de PCR também foi digerido com as enzimas BstXI e BstBI (figura 27).

Figura 26: Amplificação de DNA por técnica de PCR, em gel de agarose 1% demonstra a inserção do gene CTA1 interrompido com HIS3 nas colônias (B) e (C) da linhagem $\Delta prx1$. Os oligonucleotídeos utilizados foram CTA1-1 e HIS3-11 e CTA1-1 e HIS3-12. Padrão de corrida: 1Kb ladder (Biotools).

Figura 27: Produtos de PCR de DNA da linhagem duplo-mutante obtida (mostrados na figura 26) digeridos com as enzimas BstXI e BstBI, demonstrando a correta inserção do gene interrompido.

As linhagens construídas foram então utilizadas na verificação de compensação e cooperação entre a catalase A e cada uma das peroxirredoxinas de *Saccharomyces cerevisiae*, através de ensaios de viabilidade, análise de danos oxidativos por detecção de proteínas carboniladas e análise de expressão gênica como descrito anteriormente.

O fenótipo das deleções: comparação da viabilidade das linhagens duplo-mutantes

A comparação da viabilidade das linhagens duplo-mutantes, selvagem, *prxΔ* e $\Delta 8$ frente a diferentes concentrações de peróxido (figura 28) demonstrou novamente a forte sensibilidade da linhagem $\Delta 8$ a baixas concentrações de tratamento oxidante, tanto de peróxido de hidrogênio como de peróxido orgânico. A linhagem $\Delta 8$ demonstrou uma menor viabilidade mesmo em situação controle, constituída de crescimento em meio contendo oleato como fonte de carbono (situação de alta atividade peroxissomal e metabolismo respiratório) e crescimento a 30°C por 5 dias.

Segundo Wong *et al.* (2004), na ausência total de peroxirredoxinas, a expressão de outras proteínas antioxidantes foram induzidas. Mais especificamente, ao comparar a linhagem *prxΔ* à selvagem BY4741, verificou-se a indução da transcrição de *CTT1* (catalase citosólica T), *TRX1* (tiorredoxina 1) e *GPX2* (glutathiona peroxidase 2) em condições controle e *SOD1* (superóxido dismutase 1), *TRX2* (tiorredoxina 2) e *GLR1* (glutathiona oxido-redutase) sob tratamento com peróxido de hidrogênio, em meio de cultura contendo glicose como fonte de carbono. Esses resultados demonstram a compensação da ausência de peroxirredoxinas por outras classes de enzimas antioxidantes, incluindo glutathiona peroxidases. Era esperado, portanto, que a ausência concomitante das cinco peroxirredoxinas e três glutathiona peroxidases, como ocorre na linhagem $\Delta 8$, fosse deletéria em situações de estresse oxidativo.

A linhagem *prxΔ* apresentou menor viabilidade, se comparada com a linhagem selvagem, em níveis de 0,5mM de tBHP e 0,25mM de peróxido de hidrogênio (figura 28), indicando a importância de peroxirredoxinas na defesa contra ambos oxidantes e corroborando os dados da literatura (Wong *et al.*, 2004).

Figura 28: Ensaio de viabilidade: tolerância de linhagens de levedura a H₂O₂ (0,25mM) e a tBHP (0,1mM e 0,5mM), em meio de cultura contendo oleato como fonte de carbono.

Ao comparar as linhagens duplo-mutantes desenvolvidas, nota-se que a linhagem mais afetada por tratamento com hidroperóxido orgânico é a $\Delta cta1/tsa2$ (figura 28). A Tsa2 é altamente induzível e exhibe mecanismos de cooperação e compensação com a Tsa1 e catalases (Munhoz e Netto, 2004). Na ausência concomitante da catalase peroxissomal e Tsa2, há uma maior sensibilidade a peróxido, sugerindo que essa peroxirredoxina é importante para a manutenção da viabilidade celular observada na linhagem $\Delta cta1$ e, portanto, um forte candidato a componente compensatório de uma via antioxidante alternativa à catalase peroxissomal.

O fenótipo das deleções: carbonilação de proteínas das linhagens duplo-mutantes

Em células deficientes na catalase A foi observada uma manutenção das defesas oxidantes, mesmo no nível proteico. Para verificar a possível compensação à ausência de catalase A por uma peroxirredoxina, foi realizado o ensaio de detecção de proteínas carboniladas com as linhagens duplo-mutantes.

Figura 29: Ensaio de detecção de proteínas carboniladas por Western blot com anticorpo anti-DNP. Amostras das linhagens selvagem, *prxΔ*, *Δcta1/ahp1*, *Δcta1/tsa1*, *Δcta1/tsa2*, *Δcta1/prx1* e *Δcta1/dot5* crescidas em meio de cultura contendo oleato como fonte de carbono. Tratamento de hidroperóxido de *tert*-butila 2,5mM por 30 minutos, a 30°C, em agitação. Padrão de corrida: Full Range Rainbow (GE Healthcare).

A figura 29 indica menor carbonilação proteica da linhagem *Δcta1/ahp1* em condição controle (crescimento em meio contendo oleato como fonte de carbono), se comparada com as demais linhagens. A linhagem *Δcta1/dot5* também parece ter sofrido menos carbonilação proteica, porém a análise é dificultada pelo fato dessa amostra apresentar-se corada mais fracamente com o Ponceau Red.

A linhagem *Δcta1/dot5* também parece ter sido mais resistente à carbonilação proteica sob tratamento oxidante (*t*BHP 2,5mM por 30 minutos), indicando que a Dot5

não seria um componente importante à defesa antioxidante na ausência de Cta1. A linhagem $\Delta cta1/tsa2$ parece não ter sofrido uma maior carbonilação de proteínas sob tratamento com *t*BHP, o que não condiz com o resultado dos ensaios de viabilidade que indicaram a possível compensação da ausência de Cta1 por Tsa2. Por outro lado, em condições basais, o nível de carbonilação da linhagem $\Delta cta1/tsa2$ parece alto, sugerindo um efeito compensatório de Tsa2 na ausência de catalase. A análise desses efeitos compensatórios não é trivial, uma vez que as relações entre enzimas antioxidantes são múltiplas, mas nossos dados sugeriram que a expressão de *TSA2* é induzida em linhagem $\Delta cta1$.

Devido aos resultados de viabilidade que indicaram a importância de Tsa2 para a defesa antioxidante na ausência de catalase A, assim como a possível regulação positiva de uma via alternativa de defesa antioxidante na ausência concomitante de Cta1 e Ahp1, foram selecionadas as linhagens $\Delta cta1/tsa2$, $\Delta cta1/ahp1$, além das linhagens selvagem, $\Delta ahp1$, $\Delta cta1$ e $\Delta tsa2$ e $prx\Delta$ para análise de danos a proteínas sob diferentes tratamentos oxidantes.

Figura 30: Ensaio de detecção de proteínas carboniladas por Western blot com anticorpo anti-DNP. Amostras das linhagens selvagem, $\Delta ahp1$, $\Delta cta1$, $\Delta tsa2$, $\Delta cta1/ahp1$, $\Delta cta1/tsa2$, e $prx\Delta$ crescidas em meio de cultura contendo oleato como fonte de carbono. Tratamento de peróxido de hidrogênio 1mM por 30 minutos, a 30°C, em agitação. Padrão de corrida: Full Range Rainbow (GE Healthcare).

Observando as canaletas correspondentes à linhagem *prxΔ* (figura 30, acima), é possível novamente verificar a maior marcação de oxidação proteica, tanto em situação controle, quanto sob tratamento com peróxido de hidrogênio. Esse resultado indica mais uma vez que, apesar da presença de outras enzimas antioxidantes, como catalases e glutathione peroxidases, as peroxirredoxinas são de extrema importância na defesa da célula a peróxido de hidrogênio.

O tratamento com peróxido de hidrogênio não parece ter particularmente afetado a carbonilação de proteínas na linhagem selvagem, o que indica a existência de defesas antioxidantes eficientes contra esse insulto. Também não parece ter afetado as linhagens *Δahp1*, *Δcta1* e *Δtsa2*, indicando a existência de mecanismos de compensação à ausência dessas enzimas.

A linhagem *Δcta1/tsa2* demonstrou maior dano proteico em condições basais e sob tratamento oxidante, se comparada com as linhagens selvagem, *Δcta1* e *Δtsa2*. O resultado sugere, portanto, a existência de compensação entre as enzimas Cta1 e Tsa2 na defesa contra peróxido de hidrogênio. Anteriormente, foi mostrada a cooperação dessas enzimas em condições fermentativas e respiratórias (Munhoz e Netto, 2004). Agora, ampliamos esses achados para condições de alta atividade peroxissomal.

A linhagem *Δcta1/tsa2* também exibiu uma marcação mais forte do que a linhagem *Δcta1/ahp1*, demonstrando, portanto, ser mais sensível ao estresse oxidativo devido a peróxido de hidrogênio. A Ahp1 é descrita como mais eficaz na defesa a alqui-hidroperóxidos, portanto era esperado que não fosse essencial na defesa a peróxido de hidrogênio, mesmo na ausência de catalase, principalmente considerando a atividade de Tsa1 e Tsa2, presentes na linhagem *Δcta1/ahp1*.

Foi também verificado o efeito do estresse oxidativo devido a peróxido orgânico sobre a carbonilação proteica das mesmas linhagens utilizadas acima.

Figura 31: Ensaio de detecção de proteínas carboniladas por Western blot com anticorpo anti-DNP. Amostras das linhagens selvagem, $\Delta ahp1$, $\Delta cta1$, $\Delta tsa2$, $\Delta cta1/ahp1$, $\Delta cta1/tsa2$, e $prx\Delta$ crescidas em meio de cultura contendo oleato como fonte de carbono. Tratamento de hidroperóxido de *tert*-butila 2,5mM por 30 minutos, a 30°C, em agitação. Padrão de corrida: Full Range Rainbow (GE Healthcare).

Novamente foi possível perceber um maior efeito oxidante na linhagem $prx\Delta$ sob tratamento com *t*BHP, demonstrando a importância de peroxirredoxinas na defesa contra peróxidos orgânicos (figura 31).

A linhagem $\Delta ahp1$ apresenta um pequeno aumento de carbonilação proteica, se comparado com as linhagens selvagem, $\Delta cta1$, $\Delta tsa2$, demonstrando a maior sensibilidade da linhagem $\Delta ahp1$ ao insulto por hidroperóxidos orgânicos. O resultado corrobora dados da literatura (Lee *et al.*, 1999b) e de ensaios de viabilidade apresentados previamente (figuras 14, 15 e 16).

As linhagens $\Delta cta1$, $\Delta tsa2$ e $\Delta cta1/ahp1$ apresentaram padrão de carbonilação proteica muito similar à linhagem selvagem. É interessante notar que a linhagem $\Delta cta1/ahp1$ apresenta uma menor carbonilação proteica se comparada à linhagem $\Delta ahp1$, demonstrando uma recuperação do fenótipo selvagem. Esse resultado sugere a ativação de um mecanismo de defesa antioxidante a hidroperóxidos orgânicos na ausência de Cta1 e condiz com resultados de viabilidade apresentados anteriormente (figuras 15 e 18).

A linhagem $\Delta cta1/tsa2$ também exibiu uma maior carbonilação proteica resultante do tratamento, se comparada com as linhagens selvagem, $\Delta ahp1$, $\Delta cta1$, $\Delta tsa2$ e $\Delta cta1/ahp1$ (figura 31), sugerindo mais uma vez a importância da Tsa2 à resposta antioxidante na ausência de Cta1.

Catalases não agem na degradação de hidroperóxidos orgânicos. Na ausência de catalase A, parece ocorrer a ativação de um sistema de defesa antioxidante que seria eficiente na remoção tanto de peróxido de hidrogênio como de hidroperóxidos orgânicos. A defesa contra peróxido de hidrogênio é, portanto, suprida e ocorre um aumento da defesa contra hidroperóxidos orgânicos. A Tsa2 parece participar desse processo, já que a ausência concomitante de Cta1 e Tsa2 não apresenta esse fenótipo de resistência aumentada, como visto nos ensaios detecção de proteínas carboniladas (figura 31) e de viabilidade (figura 28).

Os ensaios para determinação de carbonilação de proteínas mostraram-se pouco quantitativos e de difícil interpretação. Por outro lado, análises da razão GSH /GSSG em diferentes linhagens sob estresse induzido por peróxidos, na presença e ausência de ATZ, parece ser uma abordagem mais promissora para análise de fenótipos de deleções.

Análise de expressão gênica de TSA2

Com o intuito de verificar a proposta de compensação da ausência concomitante de catalase A e Ahp1 por Tsa2, foi realizada a análise da transcrição do gene de Tsa2 em diferentes condições, através da técnica de *Northern blot* (figura 32). Foram analisadas as linhagens selvagem (WT), $\Delta ahp1$, $\Delta cta1$, $\Delta tsa2$ (controle negativo) e a linhagem duplo-mutante $\Delta cta1/ahp1$ crescidas em meio contendo oleato como fonte de carbono e tratadas com peróxido de hidrogênio ou hidroperóxido de *tert*-butila.

Figura 32: *Northern blot* comparando a expressão do gene *TSA2* nas linhagens WT, Δ *ahp1*, Δ *cta1*, Δ *tsa2* e no duplo-mutante Δ *cta1/ahp1* crescidas em meio de cultura contendo oleato como fonte de carbono e submetidas a diferentes tratamentos oxidantes por 30 minutos. As amostras de RNA foram hibridadas com sonda específica para o gene *TSA2*. Amostras de rRNA em gel de agarose/formaldeído antes da transferência são apresentadas como controle de carregamento. (A) e (B) diferem quanto ao tempo de exposição do filme à membrana: (A) 15 horas, (B) 3 horas.

O resultado corroborou o fato do gene de *Tsa2* ser altamente induzível por peróxidos, tanto de hidrogênio como por *tBHP*. Também é possível constatar que a indução é mais forte devido ao tratamento com peróxido de hidrogênio, nas concentrações analisadas. No entanto, a intensidade da indução não se mostrou significativamente diferente entre as diferentes linhagens, sugerindo que a expressão de *Tsa2* não é única componente da compensação à ausência de catalase A e *Ahp1*.

A sétima canaleta, correspondente à linhagem Δ *ahp1* tratada com peróxido de hidrogênio, parece exibir um aumento de expressão de *Tsa2*, o que fica mais evidente na figura 32(B), onde o filme foi exposto à membrana por um tempo menor. No entanto, seria esperado que a linhagem duplo-mutante Δ *cta1/ahp1* também exibisse uma maior indução de *TSA2*, o que não ocorreu, dificultando a elucidação do mecanismo regulatório em questão. Além disso, a possível indução de *TSA2* pela ausência de

Ahp1 também não foi observada na condição controle ou sob tratamento com *t*BHP. O significado desse resultado ainda precisa ser melhor investigado.

Ao comparar as diferentes linhagens em situação controle (sem estímulo oxidativo exógeno), foi possível verificar uma diferença nos níveis basais de *TSA2* (figura 33). Há uma indução de *TSA2* nas linhagens Δ *cta1* e Δ *cta1/ahp1*, que não apresentam catalase A, mas não na linhagem Δ *ahp1*. Esse resultado indica que a ausência de catalase A pode causar a indução de *TSA2*, possivelmente devido ao acúmulo de peróxido de hidrogênio endógeno.

Figura 33: *Northern blot* comparando a expressão do gene *TSA2* nas linhagens WT, Δ *ahp1*, Δ *cta1*, Δ *tsa2* e no duplo-mutante Δ *cta1/ahp1* crescidas em meio de cultura contendo oleato como fonte de carbono. As amostras de RNA foram hibridadas com sonda específica para o gene *TSA2*. Amostras de rRNA em gel de agarose/formaldeído antes da transferência são apresentadas como controle de carregamento.

No entanto, a variação de sinal observada na situação controle não foi detectada em situação de estresse oxidativo exógeno (figura 32). Como *TSA2* é altamente induzível, o resultado pode ser devido ao gene já estar fortemente induzido sob tratamento com peróxido, sendo a diferença ocasionada pela ausência de catalase A pouco significativa, nessas condições.

Durante a redação dessa dissertação, foi veiculado um artigo sobre defesa antioxidante de *Saccharomyces cerevisiae* em condições de alta atividade peroxissomal que mostra a localização peroxissomal de Gpx1 em células crescidas em meio contendo oleato como fonte de carbono (Ohdate e Inoue, 2012). Os resultados indicaram que a regulação redox de Gpx1 está relacionada ao crescimento em oleato e à biogênese peroxissomal, mas não esclareceu o mecanismo pelo qual isso ocorre. O trabalho também demonstrou a indução de Gpx1 em oleato e a modulação de sua expressão pelo sistema Msn2/Msn4, fatores de transcrição responsáveis por resposta geral a estresse, inclusive ao estresse oxidativo. A Gpx1 exibe atividade peroxidásica usando tioredoxina ou glutathione como redutores, podendo reduzir tanto peróxido de hidrogênio como tBHP. Portanto, Gpx1 pode ser responsável pela defesa contra oxidantes peroxissomais, complementando e compensando a atividade da catalase A.

Alternativamente, levando em consideração os dados de viabilidade reduzida (figura 28) e a maior carbonilação proteica (figura 31) da linhagem $\Delta cta1/tsa2$, se comparada com as outras linhagens, é possível que haja uma regulação pós-transcricional da Tsa2, o que explicaria o fenótipo observado e a ausência de indução gênica. Um possível componente traducional da regulação gênica de Tsa1 foi previamente observado (Hasan *et al.*, 2002), sugerindo um outro nível de regulação da defesa antioxidante a ser considerado. Seriam necessários ensaios de quantificação proteica (por *Western blot*) ou de atividade enzimática para a verificação dessa hipótese.

Discussão geral

Em situação de alta atividade peroxissomal e ausência da catalase A, responsável pela defesa contra oxidantes provenientes desta organela, seria esperado um fenótipo mais grave do que o observado. Propusemos, portanto, a existência de uma via alternativa e compensatória de defesa contra oxidantes provenientes do peroxissomo.

Ensaio de viabilidade (figuras 16, 17 e 18) e de detecção de proteínas carboniladas, que evidenciam danos oxidativos nas proteínas (figuras 22, 30 e 31), corroboraram o fenótipo brando da deficiência de catalase A previamente descrito (Hiltunen *et al.*, 2003). A viabilidade, os baixos níveis de carbonilação de proteínas e os níveis de glutatona (razão GSH/GSSG; tabela 1) na linhagem deficiente em catalase peroxissomal ($\Delta cta1$), sob situações de estresse oxidativo, indicam que a ausência de catalase A leva a uma resposta compensatória eficiente na defesa antioxidante. A ausência de catalase A poderia levar ao acúmulo endógeno de peróxido de hidrogênio em condições basais, causando a ativação de Yap1 (entre outros reguladores) e resultando no aumento da transcrição de vários genes envolvidos no *regulon* de resposta a esse oxidante (Lee *et al.*, 1999a). Esse fenômeno seria acentuado em condições de alta atividade mitocondrial e peroxissomal, quando ROS são geradas em maior intensidade como sub-produtos de atividade respiratória e da beta-oxidação de ácidos graxos e não há a repressão gênica por glicose.

Consideramos a possibilidade da Ahp1 ser localizada no peroxissomo em situações em que fosse necessária uma maior defesa contra oxidantes provenientes dessa organela, já que essa peroxirredoxina apresenta um possível sinal de importação peroxissomal. Entre os ensaios realizados para a confirmação da localização peroxissomal da Ahp1, a microscopia eletrônica foi inconclusiva (figuras 12 e 13). Já o subfracionamento celular seguido de Western blot indicou uma presença organelar (fração contendo mitocôndrias e peroxissomos) concomitante à citossomal (figura 11). Esse resultado foi também descrito recentemente por Ohdate e Inoue (2012), que

encontraram a presença organelar de Ahp1 em leveduras crescidas em meio contendo oleato como fonte de carbono e, assim como o resultado exibido na figura 11, também encontraram uma quantidade significativamente maior de Ahp1 localizada no citosol. No entanto, seria importante realizar esse estudo de forma comparativa com proteínas com localização celular bem estabelecida, como actina (citossol) e Pot1 ou Pex11 (peroxissomo). O fracionamento de mitocôndrias e peroxissomos é difícil, pois estas organelas estão fortemente associadas, porém pretendemos realizar esse procedimento futuramente. De acordo com estudos publicados recentemente (Ohdate e Inoue, 2012), a separação de mitocôndrias e peroxissomos é possível.

A ausência de Ahp1 causa um fenótipo de aumento de sensibilidade a hidroperóxidos orgânicos (Lee *et al.*, 1999b; resultados de viabilidade apresentados na figura 15B e 16). Devido à sua possível localização peroxissomal e à sua relativa eficiência na defesa a peróxido de hidrogênio, esperávamos que a Ahp1 fosse relevante na defesa contra oxidantes na ausência de catalase A (Cta1). No entanto, ensaios de viabilidade com a linhagem $\Delta ahp1$ com supressão de atividade catalásica (figuras 15 e 18) e com a linhagem duplo-mutante $\Delta cta1/ahp1$ (figura 28) demonstraram um aumento de viabilidade, sob tratamento com hidroperóxido orgânico. Esses resultados foram corroborados através de ensaio de proteínas carboniladas, que indicaram uma menor carbonilação proteica – ou seja, uma menor quantidade de danos oxidativos - na linhagem $\Delta cta1/ahp1$ sob tratamento com hidroperóxido orgânico, se comparada com a linhagem $\Delta ahp1$ (figura 31). Portanto, a ausência de catalase A parece estimular um sistema compensatório de defesa a hidroperóxidos orgânicos eficiente na célula, o que ocorre apesar da ausência de Ahp1. Como Ahp1 está envolvido na ativação do fator de transcrição Cad1 (Iwai *et al.*, 2010), é possível que os efeitos compensatórios observados em $\Delta cta1$ e $\Delta cta1/ahp1$ sejam mediados por outra via, talvez Yap1 e Skn7 (Lee *et al.*, 1999a) ou Msn2/Msn4 (Hasan *et al.*, 2002).

A análise de viabilidade das linhagens duplo-mutantes frente a peróxidos indicou uma maior sensibilidade da linhagem $\Delta cta1/tsa2$ ao tratamento com hidroperóxido orgânico (figura 28), ou seja, nessa linhagem parece não ter ocorrido o aumento de proteção verificado anteriormente. Baseado principalmente nos resultados de viabilidade, além de sua característica altamente induzível (Munhoz e Netto, 2004), a

peroxirredoxina Tsa2 pareceu ser uma boa candidata a componente de uma via alternativa contra oxidantes em situação de alta atividade peroxissomal.

Ao verificarmos, através de ensaios de detecção de proteínas carboniladas, o fenótipo de oxidação proteica da linhagem $\Delta cta1/tsa2$, foi possível perceber um maior efeito do tratamento oxidante realizado tanto com peróxido de hidrogênio (figura 30) quanto com hidroperóxido orgânico (figura 31). Esse dado corrobora a participação de Tsa2 em uma via antioxidante alternativa, regulada positivamente na ausência de catalase A.

Catalases reduzem especificamente peróxido de hidrogênio e, portanto, não agem na degradação de hidroperóxidos orgânicos. Na ausência de catalase A, propomos a ocorrência da ativação de um sistema de defesa antioxidante que seria eficiente na remoção tanto de peróxido de hidrogênio como de hidroperóxidos orgânicos. Dessa forma, haveria um aumento da defesa contra hidroperóxidos orgânicos, o que resultaria no fenótipo observado de resistência aumentada a hidroperóxidos orgânicos na ausência de catalase A. A Tsa2 poderia participar desse processo, já que a ausência concomitante de Cta1 e Tsa2 não apresenta esse fenótipo de resistência aumentada - fenômeno observado tanto nos ensaios de detecção de proteínas carboniladas (figura 31) quanto nos de viabilidade (figura 28).

Como o TSA2 não foi mais expresso nas linhagens $\Delta cta1$ e $\Delta cta1/ahp1$ (figura 32) sob tratamento com peróxidos, Tsa2 não deve ser a única enzima antioxidante responsável pelo fenótipo de resistência a peróxidos observado em $\Delta cta1$. De qualquer forma, como TSA2 é um gene altamente induzível, ele deve ser um dos componentes envolvidos na defesa de leveduras contra estresse induzido por peróxidos.

Como já foi mencionado, durante a redação desse trabalho foi publicado um artigo (Ohdate e Inoue, 2012) mostrando a localização peroxissomal de Gpx1, uma glutathione peroxidase, além da sua modulação gênica pelo sistema Msn2/Msn4, reguladores envolvidos com resposta geral a estresse. Assim, Gpx1 provavelmente é uma das enzimas antioxidantes envolvidas na resposta de leveduras a oxidantes quando há a ausência de catalase A, em condições de alta atividade peroxissomal. Além disso, o acúmulo de peróxido gerado pela ausência da catalase A poderia estimular a ativação dos fatores de transcrição Msn2/Msn4, que, ao serem

translocados para o núcleo, induziriam vários genes de proteção. O sistema Msn2/Msn4 ativa uma resposta a estresse de diferentes tipos e envolve a indução de genes que codificam proteases, proteínas *heat-shock*, enzimas metabólicas e moléculas envolvidas na recuperação da célula após situação de estresse, além de apenas dois genes diretamente relacionados com a defesa antioxidante (Hasan *et al.*, 2002).

Além disso, existem mecanismos alternativos de indução das mesmas enzimas antioxidantes. A catalase citosólica (Ctt1), por exemplo, pode ter sua transcrição induzida por Msn2/Msn4 ou por Yap1, de maneira Skn7-dependente. Este segundo mecanismo de indução é compartilhado pelos genes que codificam a Tsa1, Tsa2 e Ahp1, entre outros (Lee *et al.*, 1999a). Assim, o mesmo estímulo pode ativar diferentes fatores de transcrição, e diferentes fatores de transcrição podem induzir alguns dos mesmos genes.

Contudo, apesar de fazerem parte da defesa antioxidante e induzirem alguns dos mesmos genes, os sistemas de resposta a estresse oxidativo apresentam diferenças funcionais significativas. O sistema Msn2/Msn4 está envolvido principalmente com a tolerância a estresse oxidativo agudo e a recuperação após o período de estresse. Por outro lado, Yap1 tem papel importante na prevenção ao estresse oxidativo e na adaptação a peróxido (Hasan *et al.*, 2002), já que induz enzimas antioxidantes e membros das vias de glutatona e tioredoxina (Lee *et al.*, 1999a).

A modulação secundária da resposta a estresse também não ocorre de maneira específica, envolvendo as várias vias de sinalização, porém de maneira diferenciada. Por exemplo, o efeito supressor da via Ras-cAMP envolve diversos alvos, como Msn2/Msn4, parte da via de Yap1 (Fernandes *et al.*, 1997) e Skn7 (Charizanis, *et al.*, 1999). De fato, o aumento de atividade da via Ras-cAMP diminui a tolerância de leveduras a H₂O₂ (Hasan *et al.*, 2002).

Há evidências de redundância e de grande complexidade na defesa antioxidante de leveduras. Estudos com linhagens triplo-mutantes $\Delta msn2/msn4/yap1$ exibiram aumento de expressão de certos genes, sugerindo vias alternativas ainda desconhecidas de indução gênica (Hasan *et al.*, 2002).

Tendo em vista a complexidade e a redundância parcial dessas vias de sinalização, além da provável existência de mecanismos desconhecidos, é dificultada a proposição de um sistema específico de defesa antioxidante ativado na ausência de catalase A em situação de grande atividade peroxissomal. Os resultados do presente trabalho indicam o envolvimento de Tsa2, além de outras enzimas antioxidantes, nessa compensação. Como perspectivas, acreditamos que seria necessário um estudo mais aprofundado, de preferência em escala genômica. Além disso, análises da razão de GSH/GSSG podem trazer informações importantes relacionadas aos efeitos das diferentes deleções gênicas sobre o estado redox.

Alternativamente, a manutenção da viabilidade e do estado redox de leveduras *Δcta1* pode ser explicada pelo menos em parte pela presença de Gpx1 no peroxissomo, a qual seria responsável pela degradação direta de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos formados nessa organela, na ausência de catalase A. Seria interessante comprovar uma possível indução gênica de *GPX1* em leveduras *Δcta1* e em outras linhagens estudadas nessa tese, em situação de grande atividade peroxissomal. De qualquer maneira, a compensação da ausência de catalase A (que é capaz de reduzir apenas peróxido de hidrogênio) seria realizada por enzimas capazes de reduzir tanto peróxido de hidrogênio quanto peróxidos orgânicos, o que explicaria o aumento de resistência a estes peróxidos na ausência de catalase A.

Conclusões

- Ahp1 apresenta localização organelar (possivelmente mitocondrial ou peroxissomal), concomitante à já conhecida localização citosólica.
- Na ausência de catalase A de *Saccharomyces cerevisiae* em situação de grande atividade peroxissomal, ocorre uma compensação por uma via antioxidante alternativa, capaz de decompor tanto peróxido de hidrogênio, como tBHP.
- O mecanismo de compensação à ausência de catalase A não é dependente de Ahp1.
- Peroxirredoxinas são importantes para a manutenção do estado redox da célula e de sua viabilidade em situação de estresse oxidativo.
- As tiól-peroxidases são extremamente importantes para a manutenção da viabilidade celular em condição de grande atividade peroxissomal, sob situação de estresse oxidativo.
- A ausência de catalase A em condições basais (sem tratamento com peróxidos) causa a indução do gene *TSA2*, em situação de grande atividade peroxissomal. Porém, apesar de fortemente induzido em situação de estresse oxidativo, o gene *TSA2* não é ainda mais induzido na ausência concomitante de catalase A e Ahp1 nessas condições.

Resumo

Defeitos peroxissomais estão associados a diversas doenças complexas. O peroxissomo é responsável pela beta-oxidação de ácidos graxos, quando é gerado peróxido de hidrogênio.

A catalase A, de ocorrência peroxissomal, é frequentemente considerada a única defesa antioxidante dessa organela, porém, em diversos organismos, a ausência dessa enzima não acarreta uma alteração fenotípica clara. Em *Saccharomyces cerevisiae*, linhagens mutantes deficientes em catalase A ($\Delta cta1$) apresentam viabilidade muito similar à linhagem selvagem correspondente. Trabalhamos com a hipótese de que peroxidases baseadas em cisteína compensam a ausência de catalase A, contribuindo para a detoxificação de peróxidos provenientes do peroxissomo.

De fato, linhagens com os genes para as peroxirredoxinas Ahp1 e Tsa1 nocauteados mostraram-se mais sensíveis a hidroperóxido de *tert*-butila (*tBHP*) em comparação a linhagem selvagem. A linhagem de levedura deficiente nas cinco peroxirredoxinas (*prxΔ*) mostrou-se ainda mais sensível a *tBHP*. Em relação ao estresse induzido por peróxido de hidrogênio, a *prxΔ* apresentou maior sensibilidade do que as linhagens selvagem e mutantes com deleções simples, apesar da presença de catalases (peroxissomal e citossólica).

Esses dados estão de acordo com resultados obtidos no nosso grupo demonstrando um aumento da expressão de genes referentes às peroxirredoxinas Ahp1, Prx1 e Tsa2 em células $\Delta cta1$ crescidas em condições de alta atividade peroxissomal (oleato), indicando uma cooperação entre catalase e peroxirredoxinas na proteção antioxidante.

A peroxirredoxina Ahp1 pode apresentar localização organelar (possivelmente mitocondrial ou peroxissomal), o que sugere que Ahp1 pode ser um componente relevante da defesa contra oxidantes provenientes do peroxissomo. No entanto, a linhagem $\Delta ahp1$, normalmente sensível a peróxido orgânico, apresentou ganho de resistência na ausência de atividade de catalase (com a adição de ATZ e na linhagem

duplo-mutante $\Delta cta1/ahp1$), indicando a existência de uma via antioxidante compensatória induzida pela ausência de catalase A.

A construção das linhagens duplo-mutantes $\Delta cta1/ahp1$, $\Delta cta1/tsa1$, $\Delta cta1/tsa2$, $\Delta cta1/prx1$ e $\Delta cta1/dot5$ foi realizada com o objetivo de investigar mecanismos compensatórios entre enzimas que podem proteger a levedura contra os oxidantes provenientes do peroxissomo. Para tanto, foram realizados ensaios de viabilidade comparativa em condições de alta atividade peroxissomal. Além disso, os níveis comparativos de proteínas carboniladas foram analisados nessas linhagens. Os resultados indicaram maior sensibilidade a peróxido e maiores níveis de danos oxidativos na linhagem $\Delta cta1/tsa2$, apontando a peroxirredoxina Tsa2 como candidata a importante componente da via antioxidante de compensação à ausência de catalase A.

Nesses ensaios, também foram utilizadas a linhagem quádrupla mutante ($prx\Delta$) e uma linhagem deficiente nas cinco peroxirredoxinas e três glutathione peroxidases - deficiente em oito tiól-peroxidases baseadas em cisteína ($\Delta 8$). A comparação das linhagens $prx\Delta$ e $\Delta 8$ com as linhagens selvagem, simples-mutantes e duplo-mutantes evidenciou a importância das peroxirredoxinas na defesa antioxidante da célula e o fato das tiól-peroxidases serem imprescindíveis em condições de estresse oxidativo.

Ao examinar a expressão gênica de *TSA2* em células crescidas em oleato, foi verificada a indução do gene na ausência de catalase A, em condição basal.

Os resultados obtidos indicam a existência de uma eficiente via de defesa antioxidante, na qual estão envolvidas tiól-peroxidases, que compensa a ausência de catalase A na célula e que protege leveduras contra estresse induzido tanto por peróxido de hidrogênio como peróxido orgânico. A peroxirredoxina Tsa2 parece estar envolvida na via compensatória à ausência de catalase peroxissomal através de um mecanismo ainda não esclarecido.

Abstract

Defects in peroxisomes are associated with several complex diseases. Beta-oxidation of fatty acids takes place in these organelles, with the concomitant generation of hydrogen peroxide.

Generally, it is assumed that peroxisomal catalase is the enzyme responsible for degradation of hydrogen peroxide, but in several organisms, deletion of its gene results in no clear phenotype. In *Saccharomyces cerevisiae*, catalase A– null ($\Delta cta1$) mutant strains exhibit very similar viability levels when compared with the corresponding wild-type strain. We hypothesized here that Cys-based peroxidases compensate the absence of catalase A, contributing to the detoxification of peroxides derived from the peroxisome.

Indeed, null mutant strains for the peroxiredoxins Ahp1 and Tsa1 displayed increased sensitivity for *tert*-butylhydroperoxide (*tBHP*) in comparison to the wild type strain. Furthermore, a mutant strain whose five genes for peroxiredoxins were interrupted (*prxΔ*) was even more sensitive to *tBHP*. In regards to hydrogen peroxide insult, the *prxΔ* strain was more susceptible to oxidative stress than the single mutant and wild-type strains, despite the activity of catalases.

These data are in agreement with previous results from our group demonstrating increased expression of genes encoding the three peroxiredoxin enzymes: Ahp1, Prx1 and Tsa2 in $\Delta cta1$ cells at high peroxisomal activity (media containing oleate). Indeed, a yeast strain deleted of all five peroxiredoxin genes is more sensitive to peroxides than the corresponding wild type cells. These results indicated that catalase and peroxiredoxins cooperate to protect yeast in conditions of high fatty acid intake.

There are evidences of an organellar location of Ahp1 (possible peroxisomal or mitochondrial), suggesting it could be a relevant component of antioxidant defense relative to the insult derived from the peroxisome. Nonetheless, the *ahp1*-null strain ($\Delta ahp1$), which is usually sensitive to organic peroxide, displayed a gain of resistance in the absence of catalase activity (in the presence of ATZ and in the double-mutant strain

Δcta1/ahp1), indicating the existence of a compensatory antioxidant pathway induced in the absence of catalase A.

The double-mutant strains *Δcta1/ahp1*, *Δcta1/tsa1*, *Δcta1/tsa2*, *Δcta1/prx1* and *Δcta1/dot5* were developed in order to elucidate the identity of the enzymes that cooperate to protect yeast against oxidative insult derived from the peroxisome. To this end, comparative viability assays in conditions of high peroxisomal activity were realised, as well as assays in comparative total protein carbonyl levels. Among the double-mutant strains, *Δcta1/tsa2* displayed higher sensibility to peroxide and higher levels of oxidative damage, suggesting that the peroxiredoxin Tsa2 may be an important component in the antioxidant pathway that compensates the lack of catalase A.

In addition, a quintuple mutant strain, lacking all peroxiredoxins, and a mutant strain lacking all eight Cys-based, thiol peroxidases were used in these assays. The comparison of these strains with the wild-type, single-mutant and double-mutant strains demonstrated the importance of peroxiredoxins in the cellular antioxidant defence and that thiol-peroxidases are vital in conditions of oxidative stress.

The expression of the *TSA2* was induced in the absence of catalase A in cells grown in oleate and with no exogenous oxidants.

The results suggest the existence of an efficient pathway of antioxidant defense, involving thiol-peroxidases, which compensates the absence of catalase A in the cell and protects yeast against oxidative stress induced by both hydrogen peroxide and organic peroxide. The peroxiredoxin Tsa2 may be involved in the antioxidant pathway that compensates the absence of peroxisomal catalase through an unknown mechanism.

Referências bibliográficas

- Aksam, E.D., de Vries, B., van der Klei, I.J., Kiel, J.A. (2009) Preserving organelle vitality: peroxisomal quality control mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res.* **9(6)**: 808-820. Review.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008) *Molecular Biology of the Cell*. 4a. ed. Garland Science, New York, USA.
- Asensi, M., Sastre, J., Pallardo, F.V., Lloret, A., Lehner, M., Garcia-de-la Asuncion, J., Viña, J. (1999) Ratio of Reduced to Oxidized Glutathione as Indicator of Oxidative Stress Status and DNA Damage. *Methods in Enzymology*. **299**: 267-276.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (2003) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons Inc, New York, USA.
- Ben-Ari, G., Zenvirth, D., Sherman, A., David, L., Klutstein, M., Lavi, U., Hillel, J., Simchen, G. (2006) Four linked genes participate in controlling sporulation efficiency in budding yeast. *PLoS Genet.* **2(11)**: e195.
- Birboim, H.C., Dolly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid Res.* **7**: 1513-1523.
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J. (1996) *Protein methods*. John Wiley & Sons Inc., New York, USA.
- Castrillo, J.I., Oliver, S.G. (2004) Yeast as a touchstone in post-genomic research: strategies for integrative analysis in functional genomics. *J Biochem Mol Biol* **37(1)**: 93 -106.
- Cha, M.K., Choi, Y.S., Hong, S.K., Kim, W.C., No, K.T., Kim, I.H. (2003) Nuclear thiol peroxidase as a functional alkyl-hydroperoxide reductase necessary for stationary phase growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278(27)**: 24636-24643.

- Chae, H.Z., Chung, S.J., Rhee, S.G. (1994) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem.* **269(44)**: 27670-27678.
- Charizanis, C., Juhnke, H., Krems, B., Entian, K.D. (1999) The oxidative stress response mediated via Pos9/Skn7 is negatively regulated by the Ras/PKA pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* **261(4-5)**: 740-752.
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.B., Vinh, J., Toledano, M.B. (2002) A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* **111(4)**: 471-481.
- Demasi, A.P.D., Pereira, G.A., Netto, L.E. (2006) Yeast oxidative stress response – Influences of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial functional state. *FEBS Journal* **273**: 805- 816.
- Deutschbauer, A.M., Davis, R.W. (2005) Quantitative trait loci mapped to single nucleotide resolution in yeast. *Nat Genet.* **37(12)**:1333-1340.
- Eberhardt, I., Hohmann, S. (1995) Strategy for deletion of complete open reading frames in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **27(4)**: 306-308.
- Farcasanu, I.C., Hirata, D., Tsuchiya, E., Mizuta, K., Miyakawa, T. (1999) Involvement of thioredoxin peroxidase type II (Ahp1p) of *Saccharomyces cerevisiae* in Mn²⁺ homeostasis. *Biosci Biotechnol Biochem* **63(11)**:1871-1881.
- Fernandes, L., Rodrigues-Pousada, C., Struhl, K. (1997) Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol. Cell. Biol.* **17(12)**: 6982-6993.
- Fomenko, D.E., Koc, A., Agisheva, N., Jacobsen, M., Kaya, A., Malinouski, M., Rutherford, J.C., Siu, K.L., Jin, D.Y., Winge, D.R., Gladyshev, V.N. (2011) Thiol peroxidases mediate specific genome-wide regulation of gene expression in response to hydrogen peroxide. *PNAS* **108(7)**: 2729-2734.
- Genu, V. **Ahp1 e Tsa1 de *saccharomyces cerevisiae*: regulação gênica, caracterização bioquímica, estrutura e função das duas peroxirredoxinas mais abundantes de leveduras.** 2007. 160f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- Ghaemmamghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., & Weissman, J.S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 425, 737–741.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274(5287)**: 546, 563-567.
- Grant C.M. (2001) Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol Microbiol* **39(3)**:533-541.
- Gurvitz, A., Rottensteiner, H. (2006) The biochemistry of oleate induction: Transcriptional upregulation and peroxisome proliferation. *Biochim Biophys Acta* **1763(12)**: 1392-1402.
- Guthrie, C., Fink, G.R. (ed.) (1991) *Methods in Enzymology*. Vol. 194: Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Academic Press, San Diego, USA.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2008) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4a. ed. Oxford University Press, New York, USA.
- Hanaham, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol Biol* **166**: 157- 163.
- Hasan, R., Leroy, C., Isnard, A.D., Labarre, J., Boy-Marcotte, E., Toledano, M.B. (2002) The control of the yeast H₂O₂ response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol Microbiol*. **45(1)**: 233-241.
- Hiltunen, J.K., Mursula, A.M., Rottensteiner, H., Wierenga, R.K., Kastaniotis, A.J., Gurvitz, A. (2003) The biochemistry of peroxisomal β -oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* **27**: 35-64.
- Horiguchi, H., Yurimoto, H., Kato, N., Sakai, Y. (2001) Antioxidant System within Yeast Peroxisome - Biochemical and physiological characterization of CbPmp20 in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *J Biol Chem*. **276(17)**:14279-14288.
- Horta, B.B. **Caracterização funcional e estrutural de peroxidases dependentes de tiól da bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa***. 2009. 140f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- Hörtnner, H., Ammerer, G., Hartter, E., Hamilton, B., Rytka, J., Bilinski, T., Ruis, H. (1982) Regulation of synthesis of catalases and iso-1-cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae* by glucose, oxygen and heme. *Eur J Biochem.* **128(1)**:179-184.
- Huang, M.E., Rio, A.G., Nicolas, A., Kolodner, R.D. (2003) A genomewide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes that suppress the accumulation of mutations. *PNAS* **100(20)**: 11529-11534.
- 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.* (6): e1000524.
- Iwai, K., Naganuma, A., Kuge, S. (2010) Peroxiredoxin Ahp1 acts as a receptor for alkyl hydroperoxides to induce disulfide Bond formation in the Cad1 transcription factor. *J Biol Chem.* **285(14)**:10597-10604.
- Jang, H.H., Lee, K.O., Chi, Y.H., Jung, B.G., Park, S.K., Park, J.H., Lee, J.R., Lee, S.S., Moon, J.C., Yun, J.W., Choi, Y.O., Kim, W.Y., Kang, J.S., Cheong, G.W., Yun, D.J., Rhee, S.G., Cho, M.J., Lee, S. Y. (2004) Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell.* **117(5)**: 625-635.
- Jeong, W., Kwon, S.J., Kang, S.W., Rhee, S.G., Kim, K. (1999) Purification and characterization of a second type thioredoxin peroxidase (type II TPx) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry.* **38(2)**:776-783.
- Johnston, M., Carlson, M. (1992) Regulation of carbon and phosphate utilization. *In The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae. Vol. 2: Gene expression.* Jones, E.W., Pringle, J.R., Broach, J.R. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, USA.
- Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., Toledano, M.B. (1999a) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem.* **274(23)**: 16040-16046.

- Lee, J., Spector, D., Godon, C., Labarre, J., Toledano, M.B. (1999b) A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast. *J. Biol. Chem.* **274(8)**: 4537- 4544.
- Lian, F.M., Yu, J., Ma, X.X., Yu, X.J., Chen, Y., Zhou, C.Z. (2012) Structural Snapshots of Yeast Alkyl Hydroperoxide Reductase Ahp1 Peroxiredoxin Reveal a Novel Two-cysteine Mechanism of Electron Transfer to Eliminate Reactive Oxygen Species. *J Biol Chem.* **287(21)**: 17077-17087.
- Lowther, W.T., Haynes, A.C. (2011) Reduction of cysteine sulfinic acid in eukaryotic, typical 2-Cys peroxiredoxins by sulfiredoxin. *Antioxid Redox Signal.* **15(1)**: 99-109
- Martínez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., Estruch, F. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* **15(9)**: 2227-2235.
- Monteiro, G., Pereira, G.A., Netto, L.E. (2002) Regulation of mitochondrial thioredoxin peroxidase I expression by two different pathways: one dependent on cAMP and the other on heme. *Free Radic Biol Med.* **32(3)**: 278-288.
- Monteiro, G., Netto, L.E. (2004) Glucose repression of PRX1 expression is mediated by Tor1p and Ras2p through inhibition of Msn2/4p in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett.* **241(2)**: 221-228.
- Monteiro, G., Horta, B.B., Pimenta, D.C., Augusto, O., Netto, L.E. (2007) Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *PNAS.* **104(12)**: 4886-4891.
- Munhoz, D.C., Netto, L.E.S. (2004) Cytosolic Thioredoxin Peroxidase I and II are important defenses of yeast against organic hydroperoxide insult. *J. Biol. Chem.* **279(34)**: 35219-35227.
- Nelson, K.J., Knutson, S.T., Soito, L., Klomsiri, C., Poole, L.B., Fetrow, J.S. (2011) Analysis of the peroxiredoxin family: using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis. *Proteins* **79(3)**: 947-964.

- Netto, L.E.S., de Oliveira, M.A., Monteiro, G., Demasi, A.P., Cussiol, J.R., Discola, K.F., Demasi, M., Silva, G.M., Alves, S.V., Faria, V.G., Horta, B.B. (2007) Reactive cysteine in proteins: Protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. **146**: 180-193.
- Ogusucu, R., Rettori, D., Munhoz, D.C, Netto, L.E., Augusto, O. (2007) Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: Rate constants by competitive kinetics. *Free Radical Biology & Medicine* **42**: 326–334.
- Ogusucu, R., Rettori, D., Netto, L.E., Augusto, O. (2009) Superoxide dismutase 1-mediated production of ethanol- and DNA-derived radicals in yeasts challenged with hydrogen peroxide: molecular insights into the genome instability of peroxiredoxin-null strains. *J Biol Chem*. **284**(9):5546-5556.
- Ohdate, T., Inoue, Y. (2012) Involvement of glutathione peroxidase 1 in growth and peroxisome formation in *Saccharomyces cerevisiae* in oleic acid medium. *Biochim Biophys Acta*. In press (doi: 10.1016/j.bbailip.2012.05.004).
- Park, S.G., Cha, M.K., Jeong, W., Kim, I.H. (2000) Distinct Physiological Functions of Thiol Peroxidase Isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem*. **275**: 5723-5732.
- Pedrajas J.R., Miranda-Vizuete, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J.A., Spyrou, G. (2000) Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J Biol Chem* **275**(21): 16296-16301.
- Petriv, O.I., Tang, L., Titorenko, V.I., Rachubinski, R.A. (2004) A New Definition for the Consensus Sequence of the Peroxisome Targeting Signal Type 2. *J. Mol. Biol*. **341**: 119-134.
- Petrova, V.Y., Drescher, D., Kujumdzieva, A.V., Schmitt, M.J. (2004) Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *Biochem J*. **380**: 393-400.
- Poole, L.B., Hall, A., Nelson, K.J. (2011) Overview of peroxiredoxins in oxidant defense and redox regulation. *Curr Protoc Toxicol*. 7.9.1-7.9.15.

- Rucktäschel, R., Girzalsky, W., Erdmann, R. (2011) Protein import machineries of peroxisomes. *Biochim Biophys Acta*. **1808(3)**: 892-900.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis. T. (1989) *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schiestl, R.H., e Gietz, R.D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acid as a carrier. *Curr. Genet*. **16**: 339-346.
- Schrader, M., Fahimi, H.D. (2008) The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochem Cell Biol* **129**: 421-440.
- Schluter, A., Real-Chicharro, A., Gabaldon, T., Sanchez-Jimenez, F., Pujol, A. (2010) PeroxisomeDB 2.0: an integrative view of the global peroxisomal metabolome. *Nucleic Acids Res*, **38**: D800-805.
- Sherman, F. (2002) Getting started with yeast. *Methods Enzymol*. **350**: 3 - 41.
- Shimozawa, N., Tsukamoto, T., Suzuki, Y., Orii, T., Shirayoshi, Y., Mori, T., Fujiki, Y. (1992) A human gene responsible for Zellweger syndrome that affects peroxisome assembly. *Science* **255(5048)**: 1132-1134.
- Sideri, T.C., Stojanovski, K., Tuite, M.F., Grant, C.M. (2010) Ribosome-associated peroxiredoxins suppress oxidative stress-induced de novo formation of the [PSI⁺] prion in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107(14)**: 6394-6399.
- Singer, M.S., Kahana, A., Wolf, A.J., Meisinger, L.L., Peterson, S.E., Goggin, C., Mahowald, M., Gottschling, D.E. (1998) Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **150(2)**: 613-632.
- Tachibana, T., Okazaki, S., Murayama, A., Naganuma, A., Nomoto, A., Kuge, S. (2009) A major peroxiredoxin-induced activation of Yap1 transcription factor is mediated by reduction-sensitive disulfide bonds and reveals a low level of transcriptional activation. *J Biol Chem*. **284(7)**: 4464-4472.
- Temple, M.D., Perrone, G.G., Dawes, I.W. (2005) Complex cellular responses to reactive oxygen species (Review). *Trends Cell Biol*. **15(6)**: 319-326.
- Terlecky, S.R., Koepke, J.I., Walton, P.A. (2006) Peroxisomes and aging (Review). *Biochim Biophys Acta* **1763(12)**: 1749-1754.
- Thoms, S.; Grønborg, S.; Gärtner, J. (2009) Organelle interplay in peroxisomal disorders. *Trends Mol Med*. **15(7)**:293-302.

- Trotter, E.W., Rand, J.D., Vickerstaff, J., Grant, C.M. (2008) The yeast Tsa1 peroxiredoxin is a ribosome-associated antioxidant. *Biochem. J.* **412(1)**: 73–80.
- van der Zand, A., Gent, J., Braakman, I., Tabak, H.F. (2012) Biochemically distinct vesicles from the endoplasmic reticulum fuse to form peroxisomes. *Cell.* **149(2)**: 397-409.
- Vizeacoumar, F.J., Torres-Guzman, J.C., Bouard, D., Aitchison, J.D., Rachubinski, R.A. (2004) Pex30p, Pex31p, and Pex32p form a family of peroxisomal integral membrane proteins regulating peroxisome size and number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **15 (2)**: 665-677.
- Wood, Z.A., Schröder, E., Robin Harris, J., Poole, L.B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* **28(1)**: 32-40.
- Wong, C.M., Siu, K.L., Jin, D.Y. (2004) Peroxiredoxin-null yeast cells are hypersensitive to oxidative stress and are genomically unstable. *J. Biol. Chem.* **279**: 23207-23213.
- Wong, C.M., Zhou, Y., Ng, R.W., Kung, H.F., Jin, D.Y. (2002) Cooperation of yeast peroxiredoxins Tsa1p and Tsa2p in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem* **277(7)**: 5385-5394.