

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

Janaina de Moraes Maciel Leme

Mutação sítio-específica de cisteínas glutationiladas na subunidade $\alpha 5$ do proteassomo 20S da levedura *Saccharomyces cerevisiae*: implicações no metabolismo de proteínas oxidadas e na longevidade celular.

São Paulo
2016

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

Janaina de Moraes Maciel Leme

Mutação sítio-específica de cisteínas glutationiladas na subunidade $\alpha 5$ do proteassomo 20S da levedura *Saccharomyces cerevisiae*: implicações no metabolismo de proteínas oxidadas e na longevidade celular.

Site-specific mutation of the glutathionylated cysteine in the $\alpha 5$ subunit of the 20S proteasome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: implications on the metabolism of oxidized proteins and on the cell longevity.

São Paulo
2016

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

Janaina de Moraes Maciel Leme

Mutação sítio-específica de cisteínas glutationiladas na subunidade $\alpha 5$ do proteassomo 20S da levedura *Saccharomyces cerevisiae*: implicações no metabolismo de proteínas oxidadas e na longevidade celular.

Site-specific mutation of the glutathionylated cysteine in the $\alpha 5$ subunit of the 20S proteasome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: implications on the metabolism of oxidized proteins and on the cell longevity.

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

Versão corrigida. A original se encontra disponível no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Orientador(a):
Dra. Marilene Demasi
Laboratório de Bioquímica e Biofísica
Instituto Butantan

São Paulo
2016

Ficha Catalográfica

Leme, Janaina de Moraes Maciel.

“Mutação sítio-específica de cisteínas glutationiladas na subunidade $\alpha 5$ do proteassomo 20S da levedura *Saccharomyces cerevisiae*: implicações no metabolismo de proteínas oxidadas e na longevidade celular.”

133 páginas.

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Proteassomo; 2. Glutationilação; 3. Estresse Oxidativo.

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Merari de Fátima Ramires Ferrari

Prof(a). Dr(a).

José Ribamar dos Santos Ferreira Júnior

Prof(a). Dr(a).

Fernanda Marques da Cunha

Prof(a). Dr(a).

Daniel Carvalho Pimenta

Prof(a). Dr(a).

Marilene Demasi

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

Aos meus pais, a quem devo tudo!

À minha filha Ana Lara, minha maior e melhor experiência na vida!

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho normal”.

(Albert Einstein)

Agradecimentos

A Deus, por sua constante presença em todos os momentos da minha vida me iluminando diante das dificuldades e propiciando o convívio com pessoas tão especiais;

Aos meus pais Antônio e Bernadete, por terem acreditado em mim e investido seus esforços na minha educação. Obrigada pelo amor e apoio incondicional e por me oferecerem as condições necessárias para a minha formação pessoal e profissional;

À Dra. Marilene Demasi, pela oportunidade e por sua orientação e paciência. Agradeço por todos os ensinamentos e por sua inestimável contribuição na minha formação científica. Sua competência e dedicação a ciência me serviram como exemplos quais levarei por toda a vida;

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto pelo apoio, sugestões e disponibilização irrestrita de seu laboratório durante todo o desenvolvimento deste projeto. Agradeço enormemente pelo profissionalismo e pelos conselhos que sempre me ajudaram;

Ao Prof. Mário Henrique de Barros por sua orientação para a construção das linhagens mutantes de levedura aqui estudadas;

Ao Dr. Prof. Cristiano Luis Pinto de Oliveira e sua aluna de mestrado Renata Naporano Bicev pelas imagens por microscopia eletrônica de transmissão do proteassomo;

A Dra. Maria Luiza M. B. de Chaves e sua aluna de doutorado Caroline Antunes Lino pelos ensaios de RT-PCR;

Ao Dr. Daniel Carvalho Pimenta e seu aluno de doutorado Douglas Oscar Ceolin Mariano pelo auxílio e ajuda na identificação de proteínas por espectrometria de massas;

A minha família, que sempre me apoiaram nos momentos mais felizes e nos mais difíceis. Me deram amor e compreenderam a minha ausência;

Ao Adairton Moreira, pelo apoio e incentivo constante para ir atrás de meus objetivos e por sempre acreditar e se orgulhar de mim;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo indispensável suporte financeiro para realização deste trabalho;

A todos os meus queridos amigos, espalhados por todos os cantos, que sempre me deram força e torceram para que eu pudesse conquistar mais essa vitória;

As “minas do PT”, Vanessa Simões, Daniele Silva, Erina Ohara, Vanessa Crispi, Verônica Feijoli e Carolina Oliveira, por compartilhar conhecimentos, e, partilhar inúmeros momentos inesquecíveis. Mais do que companheiras de pesquisas – verdadeiras amigas de muitas risadas e ensinamentos. Obrigada meninas pela amizade e por não me deixarem desistir diante das dificuldades;

Aos companheiros uspianos (presentes e ex alunos): Adriana Macedo, Mariana Zampol, Renata B. Fernandes, Fernando Gomes, Thiago Alegria, Marcela Pimenta, Raquel Monteiro, Simone V. Alves, Andressa Sakugawa, Maria Cristina Spinola, Valesca Anshau, Flávio Romero, Eduardo T. Tsuchida, Diogo de A. Meirelles, Anita Del Guercio, Jonas Gaiarsa e Aline Reydon, pelos vários momentos de auxílio nos experimentos, incentivo, idéias e amizade. Agradeço enormemente pelo profissionalismo e pelos conselhos que sempre me ajudaram;

Aos senhores membros da banca;

E o meu mais profundo agradecimento a minha filha Ana Lara, que transformou a minha vida e se tornou o meu maior incentivo para concluir essa etapa, mesmo diante de inúmeros obstáculos e desilusões... Te amo, pequena!

Sumário

Resumo.....	11
Abstract.....	12
Abreviaturas e Siglas.....	13
I. Introdução.....	15
A proteólise intracelular – Do lisossomo ao proteassomo.....	15
O Proteassomo.....	16
Automontagem do proteassomo 20S.....	18
Regulação do proteassomo 20S.....	21
Regulação do proteassomo 20S por modificação pós-traducional.....	29
Glutona e a glutonilação do proteassomo.....	31
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudos biológicos.....	35
II. Objetivos.....	40
III. Materiais e Métodos.....	41
Linhagens e plasmídeos utilizados.....	41
Meios de cultura.....	42
Condições de cultivo dos microrganismos.....	43
Métodos gerais para a manipulação de DNA.....	43
Preparação de bactérias <i>E. coli</i> competentes para transformação com DNA plasmidial recombinante.....	44
Preparo de DNA plasmidial de bactéria em pequena escala.....	45
Preparo de DNA plasmidial de bactéria em média escala.....	45
Transformação de células da levedura <i>S. cerevisiae</i>	46
Mini preparação de DNA genômico de levedura.....	47
Construção de oligonucleotídeos.....	47
Preparação das células de <i>S. cerevisiae</i> para dissecção de tétrades.....	48
Teste de complementação e cruzamento entre as linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	49
Construção de plasmídeos recombinantes.....	49
Inativação gênica no <i>PUP2</i>	49
Construção dos alelos mutantes no gene <i>PUP2</i>	54
Crescimento celular das linhagens de levedura <i>S. cerevisiae</i> e preparação do extrato celular total.....	57
Purificação do proteassomo 20S por cromatografia de afinidade a níquel.....	58
Purificação do proteassomo 20S em coluna de troca iônica (aniônica).....	58
Purificação do proteassomo 20S em coluna anti-FLAG.....	59
Ensaio de atividade peptidásica do proteassomo 20S.....	59
Ensaio de atividade proteolítica analisada por SDS-PAGE.....	59
Curva de crescimento.....	60
Tolerância ao estresse oxidativo com peróxidos por diluição seriada.....	60
Análise morfológica das linhagens.....	61

Ensaio de envelhecimento cronológico.....	61
Gel de poli-acrilamida desnaturante (SDS-PAGE).....	61
Gel Nativo.....	62
Gel de acrilamida – Eletroforese bidimensional (2-DE).....	63
Reidratação das tiras IPG.....	63
Primeira dimensão - Separação de proteínas pelo ponto isoelétrico.....	63
Segunda dimensão - Separação de proteínas pelo peso molecular.....	64
Coloração com Coomassie Brilliant Blue – R 250.....	65
Coloração com Coomassie® Blue G-250 coloidal.....	65
Ensaio de imunomarcção.....	65
Extração de RNA total de levedura <i>S. Cerevisiae</i>	66
Reação de qPCR.....	67
Análise do proteossomo 20S por microscopia eletrônica de transmissão.....	68
Identificação do resíduo glutationilado (Cys76) da subunidade $\alpha 5$ do proteossomo 20S na linhagem mutante C221 através da espectrometria de massas.....	69
IV. Resultados.....	71
Análise estrutural e caracterização funcional do papel das cisteínas glutationiláveis da subunidade $\alpha 5$ do 20SPT em linhagens mutantes de <i>S. cerevisiae</i>.....	72
Análise das atividades peptidásicas e proteolíticas do proteossomo 20S.....	72
Controle da câmara catalítica do 20SPT é dependente do estado redox dos resíduos de cisteínas presentes na subunidade $\alpha 5$	76
Análise proteômica e espectrometria de massas.....	77
Análise das concentrações de 19SPT e 20SPT entre as linhagens.....	82
Análise da expressão de subunidades proteossomais por q-PCR.....	85
Automontagem do 20SPT.....	88
Análise fenotípica das linhagens mutantes de <i>S. cerevisiae</i>.....	89
Diferenças morfológicas causadas pela mutação sitio-específica.....	89
Avaliação quantitativa do crescimento das linhagens.....	90
Teste de viabilidade das linhagens sobre condições de estresse oxidativo.....	91
Envelhecimento cronológico das linhagens.....	93
V. Discussão.....	94
VI. Conclusões.....	103
VII. Referências Bibliográficas.....	105
VIII. Anexos.....	115

Resumo

O proteassomo é uma protease intracelular multimérica e multicatalítica responsável pela degradação de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, processos de sinalização, apresentação antigênica e no controle de síntese proteica. Ele é constituído por uma unidade catalítica central denominada 20S (20SPT) e por unidades regulatórias (19S) acopladas em uma ou ambas as extremidades para formar o 26S (26SPT). O 26SPT reconhece e direciona os substratos poliubiquitinados para a proteólise por um mecanismo dependente de ATP. Entretanto, o 20SPT também é ativo quando dissociado de unidades regulatórias, degradando proteínas independentemente de poliubiquitinação e consumo de ATP. Proteínas modificadas oxidativamente e outros substratos são degradados desta maneira. O 20SPT é composto por dois anéis heptaméricos centrais (β) onde estão localizados os sítios catalíticos e por dois anéis heptaméricos externos (α) que são responsáveis pela abertura da câmara catalítica. Anteriormente, foi observado pelo grupo que o 20SPT da levedura *S.cerevisiae* sofre S-glutationilação na subunidade $\alpha 5$ nos resíduos de Cys76 e Cys221. Assim, foram obtidas neste projeto linhagens de levedura *S. cerevisiae* portando mutações sítio-específicas na subunidade $\alpha 5$ do 20SPT ($\alpha 5$ -C76S ou $\alpha 5$ -C221S), e posteriormente, ensaios comparativos quanto às consequências estruturais e funcionais dessas mutações foram realizados. Observamos um aumento na capacidade/velocidade de degradação nas atividades peptidásicas e proteolíticas da mutante C221, e também que, a população de proteassomo isolada dessa linhagem apresenta maior proporção da forma aberta da câmara catalítica, sendo esta imediatamente fechada pela remoção da glutatona do 20SPT na presença de DTT. Resultados opostos foram observados na linhagem mutante C76. Identificamos por espectrometria de massas o resíduo C76 do 20SPT glutationilado na mutante C221. Os ensaios fenotípicos mostraram um aumento da longevidade e resistência ao estresse oxidativo da C221, enquanto que a linhagem C76 mostrou uma dificuldade no crescimento. Contudo, a S-glutationilação do 20SPT é uma modificação química pós-traducional reversível de ocorrência fisiológica dependente do estado redox celular, e, o presente trabalho discute a modulação da câmara catalítica do 20SPT através da S-glutationilação de dois resíduos de cisteína localizados na subunidade $\alpha 5$, e as consequências desta modificação na função proteassomal.

Abstract

The proteasome is a multimeric and multicatalytic intracellular protease responsible for the degradation of proteins involved in cell cycle control, signaling processes, antigen presentation, and control of protein synthesis. It comprises a central catalytic unit called 20S (20SPT) and regulatory units (19S) coupled at one or both ends to form 26S (26SPT). The 26SPT recognizes and directs polyubiquitinated substrates targeted for proteolysis by an ATP-dependent mechanism. However, 20SPT is also active when dissociated from regulatory units, degrading proteins by a process independent of polyubiquitination and ATP consumption. Oxidatively modified proteins and other substrates are degraded in this manner. The 20SPT comprises two central heptameric rings (β) where are located the catalytic sites and two external heptameric rings (α) that are responsible for proteasomal gating. Previously, it was observed by our group that the 20SPT of yeast *S. cerevisiae* is modified by S-glutathionylation in the residues Cys76 and Cys221 of the $\alpha 5$ subunit. Thus, were obtained in this project strains of the *S. cerevisiae* carrying site-specific mutations in the $\alpha 5$ subunit of the 20SPT ($\alpha 5$ -C76S or $\alpha 5$ -C221S), and comparative assays as the structural and functional consequences of these mutations were performed. We observed an increase in capacity/speed of degradation in peptidase and proteolytic activity in the C221 strain and also that, the isolated population of the proteasome this strain presents the highest frequency of open catalytic chamber conformation, which is immediately closed by the removal of glutathione of the 20SPT in the presence of DTT. Opposite results were observed in the C76 strain. We identified by mass spectrometry the C76 residue of the 20SPT glutathionylated the C221 mutant. Phenotypic assays show an increased longevity and resistance to oxidative stress of C221, while the C76 strain showed a difficulty in growth. However, the S-glutathionylation of the 20SPT is a reversible post-translational chemical modification of physiological occurrence dependent on the cellular redox state, and this project discusses the modulation of the catalytic chamber of 20SPT via S-glutathionylation of the two cysteine residues located the $\alpha 5$ subunit, and the consequences of this change in proteosomal function.

Abreviaturas e Siglas

19SPT	Proteassomo 19S (unidade regulatória)
20SPT	Proteassomo 20S (unidade catalítica)
26SPT	Proteassomo 26S (unidade regulatória acoplada à catalítica)
ACN	Acetonitrila
ATP	Adenosina trifosfato
C221	Linhagem de <i>S. cerevisiae</i> com proteassomo com a mutação $\alpha 5$ -C221S
C221S	Proteassomo com a mutação $\alpha 5$ -C221S
C76	Linhagem de <i>S. cerevisiae</i> com proteassomo com a mutação $\alpha 5$ -C76S
C76S	Proteassomo com a mutação $\alpha 5$ -C76S
ChT-L	Atividade tipo-quimi tripsina do proteassomo
Cys	Resíduo de cisteína
Cys-SO ₂ H	Resíduo de cisteína oxidada a ácido sulfínico
Cys-SOH	Resíduo de cisteína oxidado a ácido sulfênico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DTT	1,4-Ditiotreitol
DUBs	Enzimas desubiquitinadoras
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ESI	Ionização por <i>Electrospray</i>
Grx	Glutarredoxina
GSH	Glutathiona
GSSG	Glutathiona oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IAA	Iodoacetamida
KAc	Meio de esporulação
kDa	Kilo dáltons
Lamp	Luria Bertani Medium com adição de ampicilina
LB	Luria Bertani Medium
LC (HPLC/UPLC)	Cromatografia líquida (Alta/Ultra Desempenho)
MALDI	Ionização por dessorção a laser auxiliada por matriz
<i>MAT</i>	Locus de determinação sexual em <i>S. cerevisiae</i>
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MS	Espectrometria de massas
PA	Atividade pós-acídica do proteassomo
PCR	Reação de polimerase em cadeia
pDNA	Ácido desoxirribonucléico plasmidial
PEG	Poli(et)ilenoglicol
<i>Pellet</i>	Sedimento celular
PTM	Modificação pós-traducional
PT-SG	Proteassomo glutatiolado <i>in vitro</i>
PT-YPD	Proteassomo nativamente glutatiolado extraído de YPD
SAXS	Small Angle X Ray Scattering
TBE	Tris/Borato/EDTA
TE	Tris-ácido etilenodiaminotetracético
TEL	Tris-ácido etilenodiaminotetracético lítio
TFA	Ácido trifluoracético
t-BOOH	tert-Butyl hidroperóxido
T-L	Atividade tipo-tripsina do proteassomo
Ub	Ubiquitina
UPS	Sistema ubiquitina-proteassomo
UV	Radiação ultravioleta
WO	Meio mínimo com glicose
YE _p	Plasmídeo episomal de levedura
YI _p	Plasmídeo integrativo de levedura
YPD	Peptona dextrose para levedura
YPEG	Peptona etanol glicerol para levedura

I. Introdução

As células eucarióticas possuem diversos mecanismos de regulação dos processos fisiológicos, que vão desde o controle da transcrição gênica ou da tradução de proteínas, até a modulação da degradação de proteínas pelos sistemas de proteólise. A proteólise intracelular está envolvida no controle de qualidade removendo proteínas aberrantemente sintetizadas, assim como as que tenham sido danificadas durante o metabolismo, além de participar da manutenção do conteúdo de aminoácidos e na geração de peptídeos ativos. Outro aspecto engloba a degradação de proteínas que variam a concentração ao longo do tempo, comumente relacionadas com vias regulatórias específicas. Portanto, para manter a funcionalidade e a viabilidade celular é importante que as proteínas adquiram uma conformação correta e caso contrário, proteínas deformadas, danificadas, modificadas ou proteínas que se tornaram "desnecessárias" devem ser reconhecidas e degradadas, pois o acúmulo de tais podem formar agregados proteicos que na maioria das vezes são tóxicos para a célula, devido à exposição de superfícies hidrofóbicas que se ligam e inibem a função das proteínas normais (KUBOTA, 2009). As chaperonas moleculares representam a primeira linha de defesa contra o acúmulo de proteínas deformadas contribuindo para o dobramento correto de proteínas recentemente sintetizadas inibindo a sua associação e/ou agregação com outras proteínas celulares. Quando isso não é possível, esses complexos de chaperonas selecionam tais proteínas para a degradação via interação direta com os componentes dos mecanismos de degradação (DING & YIN, 2008).

As duas principais vias de degradação descritas para a maioria das proteínas celulares em células eucarióticas são: o Sistema Ubiquitina-Proteassomo (UPS), responsável pela degradação 80-90% de proteínas, incluindo proteínas regulatórias, de curta duração, anormais, desnaturadas ou em geral, proteínas danificadas (ROCK *et al.*, 1994), e, o sistema de autofagia, responsável pela degradação da maior parte das proteínas de longa duração, proteínas agregadas, bem como organelas celulares (mitocôndrias, peroxissomos, ribossomos e organismos infecciosos). Assim, se a produção de proteínas deformadas excede a capacidade dos sistemas de degradação celular, monômeros e pequenos agregados são ativamente recolhidos em grandes agregados que, eventualmente, são degradados por autofagia (IWATA *et al.*, 2005; KIRKIN *et al.*, 2009; KOMATSU *et al.*, 2007; PANKIV *et al.*, 2007).

A proteólise intracelular – Do lisossomo ao proteassomo

Inicialmente acreditava-se que a célula era um sistema de estruturas estáveis e energeticamente econômicas até que, SCHOENHEIMER (1942) sugeriu a existência da degradação de proteínas intracelulares através de estudos realizados com marcação metabólica utilizando tirosina¹⁵ onde observou que as proteínas estavam em estado dinâmico, ou seja, eram constantemente sintetizadas e degradadas. De início foi difícil de aceitar bem como compreender a necessidade da proteólise intracelular, uma vez que o que estava em causa era a hidrólise de ligações peptídicas das proteínas que se pensava serem moléculas estáveis. Em meados de 1953 foi descrito o primeiro sistema de proteólise intracelular onde toda a atividade de degradação da célula foi atribuída à proteólise lisossomal no qual as proteínas endocitadas ou contidas em vesículas citoplasmáticas eram degradadas pelas enzimas hidrolíticas existentes no lisossomo (DE DUVE *et al.*, 1955). No entanto, esse sistema não mostrava a especificidade das proteínas direcionadas para serem degradadas, bem como a diferença entre as meias-vidas das proteínas encontradas dentro da célula. Concomitantemente, surge uma publicação qual mostra que a proteólise intracelular é dependente de energia metabólica, diferentemente do lisossomo (SIMPSON, 1953).

Durante um período de mais de duas décadas, evidências experimentais indicaram que a degradação de proteínas celulares sob determinadas condições fisiológicas era via não-lisossomal. Essa via alternativa denominada Sistema Ubiquitina-Proteassomo (UPS – Ubiquitin Proteasome System) foi descrita primeiramente por ETLINGER & GOLDBERG (1977) em reticulócitos de coelho (eritrócitos imaturos desprovidos de núcleo e organelas), onde observou a degradação proteica via dependência de ATP. Tomando vantagem do sistema proteolítico dependente de ATP anteriormente identificado em extratos de reticulócitos, HERSHKO *et al.* (1983) analisaram bioquimicamente o mesmo e identificaram que esse sistema era composto por uma série de enzimas capazes de marcar proteínas, conferindo especificidade às proteínas-substratos e sinalizando-as para posterior degradação. A proteína responsável pela marcação dos substratos para degradação foi denominada Ubiquitina (Ub), uma pequena proteína de 8,5 kDa, com 76 aminoácidos, altamente conservada evolutivamente e considerada ubíqua nos diversos reinos (SCHLENSINGER *et al.*, 1975; WILKINSON *et al.*, 1980). Em meados de 80 foi descrita a protease envolvida neste sistema, onde HOUGH *et al.* (1987) caracterizaram um complexo proteolítico de alto peso molecular encarregado da degradação de proteínas poliubiquitinadas. Esse complexo

protéico (constituído por várias cadeias peptídicas) recebeu diferentes denominações antes de ser definitivamente chamado de proteassomo (*proteasome* no inglês: *protea* de protease e *some* de soma, partícula), devido à sua alta massa molecular – 2000 kDa (ARRIGO *et al.*, 1988).

O Proteassomo

O proteassomo 20S (20SPT) é uma estrutura cilíndrica (11-12 nm de largura por 15-16 nm de comprimento e um estreito poro de 2-3 nm de diâmetro), formado pelo empilhamento de quatro anéis, sendo dois anéis heptaméricos externos do tipo α e dois anéis heptaméricos internos do tipo β , resultando em uma configuração α - β - β - α , com uma massa de aproximadamente 700 kDa. O 20SPT exibe configurações distintas entre arqueae e eucarionte (**Figura 1**) apresentando nos anéis α apenas um tipo de subunidade α , e, nos anéis β apenas um tipo de subunidade β . Diferentemente, nas células eucarióticas o 20SPT é constituído por 14 subunidades distintas, com pesos moleculares que variam de 22 a 34 kDa, sendo sete subunidades do tipo α em ambos os anéis α (α 1- α 7), bem como nas subunidades do tipo β , nos anéis β (β 1- β 7) (TANAKA, 2009).

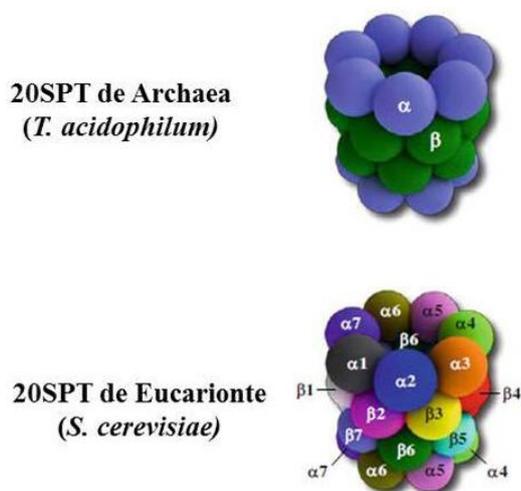


Figura 1. Proteassomo 20S de Archaea e Eucarionte. A parte superior da imagem ilustra um modelo simplificado do 20SPT de *T. acidophilum* (Arquea), e na parte inferior um modelo “mais evoluído” de 20SPT de *S. cerevisiae* (Eucarionte). As subunidades são representadas por esferas e codificadas por cores. O 20SPT de Archaea contém apenas um tipo de subunidades α (azul) e β (verde), dispostos em dois anéis heptaméricos homodiméricos empilhados na disposição α 7- β 7- β 7- α 7. Já o 20SPT de levedura e mamíferos mostra o mesmo arranjo de subunidades, mas contém em cada anel sete subunidades do tipo α e do tipo β diferentes, agrupadas em quatro anéis heterodiméricos α 1-7/ β 1-7/ β 1-7/ α 1-7. As diferentes subunidades mostram o mesmo código de cores como no modelo simplificado acima (Adaptado de JUNG *et al.*, 2009).

A abertura da câmara catalítica do 20SPT e conseqüentemente a entrada do substrato é regulada pelos anéis externos do tipo α , enquanto que nos anéis internos do tipo β , encontram-se os sítios catalíticos. As cadeias α embora cataliticamente inativas desempenham papel essencial na estabilização dos anéis das cadeias β e na formação estrutural do complexo 20S (KOPP *et al.*, 1997). As subunidades α possuem funções de ligação com os complexos reguladores, mas as regiões de contatos e os mecanismos de ligação não são totalmente conhecidos. O que se sabe é que modificações pós-traducionais regulam a atividade enzimática do 20S, a associação com os complexos reguladores e a abertura do anel através de mudanças conformacionais (BOSE *et al.*, 1999; IWAFUNE *et al.*, 2002; SILVA *et al.*; 2012) (**Figura 2a**). Além disso, o 20SPT foi caracterizado como uma protease multicatalítica, onde 3 subunidades tipo β possuem características específicas de cada sítio ativo, conferindo-lhes atividades catalíticas diferentes entre si, sendo responsáveis pela hidrólise dos substratos, atividade que pode ser atribuída aos resíduos proteolíticos de treonina N-terminal, qual age como um nucleófilo (COUX *et al.*, 1996; GROLL *et al.*, 1999; HEINEMEYER *et al.*, 1997; JUNG *et al.*, 2009; TANAKA, 2009). Assim, subunidades β 1 possuem atividade pós-acídica (P-A), clivando ligações preferencialmente após resíduos ácidos; subunidades β 2 possuem atividade tipo quimiotripsina (ChT-L), clivando ligações preferencialmente após resíduos hidrofóbicos; subunidades β 5 apresentam atividade tipo tripsina (T-L) e clivam ligações preferencialmente após resíduos básicos (**Figura 2b**). Os substratos variam em comprimento de 3-23 aminoácidos (BOCHTLER *et al.*, 1999; FAROUT *et al.*, 2000; VOGES *et al.*, 1999).

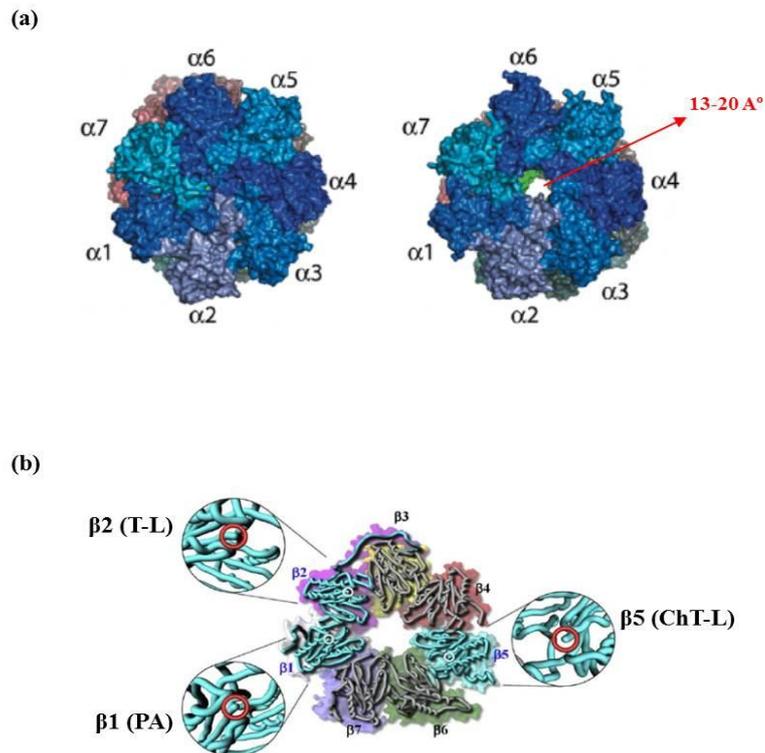


Figura 2. Anéis α e β e as subunidades do proteassomo 20S de eucarionte. (a) Vista frontal do anel α mostrando as subunidades $\alpha 1$ - $\alpha 7$ do 20SPT. A esquerda, as subunidades α do 20SPT regulando o fechamento da câmara catalítica, e, a direita ilustração da conformação aberta, como indicada pela seta em vermelho. (b) Vista frontal do anel β mostrando as subunidades $\beta 1$ - $\beta 7$ do 20SPT, em destaque as subunidades proteolíticas. Esta figura mostra a disposição das subunidades β encontradas no 'core' 20SPT, e a superfície molecular representada pela densidade eletrônica. As subunidades proteolíticas ativas $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ estão destacadas em azul claro, e as inativas em cinza. Os centros ativos são indicados por um anel branco ou vermelho, respectivamente. As imagens circulares mostram uma ampliação da área em torno da Thr1 (Adaptado de JUNG *et al.*, 2009).

Automontagem do proteassomo 20S

Como mencionado acima, o 20SPT de células procariontes consistem de homoligômeros formados por subunidades α e β , e estas subunidades podem se “montar” em proteassomos funcionalmente maduros sem a ajuda de qualquer proteína acessória (MAUPIN-FURLLOW *et al.*, 2006). Por outro lado, o 20SPT de eucariontes possui uma composição de subunidades mais complexa, sendo ambos os anéis α e β formados por 7 subunidades distintas, e, a sua montagem requer, principalmente, de múltiplas chaperonas. Assim, a montagem do 20SPT se inicia com a formação do anel α por quatro chaperonas conhecidas em levedura como Pba1-4 (*Proteasome Biogenesis Associated Protein*) em levedura, e, PAC1-4 (*Proteasome Assembly Chaperone*) em mamíferos (HIRANO *et al.*, 2005; LE TALLEC *et al.*, 2007; MURATA *et al.*, 2009; RAMOS & DOHMEN, 2008;

YASHIRODA *et al.*, 2008). Estas chaperonas formam um par de heterodímeros funcionais, Pba1/Pba2 (PAC1/PAC2) e Pba3/Pba4 (PAC3/PAC4), os quais possuem papéis em diferentes etapas no processo de automontagem, cooperando na montagem do anel α e do “meio-proteassomo” 15S. Contudo, essas chaperonas regulam o tempo de incorporação da subunidade, evitando o arranjo incorreto de subunidades, e, controlam o processamento dos propeptídeos presentes em algumas subunidades β .

Estudos de Pba3/Pba4 em levedura sugerem que essas chaperonas atuam na fase inicial do processo de automontagem do anel α , começando com a formação de um complexo terciário entre Pba3/Pba4 e a subunidade $\alpha 5$, auxiliando na ordenação e incorporação das subunidades α vizinhas. A análise estrutural do complexo Pba3/Pba4- $\alpha 5$ demonstrou a ligação de tais chaperonas à superfície do anel α numa posição em que as subunidades β são posteriormente inseridas. Assim, Pba3/Pba4 parece se dissociar da montagem intermediária do proteassomo quando a subunidade $\beta 4$ é incorporada, representando a sua ausência no intermediário 15S. Isto pode ser compreendido através do modelamento deste complexo com a subunidade $\alpha 5$ do 20SPT, onde mostra um impedimento estérico entre a subunidade $\beta 4$ e Pba3/Pba4 (YASHIRODA *et al.*, 2008) (**Figura 3a**). Uma importante função de Pba3/Pba4 é no controle da incorporação da subunidade $\alpha 3$ no proteassomo (KUSMIERCZYK *et al.*, 2008). Entretanto, na ausência da subunidade $\alpha 3$, uma segunda cópia da subunidade $\alpha 4$ toma o seu lugar em cada anel α (VELICHUTINA *et al.*, 2004).

As chaperonas diméricas Pba1/Pba2 se ligam as subunidades $\alpha 5$, $\alpha 6$ e $\alpha 7$ e também promovem a formação do anel α . Entretanto, Pba1/Pba2 não só auxilia na formação do anel α , mas também evita a prematura dimerização até que o 20SPT esteja completamente montado. Posteriormente a conclusão da automontagem do 20SPT, esse complexo de chaperonas é degradado pelo proteassomo recém-formado (HIRANO *et al.*, 2005). Curiosamente, essas chaperonas possuem um motivo C-terminal HbYX (hydrophobic-tirosina-aminoácido qualquer). O motivo HbYX é encontrado em um número de ativadores do proteassomo, onde ele é necessário para que consiga se ligar a bolsões formados entre subunidades α específicas (FORSTER *et al.*, 2005; LAM *et al.*, 2002; SADRE-BAZZAZ *et al.*, 2010). Assim, o C-terminal de Pba1 se liga entre os bolsões das subunidades $\alpha 5$ e $\alpha 6$, enquanto que o C-terminal de Pba2 interage com o bolsão entre $\alpha 6$ - $\alpha 7$ (**Figura 3b**).

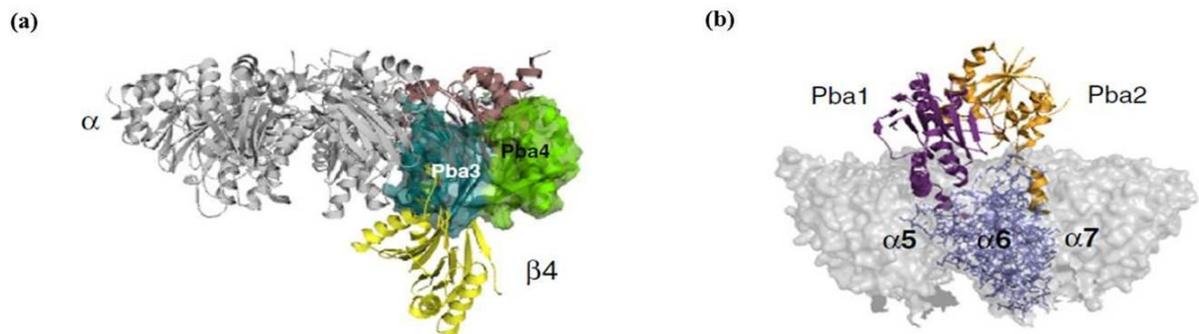


Figura 3. Associação das chaperonas Pba1-4 com as subunidades α do 20SPT. (a) Chaperonas Pba3 (azul) e Pba4 (verde) associadas com a subunidade α (roxo), mostrando que existe um impedimento estérico com a subunidade β 4 (amarelo), a menos que Pba3/4 se dissocie antes desta subunidade ser incorporada ao 20SPT. **(b)** Chaperonas Pba1 (roxo) e Pba2 (laranja) interagem com os “bolsões” das subunidades α 5, α 6 e α 7 (cinza) através do motivo C-terminal HbYX. Estas imagens foram feitas usando PyMOL usando estruturas elucidadas nas referências (TOMKO & HOCHSTRASSER, 2013).

Subsequentemente a automontagem do anel α , as subunidades β são incorporadas sobre o anel α em suas posições específicas e em uma ordem definida. Contudo, durante a montagem do anel β um complexo intermediário denominado 15S (ou “meio-proteassomo”) é formado, o qual consiste de um anel α e de subunidades β não processadas (LI *et al.*, 2007). Em levedura, a automontagem do anel β envolve a ação de outra chaperona, a Ump1 (hUMP1 ou POMP1 em humanos), responsável pela verificação da incorporação correta das subunidades durante o processo de montagem, inibindo a dimerização do “meio-proteassomo” até que a última subunidade β (β 7) seja incorporada ao mesmo. Entretanto, a dimerização prematura poderia dificultar a incorporação de β 7 bem como de outras subunidades dentro do complexo, gerando um proteassomo imaturo ou mesmo cataliticamente inativo. A dimerização do “meio-proteassomo” forma o preholoproteassomo que ainda é imaturo. Muitas proteases são sintetizadas com propeptídeos que são posteriormente processados para permitir a formação dos seus locais catalíticos ativos. A função para estes propeptídeos do proteossomo é proteger os resíduos do local ativo de $N\alpha$ -acetilação. Portanto, os propeptídeos são processados e conseqüentemente removidos após dois “meio-proteassomo” terem se emparelhado, impedindo assim o acesso de $N\alpha$ -acetiltransferases (ARENDDT & HOCHSTRASSER, 1997 e 1999). Finalmente, a maturação do 20SPT ocorre através do processamento autocatalítico do propeptídeo das subunidades β , seguida da degradação de Ump1. O complexo Pba1/2 também é liberado após a maturação. Este processo produz um 20SPT funcional para a degradação de proteínas. A **Figura 4** mostra um esquema do processo de automontagem do 20SPT.

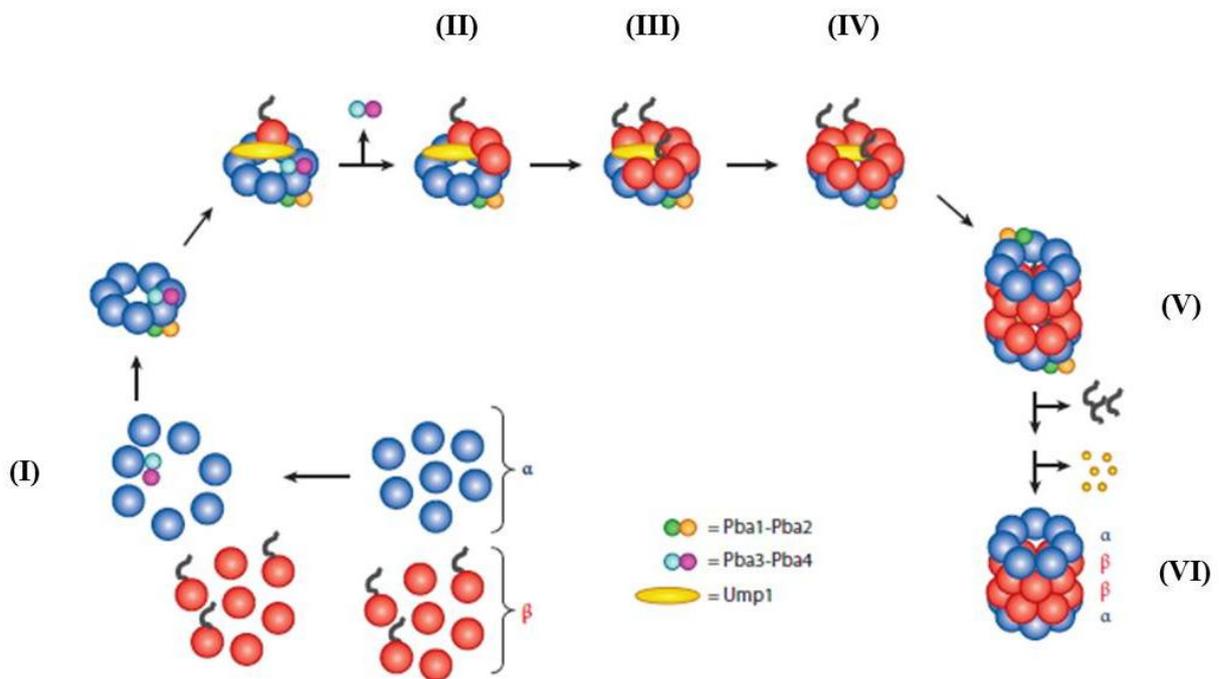


Figura 4. Automontagem do 20SPT de levedura. Ilustração esquemática da montagem do 20SPT: **(I)** As subunidades α (azul) e β (vermelho) com propeptídeos são sintetizadas como polipeptídeos livres. Um anel α é inicialmente formado com o auxílio de Pba3/4 (azul e rosa) que interagem especificamente com a subunidade α_5 ; **(II)** O intermediário 15S contém um anel α completo, as subunidades $\beta_2, \beta_3, \beta_4$, e, outras duas chaperonas que auxiliam na montagem, Pba1/2 (verde e laranja) e Ump1 (amarelo); **(III)** O intermediário é composto por um conjunto completo de subunidades, exceto a subunidade β_7 ; **(IV)** O “meio proteassomo” tem um anel completo α e β , mas ainda está associado com Pba1/2 e Ump1; **(V)** A dimerização do intermediário forma o preholoproteassomo que ainda é imaturo; **(VI)** A maturação do 20SPT se dá pelo processamento autocatalítico do propeptídeo das subunidades β e a degradação da chaperona Ump1. Pba1/2 também é liberado após a maturação. Este processo produz um 20SPT funcional para a degradação de proteínas (TOMKO & HOCHSTRASSER, 2013).

Regulação do proteassomo 20S

O complexo regulatório mais abundante do 20SPT é a unidade 19S, que pode ser dividida em dois subcomplexos: a tampa e a base. Ambas estão relacionadas com o reconhecimento de substratos poliubiquitinados, desdobramento das proteínas-alvo, desubiquitinação do substrato, abertura da câmara catalítica e a translocação de substrato para o interior do 20SPT (GLICKMAN *et al.*, 1998; NAVON & GOLDBERG, 2001). A tampa é formada por nove subunidades não-ATPase (Rpn3, Rpn5-9, Rpn11, Rpn12 e Rpn15) e a base consiste de seis subunidades ATPase (Rpt1-6) e 2 subunidades não-ATPase (Rpn1 e Rpn2). A subunidade Rpn10 parece existir na interface dos subcomplexos tampa e base, e a Rpn13 está associada com a Rpn2 (JUNG & GRUNE, 2013) (**Figura 5**).

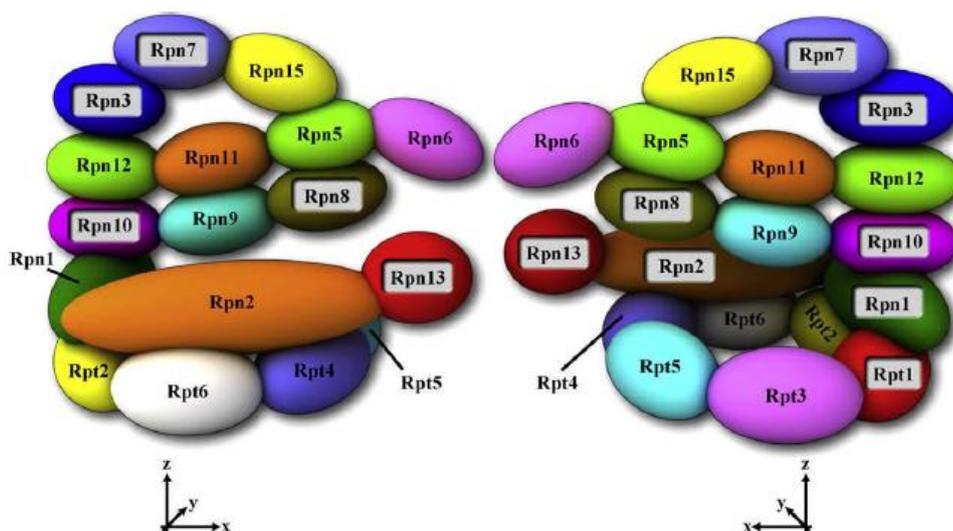


Figura 5. Unidade regulatória 19S. Ilustração esquemática da disposição das subunidades da unidade regulatória 19S. Estas duas imagens mostram uma estrutura de modelo simplificado do 19S, onde a montagem das subunidades pode ser observada em dois ângulos diferentes (JUNG *et al.*, 2009).

Em células eucarióticas, o proteassomo 26S é responsável pela degradação de proteínas marcadas com uma cauda de poliubiquitina, e, pode ser encontrado no citoplasma e no núcleo de células eucarióticas. Entretanto, sua abundância nestes compartimentos é muito variável (COUX *et al.*, 1996; JUNG *et al.*, 2009; PALMER *et al.*, 1996; RIVETT *et al.*, 1992; WIGLEY *et al.*, 1999). Ele é composto por uma unidade catalítica central denominada 20SPT, que pode estar ou não flanqueada a uma ou em ambas as extremidades por unidades regulatórias associadas em orientações opostas através da interação com as subunidades α , modulando assim a atividade do proteassomo (GROLL *et al.*, 2005; NICKELL *et al.*, 2009).

Esta via proteolítica dependente de ATP e ubiquitina (Ub) é composta por uma série de enzimas capazes de marcar proteínas, sinalizando e direcionando-as para a degradação. Esta marcação confere a especificidade aos substratos que posteriormente serão reconhecidos por um complexo protéico que promoverá a degradação destas proteínas (NANDI *et al.*, 2006). A Ub, responsável pela marcação dos substratos para degradação, é uma pequena proteína de 8,5 kDa, com 76 aminoácidos, altamente conservada evolutivamente, considerada ubíqua nos diversos reinos (SCHLENSINGER *et al.*, 1975; WILKINSON *et al.*, 1980), sendo encontrada como um monômero e também conjugada a outras proteínas por uma ligação covalente entre seu C-terminal e uma lisina da proteína que será marcada. Esse complexo que inclui a unidade catalítica 20S e as unidades regulatórias 19S é denominado proteassomo 26S, com 2500 kDa, que possui atividade catalítica dependente de ATP e ubiquitina, como mencionado acima

(BAUMEISTER & LUPAS, 1997; TANAKA, 1998). É um complexo protéico grande, com 45 nm de comprimento e 20 nm de largura, sendo composto por 32–34 subunidades distintas, sendo 14 subunidades no núcleo catalítico 20S e 18–20 no complexo regulatório 19S (VOGES *et al.*, 1999).

O sistema ubiquitina-proteassomo (UPS) é dependente de ATP, tanto para a etapa de marcação da proteína alvo com ubiquitina quanto na etapa de desdobramento e translocação do substrato para a câmara catalítica. As proteínas são marcadas em um processo chamado ubiquitinação, este essencial para a degradação de proteínas que têm os níveis regulados constitutivamente ou em resposta a mudanças no ambiente (WEISSMAN, 2001). A via de ubiquitinação protéica foi descoberta uma década antes da caracterização da protease responsável pela hidrólise das proteínas ubiquitinadas (CIECHANOVER *et al.*, 1978; HERSHKO *et al.*, 1979; HERSHKO *et al.*, 1983), e consiste numa modificação pós-traducional reversível que ocorre na formação de uma ligação isopeptídica entre a ubiquitina e a proteína-substrato, e, envolve pelo menos a ação de três classes de enzimas: E1, E2 e E3, como discutidas resumidamente a seguir. A **Figura 6** ilustra etapas desse processo, onde envolve a ação conjunta de enzimas conhecidas como E1 (ativadora de ubiquitina) que, a custa de ATP ativa a molécula de ubiquitina transferindo-a para as E2's (proteínas conjugadoras de ubiquitina) as quais preparam a ubiquitina para conjugação, e então interagem com diversas E3's (ubiquitina-ligases), culminando na ligação de múltiplas ubiquitinas a um resíduo de lisina da proteína que será degradada.

Existem dois tipos principais de E3: a RING (*Really Interesting New Gene*) e a HECT (*Homologous to E6AP Carboxy Terminus*). A principal diferença entre tais está no modo de interação com o substrato, ou seja, as E3's ligases do tipo RING catalisam a transferência da ubiquitina diretamente da E2 para o substrato, enquanto que nas E3's do tipo HECT a transferência da ubiquitina ocorre inicialmente para o domínio HECT deste grupo de E3 e, em seguida, deste domínio para o substrato. Após a adição da primeira ubiquitina, novas moléculas de ubiquitina são inseridas nas moléculas já existentes, formando uma cadeia de poliubiquitina que atuará como sinal de reconhecimento para degradação pelo 26SPT (HATAKEYAMA & NAKAYAMA, 2003).

A elucidação de como ocorre o processo de degradação celular de proteínas mediado por cadeias de poliubiquitina laureou três pesquisadores com o Prêmio Nobel de Química de 2004: Aaron Ciechanover, Avram Hershko e Irwin Rose, que conjuntamente desvendaram esse sistema. Esses três componentes enzimáticos são necessários para ligar a cadeia de

ubiquitina nas proteínas destinadas à degradação, embora a seletividade da reação dependa do par de E2-E3, que é capaz de reconhecer, interagir e conjugar ubiquitina para substratos de proteínas específicas (CIECHANOVER, 2005; GLICKMAN & CIECHANOVER, 2002; HERSHKO & CIECHANOVER, 1998; HIRSCH & PLOEGH, 2000). O genoma humano codifica duas isoformas de E1, mais de 30 isoformas de E2s, e, mais de 1000 E3s, enquanto que o genoma de levedura codifica uma E1, onze E2s, 60-100 E3s e 20 DUBs (enzimas desubiquitinadoras) (FINLEY *et al.*, 2012; PICKART & EDDINS, 2004). A existência de enzimas E4's, responsáveis pela prolongação da cadeia de ubiquitina ainda está em discussão. Como mencionado acima, a ubiquitinação proteica é um processo reversível, participando deste também as DUBs que desempenham um importante papel na proteólise ubiquitina-dependente, catalisando a remoção da ubiquitina das proteínas (PICKART & COHEN, 2004). Assim, as moléculas de ubiquitinas são liberadas no citosol durante a degradação do substrato na forma de cadeias de poliubiquitinas, as quais são decompostas a moléculas únicas de Ub pelas DUBs, a fim de evitar uma competição dessas cadeias de Ub com os substratos poliubiquitinados (AMERIK & HOCHSTRASSER, 2004).

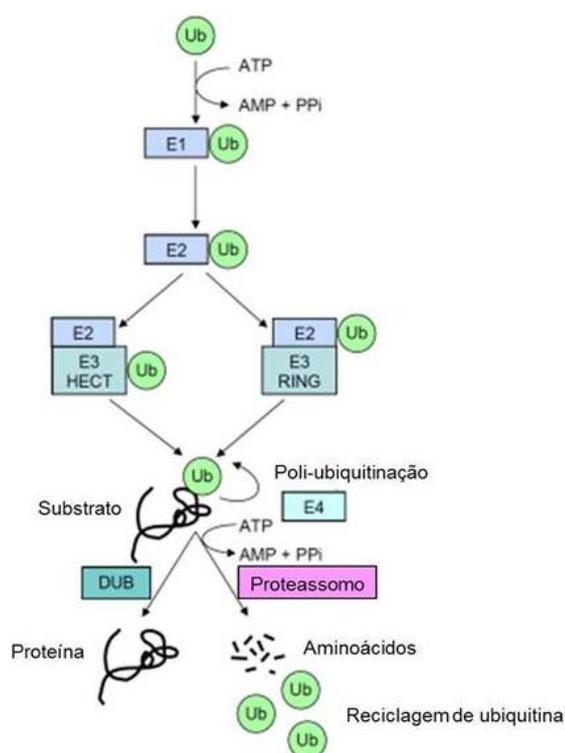


Figura 6. Via de ubiquitinação proteica. Representação esquemática dos principais processos enzimáticos da via proteolítica dependente de ubiquitina/proteassomo. Ub – ubiquitina; E1 – enzima ativadora de Ub; E2 – enzima conjugadora de Ub; E3 – ligase de Ub–proteína; E4 – enzima prolongadora de Ub; DUB – enzima desubiquitinadora (Adaptado de LILIENBAUM, 2013).

A ubiquitina pode se ligar a proteína-substrato de diversas maneiras gerando um amplo repertório de sinais com diferentes topologias e comprimentos, podendo ser posteriormente reconhecidas por outras proteínas e, então encaminhadas a diferentes vias funcionais. O destino das proteínas-substrato parece ser determinado pelo número de ubiquitinas ligadas e o tipo de ligações entre estas (**Figura 7a**). Assim, a Ub se liga no grupo ϵ -NH₂ de resíduos de lisina na proteína-substrato pelo resíduo C-terminal na sua última glicina (resíduo 76), modificando a proteína-substrato pela adição de uma única molécula de Ub (monoubiquitinação), ou pela adição de várias moléculas de Ub em diferentes resíduos de lisina presentes na proteína-substrato (monoubiquitinação múltipla). Entretanto, este sinal pode ser prolongado pela adição de outras moléculas de ubiquitina, por um mecanismo chamado poliubiquitinação (LILENBAUM, 2013).

Inicialmente, a conjugação de cadeia de poliubiquitina a uma proteína-substrato foi caracterizada como um sinal para degradação da proteína, que ainda parece ser um papel dominante (HERSHKO *et al.*, 1980). Entretanto, a poliubiquitinação pode desencadear funções múltiplas, dependendo de qual resíduo de lisina na sequência de ubiquitina é usado para prolongar a cadeia (CHEN & SUN, 2009; KOMANDER, 2009; SPENCE *et al.*, 1995). Além da poliubiquitinação homogênea podem ocorrer tipos mistos de adição de ubiquitina utilizando diferentes resíduos de lisina na mesma cadeia linear, ou múltiplas cadeias ramificadas em vários resíduos de lisina em um polipeptídeo de ubiquitina ou proteína-substrato, como ilustrado na **Figura 7b e 7c**, respectivamente. A metionina N-terminal da ubiquitina também pode se ligar a glicina C-terminal, gerando uma cadeia linear.

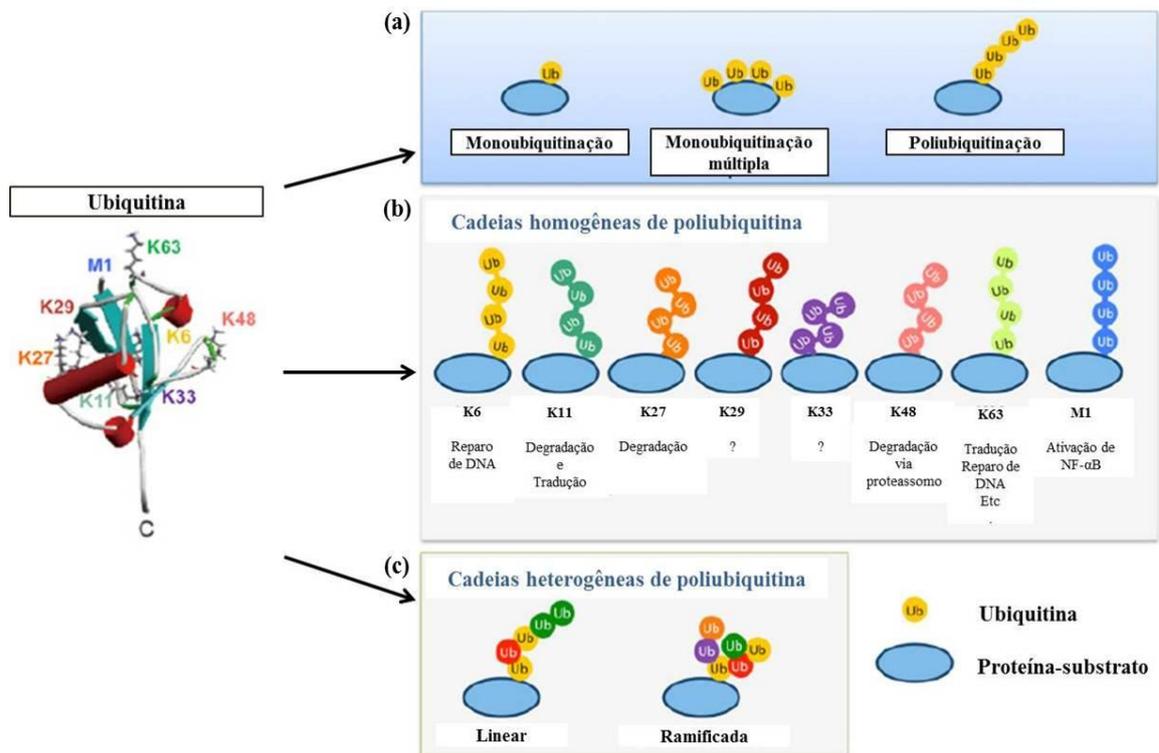


Figura 7. Variações nas ligações de ubiquitina e os seus papéis biológicos. À esquerda, estrutura secundária da molécula de Ub mostrando os seus 3 segmentos em α -hélice, 5 em folhas β , e, a distribuição dos sete resíduos de lisina. **(a)** Diferentes mecanismos de ligação da Ub a proteína-substrato: monoubiquitinação, monoubiquitinação múltipla e poliubiquitinação. **(b)** e **(c)** Modificações e tipos de cadeias de poliubiquitinação marcando as proteínas que serão encaminhadas a diferentes vias funcionais, de acordo com o número de ubiquitinas ligadas e o tipo de ligações entre estas.

Outros complexos proteicos regulatórios do 20SPT já foram descritos (ilustrados na **Figura 8**), como o proteassomo 11S ou PA26 envolvido na geração de peptídeos para a apresentação antigênica em associação ao imunoproteassomo (HILL *et al.*, 2002; LI & RECHSTEINER, 2001). Sua formação pode ser induzida por IFN- γ , TNF- α , ou lipopolissacarídeos (NELSON *et al.*, 2000). Neste caso, ao invés das subunidades proteolíticas constitutivas (β 1, β 2 e β 5) do proteassomo 20S constitutivo (c20SPT), as formas induzíveis (i β 1, i β 2, e i β 5) são usadas durante a síntese do proteossomo. Portanto, a principal função do imunoproteassomo é a produção de pequenos oligopeptídeos com C-terminal hidrofóbico, que podem ser apresentados por moléculas MHC-I (*Immuno histocompatibility complex-I*) sobre a superfície da célula. Após o reconhecimento de antígenos desconhecidos por células CD8^T, a célula de apresentação é destruída. Assim, a célula é capaz de responder rapidamente a patógenos ou processos inflamatórios. Como o proteassomo constitutivo, o imunoproteassomo é capaz de degradar substratos (já desdobrados ou desestruturados) de forma independente de ATP. O proteassomo 11S é formado também por anéis heptaméricos

que estimulam a hidrólise de peptídeos via estabilização de uma conformação aberta do 20SPT (FORSTER *et al.*, 2003 e 2005). O 11S induz a atividade do proteossomo significativamente: a atividade $\beta 2$ é aumentada 10 vezes, e, tanto $\beta 1$ e $\beta 5$ 50 vezes cada (DI, 1992; KUEHN & DAHLMANN, 1996). Ainda, a ligação de ambos os reguladores 11S e 19S em cada extremidade do 20SPT forma o tipo "híbrido" (19S-20S-11S), capaz de degradar de maneira dependente e independente de ATP, o que contribui para uma ampla variedade de oligopeptídeos para a apresentação de MHC-I.

Em levedura, um sistema regulatório do 20SPT é o Blm10, relacionado ao PA200 de mamíferos. O Blm10 é uma proteína de aproximadamente 250 kDa sem função fisiológica muito bem caracterizada, entretanto, quando associada ao proteossomo promove a estimulação da degradação de peptídeos (SADRE-BAZZAZ *et al.*, 2010). Outra proteína regulatória do 20SPT é a Ecm29. Acredita-se que essa estabilize o complexo 26SPT. Entretanto, em resposta ao estresse oxidativo, Ecm29 desempenharia um papel fundamental no desacoplamento das unidades 19S e 20S associando-se especificamente com o 19S (PARK *et al.*, 2011). No entanto, o mecanismo exato bem como a sua função permanecem incertos.

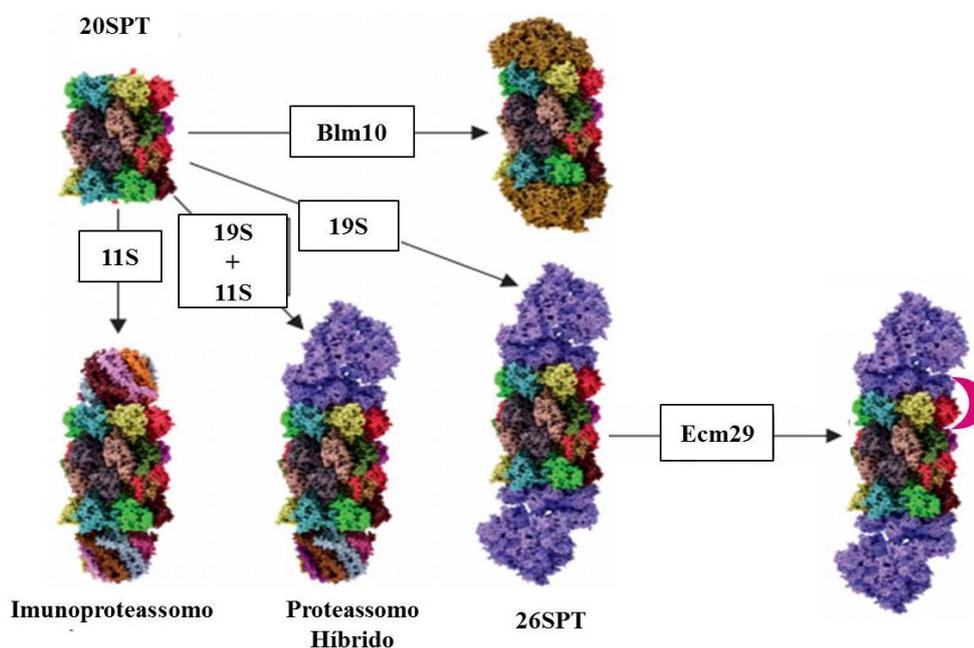


Figura 8. Proteínas regulatórias do proteossomo 20S. Ilustração das possíveis formas de interações do 20SPT com as proteínas regulatórias: 11S (imunoproteassomo), 19S (26SPT), Blm10 e Ecm29. Note que, além do 20SPT de células eucarióticas poder se ligar a diferentes complexos regulatórios, às vezes o mesmo pode se ligar a diferentes reguladores ao mesmo tempo em cada extremidade, como por exemplo: 19S-20S-11S ("híbrido") (JUNG & GRUNE, 2013).

Apesar de diversos complexos e proteínas regulatórias serem capazes de se associarem ao 20SPT, as células de mamíferos e leveduras possuem mais de 20-30 % do proteassomo destituído de subunidades regulatórias, não sendo capaz de reconhecer e degradar proteínas poliubiquitinadas (BABBITT *et al.*, 2005). Alternativamente, o 20SPT livre é capaz de degradar de maneira independente de ATP e ubiquitina os substratos desestruturados, como por exemplo, as proteínas oxidadas (ASHER *et al.*, 2005; INAI & NISHIKIMI, 2002; SHRINGARPURE *et al.*, 2003). Trabalhos já mostraram que o 20SPT pode clivar >20% de proteínas intracelulares, iniciando o processamento do polipeptídeo em regiões desordenadas, incluindo domínios internos (BAUGH *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2003). Tais proteínas podem ser oxidadas durante o ciclo catalítico de enzimas, durante processos sinalizadores, e, durante condições de desafios e estresses oxidativos. Assim, certas modificações na proteína incorrem em perda de estrutura secundária e terciária, bem como em aumento de hidrofobicidade superficial, fatores responsáveis pelo reconhecimento das proteínas-alvo pelo 20SPT.

O processo de oxidação de proteínas é um fenômeno permanente presente em todas as células ocorrendo principalmente durante condições de desafios e estresses oxidativos (DAVIES, 2000; FERRINGTON *et al.*, 2001). Embora a degradação de proteínas danificadas oxidativamente possa ocorrer tanto pelo 26SPT quanto pelo 20SPT vários estudos sugerem que o 20SPT pode ser mais crítico para a remoção das mesmas (BREUSING & GRUNE, 2008; DAVIES, 2001; JUNG & GRUNE, 2008; PICKERING *et al.*, 2010). Tudo indica que as proteínas oxidadas não dependem de poliubiquitinação para serem reconhecidas e degradadas pelo proteassomo (BAUGH *et al.*, 2009; INAI & NISHIKIMI, 2002; SHRINGAPURE *et al.*, 2003). Assim, a degradação seletiva pelo proteassomo 20S de proteínas oxidadas tem sido intensamente investigada e proposta como defesa antioxidante celular (DAVIES, 2001; PACIFICI & DAVIES, 1990; VARSHAVSKY, 2005).

O mecanismo pelo qual as proteínas oxidadas interagem com o 20SPT não está claro. No entanto, acredita-se que o aumento da hidrofobicidade superficial dessas proteínas parece ser uma característica importante para permitir a interação proteína-20SPT e consequente degradação (PACIFICI *et al.*, 1993). A degradação através do proteassomo produz pequenos peptídeos, a maioria dos quais são rapidamente hidrolisados por peptidases citosólicas a aminoácidos, exceto alguns deles com papel imunológico (KNECHT *et al.*, 2009).

O acúmulo de proteínas oxidadas devido ao aumento do processo oxidativo quanto ao decréscimo de sua remoção está fortemente associado ao processo de envelhecimento e subjacente à patogênese de diversas doenças neurodegenerativas (BUTTERFIELD *et al.*,

2006; STADTMAN, 2006). Contudo, as condições não reguladas de oxidação levam ao dano protéico com possível desestruturação e perda de função. Portanto, se a remoção destas proteínas não ocorre rapidamente, seu acúmulo pode acarretar em grande citotoxicidade, levando até mesmo à morte celular (COSTA *et al.*, 2007; DUNLOP *et al.*, 2009). Contudo, a remoção dessas proteínas danificadas oxidativamente é considerada uma defesa antioxidante e preventiva de agregação proteica (DAVIES, 2001; JUNG, *et al.*; 2009; VARSHAVSKY, 2005).

Regulação do proteassomo 20S por modificação pós-traducional

Algumas proteínas são frequentemente modificadas posteriormente a sua tradução, e em muitos casos, adquirem a sua função intrínseca mediante a tal modificação ocorrida. Assim, modificações pós-traducionais (PTMs) podem regular as funções das proteínas alterando as suas estruturas e propriedades físico-químicas (MANN & JENSEN, 2003; WITZE *et al.*, 2007) incluindo a sua atividade bioquímica, a localização intracelular e as interações proteína-proteína. Portanto, a identificação e caracterização de PTMs são importantes para a determinação da função de proteínas bem como para a compreensão de como as proteínas são reguladas em vários ambientes celulares.

Já foram descritas várias PTMs ocorridas no 20SPT de diversos organismos, e apesar de identificadas, muitas ainda não possuem função fisiológica conhecida. Existem interpretações e alguns dados indiretos de que essas modificações estejam correlacionadas com a modulação da atividade proteolítica, manutenção da meia-vida da unidade 20S e no processo de associação das subunidades para a montagem do 20SPT (processo de “*assembly*” ou automontagem). Embora a maioria das PTMs identificadas *in vivo* tenham sido descritas inicialmente em baixas concentrações, as limitações das técnicas e no uso da espectrometria de massa dificultavam as identificações das PTMs nas subunidades devido à baixa abundância de peptídeos modificados em oposição a peptídeos não modificados, e também à baixa eficiência de ionização dos peptídeos modificados em um espectrômetro de massa, necessitando assim de técnicas mais sensíveis para a detecção (KIKUCHI *et al.*, 2010). Contudo, o desenvolvimento e aperfeiçoamento da espectrometria de massa e das técnicas associadas para PTMs facilitaram a identificação e análise de várias PTMs.

Dentre as PTMs descritas ocorridas nas subunidades do 20SPT está a fosforilação, onde um grupo fosfato se liga a resíduos de serina, treonina, e/ou tirosina de proteínas, formando diferentes fosfoproteínas. Assim, as proteínas podem mudar o seu modo de interação com outras proteínas ou ligantes. Contudo, essa PTM desempenha um papel importante na transdução de sinal inter e intracelular, sendo também uma reação reversível que envolve a ação de proteínas quinases e fosfatases, e o tempo de reação pode variar de acordo com a situação. IWAFUNE *et al.* (2002) identificaram no 20SPT de levedura as subunidades $\alpha 2$, $\alpha 4$ e $\alpha 7$ fosforiladas, apresentando-se em múltiplos spots em análise por 2-DE sendo posteriormente reduzidas a um único spot após o tratamento com fosfatase alcalina. Além disso, o tratamento do proteossomo com a fosfatase alcalina aumentou o valor da constante cinética (K_m) para a atividade tipo-quimiotripsina, indicando a fosforilação como detentora de um papel regulatório da atividade proteossomal. Posteriormente, IWAFUNE *et al.*, 2004 identificaram três resíduos suscetíveis a esta modificação na subunidade $\alpha 7$ (Ser258, Ser263 e Ser264). A fosforilação da subunidade $\alpha 7$ é regulada negativamente por ação de interferon- γ , diminuindo a quantidade de 26S e aumentando os níveis do imunoproteossomo. No entanto, apesar de não ser essencial na montagem do 26SPT, a fosforilação desta subunidade parece estar envolvida na estabilização do complexo (BOSE *et al.*, 2004).

Outra PTM é a acetilação N-terminal de algumas subunidades do 20SPT. KIMURA *et al.* (2000 e 2003) investigaram a acetilação do 26SPT na levedura *S. cerevisiae* e encontraram todas as subunidades α acetiladas no N-terminal, bem como as subunidades $\beta 3$ e $\beta 4$. Além disso, descreveram enzimas responsáveis por essa modificação. Em células de mamíferos, as subunidades $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 3$, e $\beta 4$ também foram descritas como acetiladas (GOMES *et al.*, 2006). Essa conservação em leveduras e mamíferos da acetilação N-terminal das subunidades $\alpha 2$, $\alpha 5$ e $\alpha 7$, bem como das duas subunidades β , sugere um possível papel funcional desta modificação durante a associação do 20SPT. Entretanto, o papel da N α -acetilação no 20SPT continua a ser identificado.

Além das PTMs citadas acima, algumas subunidades do 20SPT também sofrem o processo de glutationilação, que é formação de dissulfeto misto entre a glutathiona e resíduos de cisteína de proteínas. Descrita originalmente como um resultado do estresse oxidativo (ZIEGLER, 1985), a S-glutathionilação foi posteriormente reconhecida como uma PTM que pode desempenhar importantes funções regulatórias (DALLE-DONNE *et al.*, 2009; GALLOGLY & MIEYAL, 2007; HILL & BHATNAG, 2012), como será abordado abaixo.

Glutationa e a glutationilação do proteossomo

A glutaciona (GSH) é o mais abundante e versátil tiol de baixo peso molecular na célula. É um tri-peptídeo (γ -GluCysGly) encontrado em algumas eubactérias e em todos os organismos eucarióticos, incluindo vegetais e fungos. A ligação γ -glutamil da GSH é resistente ao ataque por peptidases intracelulares, permitindo que o peptídeo se acumule nas células em concentrações elevadas (1-10 mM) (SIES, 1999). Existe em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), sendo um dos principais tampões redox intracelulares, atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, como na manutenção da homeostase redox, estando envolvida no sequestro de radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além de suprir de equivalentes redutores, diversas enzimas como glutaciona peroxidase (Gpx) e glutarredoxinas (Grx) (MEYER & HELL, 2005; POCSI *et al.*, 2004). O metabolismo de GSSG envolve ainda sua redução pela ação da enzima Glutaciona Redutase (GR) que utiliza NADPH como equivalente redutor, recuperando o conteúdo de GSH, sendo que a razão entre GSH:GSSG é um dos fatores determinantes do estado redox intracelular (JONES *et al.*, 2002).

Entretanto, nos últimos 10 anos, a investigação sobre a S-glutacionilação de proteínas foi intensificada devido à maior compreensão sobre o papel de ROS e das espécies derivadas de NO na transdução de sinal e, provavelmente também, pela reversibilidade desse processo (GUTSCHE *et al.*, 2009; KLATT & LAMAS, 2000). Além da adição de glutaciona em proteínas ser um processo antioxidante no qual as sulfidrilas protéicas são protegidas de hiperoxidações irreversíveis através da formação de dissulfetos mistos com a glutaciona servindo como transdutor de sinal redox, a S-glutacionilação também é vista como uma importante PTM, atuando de maneira regulatória sobre a atividade de diversas enzimas (GHEZZI, 2005; GIUSTARINI *et al.*, 2004; HOLMGREN, 1989; SHELTON & MIEYAL, 2008). Assim, a célula ao se recuperar do estresse, reduziria os dissulfetos mistos por processos enzimáticos regenerando as sulfidrilas protéicas (GILBERT, 1995). Portanto, inúmeras proteínas podem ser glutacioniladas devido a mudanças no ambiente redox intracelular, como chaperonas, fatores de transcrição, proteínas do citoesqueleto, reguladores de ciclo celular e enzimas intermediárias do metabolismo (LIND *et al.*, 2002).

A formação do dissulfeto misto entre os resíduos de cisteína protéicos e a glutaciona pode ocorrer por diferentes vias de acordo com o estado redox da sulfidrilas de ambos. Os mecanismos mais relevantes fisiologicamente estão demonstrados na **Figura 9**, onde a

glutathionilação pode ocorrer pela reação direta de GSSG com Cys protéicas reduzidas (-SH), mecanismo que supostamente ocorre quando a razão GSH/GSSG intracelular diminui a níveis críticos (**reação 1**). Alternativamente, a glutathionilação por glutathiona reduzida (GSH) pode ocorrer após a oxidação da sulfidrila por espécies reativas do oxigênio (ROS) formando intermediários não radiculares como o ácido sulfênico (-SOH, **reação 2**), este altamente reativo (CLAIBORNE *et al.*, 2001; NETTO *et al.*, 2007), fator que rapidamente poderia tornar o resíduo de cisteína susceptível a S-glutathionilação. A glutathionilação por GSH também pode ocorrer pela reação com a cisteína na forma de nitrosotiol (-SNO, **reação 3**) (DEMASI *et al.*, 2014 – revisão apresentada em anexo IV).

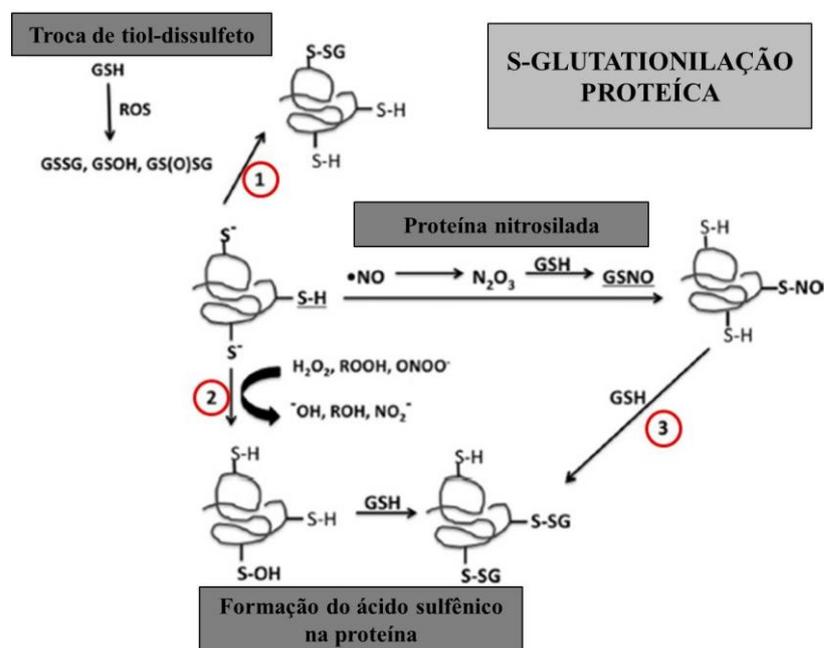


Figura 9. Principais mecanismos de S-glutathionilação de proteínas. (1) descreve o mecanismo clássico de S-glutathionilação proteica. Este mecanismo causa modificação através da troca de tiol-dissulfeto. A formação pode ser desencadeada por um aumento no pool de GSSG (ou GSOH e GS(O)SG) mediada pela formação intensificada de ROS; (2) descreve os mecanismos com base na formação do ácido sulfênico na proteína através da reação com peróxidos ou peroxinitrito seguido pela reação com GSH. Outros oxidantes fisiológicos, por exemplo, ácido hipocloroso ou derivados de cloramina podem também oxidar os grupos tiol para formar o ácido sulfênico (GUPTA & CARROLL, 2014); (3) descreve os mecanismos baseados em proteína nitrosilada que são formadas através da reação com intermediários do metabolismo de NO (Adaptado de DEMASI *et al.*, 2014).

A descrição da S-glutathionilação no 20SPT se deu primeiramente em células de mamíferos (epitélio hepático de ratos) incubadas com inibidores irreversíveis e específicos do proteassomo como lactacistina, NLVS e β -lactona. Observaram também que preparações de 20SPT purificadas de eritrócito humano e de eritroblasto de coelho possuíam atividade ChT-L, porém não a T-L, modulável pela incubação com GSH, GSSG e cisteína. A modulação da

atividade do proteassomo por GSH e GSSG *in vitro*, foi interpretada como fenômeno consequente da glutathionilação do 20SPT (DEMASI *et al.*, 2001).

Posteriormente, foi descrito o mecanismo *in vitro* pelo qual ocorre o processo de S-glutathionilação do 20SPT de levedura *S. cerevisiae*. Os resultados deste trabalho demonstraram que durante o estresse oxidativo, resíduos de cisteínas do 20SPT podem ser oxidados para Cys-SOH seguido de S-glutathionilação pela forma reduzida da glutathiona. Assim, acredita-se que o mecanismo de glutathionilação do 20SPT inclui a formação do intermediário ácido sulfênico em suas sulfidrilas e esta modificação causa diminuição da atividade ChT-L *in vitro*. Células de levedura desafiadas com peróxido de hidrogênio revelaram a presença de glutathiona incorporada ao 20SPT, demonstrando a provável ocorrência do fenômeno *in vivo*, dependente do estado redox celular. A glutathionilação do 20SPT de levedura também inibiu a atividade ChT-L, porém, não alterou a atividade T-L (DEMASI *et al.*, 2003).

Em trabalho publicado pelo nosso grupo, SILVA *et al.* (2012) descreveram os mecanismos de modulação da atividade do 20SPT por glutathionilação. Neste, foram identificados por espectrometria de massas a glutathionilação de alguns resíduos de Cys concentrados exclusivamente em subunidades α do 20SPT. Uma das consequências estruturais dessa modificação em subunidades α , é que além de modular as atividades sítio-específicas, indicando um mecanismo alostérico da atividade proteassomal, dados obtidos por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e por SAXS (Small Angle X-ray Scattering) mostraram que a glutathionilação desses resíduos promove a abertura da câmara catalítica o que facilitaria a entrada do substrato a ser degradado, e, consequente desacoplamento ou inibição do acoplamento com 19SPT. Outro dado bastante significativo é o fato de que a forma glutathionilada, quando comparada à reduzida, degrada mais eficientemente proteínas oxidadas. A análise do 20SPT isolado de leveduras crescidas em meio YPD até a fase estacionária glutathionilado *in vivo* e *in vitro* permitiu a identificação de quatro diferentes subunidades glutathioniladas ($\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ e $\alpha 7$) e um total de sete resíduos de cisteínas diferentes distribuídos entre elas (**Figura 10a**). Entretanto, apenas as cisteínas presentes na subunidade $\alpha 5$ (Cys76 e Cys221) foram encontradas em ambas as situações citadas acima, sugerindo uma especificidade no processo de regulação redox do 20SPT.

Com relação aos resíduos de cisteína encontrados glutathionilados na subunidade $\alpha 5$, observou-se por estrutura tridimensional, que a Cys221 é o único resíduo modificado cujo grupo tiol está totalmente acessível ao solvente, portanto, sujeita às influências do estado

redox celular (como ilustrado na **Figura 10b**). Posteriormente, análises do alinhamento da sequência primária desta subunidade revelaram que o resíduo Cys76 é altamente conservado, desde *S. cerevisiae* a humanos, sugerindo dessa forma um papel proeminente para este resíduo (**Figura 10c**).

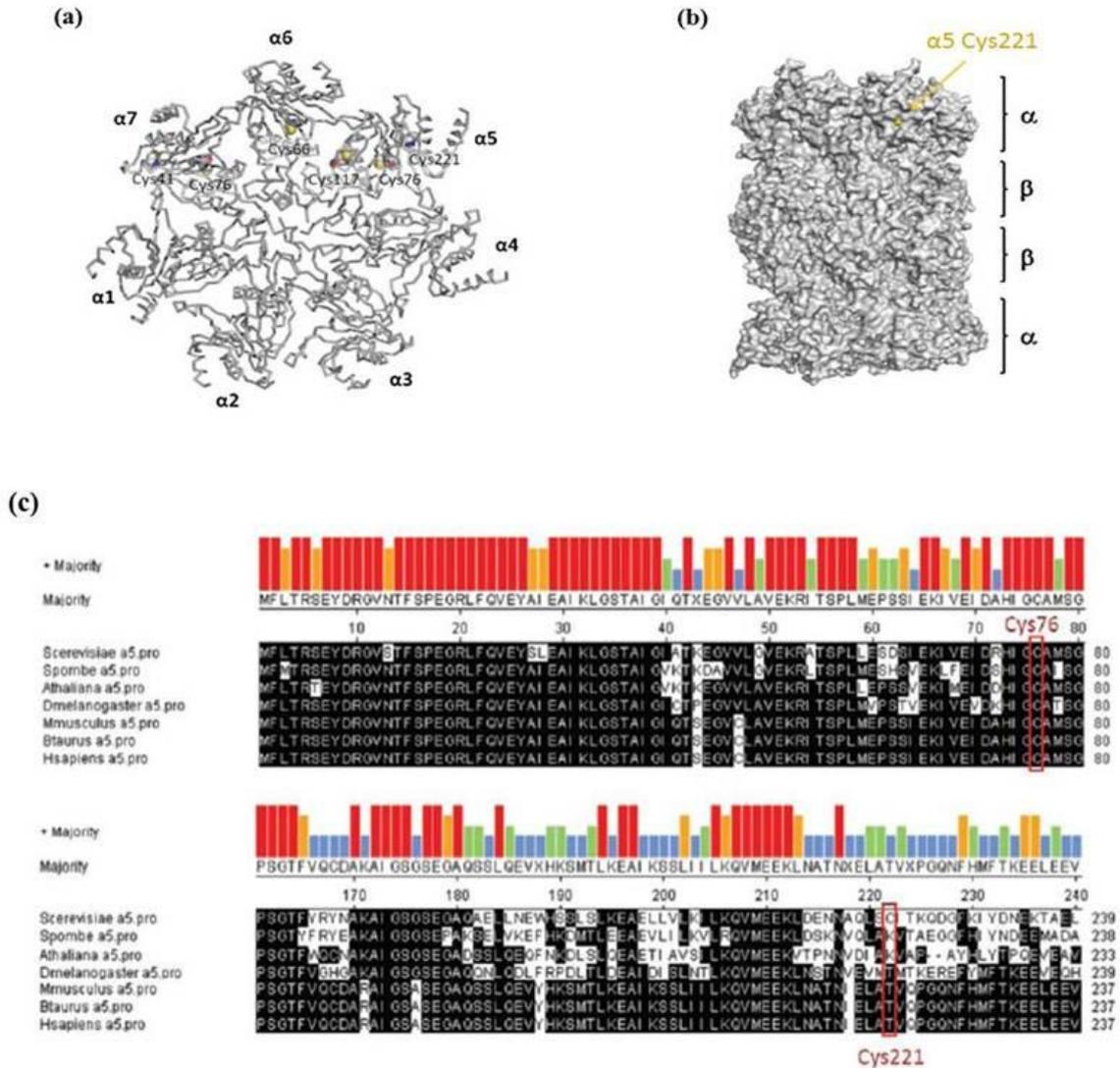


Figura 10. Resíduos de cisteína identificados S-glutationilados no proteassomo 20S de *S. cerevisiae*. (a) Vista frontal do anel α do 20SPT ilustrando os resíduos de cisteína encontrados glutationilados, totalizando 7 resíduos. (b) Estrutura 3D do 20SPT evidenciando que o resíduo Cys221 da subunidade $\alpha 5$ apresenta a sulfidrilha totalmente exposta ao solvente (indicado pela seta amarela). (c) Alinhamento da sequência primária da subunidade $\alpha 5$ do 20SPT mostrando a conservação do resíduo Cys76 entre as espécies. Os alinhamentos foram realizados com o software MegAlign DNASTAR e ClustalW2 - European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), e as sequências primárias foram obtidas do SGD (Saccharomyces Genome Database) e NCBI Protein Database (SILVA *et al.*, 2012).

***Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudos biológicos**

Para o entendimento de diversos processos biológicos, organismos modelos são extensivamente estudados por apresentarem grande simplicidade quando comparados com organismos complexos. Estes organismos possuem o genoma totalmente sequenciado e muitos genes conhecidos, além de conferirem determinadas características que os tornam altamente atraentes para estes estudos devido às vantagens que proporcionam. Com isso, diversos trabalhos têm auxiliado nos estudos do comportamento, envelhecimento, desenvolvimento embriológico e corporal de organismos complexos, além da busca por novos medicamentos, e o entendimento de várias doenças humanas devido à grande quantidade de mutantes disponíveis e ao acúmulo de informação destes organismos modelos.

Dentre os principais organismos modelos destaca-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, um fungo unicelular, primeiramente isolado do malte empregado na produção de cerveja. O nome vem do grego latinizado: *saccharo* significa açúcar, *myces*, fungo, e *cerevisiae*, da cerveja, assim sendo um organismo muito útil para o homem na fabricação de vinho, cerveja e pães (FELDMANN, 2010). Essa levedura é encontrada naturalmente nas cascas de uvas e é dispersa por alguns tipos de vespas, processo importante para manter a diversidade de leveduras selvagens (STEFANINI *et al.*, 2012).

As células da levedura *S. cerevisiae* são elípticas, medindo cerca de 6 a 8 µm de comprimento por 5 µm de largura. Reproduzem-se assexuadamente por brotamento (ou gemulação), onde o núcleo se divide e uma porção dele entra no broto juntamente com outras organelas; o broto aumenta de tamanho e então se separa. Assim, uma nova célula é formada como uma pequena protuberância da célula antiga. Muitas leveduras multiplicam-se assexuadamente somente na condição haplóide. Cada célula haplóide é capaz de servir como gameta e, em certo momento, duas células haplóides podem fundir-se formando uma célula diplóide, ou zigoto. Algumas leveduras também realizam a reprodução sexuada por meio de um processo denominado esporulação em que ocorre fusão de duas células. Embora a maioria das leveduras reproduza-se apenas como células individuais, algumas leveduras podem formar filamentos sob determinadas condições ambientais (como por exemplo, a indisponibilidade de nitrogênio) (MADIGAN *et al.*, 2004).

Dentre as principais vantagens no uso de *S. cerevisiae* como organismo modelo pode-se citar:

- É um organismo unicelular capaz de crescer em meio de cultura definido, o que possibilita maior controle das interferências físico-químicas ambientais;
- O cultivo de leveduras é barato, depende de pequeno espaço para crescimento que pode ser modulado em diferentes temperaturas;
- Possui tempo de geração pequeno e um ciclo de vida curto, com alternância de gerações, facilitando estudos e manipulações genéticas;
- As células se dividem e a progênie pode ser separada por micromanipulação;
- Pode ser mantido e estudado em seu estado haplóide, possibilitando assim estudos de recombinação homóloga e mutações recessivas.

Ainda, o pequeno tamanho de seu genoma possibilitou o primeiro sequenciamento genético completo de eucariontes (GOFFEAU *et al.*, 1996), o que permitiu um maior controle de estudos moleculares no organismo. O DNA nuclear, de 12068 kilobases, está organizado em 16 cromossomos, com cerca de 6000 genes que codificam proteínas em potencial. Estudos genéticos posteriores revelaram alto grau de conservação ou de similaridade entre os produtos gênicos de leveduras e de outros eucariotos, o que mostrou que as leveduras são excelentes modelos para a análise de genes de outros organismos. A levedura é também, excelente modelo para estudos mitocondriais, pois é um organismo aeróbio facultativo, o que permite isolar mutantes respiratórios em meios apropriados, e, a maioria dos genes mitocondriais de *S. cerevisiae* são altamente conservados nos outros eucariotos, permitindo estudos fisiológicos de proteínas mitocondriais (FOURY & KUCEJ, 2001; RABILLOUD *et al.*, 1998).

As células de levedura podem ser cultivadas tanto em meio rico, quanto em meio mínimo. O meio rico YPD (Yeast Extract, Peptone e Dextrose) apresenta grande quantidade de nutrientes (fonte protéica, micronutrientes e fonte de carbono), e é normalmente usado para o crescimento de levedura quando “condições especiais” não são necessárias. Já no meio mínimo, a disponibilidade dos nutrientes, bem como o crescimento e alimentação celular são controlados de maneira que ocorra a seleção das células de interesse. Entretanto, utiliza-se YNB (Yeast Nitrogen Base) sem aminoácidos e glicose como um meio basal onde posteriormente adiciona-se os aminoácidos de acordo com as auxotrofias da linhagem. Ambos os meios de cultura citados acima podem induzir as células de levedura a seguirem uma via fermentativa (meio de crescimento em glicose) ou uma via respiratória (meio de cultivo em glicerol e etanol). No início do crescimento (fase *lag*), as células de levedura passam por um período de adaptação ao meio. Subsequentemente, na fase *log*, esta caracterizada pelo aumento exponencial do número de células e intenso metabolismo, as células utilizam a

glicose para produção de energia por meio da via glicolítica, ocorrendo a fermentação e a repressão do metabolismo oxidativo. Conforme diminui a concentração de glicose disponível no meio de cultura (menos de 0,5%), ocorre gradativamente a ativação de genes que codificam enzimas que participam da biossíntese de mitocôndrias, proteínas necessárias para a utilização de fontes de carbono alternativas e outros fatores necessários ao metabolismo respiratório (CRAUWELS *et al.*, 1997). Assim, com o esgotamento da glicose, as células começam a se adaptar para usar o etanol (principal produto da fermentação) como fonte de carbono, e conseqüentemente ocorre a produção de componentes da cadeia de transporte de elétrons e enzimas do ciclo de Krebs. Portanto, as células de levedura modificam seu metabolismo de fermentativo para oxidativo, onde enzimas e metabólitos antioxidantes, bem como outros sistemas de proteção são sintetizados. Uma vez esgotado o etanol ou outro nutriente essencial, as células de levedura entram na fase estacionária de crescimento, não havendo mais divisão celular e ocorrendo diminuição da sua taxa metabólica. No entanto, as células podem ainda sobreviver semanas ou meses às custas de suas reservas.

As linhagens de *S. cerevisiae* possuem um estado haplóide (com 16 cromossomos) e outro diploide, onde duas células de levedura haplóides podem fundir-se (acasalar), produzindo uma célula diplóide (com 32 cromossomos). Nas células haplóides, a mitose ocorre antes de cada divisão celular, a fim de manter os 16 cromossomos por célula. Já a meiose corresponde a um processo de conversão do estado diplóide para haplóide, no qual envolve duas divisões, ou seja, na primeira divisão meiótica, os cromossomos homólogos são segregados em células separadas, alterando o estado genético de diplóide para haploide, e, na segunda divisão meiótica é essencialmente igual à mitose, uma vez que as duas células haplóides se dividem, originando um total de quatro gametas haploides. As leveduras apresentam dois tipos de células haplóides denominados “a” e “ α ”, sendo tal determinado geneticamente por uma região em um dos cromossomos denominada *locus* MAT (do inglês mating type ou “tipo de acasalamento”), nas quais as células do tipo “a” (MAT \mathbf{a}) se acasalam com células do tipo “ α ” (MAT $\mathbf{\alpha}$) e vice-versa. Esses genes também regulam outras atividades, como a produção dos hormônios peptídicos, fator α ou fator α , excretado pelas células de levedura em processo de acasalamento. Esses hormônios ligam-se às células do tipo de acasalamento oposto, promovendo modificações em sua superfície celular, a fim de permitir a fusão. Uma vez que células de tipos de acasalamento opostos tenham-se associado, ocorre a fusão de ambas as células e de seus núcleos, resultando na formação de um zigoto diplóide. A

partir deste último, a meiose restaura a forma vegetativa haplóide, completando o ciclo de vida (MADIGAN *et al.*, 2004).

Assim, mutações recessivas podem ser isoladas e manifestadas nas linhagens haplóides, e os ensaios de complementação podem ser realizados em linhagens diplóides. Genes correspondentes a qualquer característica genética podem ser identificados por ensaios de complementação utilizando bibliotecas de plasmídeos. Os plasmídeos podem ser introduzidos nas células de levedura como moléculas replicadoras ou pela sua inserção no genoma, onde nesta última a integração do DNA transformante procede exclusivamente através de recombinação homóloga. Dessa maneira, genes normais do “tipo selvagem”, mesmo aqueles que não possuem nenhuma mutação conhecida podem ser substituídos por genes inativados pela inserção de um gene repórter e/ou por alelos portadores de mutações sítio-específicas. Os fenótipos decorrentes das mutações em genes de leveduras têm contribuído significativamente para a compreensão da função de certas proteínas *in vivo* (SHERMAN, 2002).

A maioria dos plasmídeos utilizados para estudos em leveduras são “shuttle”, ou seja, vetores que contêm sequências que permitem serem selecionados e propagados tanto em *E. coli*, através de marcadores selecionáveis à antibióticos (como por exemplo, o gene β -lactamase, *BLA2*, conferindo resistência à ampicilina), quanto capazes de se propagarem em leveduras por meio de marcadores auxotróficos permitindo a seleção de células transformantes contendo o plasmídeo desejado (exemplo: *URA3*, *HIS3*, *LEU2*, *TRP1* e *LYS2*, os quais complementam mutações auxotróficas específicas em levedura, tais como *ura3-52*, *his3- Δ 1*, *leu2- Δ 1*, *trp1- Δ 1* e *lys2-201*, respectivamente). Existem inúmeros tipos de vetores “shuttle” os quais podem ser classificados como: integrativos, YIp; episomais (ou vetores de replicação autônoma com alto número de cópias), YE_p; centroméricos (ou vetores de replicação autônoma com baixo número de cópias, YC_p). O YIp (yeast integrating plasmids) contém genes selecionáveis, porém, não possuem a sequência que permite a replicação autônoma desse plasmídeo na levedura. Portanto, a transformação ocorre pela integração do plasmídeo YIp no genoma da levedura por recombinação entre as sequências clonadas no plasmídeo e a região de homologia presente no genoma da levedura. O YE_p (yeast episomal plasmids) contém sequências conhecidas como “círculo 2 μ m” que serve como uma origem de replicação. Essas sequências permitem a replicação extracromossomal e conferem alta frequência de transformação. O YC_p (yeast centromeric plasmids) contém sequências centrômero (*CEN*), e, sequências de replicação autônoma (*ARS*), embora presentes em número de cópias muito baixos na célula (em torno de 1 a 3).

As células de levedura têm similaridades marcantes com as células de mamíferos em níveis de macromoléculas e de organelas, e, tem sido mostrado que um grande número de proteínas de leveduras possuem funcionalidade altamente conservada com proteínas homólogas humanas. O fato de que muitos genes envolvidos em desordens humanas estão associados com um grande espectro de fenótipos observados em levedura, e que podem ser identificados através da seleção do crescimento quantitativo deste microrganismo, reforça o uso de leveduras como sistema modelo gerando cada vez mais contribuições relevantes para a compreensão de diversos mecanismos moleculares em células humanas, bem como a caracterização de diversas doenças (BARRIENTOS, 2003).

Por fim, neste trabalho realizamos mutações sítio-específicas no gene *PUP2*, o qual codifica para a subunidade $\alpha 5$ do 20SPT em linhagens da levedura *S. cerevisiae* através da substituição dos dois resíduos de cisteína glutationiláveis em meio YPD (C76S e C221S), a fim de estudar as consequências oriundas das trocas dos resíduos de cisteína por serina, e, particularmente, seus efeitos quanto ao processo de glutationilação do 20SPT. Realizamos análises estruturais e fenotípicas no 20SPT dessas linhagens em comparação com a selvagem a fim de avaliar e compreender as mudanças observadas oriundas das mutações realizadas. Assim, o entendimento deste mecanismo de regulação e a importância de cada Cys no processo de modulação da atividade catalítica contribuirão para a caracterização deste processo o que, futuramente, pode auxiliar no desenvolvimento de inibidores ou ativadores especificamente desenhados para o proteassomo, importante alvo para tratamentos de doenças neurodegenerativas (MATSUDA & TANAKA, 2010; MONTAGUT *et al.*, 2006; PETRUCCELLI & DAWSON, 2004).

II. Objetivos

O objetivo geral deste projeto consiste em avaliar o papel de resíduos de cisteínas glutationiláveis sobre a atividade do 20SPT da levedura *S. cerevisiae*, e, o envolvimento desta modificação pós-traducional com o metabolismo redox intracelular.

Entre os objetivos específicos:

- Caracterizar o papel das Cys da subunidade $\alpha 5$ do 20SPT através de mutações sítio-específicas (C76S e C221S);
- Fazer análises comparativas *in vitro* da linhagem selvagem e mutantes quanto a estrutura e funcionalidade do 20SPT;
- Investigar *in vivo* as alterações fenotípicas como a capacidade de crescimento, tolerância ao estresse oxidativo e a longevidade dessas linhagens.

III. Materiais e Métodos

Linhas e plasmídeos utilizados

As tabelas abaixo descrevem as linhas e os plasmídeos utilizados durante a execução deste trabalho:

Tabela 1: Linhas de *S. cerevisiae* com seus respectivos genótipos e referências.

Linhas	Genótipo	Referência
a/αW303	<i>MATa/α, ade2-1, trp1-1, his3-115, leu2-3,112 ura3-1</i>	(ROTHSTEIN, R. Columbia University)
CB11	<i>MATa, ade-1</i>	(TZAGOLOFF, 1975)
KL14	<i>MATa, his-, Ile-, Val-</i>	(TZAGOLOFF, 1975)
RJD1144	<i>MATa, his3_200, leu2-3,112, lys2-801, trp1_63, ura3-52, PRE1 FH ::Ylplac211 URA3</i>	(DESHAIES, R. Caltech, Pasadena, CA-EUA)
a/αW303Δpup2	<i>MATa/α, ade2-1, trp1-1, his3-115, leu2-3,112 ura3-1 Δpup2::HIS3</i>	(Este estudo)
W303Δpup2/PUP2	<i>MATa, ade2-1, trp-1, his3-115, leu2-3, 112 ura3-1 Δpup2::HIS3, YEplac181-PUP2 LEU2</i>	(Este estudo)
W303Δpup2/PUP2 ^{C221S}	<i>MATa, ade2-1, trp-1, his3-115, leu2-3, 112 ura3-1 Δpup2::HIS3, YEplac181-PUP2^{C221S}LEU2</i>	(Este estudo)
RJΔpup2/PUP2 ^{C221S}	<i>MATa, ade2-1, trp-1, his3-115, leu2-3, 112 ura3-1 Δpup2::HIS3, YIp349-PUP2^{C221S} TRP1 PRE1 FH::Ylplac211 URA3</i>	(Este estudo)
RJΔpup2/ PUP2 ^{C76S}	<i>MATa, ade2-1, trp-1, his3-115, leu2-3, 112 ura3-1 Δpup2::HIS3, YIp349-PUP2^{C76S} TRP1 PRE1 FH ::Ylplac211 URA3</i>	(Este estudo)
a/αRJΔpup2/PUP2 ^{C76S/C221S}	<i>MATa/α, ade2-1, trp-1, his3-115, leu2-3, 112 ura3-1 Δpup2::HIS3, YIp349-PUP2^{C76S/C221S} TRP1 PRE1 FH::Ylplac211 URA3</i>	(Este estudo)

Tabela 2: Linhas de *E. coli* com seu respectivo genótipo e referência.

Linhas	Genótipo	Referência
RR1	<i>Δ(gpt-proA)62, leuB6, thi-1, lacY1, hsd_B20, rpsL20 (Str^r), ara-14, galK2, xyl-5, mtl-1, supE44, mcrB_B</i>	(HANAHAM, 1983)

Tabela 3: Plasmídeos utilizados com suas respectivas referências.

Plasmídeo	Referência
pUC18	VIEIRA & MESSING, 1982
YEplac181	GIETZ & SUGINO, 1988
YIp349	“Cortesia do Prof. Alexander Tzagoloff- Columbia University”

Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados para o crescimento de *S. cerevisiae* e *E. coli* foram preparados conforme descrito por ROSE *et al.* (1990), e as composições dos meios estão listadas na tabela 4. Os meios sólidos foram preparados conforme descrição na tabela 4, seguido da adição de 2% de ágar bacteriológico. Todos os meios de cultura foram preparados e autoclavados por 15 minutos a 120 °C para esterilização.

Tabela 4: Composição dos meios de cultura utilizados para o crescimento de *S. cerevisiae* e *E. coli*.

<u><i>S. cerevisiae:</i></u>
YPD: 1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% ou 4% glicose.
YPEG: 1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% etanol; 3% glicerol.
WO (meio mínimo com glicose): 2% glicose; 0,2% de base nitrogenada sem aminoácidos (YNB-AA-Yeast Nitrogen Base without aminoacids); 0,5% NH ⁴ SO ₂ , suplementado com requerimentos auxotróficos (uracila e adenina: 2 mg/mL; triptofano, histidina, leucina e lisina: 10 mg/mL).
KAc (meio de esporulação): 0,5% extrato de levedura; 1% acetato de potássio; 0,05% glicose. Suplementado com requerimentos auxotróficos (uracila e adenina: 2 mg/mL; triptofano, histidina, leucina e lisina: 10 mg/mL).
<u><i>E. coli:</i></u>
LB (Luria-Bertani): 1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 0,5% NaCl; 0,1% glicose.
Lamp: 1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 0,5% NaCl; 0,1% glicose; [100 µg/mL] de ampicilina.

Condições de cultivo dos microrganismos

As células das linhagens de *S. cerevisiae* e *E. coli* foram cultivadas a 30 °C e 37 °C, sob constante agitação a 170 e 120 rpm, respectivamente. As diferentes linhagens de *S. cerevisiae* foram armazenadas em meio líquido YPD 2% contendo glicerol 20%, a - 70 °C.

Métodos gerais para a manipulação de DNA

A manipulação geral dos ácidos nucleicos, incluindo eletroforese de DNA, digestão com enzimas de restrição, ligação e purificação dos fragmentos de DNA, foi feita conforme descrito por SAMBROOK *et al.* (1989). O processo de amplificação dos fragmentos de DNA foi realizado pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Para isso, deve-se conhecer o segmento alvo e elaborar primers (iniciadores) que se hibridam a ele. Essa reação consistiu na utilização dos seguintes reagentes: 20 µL de tampão de polimerase (5x) com MgCl₂, dNTPs (2,5 M), 0,2 pmol/µL de cada oligonucleotídeo iniciador, 2U de *Taq* DNA polimerase, aproximadamente 10 ng de DNA e água Milli-Q para um volume final de 100 µL. A mistura foi colocada no termociclador e, a amplificação realizada em 39 ciclos, conforme abaixo:

- 1) 94 °C - 30 segundos, para a desnaturação e separação da dupla-fita de DNA,
- 2) 55 °C - 1 minuto, para hibridação dos oligonucleotídeos com a fita molde de DNA, e
- 3) 72 °C - 2 minutos, para a extensão da amplificação promovida pela DNA-*taq* polimerase.

Após a amplificação do fragmento foi realizada a extração dos produtos de PCR, cujo objetivo é purificar o DNA amplificado, retirando os outros componentes utilizados na reação de PCR. A purificação do produto da PCR consistiu em adicionar 1 volume de fenol saturado nas amostras e misturar por inversão com posterior centrifugação por 3 minutos a 13.200 rpm em microcentrífuga eppendorf 5415D. A fase aquosa com o material amplificado foi coletada e transferida para um novo tubo contendo 1 volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e agitado fortemente. Após centrifugar, conforme descrito acima, o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo contendo 1/20 do volume de NaCl (5 M) e 2.5 volumes de etanol 100%. Os tubos foram agitados e incubados a -80 °C por 5 minutos. Após este tempo, o precipitado de DNA foi lavado duas vezes com etanol 80%, secado em bomba de vácuo e então ressuscitado em 40 µL de água Milli-Q.

O plasmídeo recombinante (pDNA), foi construído digerindo o vetor e o DNA com enzimas de restrição com sítios específicos permitindo sua ligação pela ação da enzima T4 DNA-ligase. Os fragmentos foram separados e selecionados por eletroforese em gel de agarose a 1%, sendo recuperados, posteriormente, por eletroeluição.

A eletroeluição é um procedimento indicado para recuperar fragmentos de DNA do gel de agarose que ainda serão ligados a outros. Consiste em primeiramente separar o fragmento de DNA em gel de agarose vertical 1% para maior definição de bandas e maior aproveitamento de DNA. Cora-se o gel com brometo de etídeo e visualiza no UV, protegendo o gel de boa parte da irradiação UV para evitar mutações no DNA. Detectada a banda de interesse, corta a banda respectiva e insere a mesma numa membrana de diálise previamente hidratada com água Milli-Q. Adiciona-se tampão TBE 1/10 na membrana contendo o fragmento de gel. Em seguida remove o excesso de tampão, sem deixar bolhas na membrana, prende as extremidades com grampos de plástico, e então, submete a mesma a uma corrente elétrica de 300 V por 15 minutos para eletroeluir o DNA do gel de agarose. Após esse tempo, pipeta o líquido contendo tampão e DNA para um tubo cônico e faz a extração do DNA com fenol/clorofórmio, conforme descrito acima, e ressuspende em 5-10 µL de água Milli-Q. Verificar em gel de agarose a quantidade de DNA que foi eletroeluída para posterior ensaio de ligação.

Preparação de bactérias *E. coli* competentes para transformação com DNA plasmidial recombinante

A preparação de bactérias *E. coli* competentes para a transformação com DNA exógeno foi feita pelo método de CaCl₂ (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Para obter as bactérias competentes, células de *E. coli* da linhagem RR1 foram cultivadas em 50 mL de meio LB líquido a 37 °C sob uma agitação de 120 rpm por aproximadamente 2 horas. Em seguida a cultura foi transferida para tubos cônicos estéreis (50 mL) e centrifugados a 4.000 rpm a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos ressuspensos em 10 mL da solução **A** (10 mM CaCl₂, 10 mM Tris pH 7.5) a 4 °C. A solução com células foi centrifugada a 4.000 rpm a 4 °C por 10 minutos e posteriormente descartado o sobrenadante. O sedimento foi ressuspensado na solução **B** (30 mM CaCl₂, 10 mM Tris pH 7.5) a uma temperatura de 4 °C e mantido em gelo por 30 minutos. Após, o material foi centrifugado nas mesmas condições descritas acima, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensado em 5 mL da solução **B**.

Os procedimentos para a transformação das células competentes com o DNA plasmidial recombinante foram realizados conforme segue: alíquotas de 200 µL de células competentes foram separadas em tubos cônicos e em cada tubo foi adicionado 10 µL da reação de ligação (plasmídeo + inserto) e incubados por 7 minutos no gelo. Após este tempo, as células foram

submetidas a um choque térmico a 42 °C por 2 minutos e em seguida incubadas por 30 segundos no gelo e deixadas em temperatura ambiente. Adicionou-se 1 mL de meio líquido LB e os tubos cônicos foram incubados a 37 °C por 30 minutos. As células foram centrifugadas a 13.200 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e as células foram ressuspensas em uma pequena quantidade de meio restante no tubo. As células transformadas foram espalhadas em meio Lamp sólido e incubadas a 37 °C para a posterior seleção de colônias transformantes.

Preparo de DNA plasmidial de bactéria em pequena escala

A obtenção de DNA plasmidial de *E. coli* foi preparado segundo BIRBOIM & DOLLY (1979). Células bacterianas cultivadas em placa de Lamp foram coletadas com uma espátula e colocadas em tubo cônico de 1,5 mL. Em seguida foram adicionados 100 µL da solução **I** ou tampão de lise (50 mM glicose, 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 7.5, 5 mg/mL de lisozima, 10 mg/mL RNase). A solução foi misturada e então adicionados 200 µL da solução **II** (0,2 M NaOH, 1% SDS) para solubilizar a membrana e misturados novamente. Adicionou-se 150 µL da solução **III** (7,5 M de acetato de amônio) para precipitar o DNA e posteriormente o tubo foi centrifugado a 13.200 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 300 µL da solução **IV** (isopropanol) para precipitar o DNA plasmidial e, misturado por inversão, seguido de centrifugação por 5 minutos. O precipitado foi lavado duas vezes com etanol 80%, secado e ressuspensado em 5 µL de água Milli-Q.

Preparo de DNA plasmidial de bactéria em média escala

A preparação de DNA plasmidial de *E. coli* em média escala seguiu o método de lise com Triton: AUSUBEL *et al.* (1989). A extração de DNA plasmidial de bactérias foi obtida a partir de células bacterianas cultivadas em placas de Lamp. As células foram coletadas com uma espátula, colocadas em tubos cônicos de 15 mL contendo 2 mL de solução de lise (5 mg/mL lisozima, 25 mM Tris pH 8.0, 0,25 M sacarose, 10 mg/mL RNase) e foram incubadas no gelo por 30 minutos. Após foi adicionado 1 mL da solução 3X TET (para um volume de 100 mL: 3 mL de 10% Triton X-100, 37 mL de 0,5 M de EDTA pH 7.5, 15 mL de 1 M de Tris pH 7.5 e 45 mL de água Milli-Q). O material foi misturado e em seguida centrifugado a 70.000 rpm em centrífuga Beckman Optima TLX com rotor TLA 120.2 a uma temperatura de 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e adicionou-se um volume igual de fenol

saturado. Depois de agitado por inversão, a solução foi centrifugada a 3.500 rpm, 5 minutos, a 4 °C, e então, o sobrenadante transferido para um tubo novo com 1 volume de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 e novamente centrifugado como descrito acima. O DNA presente no sobrenadante foi purificado com a adição de 1/20 de volume de NaCl 5 M e 3 volumes de álcool etílico 100%. A solução foi centrifugada a 4.500 rpm por 10 minutos resultando na formação de um *pellet* com aspecto oleoso. A fase aquosa foi descartada e o sedimento dissolvido com 1,5 mL de acetato de amônio 2 M e 4,5 mL de etanol 100%. Após centrifugação a 4.500 rpm por 10 minutos, a 4 °C o sobrenadante foi descartado e o *pellet* dissolvido com 300 µL de acetato de amônio 2 M e 1 mL de etanol 100%. Misturar e centrifugar em microcentrifuga a temperatura ambiente por 5 minutos. O precipitado foi lavado duas vezes com etanol 80%, secado e ressuscitado em 100 µL de água Milli-Q.

Transformação de células da levedura *S. cerevisiae*

Células de *S. cerevisiae* foram preparadas para posterior transformação utilizando-se o método de SCHIESTL & GIETZY (1989). Primeiramente, colônias de *S. cerevisiae* foram inoculadas em 10 mL de meio YPD e incubadas a 30 °C com agitação de 170 rpm. Após atingirem a metade da fase logarítmica de crescimento, as células foram sedimentadas por centrifugação a 2.500 rpm, a 21 °C por 5 minutos, então ressuscitadas em 5 mL de TEL (10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA pH 7.5, 0,1 M acetato de lítio) para desestabilizar a membrana e, centrifugadas como descrito acima. O sobrenadante foi descartado e as células ressuscitadas em alíquotas de 100 µL com TEL foram colocadas em tubos de 1,5 mL e posteriormente foram adicionados 5 µL de DNA “carrier” de esperma de salmão desnaturado (10 mg/mL) com 5 µL de DNA transformante (o DNA “carrier” ajuda o DNA transformante a entrar nas células). A solução foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e após este período foram adicionados 700 µL de solução contendo 40% de PEG (polietilenoglicol) em TE (5 mM Tris HCl pH 7.5, 0,2 mM EDTA) e novamente incubada por mais 45 minutos a temperatura ambiente sem agitação. Em seguida, os tubos foram incubados por 10 minutos em banho a 42 °C e posteriormente adicionado 500 µL de tampão TE. O procedimento foi finalizado com lavagem das células em tampão TE e subsequente centrifugação a 13.200 rpm por duas vezes. As células transformadas foram ressuscitadas em TE, espalhadas em meio seletivo e incubadas a 30 °C.

Mini preparação de DNA genômico de levedura

A extração de DNA cromossomal de *S. cerevisiae* foi preparada segundo HOLM *et al.* (1986). Colônias de *S. cerevisiae* foram inoculadas em 1 mL de meio YPD e incubadas a 30°C com agitação de 170 rpm. Após atingirem a metade da fase logarítmica de crescimento, as células foram sedimentadas por centrifugação a 3.500 rpm, a 21 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 1 mL de água. Posteriormente o mesmo foi transferido para tubo cônico de 2 mL e subsequentemente centrifugado a 13.200 rpm, a 21 °C, por 1 minuto. Após descartar o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 1 mL de 1% β-mercaptoetanol, incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos e subsequentemente centrifugadas como acima. Em seguida, as células foram ressuspensas em 500 µL da solução **A** (1 M Sorbitol, 3,5 mM EDTA, 20 mM NaPO₄ pH 6.5, 1 mg de Zymoliase) e incubadas a 37 °C, por 30 minutos. Após a digestão foi adicionado 300 µL da solução **B** (2% TritonX-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 100 mM TrisCl pH 8.0, 1 mM EDTA), levemente misturado e incubado a 65 °C por 20 minutos. Ao lisado foi adicionado 1 volume de fenol-clorofórmio-alcool isoamilico (24:24:1), mistura e então centrifuga a 3.500 rpm, por 5 minutos. Coleta a fase aquosa, e adiciona 1 volume de clorofórmio-alcool isoamilico (24:1), mistura e centrifuga como acima. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo contendo 1/20 do volume de NaCl (5 M) e 2.5 volumes de etanol 100%. Os tubos foram agitados e incubados a - 20 °C por 30 minutos. Após este tempo, o precipitado de DNA foi centrifugado a 6.000 rpm, por 10 minutos, depois lavado duas vezes com etanol 80%, secado em bomba de vácuo e então ressuspensado em 50 µL de água Milli-Q.

Construção de oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos listados na tabela 5 foram utilizados para amplificação e clonagem do gene *PUP2* e suas respectivas mutações sítio-específicas.

Tabela 5: Oligonucleotídeos utilizados nas clonagens de *PUP2*. As sequências grifadas correspondem aos sítios de restrição da enzima nos mesmos.

Oligonucleotídeo	Sequência	Sítio de restrição
PUP2-1	5'GGCG <u>GAATTC</u> GGACACTTTTGCAACTACTG3'	<i>EcoRI</i>
PUP2-2	5'GGCGGATCC <u>TGAATATTCTCACCTTA</u> 3'	<i>BamHI</i>
PUP2-3	5'GGC <u>AGATCT</u> GGGGAAAATGTGCTTACA3'	<i>BglII</i>
PUP2-4	5'GGC <u>AGATCT</u> GCAGAAAGTCCAGAAG3'	<i>BglII</i>
PUP2-5	5'GGCGAATTC <u>TTCATCGATAACAAAGCAAGACGGA</u> 3'	<i>EcoRI / ClaI</i>
PUP2-6	5'GGC <u>ATCGATGACAATTGCGCGTTATTTTC</u> 3'	<i>ClaI</i>
PUP2-7	5'GGCGGATCC <u>AAATATGACGATCAATCTCC</u> 3'	<i>BamHI</i>
PUP2-8	5'GGCGGATCC <u>GCAATGAGTGGGCTTACA</u> 3'	<i>BamHI</i>

Preparação das células de *S. cerevisiae* para dissecação de tétrades

A indução de esporulação em *S. cerevisiae* foi feita em placa contendo o meio KAc (SHERMAN & HICKS, 1991). As células esporuladas em placa contendo meio KAc, foram coletadas com uma alça microbiológica e colocadas em tubos cônicos (15 mL) contendo 1 mL de água estéril. Ao mesmo foi adicionado 10 µL de glusulase para quebrar o asco presente no envoltório das tétrades e a suspensão incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 5 mL de água estéril pela parede do tubo (nessa etapa é importante não misturar, pois movimentos bruscos diminuem a eficiência da preparação, pois as tétrades se soltam já que agora elas não possuem o asco que as mantém juntas) e as células foram centrifugadas a 300 rpm, a 21 °C, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, ao sedimento foi adicionado 5 mL de água estéril e centrifugado nas mesmas condições acima. Após o descarte do sobrenadante, ao *pellet* foi adicionado com cuidado 1 mL de água estéril. As células foram recolhidas com uma alça microbiológica e espalhadas em placa YPD para posterior micromanipulação da separação das tétrades.

Teste de complementação e cruzamento entre as linhagens de *S. cerevisiae*

O teste de complementação foi realizado com o intuito de saber se o gene *PUP2* era essencial e a complementação do mesmo seria viável, retornando-o funcional. Assim, mutantes *W303ΔPUP2::HIS3* foram transformados com as construções contendo este gene. As linhagens transformadas foram plaqueadas em meio rico (YPD), em meio não-fermentável (YPEG) e em meio seletivo suplementado com os requerimentos necessários para as auxotrofias das linhagens.

O cruzamento entre linhagens de levedura foi feito com o objetivo de separar um haplóide de acordo com o seu locus de determinação sexual (*MATa/α*). Para isso, quantidades iguais das linhagens CB11 e KLI14 foram estriadas em placas de YPD e em seguida foram estriadas as linhagens transformadas sobre as mesmas ocasionando assim o cruzamento entre as linhagens. A respectiva complementação das suas auxotrofias foi testada em meio seletivo.

Construção de plasmídeos recombinantes

Os vetores recombinantes a seguir foram utilizados na transformação de linhagens de *S. cerevisiae*, inclusive as que continham inativações gênicas dos respectivos genes presentes nos recombinantes a fim de se testar a capacidade de complementação funcional do vetor obtido.

Inativação gênica no *PUP2*

Para construir esta cepa mutante foi utilizada a estratégia de deleção de gene baseada em PCR (ROTHSTEIN, 1983), conforme esquematizado na **Figura 11a**. Todos os procedimentos de construção de linhagens mutantes no gene *PUP2* foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Mário Henrique de Barros, no Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP. O objetivo foi criar uma linhagem com um alelo mutado no gene *PUP2* através da inativação do mesmo utilizando para seleção dos mutantes o gene repórter *HIS3* para marcação de auxotrofia, como exemplificado na **Figura 11b**.

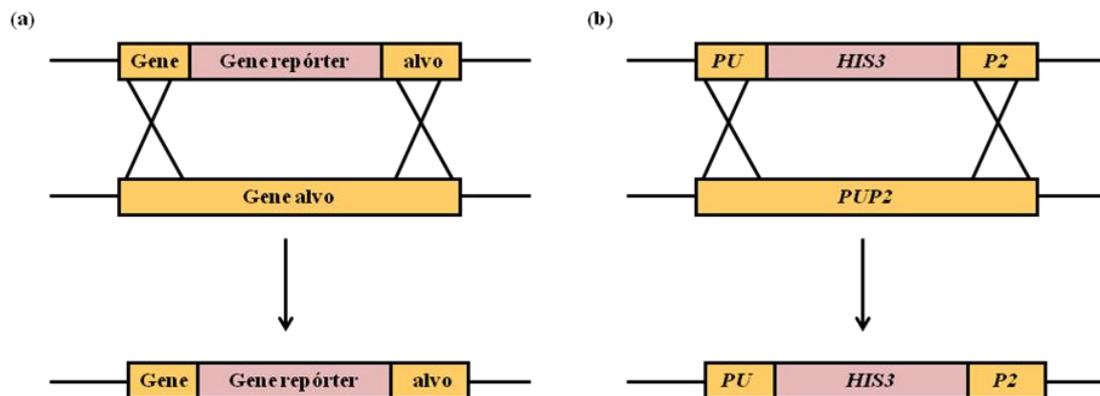


Figura 11. Inativação gênica no *PUP2*. (a) Modelo de inativação gênica com a inserção de um gene repórter, e, (b) esquema da inativação do gene *PUP2* com a inserção do gene repórter *HIS3*, utilizado para seleção dos mutantes através da marcação de auxotrofia. A homologia entre as extremidades da fita de DNA permite com que seja possível ocorrer uma recombinação entre tais, substituindo parte o gene alvo com o gene interrompido.

Os oligonucleotídeos PUP2-1 e PUP2-2 foram utilizados para amplificar o gene *PUP2* a partir de DNA nuclear de levedura, inserindo no produto sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *BamHI*, respectivamente. A amplificação dos produtos de PCR gerou um fragmento de DNA de 1300 pb. A seguir, foi feita a purificação dos produtos de PCR por extração de DNA com fenol/clorofórmio, seguida do isolamento do gene *PUP2* por digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*. Concomitantemente, foi realizada a digestão do plasmídeo pUC18 pelas mesmas enzimas. Os produtos oriundos da digestão foram aplicados em gel de agarose 1%. As bandas desejadas foram cortadas do gel e o DNA contido nelas foi eluído, seguido da extração com fenol/clorofórmio. Posteriormente, foi feita a ligação do gene *PUP2* amplificado ao plasmídeo pUC18 gerando o vetor recombinante pUC18-*PUP2* (Figura 12).

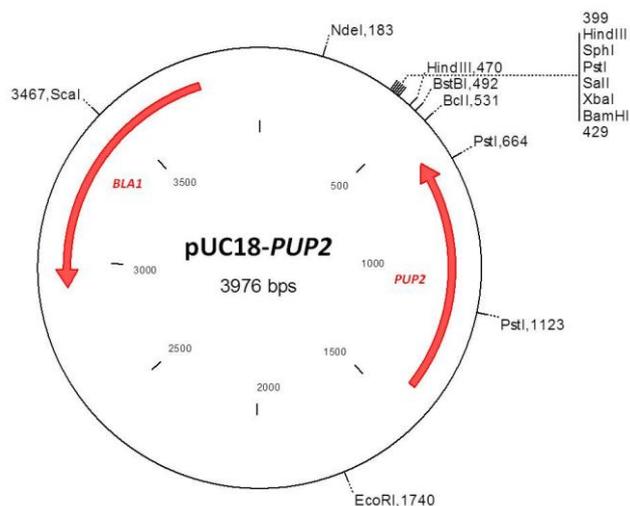


Figura 12. Representação esquemática do vetor recombinante pUC18-*PUP2*, obtido a partir da clonagem do gene *PUP2* no vetor pUC18 nos sítios de restrição *EcoRI* e *BamHI*. O mapa do vetor recombinante pUC-*PUP2* mostra onde estão os sítios de restrição relevantes para clonagens. Destacados em vermelho o local da inserção do gene *PUP2* no vetor, e, o gene *BLA1* que codifica a proteína β -lactamase tornando as bactérias transformadas resistentes à ampicilina.

Paralelamente, foi realizada a preparação de bactérias competentes pelo método de CaCl_2 , seguida da transformação de *E. coli* RR1 com DNA exógeno. Colônias de bactérias transformadas foram inoculadas em placas de seleção (Lamp) e posteriormente utilizadas na realização de ensaio de mini preparação de DNA plasmidial. Aliquotas de DNA plasmidial resultante da mini preparação do recombinante pUC18/*PUP2* foram digeridos com a enzima *HindIII*, para verificação da correta inserção do gene no plasmídeo em gel de agarose. Uma colônia foi selecionada e estriada em nova placa de Petri com meio de cultura Lamp para posterior realização de extração de DNA plasmidial de bactéria em média escala por método de lise com Triton. O DNA plasmidial obtido foi amplificado por técnica de PCR, utilizando os oligonucleotídeos PUP2-3 e PUP2-4, que contém sítios de restrição da enzima *BglIII*, gerando uma molécula de DNA de 3.300 pb. Os produtos de PCR foram purificados por extração com fenol/clorofórmio e foi realizada uma digestão preparativa com a enzima *BglIII*. 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 com fenol/clorofórmio. Foi realizada a ligação do plasmídeo contendo as regiões flangeadoras do gene *PUP2* (obtido no ensaio acima) com o gene *HIS3* contendo sítios de restrição da enzima *BamHI* nas suas extremidades. Como o fragmento amplificado com os primers PUP2-3 e PUP2-4 contém sítios de *BglIII* e o gene *HIS3* continha sítios de *BamHI* (os sítios *BglIII* e *BamHI* são

compatíveis) o mapa resultante não mostra os sítios de *BglIII* e *BamHI*. Isto porque, a ligação entre sítios de restrição de *BglIII* e *BamHI* resulta na obliteração de ambos sítios, resultando em uma ligação permanente (**Figura 13**).

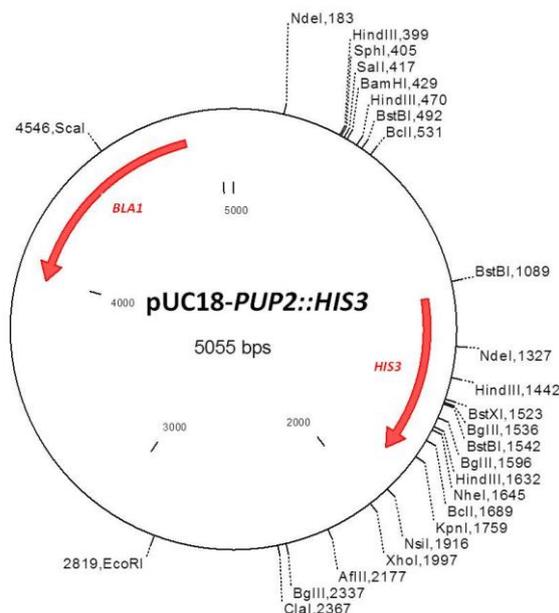


Figura 13. Representação esquemática do vetor recombinante pUC18-*PUP2*::*HIS3*, obtido a partir da inativação do gene *PUP2* com a inserção do gene *HIS3*. O mapa do vetor recombinante pUC18-*PUP2*::*HIS3* mostra onde estão os sítios de restrição relevantes para clonagens. Destacado em vermelho o local da inserção do gene *HIS3* no vetor (o gene *PUP2* não aparece no mapa porque a região codificadora dele foi interrompida com a inserção do gene *HIS3*, ficando apenas as regiões flangeadoras, nesse caso, o promotor e o terminador), e, o gene *BLA1* que codifica a proteína β -lactamase, que torna as bactérias transformadas resistentes à ampicilina.

Bactérias *E. coli* RR1 foram transformadas com o plasmídeo recombinante pUC18-*PUP2*::*HIS3* e plaqueadas em meio sólido Lamp para seleção. As 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 Lamp 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 digerido com a enzima *EcoRI* e *BamHI* e aplicado em um gel de agarose 1%. A banda desejada foi cortada do gel e o DNA foi extraído por eletroiluição seguida de extração com fenol/clorofórmio para transformar a linhagem diplóide a/ α W303.

As leveduras transformadas foram inoculadas em placas contendo meio seletivo (meio mínimo suplementado com os aminoácidos adenina, triptofano, leucina e uracila). Colônias

isoladas foram selecionadas e transferidas para outra placa com meio seletivo nas mesmas condições que a anterior para aumentar o espaço de crescimento, e posteriormente, transferidas para placa contendo meio sólido YPD, para crescimento de colônias isoladas.

Uma colônia da linhagem transformada (*a/αW303ΔPUP2::HIS3*) foi inoculada em meio YPD líquido para posterior realização de ensaio de mini preparação de DNA total de *S. cerevisiae*. O DNA resultante foi amplificado em reações de PCR com os oligonucleotídeos PUP2-1 e PUP2-2 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 *PUP2*. Os produtos de PCR foram purificados por extração com fenol/clorofórmio e alíquotas dos mesmos foram digeridas com a enzima *HindIII* para a confirmação da presença do gene *PUP2* interrompido por *HIS3* nas linhagens utilizadas. As colônias transformantes obtidas foram purificadas e o fenótipo resultante da inativação do gene *PUP2* avaliada após a análise de esporulação em meio KAc e dissecação de tétrades em meio YPD e em meio seletivo. As linhagens resultantes foram inoculadas em YPD e adicionadas ao estoque no - 80 °C.

Concomitantemente a construção de pUC18-*PUP2*, realizamos a construção do vetor recombinante YEplac181-*PUP2* seguindo a mesma metodologia (**Figura 14**).

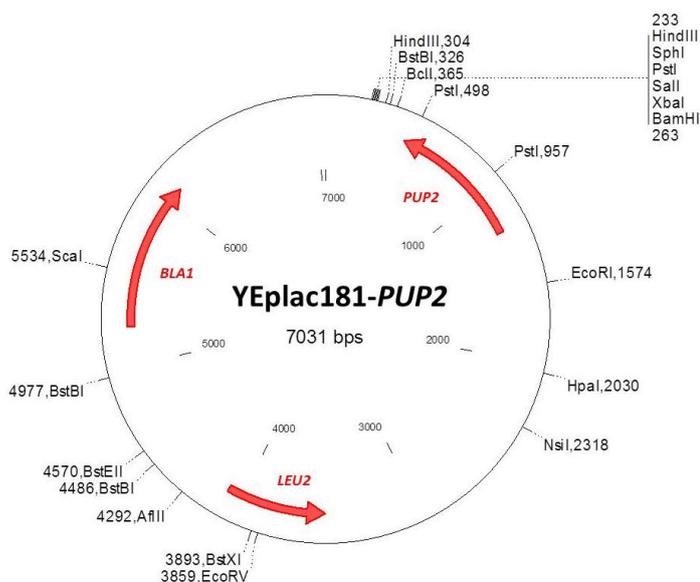


Figura 14. Representação esquemática do vetor recombinante YEplac181-*PUP2*, obtido da clonagem do gene *PUP2* no vetor YEplac181 nos sítios de restrição *EcoRI* e *BamHI*. O mapa do vetor recombinante YEplac181-*PUP2* mostra onde estão os sítios de restrição relevantes para clonagens. Destacados em vermelho o local da inserção do gene *PUP2* no vetor, o gene *BLA1* que codifica a proteína β-lactamase tornando as bactérias transformadas resistentes à ampicilina, e, o gene de seleção de leveduras em meio mínimo sem leucina (*LEU2*).

Alíquotas de DNA plasmidial resultante da mini preparação do recombinante YEplac181/*PUP2* foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *BamHI*, para verificação da inserção do gene no plamídeo em gel de agarose. Uma colônia foi selecionada e estriada em nova placa de Petri com meio de cultura Lamp para posterior realização de extração de DNA plasmidial de bactéria em média escala por método de lise com Triton. Após a confirmação da clonagem, o próximo passo foi transformar a linhagem diplóide a/α W303 Δ *PUP2::HIS3* com o vetor recombinante YEplac181/*PUP2*. As leveduras transformadas foram inoculadas em placas contendo meio de cultura seletivo (meio mínimo suplementado com os aminoácidos adenina, triptofano e uracila). Colônias isoladas foram selecionadas e transferidas para outra placa com meio seletivo nas mesmas condições que a anterior para aumentar o espaço de crescimento.

Colônias da linhagem transformada (W303 Δ *PUP2::HIS3*[YEplac181-*PUP2*]) foram purificadas e o fenótipo resultante da complementação do gene *PUP2* avaliado após a análise de esporulação em meio KAc e dissecação de tétrades em meio YPD e em meio seletivo. Selecionadas as tétrades transformantes, as mesmas foram submetidas a um cruzamento primeiramente em placa de YPD com as linhagens de levedura CB11 e KL114 e em seguida replicadas em placa com meio seletivo para selecionar células que fossem do tipo “ α ”.

Construção dos alelos mutantes no gene *PUP2*

A linhagem portando a mutação C221S foi obtida através de sucessivas reações de PCR do gene *PUP2* com a utilização dos oligonucleotídeos PUP2-5 e PUP2-2. O produto de 300 pb do PCR foi digerido com as enzimas *BamHI* e *ClaI*. Concomitantemente, foi feita a amplificação dos oligonucleotídeos PUP2-6 e PUP2-1 gerando um fragmento de 1000 pb digeridos com as enzimas *EcoRI* e *ClaI*. Ambos os fragmentos resultantes foram clonados primeiramente no vetor episomal YEplac181 e, posteriormente no vetor integrativo YIp349, ambos previamente digeridos com *EcoRI* e *BamHI*, conforme esquematizado na **Figura 15**.

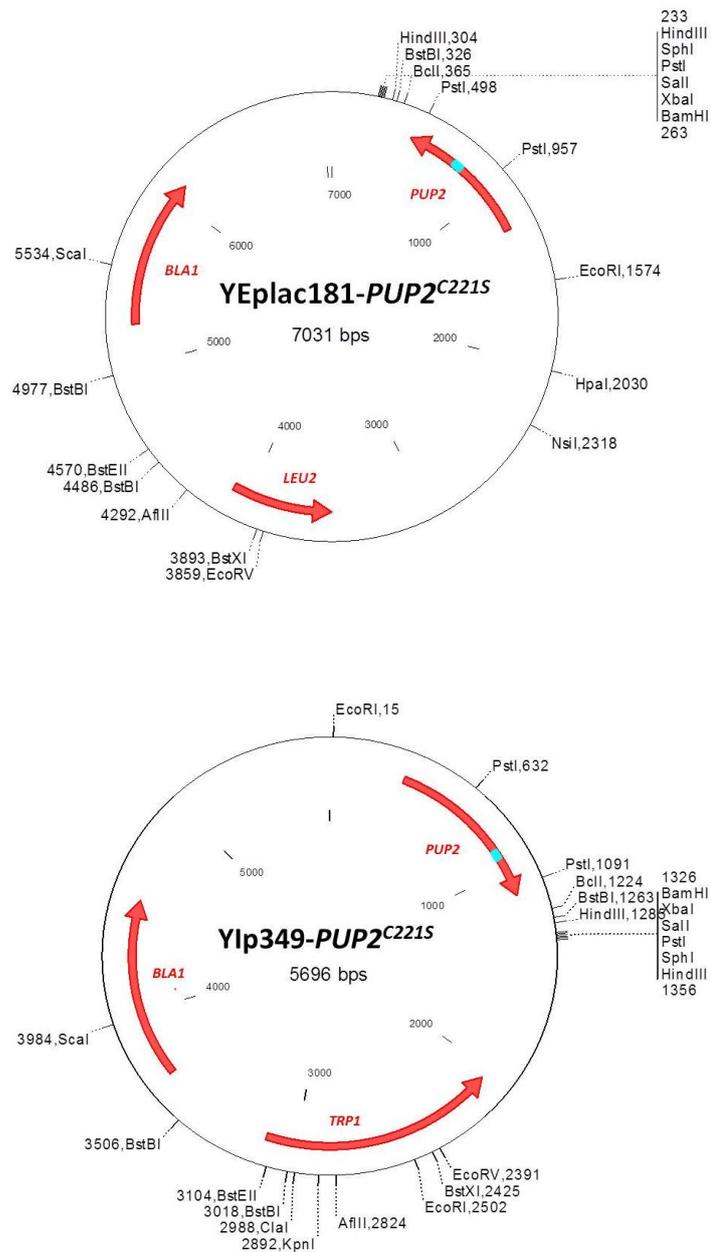
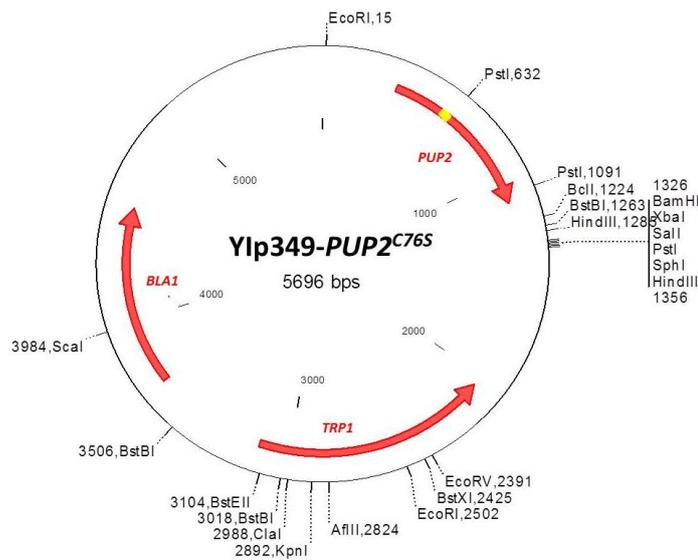


Figura 15. Representação esquemática das construções do vetor epissemal YEplac181-*PUP2*^{C221S} e do vetor integrativo YIp349-*PUP2*^{C221S}. Acima, esquema da construção do vetor recombinante YEplac181-*PUP2*^{C221S}, obtido da clonagem do gene *PUP2* portando a mutação sítio-específica C221S no vetor YEplac181 nos sítios de restrição *EcoRI* e *BamHI*, e, abaixo, esquema da construção do vetor integrativo YIp349-*PUP2*^{C221S}. O mapa mostra onde estão os sítios de restrição relevantes para clonagens. Destacados em vermelho o local da inserção do gene *PUP2* no vetor, o gene *BLA1* que codifica a proteína β -lactamase tornando as bactérias transformadas resistentes à ampicilina, e, o gene de seleção de leveduras em meio mínimo sem leucina (*LEU2*) ou sem triptofano (*TRP1*). Destacado em azul claro o local da mutação sítio-específica C221S no gene *PUP2* clonado nos respectivos vetores.

As linhagens portando a mutação simples C76S e o duplo mutante C76S/C221S foram obtidas através de sucessivas reações de PCR do gene *PUP2*. A mutação C76S foi gerada com a utilização dos oligonucleotídeos PUP2-1/PUP2-9 e PUP2-2/PUP2-10, o produto de 550 e 740 pb do PCR foi digerido com as enzimas *EcoRI/BamHI* e *BamHI*, respectivamente. Ambos os fragmentos resultantes foram clonados no vetor integrativo YIp349 previamente digerido com *EcoRI* e *BamHI*. A partir das clonagens obtidas anteriormente, a C221S, e também a C76S, ambas confirmadas por gel de agarose e sequenciamento, deu-se início a construção do duplo mutante C76S/C221S. O pDNA referente a construção da linhagem mutante C221S foi submetido a uma digestão total com a enzima *BamHI*, e posteriormente a digestão parcial com *PstI*, gerando um fragmento de 700 pb que foi clonado no pDNA contendo a mutação sítio específica YIp349-*PUP2*^{C76S}, este já digerido com as mesmas enzimas, gerando assim o vetor recombinante YIp349-*PUP2*^{C76S/C221S} (Figura 16).



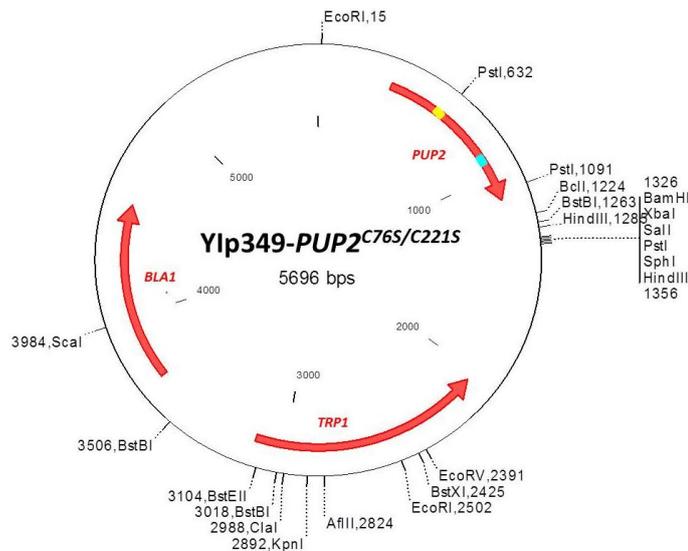


Figura 16. Representação esquemática das construções dos vetores integrativos YIp349-*PUP2*^{C76S} e do duplo mutante YIp349-*PUP2*^{C76S/C221S}. Acima, esquema da construção do vetor YIp349-*PUP2*^{C76S}, obtido da clonagem do gene *PUP2* portando a mutação sítio-específica C221S no vetor YIp349 nos sítios de restrição *EcoRI* e *BamHI*, e, abaixo, esquema da construção do duplo mutante no vetor integrativo YIp349-*PUP2*^{C76S/C221S}. O mapa mostra onde estão os sítios de restrição relevantes para clonagens. Destacados em vermelho o local da inserção do gene *PUP2* no vetor, o gene *BLA1* que codifica a proteína β-lactamase tornando as bactérias transformadas resistentes à ampicilina, e, o gene de seleção de leveduras em meio mínimo sem triptofano (*TRP1*). Destacado em amarelo o local da mutação sítio-específica C76S no gene *PUP2* clonado em ambos os vetores, e, em azul claro o local da mutação sítio-específica C221S no gene *PUP2* clonado no respectivo vetor.

Crescimento celular das linhagens de levedura *S. cerevisiae* e preparação do extrato celular total

A linhagem selvagem RJD1144 derivada da linhagem JD47-13C, e as linhagens portando as mutações sítio-específicas C76S e C221S, foram inoculadas em meio YPD contendo 4% de glicose e coletadas após 60 horas de incubação, a 30°C, sob agitação constante de 200 rpm. Após o crescimento celular, os meios foram submetidos a 3 ciclos de centrifugação por 7 minutos, a 8.000 rpm e a 4 °C, intercalados com a lavagem das células com água Milli-Q para remover o excesso de meio de cultura, obtendo-se no final das centrifugações a formação do *pellet* celular. Para a lise celular, as células foram ressuspendidas em tampão Tris-HCl (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM de MgCl₂ e 20 mM KCl) e rompidas por agitação vigorosa com pérolas de vidro a 4 °C durante 60 minutos e o extrato celular obtido foi centrifugado a 15.000 rpm por 120 minutos a 4 °C.

Purificação do proteassomo 20S por cromatografia de afinidade a níquel

As células de *S. cerevisiae* da linhagem selvagem bem como das mutantes dispõem de uma cauda de poli-histidina e a seqüência do peptídeo FLAG (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) fusionadas à subunidade PRE1 (β 4) do complexo, o que possibilita a purificação do 20SPT por cromatografia de afinidade. Assim, após o crescimento até a fase estacionária (60 horas), as mesmas foram ressuspensas em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7.5, acrescido de 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM KCl e 20 mM de imidazol. As células foram então rompidas por agitação vigorosa com pérolas de vidro a 4°C e o extrato celular obtido foi centrifugado a 8.500 rpm por 2 horas a 4 °C. O proteassomo contido no extrato protéico foi purificado em colunas de afinidade a níquel HisTrapTM FF (GE Healthcare) ou Ni-NTA Superflow Cartridge (Qiagen) de acordo com o manual do fabricante. A eluição do proteassomo da coluna foi realizada em gradiente linear no tampão da purificação contendo 400 mM de imidazol no sistema AKTA *purifier* (GE Healthcare). As alíquotas ativas foram concentradas em filtros Amicon Ultra YM-100 e dessalinizadas em colunas PD10-Desalting (GE Healthcare) em tampão padrão (20 mM Tris-HCl pH 7.5 ou 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM de MgCl₂ e 20 mM KCl).

Purificação do proteassomo 20S em coluna de troca iônica (aniônica)

As células de *S. cerevisiae* da linhagem selvagem e das mutantes foram rompidas em tampão 20 mM Tris-HCl pH 7.0, acrescido de 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl juntamente a agitação vigorosa com pérolas de vidro a 4 °C e o extrato celular foi centrifugado a 8.500 rpm por 2 horas a 4 °C. As amostras foram imediatamente injetadas no sistema AKTA *purifier* (GE Healthcare) e as separações foram realizadas em coluna HiPrep DEAE FF 16/10 (GE Healthcare). Os tampões da fase móvel utilizados foram: solução A (20 mM Tris-HCl pH 7.0, acrescido de 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl) e solução B (20 mM Tris-HCl pH 7.0, acrescido de 5 mM MgCl₂, 500 mM KCl). A eluição do proteassomo da coluna foi realizada em gradiente linear no tampão da purificação contendo 500 mM de KCl no sistema AKTA *purifier* (GE Healthcare). As alíquotas ativas foram submetidas a ensaios de atividade e posteriormente concentradas em filtros Amicon Ultra YM-100, seguidas de troca de tampão Tris para Hepes (10 mM Hepes, acrescido de 5 mM MgCl₂ e 100 mM KCl) para posterior separação por cromatografia de troca aniônica utilizando a coluna MONO-QTM 10/100 GL (GE Healthcare). A eluição do proteassomo da coluna também foi realizada em gradiente linear no tampão da purificação contendo 1 M de KCl no sistema AKTA *purifier* (GE Healthcare) e as alíquotas

ativas concentradas em filtros Amicon Ultra YM-100, seguidas de troca de tampão Hepes para Tris 20 mM, pH 7.5.

Purificação do proteassomo 20S em coluna anti-FLAG

As células de *S. cerevisiae* da linhagem mutante C76 foram rompidas em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7.4, acrescido de 150 mM NaCl juntamente a agitação vigorosa com pérolas de vidro a 4 °C e o extrato celular obtido foi centrifugado a 8.500 rpm por 2 horas a 4 °C. O proteassomo contido no extrato protéico foi purificado em coluna anti-FLAG montada em nosso laboratório de acordo com o manual do fabricante, a SIGMA (Anti-Flag M2 Affinity Gel). A eluição do proteassomo da coluna foi realizada em tampão 0.1 M glicina e as alíquotas ativas foram submetidas a ensaios de atividade e posteriormente concentradas em filtros Amicon Ultra YM-100, seguidas de troca de tampão. As alíquotas ativas foram concentradas em filtros Amicon Ultra YM-100 e dessalinizadas em colunas PD10-Desalting (GE Healthcare) para tampão padrão (20 mM Tris-HCl pH 7.5).

Ensaio de atividade peptidásica do proteassomo 20S

As atividades peptidásicas do 20SPT purificado das linhagens selvagem e mutante C76 e C221 bem como do 20SPT e 26SPT obtidos a partir do extrato celular foram testadas utilizando-se os peptídeos fluorogênicos suc-LLVY-MCA, z-ARR-AMC e z-LLE-AMC como substratos para a atividade tipo-quimiotripsina (ChT-L), tipo-tripsina (T-L) e pós-acídica (PA), respectivamente. Alíquotas de preparações de proteassomo foram incubadas com 50 µM de substrato peptídico em tampão 20 mM Tris-HCl pH 7.5 na presença ou ausência de 10 mM KCl e/ou 5 mM MgCl₂ por 45 minutos, a 37°C. Para avaliar a atividade do 26SPT adicionamos também 5 mM de ATP. A emissão da fluorescência foi capturada a 440 nm (excitação a 365 nm) em espectrofluorímetro.

Ensaio de atividade proteolítica analisada por SDS-PAGE

Para este ensaio foram utilizadas proteínas conhecidas por serem hidrolisadas pelo 20SPT de forma ubiquitina-independente, tais como a Grx2 (Glutarredoxina 2), a α -Syn (α -sinucleína) e a β -Cas (β -caseína). 15 µg de Grx2 foram incubadas com 5 µg de preparações de proteassomo selvagem e mutante α 5-C221S durante 120 minutos, na presença e ausência de DTT; 5 µg de α -sinucleína foram incubadas com 20 µg das preparações de 20SPT durante 120 minutos; 20 µg de β -caseína foram incubadas com 5 µg do proteassomo purificado durante 15

minutos. As incubações foram realizadas à 37 °C sob agitação a cada 5 minutos. Após a incubação, as amostras de α -Syn e β -Cas foram filtradas para separar o proteossomo do substrato e seus fragmentos por centrifugação em microfiltros Microcon-100 (Millipore). Recuperamos o filtrado e o ressuspendemos em tampão de amostra (10 % de glicerol, 1 % SDS, 0,02 % de azul de bromofenol em 100 mM de tampão Tris-HCl pH 6.8). Quando as proteínas utilizadas como substrato não possuíam massa molecular próxima as das subunidades do proteossomo (entre 20 e 32 kDa), o proteossomo também foi aplicado no gel e suas bandas aparecem destacadas acima das demais proteínas. Para que a degradação destas proteínas e o surgimento de fragmentos peptídicos pudessem ser acompanhados, as amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12,5-15% e submetidas a eletroforese. Os ensaios foram realizados em tampão padrão 20 mM Tris pH 7.5 acrescido de: 20 mM KCl e 5 mM MgCl₂, para a Grx2; 5 mM MgCl₂ para a α -Syn, e, para a β -Cas não houve adição iônica ao tampão. Os géis foram posteriormente corados com Coomassie Brilliant Blue – R 250.

Curva de crescimento

Os inóculos foram obtidos a partir de células das linhagens selvagem e mutante C76 e C221 cultivadas em meio YPD contendo 4% de glicose durante 12 horas. Após esse tempo, as células foram diluídas até uma D.O = 0.1 (λ 600 nm), inoculadas em meio YPD 4% e incubadas a 30 °C sob agitação contínua durante 60 horas. As medições da absorbância foram feitas nos intervalos: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 e 60 horas. A partir dos dados obtidos construiu-se um gráfico para a análise da curva de crescimento.

Tolerância ao estresse oxidativo com peróxidos por diluição seriada

Para analisar a sensibilidade das linhagens selvagem e mutantes C221 e C76 a diferentes tratamentos com peróxido inorgânico e orgânico utilizamos o método adaptado a partir de MUNHOZ & NETTO, 2004). São feitos pré-inóculos das linhagens de levedura em 5 mL de YPD e deixados a 30 °C, em agitação contínua. Após 24 horas, as culturas de células foram diluídas até uma D.O = 0.2 (λ 600 nm) em 5 mL de meio de cultura YPD 4%, a 30 °C, sob agitação, até a fase estacionária (60 horas). Passado esse tempo, a D.O é medida novamente e as amostras são ajustadas à D.O = 0.2 em água milli-Q autoclavada. Foram feitas diluições seriadas destas suspensões de células (1/5, 1/25, 1/125, 1/325) e subsequentemente 5 μ L de cada diluição foi plaqueada em YPD 4%. As placas de Petri com meio de cultura YPD 4% devem ser previamente preparadas com o tratamento dos peróxidos nas concentrações

desejadas (aqui utilizamos as concentrações de 0.5, 1, 2 e 4 mM de H₂O₂ e 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25 mM de t-BOOH), e, espalhado sobre a placa. Após plaquear as alíquotas correspondentes a cada diluição, deixar incubado a 30°C, por 48 horas e analisar o fenótipo. Fazer em duplicata!

Análise morfológica das linhagens

As células das linhagens selvagem e mutante C76 e C221 foram obtidas a partir de inóculos previamente realizados em meio líquido YPD contendo 4% de glicose, onde posteriormente foram diluídas até D.O = 0.2, inoculadas em meio YPD 4% e incubadas a 30 °C sob agitação contínua, até a fase logarítmica (12 horas), e, a fase estacionária (60 horas). Após alcançarem a fase de crescimento desejada, alíquotas dessas células foram estriadas em lâminas de vidro sobrepostas por lamínulas e a morfologia das linhagens de levedura foi observada através de microscópio óptico comum.

Ensaio de envelhecimento cronológico

As células de levedura (selvagem e mutantes) foram inoculadas em meio líquido YPD contendo 4% de glicose, durante 12 horas. Posteriormente, foram diluídas até D.O = 0.2, e crescidas em meio mínimo sintético completo (2% de glicose, 0,17% de YNB, 0,5% de sulfato de amônio e 0,12% de uma mistura de aminoácidos essenciais com exceção de Trp, Ura e His para os meios das linhagens mutantes e apenas sem His para a selvagem), sob agitação constante de 200 rpm a 30 °C. O tempo de vida cronológico foi determinado pela habilidade de formação de colônias em um meio de cultura. Para isso, a cada 48 horas de crescimento, 100 células da cultura foram semeadas em placas de YPD sólido (ágar 2%), e após 48 horas de incubação na estufa a 30 °C, as colônias foram contadas (OLIVEIRA *et al.*, 2008; TAHARA *et al.*, 2007).

Gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Os géis de poliacrilamida para verificar a pureza e tamanho das proteínas foram feitos seguindo o protocolo:

- Stacking gel (5%): Misturou-se 670 µL da solução Acrilamida/Bis-Acrilamida, 1 mL de Tris-HCl 1 M pH 6.8 + SDS 10%, e, 2,3 mL de água Milli-Q. Para que houvesse polimerização, antes de despejar a mistura entre as placas, foi adicionado 30 µL de persulfato de amônio 10% e 5 µL de TEMED (ao mesmo tempo).

- Separating gel (12,5%): Misturou-se 4,2 mL da solução Acrilamida/ Bis-Acrilamida, 2,5 mL de Tris 1 M pH 8.8 + SDS 10%, e 3,3 mL de água Milli-Q. Antes de despejar a mistura entre as placas, adicionou-se 60 µL de persulfato de amônio 10% e 6 µL de TEMED.

- Separating gel (15%): Misturou-se 5 mL da solução Acrilamida/ Bis-Acrilamida, 2,5 mL de Tris 1 M pH 8.8 + SDS 10%, e 2,5 mL de água Milli-Q. Antes de despejar a mistura entre as placas, adicionou-se 60 µL de persulfato de amônio 10% e 6 µL de TEMED.

As preparações das amostras foram misturadas com loading buffer (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS e 0,02% azul de bromofenol). O tampão de corrida utilizado foi o Tris-Glicina e o padrão de peso molecular quando utilizado foi o Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers (GE Healthcare Amersham). As condições de corrida estão mostradas na tabela abaixo. Finalizada a corrida, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue – R250, para posterior visualização dos spots e/ou bandas ou transferidos para a membrana de nitrocelulose para futuros ensaios de imunomarcção.

Tabela 6: Separação proteica por eletroforese em gel SDS-PAGE 10 - 15%.

Etapa	Voltagem (V)	Corrente (mA)	Tempo (minutos)
1	100	15	15
2	150	45	Final da corrida

Gel Nativo

Foram feitos géis nativos de poliacrilamida 4,5% para verificar a integridade do proteossomo 20S purificado. Para a preparação do gel dissolveu-se 250 mg de sacarose em 5 mL de tampão Tris-Borato pH 8.4, e misturou com 1,5 mL da solução Acrilamida/Bis-Acrilamida, 50 µL de MgCl₂ 1 M e 3,38 mL de água Milli-Q. Para que houvesse polimerização, antes de despejar a mistura entre as placas, foi adicionado 70 µL de persulfato de amônio 10% e 7 µL de TEMED (ao mesmo tempo). As preparações das amostras foram misturadas com tampão da amostra (250 mM Tris pH 7.5, 50% glicerol) e o tampão de corrida utilizado foi o Tris 90 mM e ácido bórico 80 mM, pH 8.4. A corrida do gel foi

realizada a 100 V, durante 3 horas, e após, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue – R250, para posterior visualização das bandas.

Gel de acrilamida – Eletroforese bidimensional (2-DE)

Após a preparação das amostras, as proteínas totais extraídas, purificadas e quantificadas, foram submetidas à análise por eletroforese de géis bidimensionais (2-DE), onde as proteínas são separadas em duas dimensões, de modo que todas as proteínas/moléculas se espalhem por todo o gel. As duas propriedades usadas neste tipo de separação são o ponto isoelétrico e o peso molecular.

Reidratação das tiras IPG

Cerca de 50 µg de proteína foram diluídas na solução de reidratação (Uréia 7 M, CHAPS 2% m/v, IPG buffer® 4-7 0,5% v/v, azul de bromofenol 0,002% m/v), para um volume final de 125 µL e aplicados no cassete de reidratação (GE Healthcare). Em seguida, remove-se com cuidado o plástico protetor da tira de gradiente de pH 4-7 de 7 cm, posicionamos o lado do gel da tira para baixo, molhamos a parte de gel da tira na solução de reidratação misturada com as proteínas solubilizadas de forma que o lado do gel ficasse voltado para a amostra e que a amostra ficasse distribuída de forma homogênea pela tira. As tiras foram incubadas por 16-20 horas à temperatura ambiente.

Primeira dimensão - Separação de proteínas pelo ponto isoelétrico

Na primeira etapa do experimento, as proteínas foram separadas com base nas diferenças de ponto isoelétrico, sendo esta primeira etapa chamada de focalização isoelétrica (IEF). A amostra previamente reidratada e aplicada em uma tira de gel que possui um gradiente de pH, é então submetida a um potencial elétrico, onde as proteínas migrarão até que o ponto isoelétrico seja alcançado, isto é, o ponto em que a carga da proteína seja 0 (uma carga neutra). Neste ponto, a proteína pára de migrar, ocorrendo então a primeira etapa de separação. Assim, as tiras foram retiradas do cassete de reidratação e transferidas para a cuba de corrida (IPGphor3 - GE Healthcare), montada de acordo com o manual do fabricante. Após a montagem dos eletrodos, as tiras foram cobertas com óleo mineral sendo, então, efetuada a corrida, conforme descrito na tabela 7. Após a corrida, procedeu-se a segunda dimensão.

Tabela 7: Etapas da focalização isoeétrica.

Etapa	U (V)	Tempo (Vh)
Step	300	200 Vh
Gradiente	1000	300 Vh
Gradiente	5000	4500 Vh
Step	5000	2000 Vh

T = 20°C // Tempo total = 03:01 h // Total Vh = 7000 // 50 µA por tira.

Segunda dimensão - Separação de proteínas pelo peso molecular

Após a separação de proteínas a partir de seus pontos isoeletricos, as mesmas foram separadas por outro tipo de fracionamento, o SDS-PAGE, no qual, as proteínas, com carga negativa pela associação com o SDS, são expostas à corrente elétrica e separadas de acordo com o seu peso molecular. Portanto, as proteínas maiores, migrarão vagarosamente pelo gel, ficando mais retidas, e as proteínas menores se locomoverão mais rapidamente, se depositando na região mais baixa do gel. Previamente ao SDS-PAGE, há uma etapa de equilíbrio das tiras que deve sempre ser feita pouco antes de correr a segunda dimensão. Na próxima etapa, foram utilizadas 2 abordagens diferentes com as tiras focalizadas contendo as amostras purificadas: (1) as tiras foram reduzidas com Ditionitroto (DTT) (100 mg/10 mL), e em seguida, alquiladas com Iodoacetamida (IAA) (250 mg/10 mL) ou (2) as tiras foram equilibradas apenas em solução de equilíbrio, ou seja, não passando pelas etapas de redução e alquilação. Assim, as tiras foram então incubadas em tampão de equilíbrio (Tris-HCl 75 mM pH 8.8, uréia 6 M, glicerol 30% m/v, SDS 2% m/v, azul de bromofenol 0,002%), na presença ou ausência de DTT e de IAA, por 15 minutos cada, à temperatura ambiente com agitação leve. Após a etapa de equilíbrio, as tiras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%. Finalizada a etapa de equilíbrio, as tiras devem ser posicionadas com a parte do gel em contato com o gel. Aplicar 10 – 15 µl do marcador de peso molecular (Full Range Rainbow Molecular Weight Markers - GE Healthcare), em uma pequena tira de papel de filtro (0,5 x 0,5 cm) e esta é posicionada em paralelo e alinhada com a tira. Conectar os eletrodos ao aparelho e dar início a eletroforese. A corrida foi finalizada assim que o azul de bromofenol atingiu a base dos géis voltada ao pólo positivo. Finalizada a corrida, colocar o gel em solução de fixação (etanol 50% v/v, ácido acético glacial 10% v/v) por 30 minutos e

transferido para a solução de Coomassie Blue G-250 coloidal, onde foi incubado “overnight”. Após este período, os géis foram descorados em solução de etanol 20% por 5 minutos e posteriormente mantidos em água Milli-Q para que fosse possível a visualização dos spots e futuras análises do mesmo. As condições de corrida foram as mesmas como mostradas na tabela 6. Finalizada a corrida, os géis foram corados com Coomassie[®] Blue G-250 coloidal, para posterior visualização dos spots ou transferidos para a membrana de nitrocelulose para futuros ensaios de imunomarcação, como descrito abaixo.

Coloração com Coomassie Brilliant Blue – R 250

Terminada a corrida do gel, o mesmo foi imerso em solução de Coomassie Brilliant Blue – R250 (0.1% de Coomassie Brilliant Blue – R250 dissolvido em 45% metanol e 10% ácido acético glacial) por no mínimo 30 minutos. Após este período, o gel foi descorado para que fosse possível a visualização das bandas. Isso foi feito através de sucessivas lavagens com solução descorante (10% metanol e 10% ácido acético glacial).

Coloração com Coomassie[®] Blue G-250 coloidal

A detecção dos “spots” proteicos presentes nos géis 2-DE foi realizada por coloração com Coomassie Blue G-250 coloidal. Primeiramente o gel foi incubado por 30 minutos na solução de fixação (50 % etanol e 10% ácido acético glacial), e então lavado três vezes por 5 minutos cada lavagem, com água Milli-Q. A preparação da solução para a coloração por Coomassie[®] blue coloidal foi feita conforme descrita em NEUHOFF *et al.* (1988). Os géis foram incubados na solução de corante “overnight”, e após este período, os géis foram descorados rapidamente por cerca de 5 minutos em uma solução de 20% etanol, e foram posteriormente mantidos em água Milli-Q, esta sendo trocada algumas vezes para não fungar.

Ensaio de imunomarcação

Para a realização dos experimentos de imunomarcação, foram aplicados 50-70 µg de extrato celular total em gel SDS-PAGE 12,5-15% ou 2-DE e submetidas à eletroforese. As amostras foram transferidas por 2 horas com amperagem constante em 125 mA para membrana de nitrocelulose de 0,45 µm e após, para checar a transferência e verificação das bandas ou spots e também como controle de loading, as membranas foram coradas com Ponceau Red (0,1% Ponceau Red, 5% de ácido acético). Após transferência das amostras para membrana de nitrocelulose foi feita a marcação com os anticorpos. A imunomarcação foi

realizada utilizando o aparelho SNAP I.d. (*Protein detection system – Millipore*) Assim, a membrana foi incubada com 5% de agente bloqueador diluído em TBS-T (150 mM NaCl, 0,1% de Tween-20 em 100 mM Tris-HCl pH 7.5). A membrana foi então imersa por 10 minutos em solução contendo os anticorpos primários diluídos em TBS-T, seguida de lavagens com TBS-T. Os anticorpos secundários também diluídos em TBS-T foram então adicionados sobre a mesma durante 10 minutos e novos ciclos de lavagens com TBS-T. Após a marcação da membrana com os respectivos anticorpos, a mesma foi revelada utilizando kit quimioluminescente (Sinapse - Super Signal West Dura / Extended Duration Substrate) e a emissão registrada por fotodocumentador.

Tabela 8. Diluições dos anticorpos de acordo com o sistema SNAPid™.

Anticorpo primário	Diluição	Anticorpo secundário	Diluição
<i>anti-19S</i>	1:333	Anti-rabbit	1:333
<i>anti-20S</i>	1:333	Anti-rabbit	1:333
<i>anti-actina</i>	1:333	Anti-rabbit	1:333
<i>anti-flag</i>	1:20000	Anti-mouse	1:333
<i>anti-his</i>	1:250	Anti-mouse	1:333
<i>anti-α3</i>	1:66	Anti-rabbit	1:333
<i>anti-α4</i>	1:66	Anti-rabbit	1:333

Extração de RNA total de levedura *S. Cerevisiae*

A extração do RNA das células se deu pelo método do fenol ácido quente (AUSUBEL, *et al.*, 1994), e, os ensaios foram realizados com a colaboração da Dra. Maria Luiza M. B. de Chaves (ICB-USP) e sua aluna de doutorado Caroline Antunes Lino. Células das linhagens RJD1144 selvagem e mutante simples C221 e C76 foram cultivadas em 10 mL de YPD 4% até atingirem a fase exponencial (D.O = 1.0), e coletadas por centrifugação com os devidos ajustes de volume para obtenção da mesma quantidade de células de todas as amostras.

As células foram rompidas com TES (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, SDS 0,5%) na presença de fenol ácido e clorofórmio e, em seguida, o RNA total foi precipitado com etanol

absoluto e acetato de sódio 3 M (pH 5.3), lavado com etanol 70% e ressuspendido em 50 µL de água Milli-Q. A concentração de RNA total foi determinada em espectrofotômetro de alta sensibilidade (Gen5 Data Analysis Software, BioTek, Winooski, Vermont, United States of America). A qualidade do RNA extraído foi avaliada através da análise da razão entre as absorvâncias em $\lambda = 260$ nm e $\lambda = 280$ nm e da análise da integridade das subunidades de RNA ribossomal (18S e 28S) sob luz UV, após separação por eletroforese em gel de agarose (1%) contendo brometo de etídio.

A reação de transcrição reversa para síntese da fita complementar ao mRNA (cDNA), foi realizada utilizando-se 1 µg do RNA total segundo as especificações fornecidas pelo fabricante da enzima transcriptase reversa (M-MLV Reverse Transcriptase, Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, California, United States of America) em termociclador (PTC 200 Termocycler, MJ Research, Waltham, Massachusetts, United States of America).

Reação de qPCR

As reações de qPCR foram realizadas segundo protocolo do fabricante do reagente Platinum SYBR Green qPCR UPSeR Mix-UDG (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, California, United States of America). Curvas de concentração de primer e cDNA foram previamente realizadas para a padronização das condições do ensaio. As amostras foram avaliadas em duplicata, em três experimentos independentes, sempre na presença de um controle negativo (ausência de cDNA). No termociclador, as amostras foram submetidas a 40 ciclos de temperatura (95 °C por 2 minutos; 95 °C por 15 segundos; 60 °C por 1 minuto; 72 °C por 15 segundos). Os níveis de cDNA foram determinados através do cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ Tratado} - \Delta Ct \text{ Controle})$ e $\Delta Ct = (Ct \text{ gene interesse} - Ct \text{ controle interno})$. O valor do Ct representa a linha de base para detecção da fluorescência emitida, correspondente à fase exponencial, conforme a amplificação do material genético analisado. Os níveis de *ACT1* foram utilizados como controle interno, e as sequências dos oligonucleotídeos utilizados nestes ensaios encontram-se descritas na tabela a seguir:

Tabela 9. Sequência de oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de qPCR para análise da expressão de unidades do proteassomo (19S e 20S) e da chaperona Ump1.

Gene / Subunidade	Sequência sense	Sequência anti-sense
<i>PUP2</i> / $\alpha 5$	5'TAACGCAATCGGTGTGTGAT 3'	5'ATGGCCAGCAATTAACAAGG3'
<i>PRE1</i> / $\alpha 4$	5'GACCATTGGGAGAACTCCA3'	5 TGTTTCGATTTGGGTGACGTA3'
<i>PRE9</i> / $\alpha 3$	5'CGCCGGTTATGACGATAGAT3'	5'TAGGGTTTGTGCTGCTGATG3'
<i>PRE6</i> / $\beta 4$	5'TCATGGTTACTCGGGGTTTT3'	5'AACAATGACGCCCTTGAAGT3'
<i>RPT1</i> / Rpt1	5'AAGTTGTCGAGCTGCCCTTA3'	5'GCTCAGACCCAATGACCCTA3'
<i>UMPI</i> / Ump1	5'GACACATTACGCCAGCAAGA3'	5'CTTTTCATTGGTTCGGCAAT3'
<i>ACT1</i> ***	5'GGTCCCAATTGCTCGAGAGAT3'	5'GAAGTCCAAGGCGACGTAACA3'

Os dados foram expressos como média \pm desvio-padrão e representados como vezes de indução/variação em relação ao controle (***). Os *primers* foram desenhados e sintetizados de acordo com os programas PrimerQuestSM e OligoAnalyser 3.1 (Integrated DNA Technologies-IDT, Coralville, Iowa, United States of America).

Análise do proteassomo 20S por microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A técnica de TEM foi realizada no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, em colaboração com o Prof. Cristiano L. P. de Oliveira e da mestrandia Renata N. Bicev, ambos do Departamento de Física Experimental, Instituto de Física, USP. Para estes ensaios, as amostras de 20SPT previamente purificadas (12 μ L de proteassomo (0,1- 0,5 μ g/ μ L) foram aplicadas em microtelas cobertas com um fino filme de parlódio (polímero de celulose) e carbono. Após 1 minuto, o excesso do líquido foi removido com auxílio de papel de filtro e as amostras foram coradas negativamente utilizando solução de ácido fosfotungstico a 2 % como corante. Novamente com o auxílio de um papel de filtro removeu-se por completo a solução contrastante após 10 segundos. As análises foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão LEO 906E (Zeiss, Alemanha) com voltagem de aceleração de 100 kV, e as imagens capturadas por câmera integrada Megaview III utilizando o software iTEM - *Universal TEM Imaging Platform* (Olympus Soft Imaging Solutions GMBh, Alemanha).

Identificação do resíduo glutationilado da subunidade $\alpha 5$ do proteassomo 20S (Cys76) na linhagem mutante C221 através da espectrometria de massas

Os “spots” do gel 2-DE foram retirados com o auxílio de uma espátula, e, transferidos para tubos eppendorfs, onde foram cortados em pedaços menores e posteriormente, descorados por em uma solução de 100 mM bicarbonato de amônio pH 7,8 contendo 50 % acetonitrila (ACN) durante 45 minutos a 37 °C. Este processo foi repetido por no mínimo duas vezes ou até que o corante tivesse saído completamente. Após as lavagens, os spots foram desidratados adicionando 100 μ L de ACN 100% e incubados à temperatura ambiente por 5 minutos. A ACN foi então removida, e os tubos eppendorfs foram mantidos a temperatura ambiente por 5 minutos para permitir a evaporação da ACN residual. Para iniciar a digestão enzimática, os spots secos foram reidratados em uma solução de 40 mM de bicarbonato de amônio / 10 % de ACN contendo tripsina (Trypsin Gold – Promega; 20 mg/mL) durante 1 hora e a 4 °C. Posteriormente, adicionou-se tampão de digestão não contendo tripsina até cobrir os pedaços de gel e as amostras foram incubadas por 18 horas a 37 °C. Os peptídeos gerados pela clivagem enzimática foram extraídos dos géis em 2 etapas: na primeira, as amostras foram incubadas com 150 μ L de água Milli-Q, durante 10 minutos e sob frequente agitação; logo após, a solução foi transferida para um novo tubo; na segunda etapa, as amostras foram incubadas em 50 μ L de uma solução de 50 % ACN / 5 % TFA, durante 1 hora e sob constante agitação. Em seguida, juntou-se esta solução com aquela obtida na primeira etapa. A segunda etapa foi repetida por 2 vezes. Por último, a solução contendo os peptídeos foi seca e preparada para as análises por espectrometria de massas.

As análises para a identificação proteômica das subunidades do proteassomo, bem como sobre as possíveis adições de glutationa em determinados resíduos de aminoácidos foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto Butantan. Os materiais oriundos da digestão por tripsina foram analisados através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS), utilizando um sistema UFLC binário (20A Prominence, Shimadzu Co., Japan) acoplado ao espectrômetro de massas do tipo Electrospray - Ion Trap - Time of Flight (ESI-IT-TOF) (Shimadzu Co., Japão), e/ou por espectrometria de massas tipo MALDI/TOF (Ionização e dessorção a laser assistida por matriz), sob a supervisão do Dr. Daniel Carvalho Pimenta.

Para as análises por LC-MS, as amostras foram ressuspensas em água / 0,1% Ácido Acético e analisadas em uma coluna C18 (Discovery C18, 5 μ m, 50 mm x 2.1 mm), tendo como solventes (A) Ácido Acético / água (1:999) e (B) Ácido Acético / ACN / água

(1:900:99). Por meio de um fluxo constante de 0,2 mL/min, o gradiente variou de 5 a 70% de solvente B, durante 35 minutos, a 37 °C, e monitorado a 214 nm por um detector Shimadzu SPD-M20A PDA. Seguida a etapa cromatográfica, foram realizadas as análises por espectrometria de massas, de acordo com os seguintes parâmetros: a voltagem utilizada da interface foi de 4,5 KV e a voltagem do detector, 1,76 KV, com temperatura de 200 °C; a fragmentação foi causada por gás de colisão argônio, com 50% de energia; e os espectros foram obtidos na faixa de 50 a 2000 m/z. O padrão de fragmentação para cada amostra foi processado pelo programa MASCOT (Ion Search) versão in house (versão 2.4.0) (PERKINS *et al.*, 1999) para análises proteômicas e/ou pelo Peaks Studio V7 (MA *et al.*, 2003) para sequenciamento 'de novo' e análises proteômicas e de comparação de sequências.

Além disto, a banda referente a subunidade $\alpha 5$ do proteassomo (identificada através das análises por LC-MS) foi analisada em um espectrômetro de massas do tipo MALDI – TOF/TOF (Axima Performance, Shimadzu). Antes da obtenção dos dados, o aparelho foi previamente calibrado utilizando-se o kit MALDI TOFMIX™ (LaserBio Labs). Logo após, a amostra foi ressuspendida em água / 0,1% Ácido Acético. Em seguida, uma alíquota do material foi co-cristalizada com o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (solução saturada em ACN / água / 0,1 % de ácido trifluoroacético) (matriz) e depositada sobre o amostrador para secagem ao ambiente. Os espectros foram obtidos utilizando-se o modo linear positivo e utilizando um intervalo de massas entre 1350 e 1830 Da.

IV. Resultados

O estudo da glutathionilação do proteassomo tem se mostrado interessante devido a sua conservação em diversos organismos (se estendendo de levedura a mamíferos, passando por plantas) e pelo fato de ser uma modificação pós-traducional que possui um importante papel funcional. Portanto, caracterizar e compreender este fino mecanismo de regulação, bem como a importância deste no processo de modulação da atividade catalítica do proteassomo é de grande interesse no grupo há anos. Em estudos realizados anteriormente pelo grupo foi descrito o mecanismo bioquímico pelo qual ocorre o processo de glutathionilação (DEMASI *et al.*, 2001 e 2003) e posteriormente a identificação dos resíduos de cisteína que são suscetíveis a essa modificação (SILVA *et al.*, 2012). Os resíduos encontrados glutathionilados concentram-se exclusivamente nas subunidades α do 20SPT, e, uma das consequências estruturais dessa modificação em subunidades α , além das alterações funcionais sítio-específicas (DEMASI *et al.*, 2001 e 2003), foi a observação de que, quando esses resíduos encontram-se glutathionilados, ocorre a abertura da câmara catalítica da partícula 20S, observado por microscopia eletrônica de transmissão e, conseqüente, desacoplamento ou inibição do acoplamento com unidades regulatórias 19S. Outro dado bastante significativo é o fato de que a forma glutathionilada, quando comparada à reduzida, degrada mais eficientemente proteínas oxidadas (SILVA *et al.*, 2012).

A análise do proteassomo 20S isolado de leveduras crescidas em meio YPD até a fase estacionária glutathionilado *in vivo* e *in vitro* permitiu a identificação de quatro diferentes subunidades glutathioniladas ($\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ e $\alpha 7$) e um total de sete resíduos de cisteínas diferentes distribuídos entre elas. Entretanto, apenas as cisteínas presentes na subunidade $\alpha 5$ (Cys76 e Cys221) foram encontradas em ambas as situações citadas acima, sugerindo uma especificidade no processo de regulação redox do 20SPT (SILVA *et al.*, 2012). Assim, fez-se essencial analisar o papel dessas cisteínas identificadas envolvidas neste processo e para isso, iniciamos a construção de linhagens portadoras de mutações sítio-específicas, através da substituição de um resíduo de cisteína por serina. Escolhemos trocar tais aminoácidos devido as suas cadeias laterais serem semelhantes, embora a cisteína contenha um grupo tiol que participa de reações redox.

Com relação aos resíduos de cisteína encontrados glutathionilados na subunidade $\alpha 5$, observou-se por estrutura tridimensional, que a Cys221 apresenta a sulfidrila totalmente exposta ao solvente, portanto, sujeita às influências do estado redox celular. Assim, iniciamos

o estudo obtendo linhagens com mutações primeiramente no resíduo Cys221, seguida da mutação no resíduo Cys76. As descrições das construções para a obtenção das linhagens mutantes estão mostradas no **Anexo I**. Posteriormente, analisamos as alterações estruturais oriundas das mutações realizadas no 20SPT nessas linhagens, bem como análises bioquímicas e fenotípicas a fim de avaliar e compreender as mudanças observadas entre as linhagens.

Análise estrutural e caracterização funcional do papel das cisteínas glutationiláveis da subunidade $\alpha 5$ do 20SPT em linhagens mutantes de *S. cerevisiae*

Com a obtenção das linhagens C76 e C221, portadoras das mutações sítio-específicas $\alpha 5$ -C76S e $\alpha 5$ -C221S (respectivamente), e a confirmação de que estes resíduos são essenciais para a viabilidade celular (**Anexo I**), iniciamos uma análise estrutural e a caracterização funcional destes resíduos nestas linhagens mutantes realizando diferentes ensaios comparativos com a linhagem selvagem RJD1144, como abordado abaixo.

Análise das atividades peptidásicas e proteolíticas do proteossomo 20S

Como mencionado anteriormente, o 20SPT é uma protease multicatalítica: a subunidade $\beta 1$ possui atividade pós-acídica (PA), a subunidade $\beta 2$ possui atividade tipo-tripsina (T-L), e, a subunidade $\beta 5$ possui atividade do tipo-quimiotripsina (ChT-L). Portanto, para analisarmos os diferentes tipos de atividade do proteossomo 20S, purificamos o mesmo das linhagens selvagem e mutante C221S após crescimento até atingir a fase estacionária (60 horas) em meio líquido YPD 4%, através de colunas de afinidade a níquel, seguida de outro método de separação por cromatografia de troca iônica em coluna Mono-Q, a fim de se obter amostras mais puras, conforme visualizado na **Figura 17**.

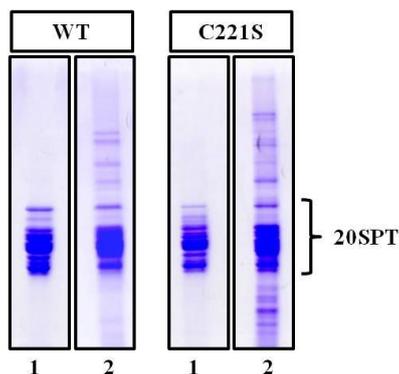


Figura 17. Pureza das preparações do 20SPT por diferentes métodos de separação. Alíquotas de 15 μg do 20SPT purificado da linhagem selvagem (WT) e mutante (C221S) foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12,5% para avaliar a pureza das amostras. (1) Cromatografia de troca iônica em coluna Mono-Q, e, (2) separação em coluna de afinidade a níquel.

Após a obtenção das preparações, incubamos 1 μg do 20SPT purificado a 37 °C em tampão 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, na presença ou ausência de 10 mM KCl e/ou 5 mM MgCl_2 . Os ensaios de atividade peptidásica e proteólise *in vitro* foram realizados por OHARA (2015). O ensaio deu-se início pela adição de 100 μM do substrato ChT-L suc-LLVY-AMC; 400 μM do substrato T-L z-ARR-AMC e 100 μM do substrato z-LLE-AMC, e a emissão da fluorescência foi capturada em espectrofluorímetro a 440 nm (excitação a 365 nm), durante 45 minutos, em intervalos de 5 minutos. Como mostrado na **tabela 10**, nos ensaios realizados em tampão Tris 20 mM, pH 7,5 na presença ou não de 5 mM MgCl_2 , o mutante C221S apresentou um aumento em torno de 40-60% na atividade sítio-específica ChT-L comparada à observada nas amostras do 20SPT selvagem, onde o mesmo efeito pode ser observado para a atividade PA. Porém, não houve variação significativa na atividade T-L entre as linhagens, independentemente do tampão utilizado.

Tabela 10 - Atividade peptidásica de preparações purificadas do 20SPT das linhagens selvagem e C221S.

	WT	C221S
ChT-L	70 \pm 13	114 \pm 10,5*
T-L	27 \pm 1	29 \pm 1
PA	22 \pm 2	32,5 \pm 2**

O 20SPT (1 μg) foi incubado em tampão Tris 20 mM, pH 7.5, a 37 °C, após a adição dos respectivos substratos, conforme descrito acima. Os resultados mostrados referem-se à média \pm SD de três experimentos independentes (diferentes preparações do 20SPT). Estão expressos em UAF (Unidade Arbitrária de Fluorescência/min). Cada ensaio foi realizado em triplicata. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,0033$ (Adaptado de OHARA, 2015).

Decidimos analisar a atividade sítio-específica ChT-L do 20SPT presente no extrato celular total da linhagem selvagem, C221S e C76S, na presença e/ou ausência de ATP (adicionando desde o início da lise celular), a fim de avaliar não apenas a atividade peptidásica do 20SPT “livre”, mas também àquele acoplado a pelo menos uma unidade regulatória 19S, formando assim o 26SPT. Na **Figura 18** estão plotados os dados obtidos neste ensaio, onde é possível observar uma ligeira queda na atividade do 20SPT na linhagem C221 em ambas as preparações (ou seja, presença ou ausência de ATP) quando comparada a selvagem, e o mesmo ocorre com a mutante C76.

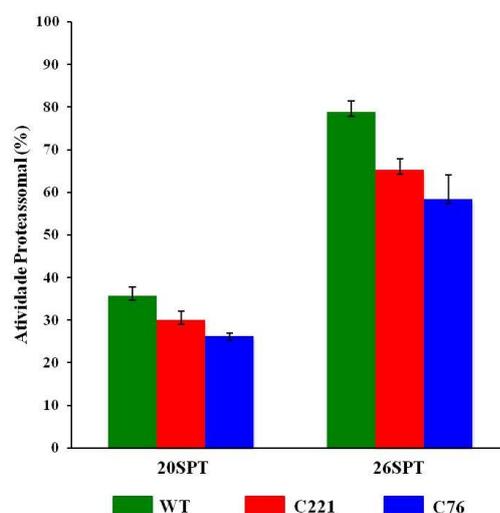


Figura 18. Atividade peptidásica do tipo-quimiotripsina do 20SPT e 26SPT no extrato celular total. Foram incubadas 60 μg do extrato celular com 50 μM de substrato peptídico suc-LLVY-AMC em tampão 20 mM Tris-HCl pH 7,5 contendo 10 mM KCl e 5 mM MgCl_2 a 37 °C. Para a atividade do 26SPT foi utilizado o mesmo protocolo, mas na presença de 5 mM de ATP. A emissão da fluorescência foi registrada por 45 minutos em intervalos de 5 minutos em espectrofluorímetro a 440 nm (excitação a 365 nm). Os resultados mostrados referem-se à média \pm SD de dois experimentos realizados em triplicata (Adaptado de OHARA, 2015).

Paralelamente aos ensaios de atividade sítio-específica do proteassomo, investigamos a atividade proteolítica do 20SPT da linhagem selvagem e mutante C221, utilizando proteínas conhecidas por serem hidrolisadas pelo 20SPT de forma ubiquitina-independente, tais como a Grx2 (Glutarredoxina 2), a α -Syn (α -sinucleína) e a β -Cas (β -caseína). Essas proteínas foram incubadas com o 20SPT purificado e a degradação pode ser visualizada tanto pela diminuição da banda original quanto pelo surgimento de fragmentos peptídicos através de gel SDS-PAGE, como mostrado abaixo na abaixo na **Figura 19**.

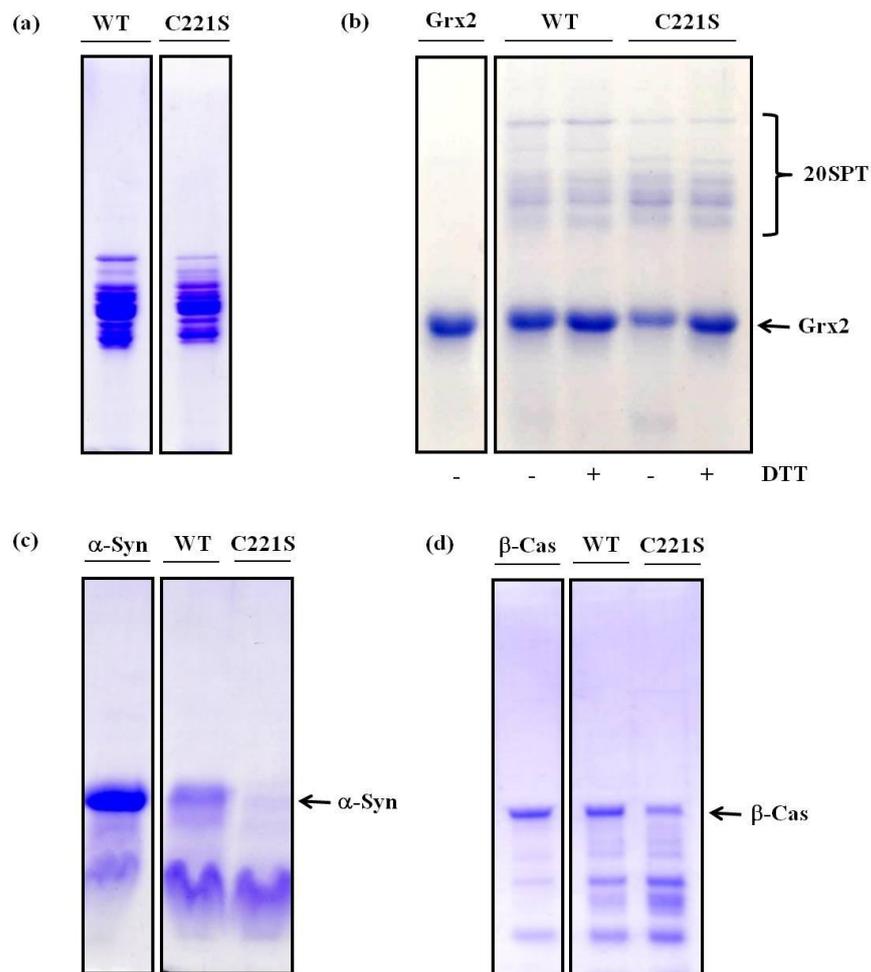


Figura 19 – Avaliação proteolítica do 20SPT selvagem e mutante C221S. (a) Géis representativos do 20SPT (8 μ g) utilizados como controle da pureza das preparações obtidas. Géis mostrando a degradação da Grx2, na presença e ausência de DTT (b), da α -syn (c) e da β -cas (d) pelo 20SPT. As incubações foram realizadas em tempos e tampões diferentes (como descrito em materiais e métodos). Preparações com o mesmo grau de pureza foram utilizadas para as medidas das atividades sítio-específicas como mostrado na Tabela 10 (Adaptado de OHARA, 2015).

Como mostrado na tabela 10 e na figura 19, o 20SPT da mutante C221 apresentou uma degradação diferencial nos respectivos ensaios quando comparada ao proteossomo selvagem. Os resultados de proteólise mostraram que além do 20SPT da linhagem C221 degradar com mais eficiência os substratos proteicos, sua capacidade de degradação também é afetada na presença de DTT, semelhante ao que ocorre com o proteossomo selvagem (**Figura 19b**). Provavelmente, essa diminuição ou ausência de degradação proteica na presença de DTT seja oriundo da redução de resíduos de cisteínas glutationilados e, conseqüentemente, o fechamento da câmara catalítica impedindo assim a entrada do substrato e posterior hidrólise.

Controle da câmara catalítica do 20SPT é dependente do estado redox dos resíduos de cisteínas presentes na subunidade $\alpha 5$

Na tentativa de correlacionar as diferenças observadas nos ensaios de proteólise realizados acima com as linhagens selvagem e mutante C221, um fator importante parece ser a intensidade da abertura da câmara, possibilitando a entrada de substrato ao centro catalítico e conseqüentemente aumento da atividade proteassomal. Assim, em colaboração com o Prof. Cristiano L. P. de Oliveira e da mestrandia Renata N. Bicev, ambos do Departamento de Física Experimental, Instituto de Física, USP, iniciamos a análise do proteassomo 20S purificado por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Alíquotas das amostras foram adicionadas em microtelas cobertas com um fino filme de parlódio (polímero de celulose) recobertas com carvão, e em seguida, foram coradas negativamente utilizando solução de fosfotungstato de potássio a 2 % como corante.

Dados obtidos anteriormente pelo nosso grupo (SILVA *et al.*, 2012) mostraram que o 20SPT purificado da linhagem selvagem apresenta alta frequência de formas abertas (**Figura 20a**), além de ser responsivo ao redutor de tióis DTT indicando que essa população de 20SPT apresenta cisteínas glutationiladas, e, conseqüentemente, maior habilidade para degradar proteínas oxidadas. Ao analisarmos o 20SPT da linhagem mutante C221, este apresentou alta frequência de formas abertas ($80\% \pm 3$) (**Figura 20b**) comparado ao 20SPT selvagem ($65\% \pm 4$) e também respondeu ao agente redutor DTT, muito provavelmente porque ainda havia algum resíduo de cisteína envolvido no processo de glutationilação. Assim, pudemos observar uma diminuição da frequência de formas abertas (em torno de 45%) após o tratamento com DTT. Em contrapartida, o 20SPT purificado da linhagem C76 apresentou prevalência de formas fechadas (30 ± 2) (**Figura 20c**). Dados quantitativos referentes à frequência de formas abertas presentes no 20SPT nas linhagens estão mostrados resumidamente na **Figura 20d**. Portanto, a S-glutationilação do resíduo Cys221 representa, na verdade, uma regulação negativa da abertura da câmara catalítica do 20SPT uma vez que, sua mutação determina maior frequência de abertura sendo que o tratamento dessas preparações com DTT induzem o fechamento da câmara catalítica. Nessa linhagem, restaria o resíduo Cys76 para ser S-glutationilado e, portanto, é a que estaria de fato regulando a abertura do 20SPT.

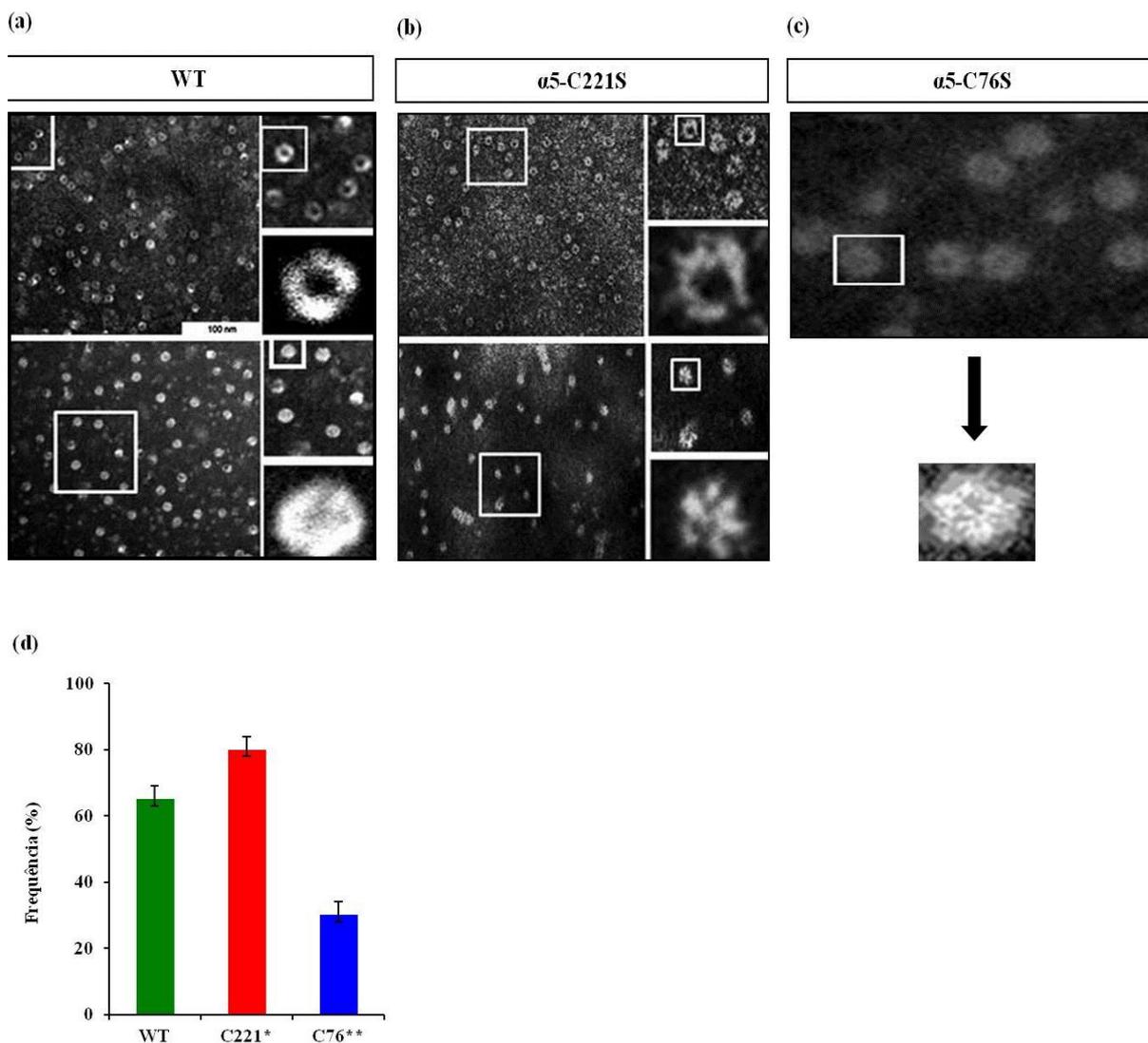


Figura 20. Análise estrutural do 20SPT das linhagens selvagem e mutantes por microscopia eletrônica de transmissão. Painéis representativos das alíquotas referentes ao 20SPT purificado das linhagens selvagem, mutante C221 e C76 (a, b e c, respectivamente) analisadas em microtelas coradas negativamente com 2% de fosfotungstato de potássio. No quadro superior temos uma visão frontal do proteossomo, evidenciando a abertura da câmara catalítica e no quadro inferior, uma vista frontal após tratamento com 20 mM de DTT, por 30 minutos, exibindo a conformação fechada na WT e $\alpha 5$ -C221S. 20SPT da linhagem C76 mostrou-se com a câmara catalítica fechada, mesmo sem tratamento com DTT. (d) As imagens foram obtidas a 100 nm e utilizadas para a contagem manual das formas abertas do 20SPT relativamente ao total de estruturas visualizadas. Os resultados mostrados referem-se à média \pm SD de três experimentos independentes. * $p \leq 0,004$ ** $p \leq 0,0001$ (Adaptado de OHARA, 2015).

Análise proteômica e espectrometria de massas

A fim de confirmarmos se na ausência da Cys221, a Cys76 estaria glutacionilada, já que este outro resíduo também havia sido anteriormente identificado pelo nosso grupo como glutacionilado, partimos então para uma análise proteômica na tentativa de identificar esse resíduo glutacionilado na linhagem mutante C221. Isso indicaria que o proteossomo com a

mutação $\alpha 5$ -C221S poderia sofrer alguma alosteria e assim expor o resíduo de Cys76 tornando-o passível de sofrer essa modificação relevante na manutenção da proteostase intracelular. As análises para a identificação proteômica do resíduo glutationilado foram feitas em colaboração com o aluno de doutorado Douglas C. Mariano, no Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto Butantan, sob a supervisão do Dr. Daniel Carvalho Pimenta, ambos do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.

Assim, procedemos com a separação por gel 2-DE das subunidades do 20SPT purificado por cromatografia de afinidade a níquel da linhagem C221 e os dados representativos estão mostrados na **Figura 21**, onde estão destacados os spots selecionados e cortados para a identificação proteica, utilizando como referência o gel 2-DE obtido com preparações do 20SPT da linhagem selvagem, onde se fez a identificação de todas as subunidades do proteassomo 20S de levedura. (SILVA *et al.*, 2012). Além dos spots destacados na **Figura 21**, outros spots também foram selecionados e identificados (dados não mostrados).

Embora a subunidade $\alpha 5$ tenha sido identificada em ambas as condições utilizadas (ou seja, ausência e presença de DTT e IAA), inicialmente nas preparações sem DTT e IAA não conseguimos identificar o resíduo C76 glutationilado por espectrometria de massa do tipo LC-MS, pois não obtivemos sucesso na ionização do peptídeo que corresponderia a este (**Figura 21a**, spots 1 e 2). Já o mesmo não ocorre com as preparações tratadas com DTT e IAA, onde pudemos identificar a presença do peptídeo e consequentemente o resíduo C76 não glutationilado (**Figura 21b**, spot 3). Essas análises realizadas através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS), utilizando um sistema UFLC binário acoplado ao espectrômetro de massas do tipo Electrospray - Ion Trap - Time of Flight (ESI-IT-TOF), permitiu que fosse possível analisarmos não somente a massa dos peptídeos tripticos do proteassomo 20S, mas também, os íons gerados após a fragmentação do íon parental na câmara de colisão, sequenciando cada peptídeo. Maiores informações sobre as identificações dos peptídeos pertencentes a subunidade $\alpha 5$ do 20SPT, bem como a identificação do peptídeo correspondente ao resíduo C76, estão listadas e ilustradas nos **Anexo II e III**, respectivamente.

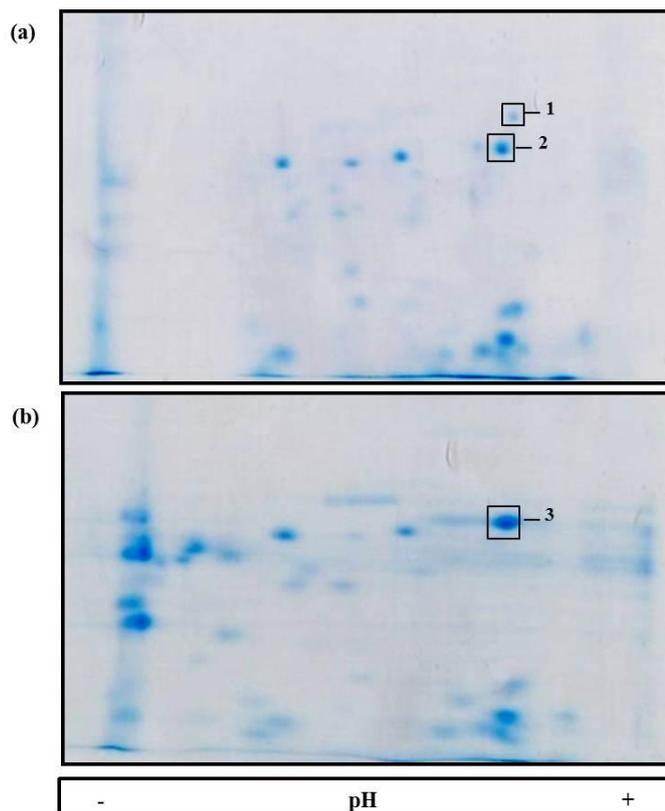


Figura 21. Análise por eletroforese bidimensional (2-DE) do proteassomo 20S da linhagem mutante C221 da levedura *S. cerevisiae*. Alíquotas (70 µg) do 20SPT purificado de YPD foram submetidas à eletroforese bidimensional em tiras de 7 cm com gradiente de pH variando entre 4 e 7, na ausência de DTT e IAA (a) ou na presença (b), evidenciando a separação das subunidades do proteassomo. Os spots corados com Coomassie coloidal foram excisados e tiveram seu conteúdo protéico digerido com tripsina e os peptídeos analisados por espectrometria de massas para a identificação correta de cada subunidade. Os quadrados pretos indicam os “spots” identificados correspondentes a subunidade $\alpha 5$.

Como inicialmente não obtivemos sucesso na identificação do resíduo da subunidade $\alpha 5$ glutationilada, a C76, por análise da separação dos spots (2-DE) e posterior identificação por espectrometria de massas, paralelamente, foram realizados ensaios de eletroforese bidimensional seguida de imunomarcagem utilizando os anticorpos primários anti- $\alpha 5$ C76S-SG e anti-GSH em preparações obtidas do 20SPT purificado por cromatografia de afinidade a níquel da linhagem mutante C221, também na ausência e presença de DTT e IAA, a fim de confirmar a glutationilação do resíduo C76 nesta linhagem, mas também não obtivemos sucesso nestes ensaios (dados não mostrados).

Portanto, isso poderia ser devido a algum artefato ou limitação das técnicas utilizadas. Assim, decidimos investir na identificação do resíduo C76 da subunidade $\alpha 5$ do 20SPT da linhagem mutante C221 realizando algumas modificações no protocolo de purificação e no processo de identificação proteica. Adicionamos mais uma etapa cromatográfica no processo

de purificação do 20SPT, uma cromatografia de troca iônica (aniônica por coluna Mono-Q) a fim de se obter material mais puro e, conseqüentemente maior capacidade de aplicação proteica, visto que o volume aplicado na tira é um fator limitante. Além do espectrômetro de massas do tipo LC-MS utilizamos também o MALDI-TOF para a identificação da C76 glutationilada na subunidade $\alpha 5$ do 20SPT.

Embora as subunidades do 20SPT apresentem equimolaridades semelhantes, trabalhos na literatura mostram dificuldades para a visualização de algumas subunidades, como a subunidade $\alpha 7$ e as subunidades $\beta 2$ e $\beta 5$ (CHOUDURI *et al.*, 2008; IWAFUNE *et al.*, 2002; KIMURA *et al.*, 2000). Assim, devido às alterações realizadas nos protocolos foi possível primeiramente visualizar uma melhoria da resolução do perfil de separação de alguns spots que apareciam menos intensos em nossos experimentos, como por exemplo, o spot 4 referente à subunidade $\alpha 5$, mostrado em destaque na **Figura 22**.

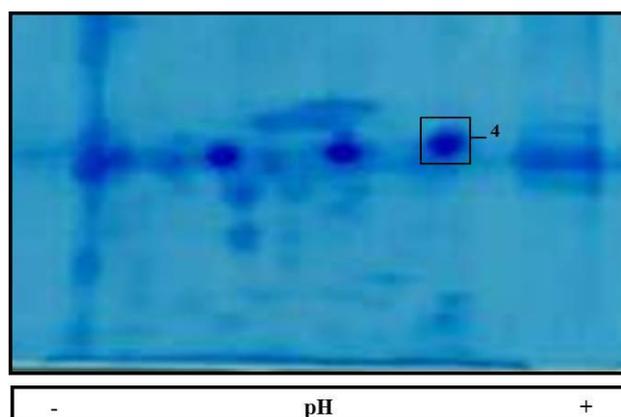


Figura 22. Melhoria da resolução na separação por 2-DE das subunidades do 20SPT da linhagem mutante C221 da levedura *S. cerevisiae*. Para melhor isolar as subunidades do 20SPT, adicionamos mais uma etapa cromatográfica no processo de purificação do 20SPT a fim de se obter material mais puro e, conseqüentemente maior capacidade de aplicação proteica. Alíquotas (70 μ g) do 20SPT purificado de YPD foram submetidas à eletroforese bidimensional em tiras de 7 cm com gradiente de pH variando entre 4 e 7. Nota-se que na região entre o pH 5-6, destacam-se alguns spots mais intensos evidenciando o ganho em resolução. Os spots corados com Coomassie coloidal foram excisados e digeridos com tripsina e os peptídeos analisados por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF para a identificação correta da subunidade. O quadrado preto indica o “spot” identificado correspondente a subunidade $\alpha 5$. Os resultados mostrados são representativos de dois experimentos independentes.

Como mencionado acima, o aumento na quantidade de proteína aplicada na tira também foi um fator importante, pois a subunidade $\alpha 5$ apresentou um spot melhor visualizado no gel, tal foi recortado e processado para posterior identificação por espectrometria de massa do tipo LC-MS. No entanto, como outrora, não foi possível a identificação do peptídeo onde se

encontra o resíduo C76 (HIGCAMSGLTADA), embora outros peptídeos tenham sido identificados por essa técnica, como mostrado na **Figura 23** e listados na **tabela 11**.

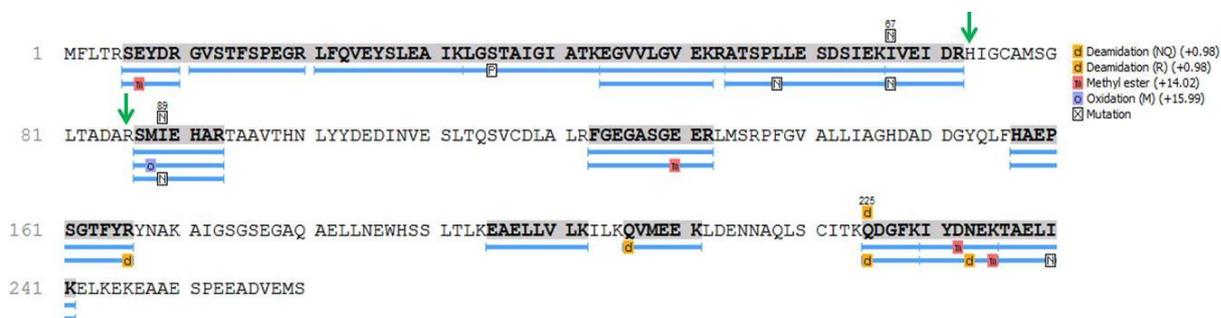


Figura 23. Análise por espectrometria de massas (LC-MS) da subunidade α5 do 20SPT. O spot referente a esta proteína foi recortada, descorada, digerida (tripsina) e analisada por LC-MS, conforme descrito em materiais e métodos. A análise dos dados foi feita utilizando-se o software Peaks Studio v7, realizando as buscas contra o banco de dados Uniprot/swiss-Prot (taxonomia: *Saccharomyces cerevisiae*). Após a clivagem enzimática, foi possível identificar diferentes sequências peptídicas que compõem a subunidade α5 do proteassomo 20S, como destacado com a caixa cinza e sublinhado em azul. Note que, conforme demarcado pela seta em verde destacando o início e o fim do peptídeo onde se encontra o resíduo C76 (HIGCAMSGLTADA), não foi identificado por LC-MS.

Tabela 11: Peptídeos da subunidade α5 do proteassomo identificados por espectrometria de massas do tipo LC-MS.

Peptídeo	Razão massa/carga (m/z)	z	Massa Observada	Massa Teórica	Modificações
K.QDGFK.I	297.612	2	593.2809	593.27	
K.Q(+.98)DGFK.I	298.136	2	594.2649	594.25	Desaminação (NQ)
R.SEYDR.G	335.1603	2	668.2766	668.265	
K.TAELIK.E	337.6924	2	673.401	673.39	
K.TAELN(sub I)K.E	338.1912	2	674.3599	674.349	Mutação
R.SE(+14.02)YDR.G	342.1239	2	682.2922	682.285	Metilação
K.IVEIDR.H	372.6882	2	743.4177	743.407	
K.N(sub I)VEIDR.H	373.2061	2	744.3766	744.366	Mutação
K.Q(+.98)VMEEK.L	382.7095	2	763.3422	763.327	Desaminação (NQ)
K.IYD(+14.02)NEK.T	398.1938	2	794.381	794.374	Metilação
K.IYDN(+.98)EK(+14.02).T	398.7112	2	795.3651	795.354	Desaminação (NQ); Metilação
R.SMIEHAR.T	422.1967	2	842.4069	842.396	
R.SMN(sub I)EHAR.T	422.6981	2	843.3657	843.355	Mutação
R.SM(+15.99)IEHAR.T	287.1035	3	858.4018	858.386	Oxidação (M)
K.EAELLV.LK.I	457.7957	2	913.5484	913.538	
K.EGVVLGVEK.R	465.2512	2	928.5229	928.512	
R.GVSTFSPEGR.L	518.7309	2	1035.4985	1035.488	
R.FGEGASGEER.L	519.7065	2	1037.4414	1037.43	
K.LGP(sub S)TAIGIATK.E	521.3099	2	1040.6229	1040.612	Mutação
R.FGEGASGE(+14.02)ER.L	526.7108	2	1051.457	1051.45	Metilação
K.EGVVLGVEKR.A	543.293	2	1084.624	1084.613	
F.HAEPSTFYR.Y	582.7672	2	1163.5359	1163.525	
F.HAEPSTFYR(+.98).Y	583.2351	2	1164.5199	1,164.055	Desaminação (R)
R.ATSPLESDSIEK.I	695.3342	2	1388.7035	1388.693	
R.ATSPN(sub L)LESDSIEK.I	695.8348	2	1389.6624	1389.651	Mutação
R.LFQVEYSLEAIK.L	720.3644	2	1438.7708	1438.76	

Após estes resultados, procedemos com uma nova abordagem para a identificação do peptídeo onde se encontra o resíduo C76 (HIGCAMSGLTADA). Utilizando um espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF, foi possível identificar o peptídeo da subunidade $\alpha 5$, tanto na forma reduzido quanto na glutacionilado (**Figura 24**). Nesta figura, podemos observar diversas massas peptídicas, destacando-se os íons 1402,6 e 1708,7. Ambos representam o peptídeo contendo o resíduo C76, porém, o segundo íon representa a forma glutacionilada do peptídeo (a diferença de +305 Da entre os íons representa a incorporação da glutatona ligada ao resíduo de cisteína).

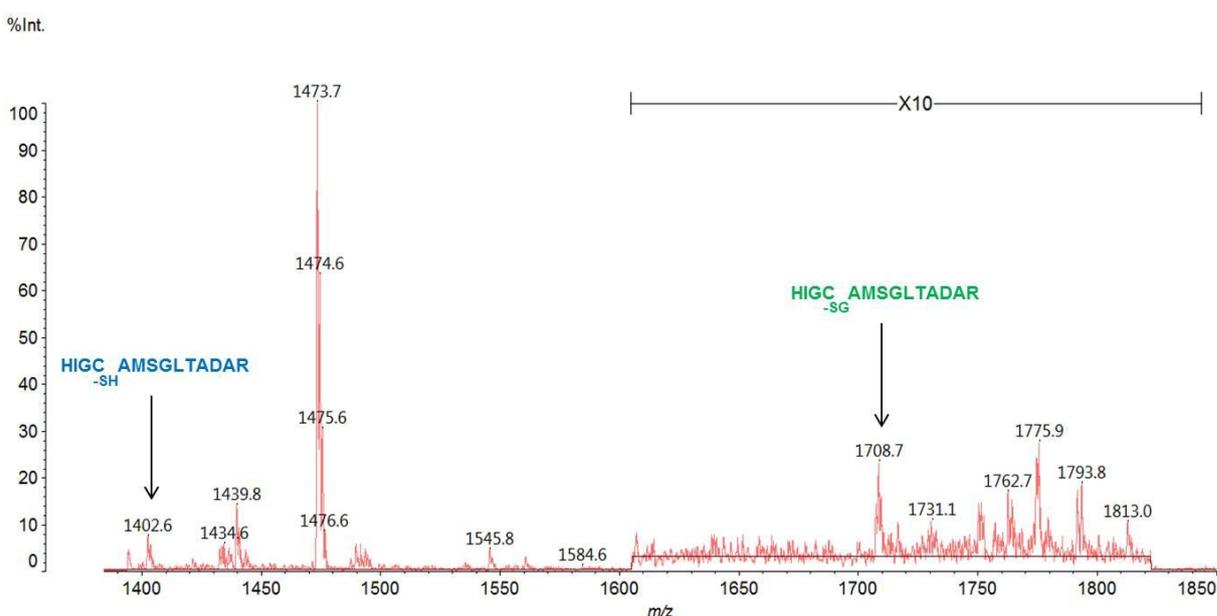


Figura 24. Análise por espectrometria de massas (MALDI-TOF) dos peptídeos trípticos gerados a partir da clivagem da subunidade $\alpha 5$ do 20SPT. 1 μ L da amostra foi misturada com 1 μ L da matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e aplicada na placa. Utilizou-se o modo linear positivo para a obtenção e acúmulo dos espectros. As razões massa/carga indicadas pelas setas correspondem aos peptídeos trípticos identificados como componentes da subunidade $\alpha 5$, onde podemos observar a presença do íon 1708,7 $[M+H]^+$. Este íon representa a forma glutacionilada do peptídeo HIGCAMSGLTADAR, ou seja, ele apresenta uma glutatona (+305,1 Da) ligada ao resíduo de cisteína, (destacado em verde). Além disto, também podemos observar a presença do mesmo peptídeo não glutacionilado (m/z 1402,6) (destacado em azul).

Análise das concentrações de 19SPT e 20SPT entre as linhagens

Com os resultados obtidos acima pudemos observar diferenças significativas entre a linhagem selvagem e mutantes. Assim, para a caracterização funcional desses resíduos de cisteína, seguimos com as análises bioquímicas do 20SPT. No entanto, para alguns ensaios foi necessária a purificação do proteossomo 20S. Importante ressaltar que o rendimento obtido das preparações da purificação do 20SPT da linhagem C76 sempre foi baixo relativamente às

preparações a partir da linhagem selvagem e C221. O fato de não conseguirmos obter concentrações comparáveis àquelas obtidas com as outras linhagens nos intrigava em alguns aspectos sugerindo várias hipóteses... A primeira hipótese foi de que a concentração da unidade regulatória 19SPT, bem como da unidade catalítica 20SPT na linhagem C76 fossem menores comparativamente à linhagem selvagem. Então, realizamos ensaios de imunomarcação a partir do extrato celular de cada linhagem e verificamos que os níveis do 19SPT, assim como do 20SPT (**Figura 25a e 25b**) não estão alterados nas linhagens C76 e C221 comparativamente à linhagem selvagem. Os ensaios abaixo foram realizados por OHARA (2015).

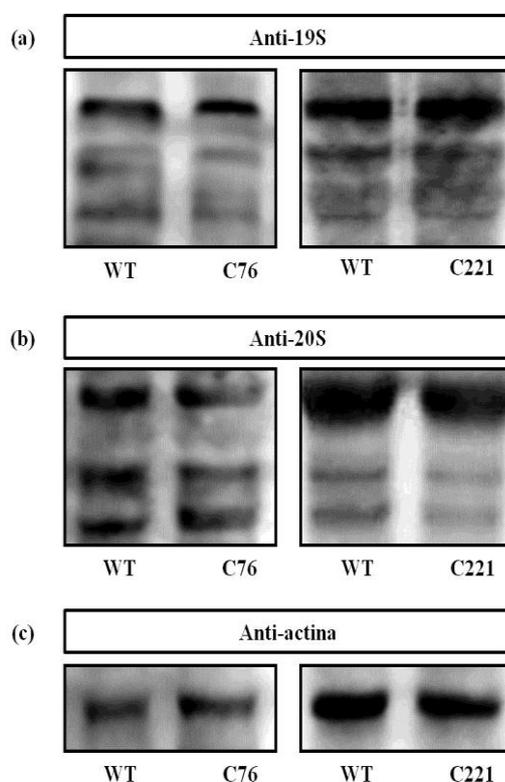


Figura 25. Análise da concentração de 19SPT e 20SPT por imunomarcação. Foram aplicados em gel SDS-PAGE 50 ug de extrato celular obtido de células selvagem (WT) e mutantes (C76 e C221). Após transferência das amostras para membrana de nitrocelulose foi feita a marcação com os anticorpos indicados para avaliar os níveis dos mesmos entre as linhagens. **(a)** anti-19SPT; **(b)** anti-20SPT, e, **(c)** anti-actina, como controle de loading. A revelação foi feita por quimioluminescência e a emissão registrada por foto documentador. Os dados mostrados são representativos de dois experimentos independentes (Adaptado de OHARA, 2015).

A questão do rendimento das preparações do 20SPT da linhagem C76 ser muito baixo (aproximadamente 30x menor comparado à linhagem selvagem) nos dificultou a obtenção de material suficiente para algumas de nossas análises. Assim, surgiu a hipótese de que a dificuldade em purificar o 20SPT da linhagem C76 fosse devido a alguma modificação

sofrida pelo 20SPT nessa linhagem oriunda da mutação sítio-específica que não permitiria a ligação da cauda de poli-histidina à resina de níquel, lembrando que as linhagens selvagem, mutante C76 e C221 possuem a cauda de poli-histidina fusionadas no gene *PRE1*, o qual codifica para a subunidade $\beta 4$ (20SPT), além da sequência do peptídeo FLAG. Então, a fim de testar a possibilidade de que a linhagem C76 tivesse perdido uma e/ou outra marcação, realizamos ensaios de imunomarcção com o extrato total dessa linhagem com anticorpo anti-his, e, também com anticorpo anti-FLAG. Assim, construímos a coluna com resina Sepharose-anti-FLAG, conforme o manual do fabricante (SIGMA), que permitiu sua separação pelo peptídeo FLAG, presente na mesma sequência onde está localizada a cauda de poli-histidina.

Como mostrado na **Figura 26**, a marcação com anticorpos conforme indicado, feita após separação do 20SPT do extrato celular com colunas de resinas diferentes, seguida de gel SDS-PAGE, transferência para membrana de nitrocelulose e imunomarcção mostrou que o 20SPT está presente em ambos os ensaios realizados com as diferentes preparações comparativamente ao da linhagem selvagem obtido pelo mesmo procedimento e ensaiado para imunomarcção nas mesmas concentrações que o 20SPT obtido da linhagem C76. Portanto, pudemos observar claramente que não houve perda tanto da marcação da fusão com a cauda poli-histidina quanto da sequência do peptídeo FLAG. No entanto, em ambas as condições de purificação também não tivemos sucesso quanto ao rendimento, pois continuou muito baixo.

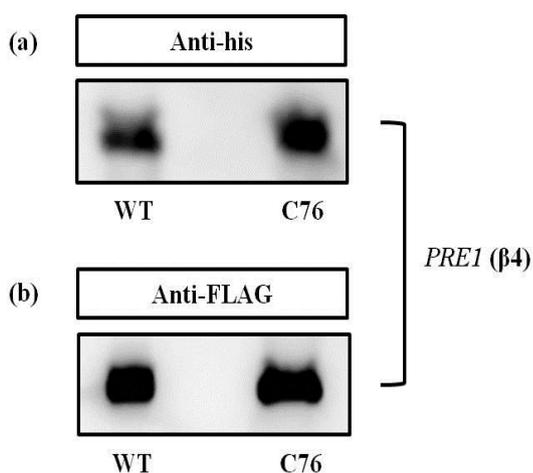


Figura 26. Confirmação da presença da cauda poli-histida e da sequência do peptídeo FLAG em diferentes preparações do 20SPT das linhagens selvagem e mutante C76. 30 μ g do extrato total da selvagem (WT) e mutante (C76) foram imunomarcadas com anticorpo anti-his (a) e anti-FLAG (b), após corrida em gel SDS-PAGE 12,5%, seguida da transferência das amostras para membrana de nitrocelulose. A revelação foi feita por quimioluminescência e a emissão registrada por foto documentador.

Analisando os dados obtidos com o proteassomo 20S da linhagem mutante C76, observamos em gel nativo 4.5%, um “rastros” presente nas preparações correspondentes ao 20SPT purificado desta linhagem por cromatografia de afinidade a níquel, o que não ocorria nessas proporções com a linhagem selvagem ou mesmo na mutante C221. Isso nos despertou interesse em identificar esse “rastros”, pois uma hipótese que explicaria a dificuldade na obtenção de 20SPT purificado obtido nesta linhagem seria a presença de proteínas associadas que co-purificam com o 20SPT. Outra hipótese seria que a estrutura do 20SPT desta linhagem se desintegraria durante a corrente elétrica (100 V / 03:00 h). Então, submetemos esse “rastros” proteico a uma digestão enzimática com tripsina e posteriormente à análise e identificação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS). Os peptídeos trípticos obtidos foram processados pelo programa MASCOT (Ion Search) versão in house (versão 2.4.0) utilizando o banco de dados NCBI, e a proteína Pnc1 foi identificada. Esse resultado corrobora com outros dados obtidos anteriormente em nosso laboratório em diferentes preparações do 20SPT selvagem isolado nas mesmas condições, na qual essa proteína também já havia sido identificada por géis 2-DE e identificação por MS/MS (SILVA *et al.*, 2012), indicando uma possível associação do 20SPT com Pnc1. Posteriormente, verificamos que não se tratava de uma co-purificação da Pnc1 com o 20SPT, mas sim de uma competição, onde Pnc1 teria maior afinidade a coluna de níquel comparada ao 20SPT, e coincidentemente, esta proteína possui ponto isoelétrico e massa molecular semelhantes às subunidades do proteassomo (6.23 e 25 kDa, respectivamente). Entretanto, é interessante que mesmo não se tratando de uma co-purificação, essa proteína apareceu mais abundante nas preparações obtidas do 20SPT da linhagem mutante C76 por cromatografia de afinidade a níquel quando comparada a linhagem selvagem. Portanto, não podemos descartar a possibilidade de que Pnc1 de alguma forma esteja envolvida com o 20SPT.

Análise da expressão de subunidades proteassomais por q-PCR

A fim de confirmar os dados de concentração do proteassomo nestas linhagens, partimos para uma análise dos níveis de expressão gênica. O processo de extração de RNA é essencial para execução da técnica de reação de transcrição reversa (qPCR), e para a obtenção de bons resultados, é vital que as sequências de RNA estejam, além de puras, em sua forma mais íntegra possível, pois moléculas fragmentadas originam dados de baixa qualidade e pouco confiáveis, em especial nas técnicas quantitativas. Essa técnica é amplamente utilizada uma vez que analisa o RNA responsável pela síntese da proteína de interesse. Sendo assim, se

há uma proteína específica, é porque há DNA sendo expresso e originando mRNA para tal proteína. Estes ensaios foram realizados por OHARA (2015) com a colaboração da Dra. Maria Luiza M. B. de Chaves (ICB-USP) e sua aluna de doutorado Caroline Antunes Lino. Para tal, selecionamos alguns genes que codificam para subunidades do proteassomo 20S e 19S e assim, o RNA das linhagens selvagem e mutantes foram isolados eficientemente e diretamente de células intactas após o crescimento em meio líquido YPD 4% até atingirem a fase exponencial (D.O 1.0) pelo método de extração com fenol-ácido quente, conforme descrito em materiais e métodos. A qualidade do RNA extraído bem como a integridade das subunidades ribossomais 28S e 18S podem ser visualizadas na **Figura 27**.

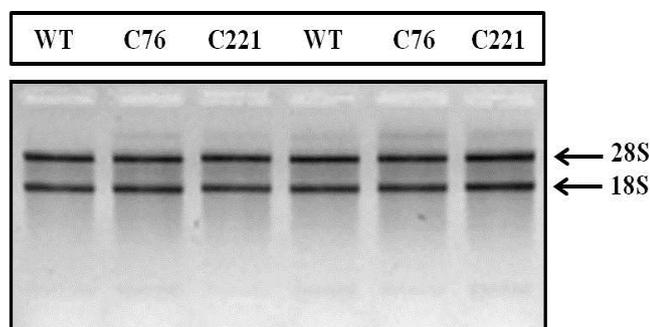


Figura 27. Perfil do RNA isolado das linhagens. O RNA foi isolado das células das linhagens selvagem e mutantes após atingirem a D.O 1.0. A concentração de RNA total foi determinada em espectrofotômetro de alta sensibilidade (Gen5 Data Analysis Software, BioTek, Winooski, Vermont, United States of America) e a qualidade do RNA extraído foi avaliada através da análise da razão entre as absorvâncias em $\lambda=260$ nm e $\lambda=280$ nm e da análise da integridade das subunidades de RNA ribossomal (18S e 28S) sob luz UV, após separação por eletroforese em gel de agarose (1%) contendo brometo de etídio. As preparações acima são representativas de duas preparações de extração independentes, embora estas análises tenham sido feitas com mais três preparações (dados não mostrados).

Após o isolamento e a confirmação da integridade dos RNAs extraídos das linhagens, utilizamos estas preparações para os ensaios de qPCR, e conseqüentemente análise da expressão gênica das subunidades analisadas.

Conforme mostrado na **Figura 28** pudemos observar que não há diferenças significativas nos níveis de expressão dos genes analisados codificantes para subunidades da unidade catalítica do 20SPT, assim como para o gene de uma das subunidades da unidade regulatória 19S, entre as linhagens (**Figura 28, b-e**); embora exista uma tendência na linhagem C76 à queda da expressão nessas subunidades essa diminuição não foi estatisticamente significativa em nenhuma das medidas. Entretanto, o gene *PUP2*, o qual codifica para a subunidade $\alpha 5$ e modificado geneticamente com as mutações sítio-específicas construídas neste projeto foi o único que apresentou expressão alterada (**Figura 28a**). Outra

hipótese para explicar a dificuldade quanto ao rendimento das preparações do 20SPT da C76, seria a de não ocorrer a automontagem do 20SPT nesta linhagem. Para que ocorra a automontagem total da unidade catalítica 20S é necessária a expressão equitativa dos 14 genes que codificam as subunidades do 20SPT. Então, analisamos também o gene *UMPI*, este envolvido com a automontagem do 20SPT (RAMOS e DOHMEN, 2008) (**Figura 28f**), e concluímos que para este conjunto de genes testados nestes ensaios não houve diferença no nível de transcrição tanto das linhagens mutantes quanto da selvagem.

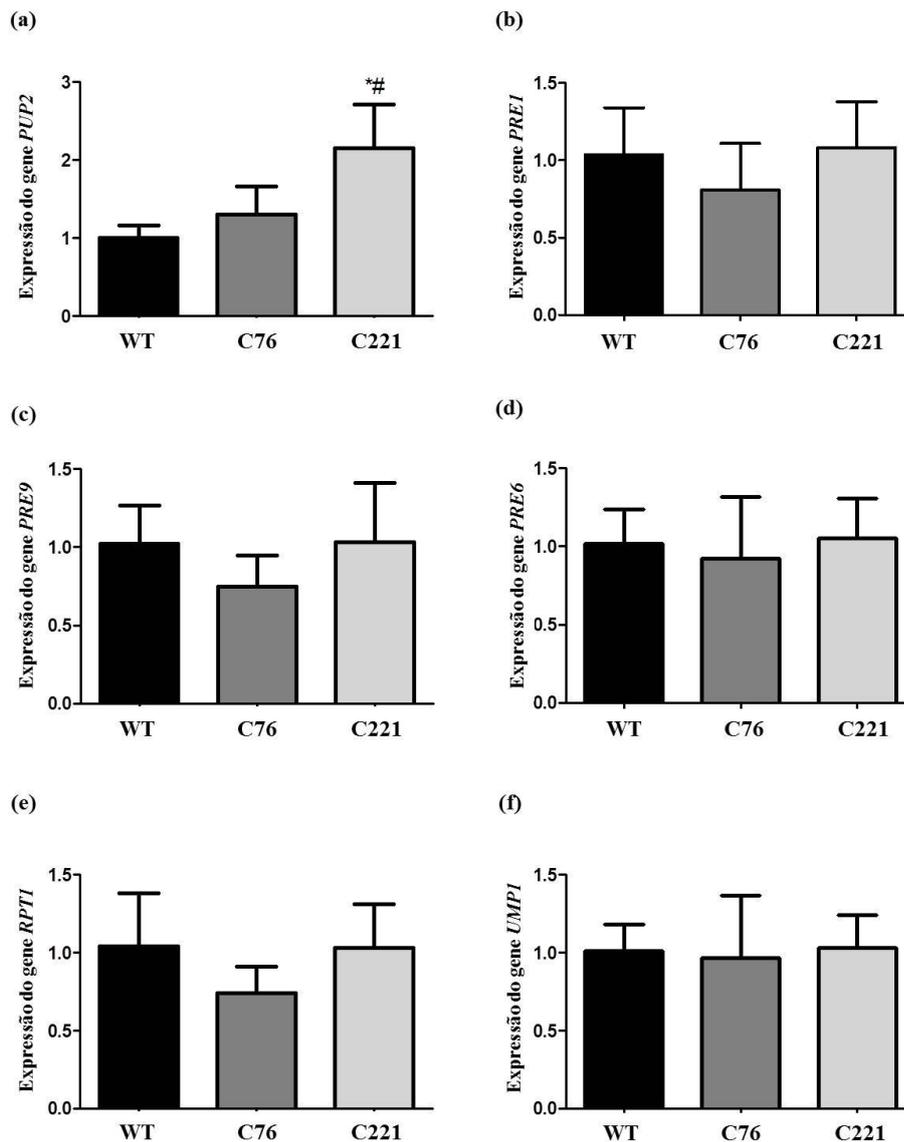


Figura 28. Ensaios de RT-PCR para analisar a expressão gênica de subunidades proteassomais. Avaliação da expressão de genes da unidade catalítica do 20SPT: (a) *PUP2*, codifica para a subunidade $\alpha 5$; (b) *PRE1*, para a subunidade $\beta 4$; (c) *PRE9*, para a subunidade $\alpha 3$ e (d) *PRE6*, para a subunidade $\alpha 4$. Avaliação da expressão de genes da unidade regulatória do 19SPT (e) *RPT1* codifica para uma subunidade ATPásica, a Rpt1 e (f) da chaperona envolvida na automontagem do 20SPT, a Ump1. Os níveis de expressão do gene *ACT1* foram utilizados como controle interno. Os resultados mostrados representam a média \pm SD de cinco experimentos independentes (Adaptado de OHARA, 2015).

Automontagem do 20SPT

Está descrito na literatura que em situações de estresse oxidativo, o proteassomo 20S pode adquirir a configuração do tipo $\alpha 4$ - $\alpha 4$, esta mais resistente do que a usual $\alpha 3$ - $\alpha 4$ (KUSMIERCZYK et al., 2008). Para testarmos essa possibilidade, lembrando que nossas células são submetidas a estresse oxidativo de crescimento (60 horas), realizamos corrida de gel desnaturante seguida de transferência para a membrana de nitrocelulose e marcação com anticorpos específicos. Corroborando com os ensaios de q-PCR (**Figura 28b e 28c** – $\alpha 4$ e $\alpha 3$, respectivamente), como discutido anteriormente, não observamos diferenças significativas nos níveis de expressão dos genes que codificam para essas subunidades, bem como nas concentrações correspondentes as subunidades $\alpha 3$ e $\alpha 4$ obtidas a partir do extrato celular (**Figura 29**).

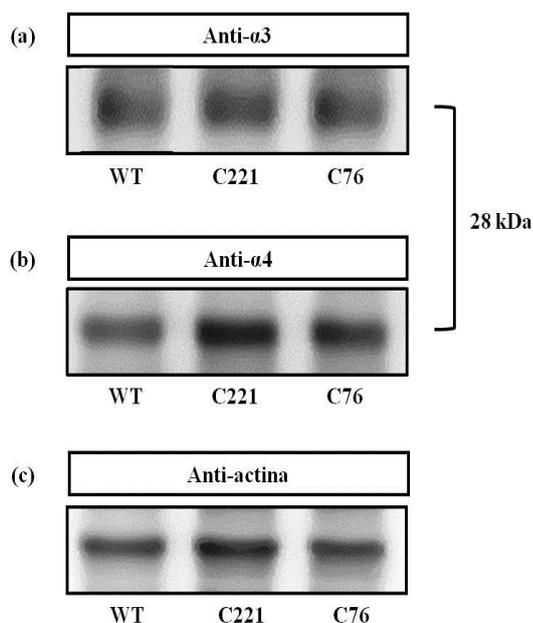


Figura 29. Análise da concentração de subunidades $\alpha 3$ e $\alpha 4$ do 20SPT por imunomarcção. Foram aplicados em gel SDS-PAGE 50 μ g de extrato celular obtido de células selvagem (WT) e mutantes (C221 e C76), após o crescimento até a fase estacionária em meio YPD 4%. Posteriormente, as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose e feita a marcação com os anticorpos indicados, (a) anti- $\alpha 3$ e (b) anti- $\alpha 4$, para avaliar os níveis dos mesmos entre as linhagens e (c) anti-actina como controle de loading. A revelação foi feita por quimioluminescência e a emissão registrada por foto documentador.

Análise fenotípica das linhagens mutantes de *S. cerevisiae*

Paralelamente as análises de estrutura do 20SPT foi realizado diferentes ensaios de fenótipo com a linhagem selvagem RJD1144 e as linhagens mutantes, como mostrado a seguir.

Diferenças morfológicas causadas pela mutação sitio-específica

Avaliando o fenótipo das linhagens selvagem e mutantes C76 e C221, partimos para uma análise da morfologia das células. A morfologia das leveduras da linhagem de *S. cerevisiae* apresentam aspecto arredondado/oval e a sua reprodução pode ocorrer através de gemação (ou brotamento) de novas células, onde ocorre a formação de pequenas protuberâncias na superfície da célula que, depois de se desenvolverem, se desprendem, passando a ter vida própria, ou por esporulação de novas células, que consiste na formação de esporos no interior das células, que se tornam livres pela ruptura das células. Assim, em colaboração com o Prof. Dr. Mário Henrique de Barros, do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, as linhagens selvagem, C221 e C76 foram cultivadas em meio rico YPD 4% até atingirem a fase logarítmica (12 horas) e a fase estacionária (60 horas). Posteriormente, a morfologia das células foram analisadas através de lâminas preparadas com as células correspondentes a cada fase de crescimento no microscópio óptico.

Conforme mostrado na **Figura 30**, as células da linhagem mutante C221 apresentaram aspecto morfológico semelhantes aos da selvagem, tanto na fase logarítmica **(a)** quanto na fase estacionária **(b)**. Diferentemente, as células da mutante C76 mostraram-se significativamente maiores quando comparadas a selvagem, independente das fases de crescimento analisadas. Não entendemos o fenótipo observado nas células dessa linhagem mutante, a C76; entretanto, é de interesse entender o que estaria de fato ocasionando essa diferença na morfologia das células dessas linhagens.

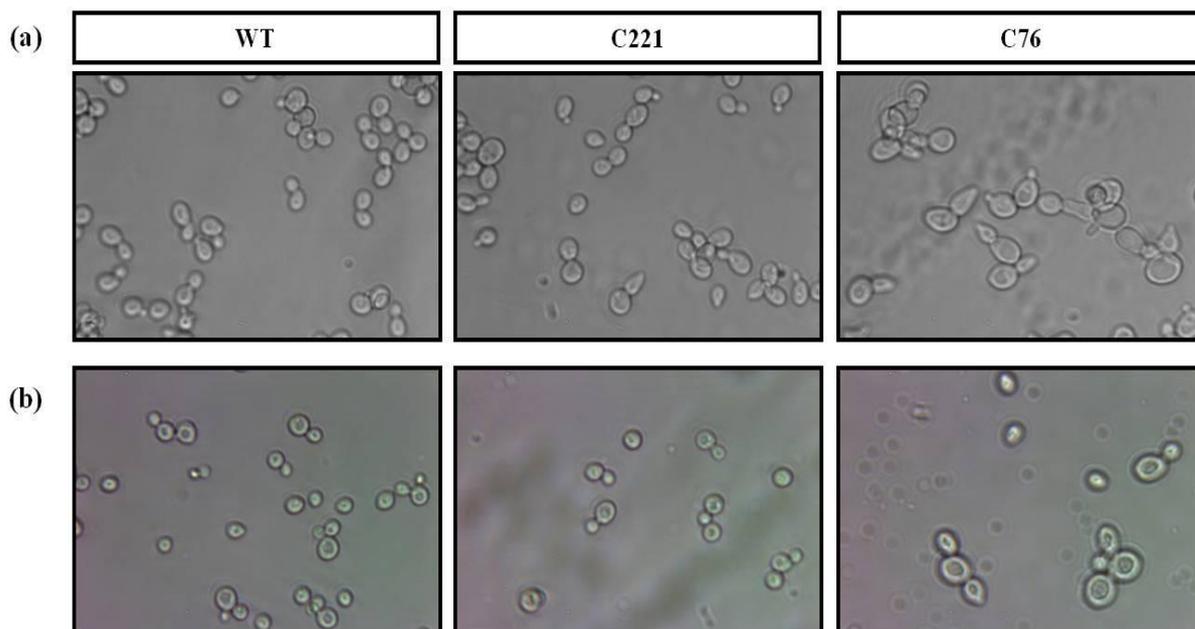


Figura 30. Análise morfológica das linhagens. Painéis representativos das células em diferentes estágios de crescimento. As células foram crescidas em meio líquido YPD 4% até fase logarítmica (12 h) **(a)**, e, subsequentemente até alcançarem a fase estacionária (60 h) **(b)**. As imagens foram obtidas através de microscópio óptico.

Avaliação quantitativa do crescimento das linhagens

Foram realizadas análises acompanhando a curva de crescimento das linhagens até alcançarem a fase estacionária. A curva de crescimento é obtida com base na determinação espectrofotométrica da Densidade Óptica (D.O) da cultura, medida no comprimento de onda de 600 nm ao longo do tempo de incubação. Assim, a avaliação da turbidez de uma cultura constitui um método rápido, embora indireto, de estimar a concentração celular. Estes ensaios foram realizados por OHARA (2015). As linhagens selvagem, mutante C221 e C76 foram crescidas durante 60 horas em meio líquido YPD 4% e no decorrer do crescimento, alíquotas das respectivas linhagens foram retiradas em intervalos diferentes para medir a D.O.

Como mostrado na **Figura 31**, durante a fase log (primeiras 12 horas), onde ocorre o aumento exponencial do número de células e intenso metabolismo celular, a mutante C76 apresentou dificuldade no crescimento, enquanto que a linhagem selvagem e a mutante C221 cresceram de maneira semelhante. Na fase estacionária, próximo ao final do experimento, a linhagem C76 apresentou um retardo no crescimento em torno de 40% quando comparada com a linhagem selvagem, indicando que provavelmente a ausência da Cys76 tenha afetado o metabolismo bem como o fenótipo da célula.

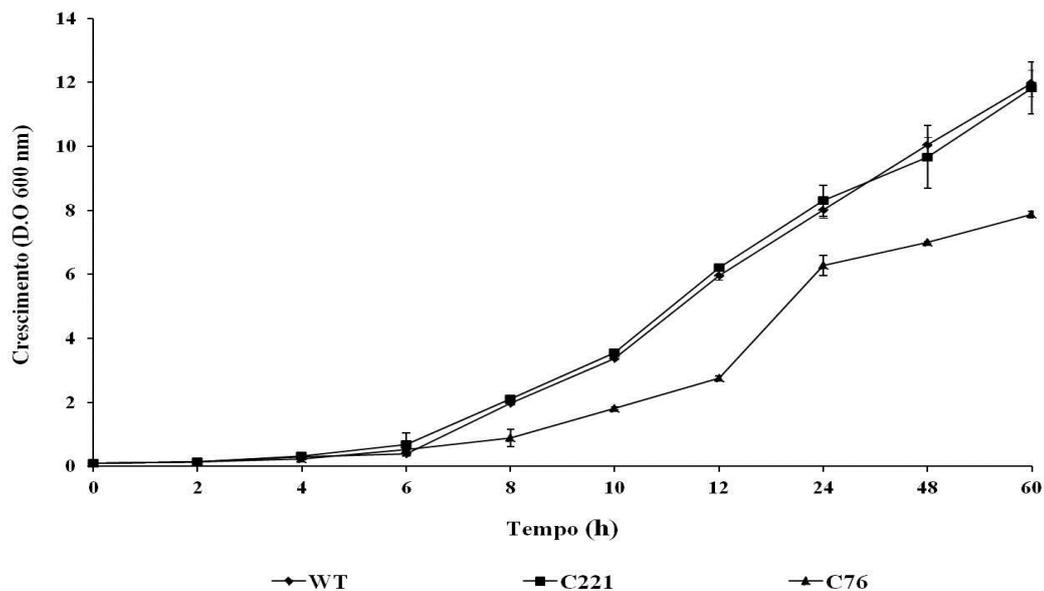


Figura 31 – Perfis de crescimento obtidos das linhagens. As células foram ajustadas para a D.O 0.1 em meio YPD 4% a partir de pré-inóculo “overnight”. O crescimento foi acompanhado por medições da absorbância de duas em duas horas por 12 horas e após esse período, de doze em doze horas até 60 horas. Os dados mostrados referem-se à média + desvio padrão de três experimentos independentes (Adaptado de OHARA, 2015).

Teste de viabilidade das linhagens sobre condições de estresse oxidativo

Posteriormente aos ensaios de curva de crescimento, OHARA (2015) também avaliou a sensibilidade das linhagens ao estresse oxidativo através de ensaios de viabilidade por diluição seriada realizando tratamentos com diferentes concentrações de peróxido inorgânico (H_2O_2) e peróxido orgânico. As linhagens selvagem e mutantes foram crescidas até a fase estacionária em meio líquido YPD 4% e então submetidas a uma diluição seriada em meio sólido YPD 4% na presença de diferentes concentrações de H_2O_2 (0.5, 1, 2 e 4 mM), e de peróxido orgânico (0.25, 0.5, 0.75, 1 e 1.25 mM) respectivamente, e então, analisamos a capacidade de formação de colônias nas diferentes diluições.

Os resultados da **Figura 32** mostram que após 48 horas na estufa a 30 °C, a linhagem C221 apresentou menor sensibilidade ao estresse oxidativo em concentrações crescentes de ambos os peróxidos utilizados comparativamente à linhagem selvagem que teve seu crescimento afetado nas concentrações a 4 mM de H_2O_2 e 0.75 mM de peróxido orgânico (**Figura 32a e b**, respectivamente), indicando que de alguma maneira a ausência do resíduo $\alpha 5$ -C221S parece ser compensado. Diferentemente da linhagem C76, qual mostrou sensibilidade similar a linhagem selvagem nos ensaios com peróxido inorgânico, porém, significativamente menor sensibilidade ao estresse nos ensaios com peróxido orgânico. A

princípio, esperávamos que a linhagem mutante C76 apresentasse uma sensibilidade ao estresse, porém, ela não apresenta uma sensibilidade ao estresse e sim uma dificuldade no crescimento em comparação as demais linhagens como mostrado na curva de crescimento.

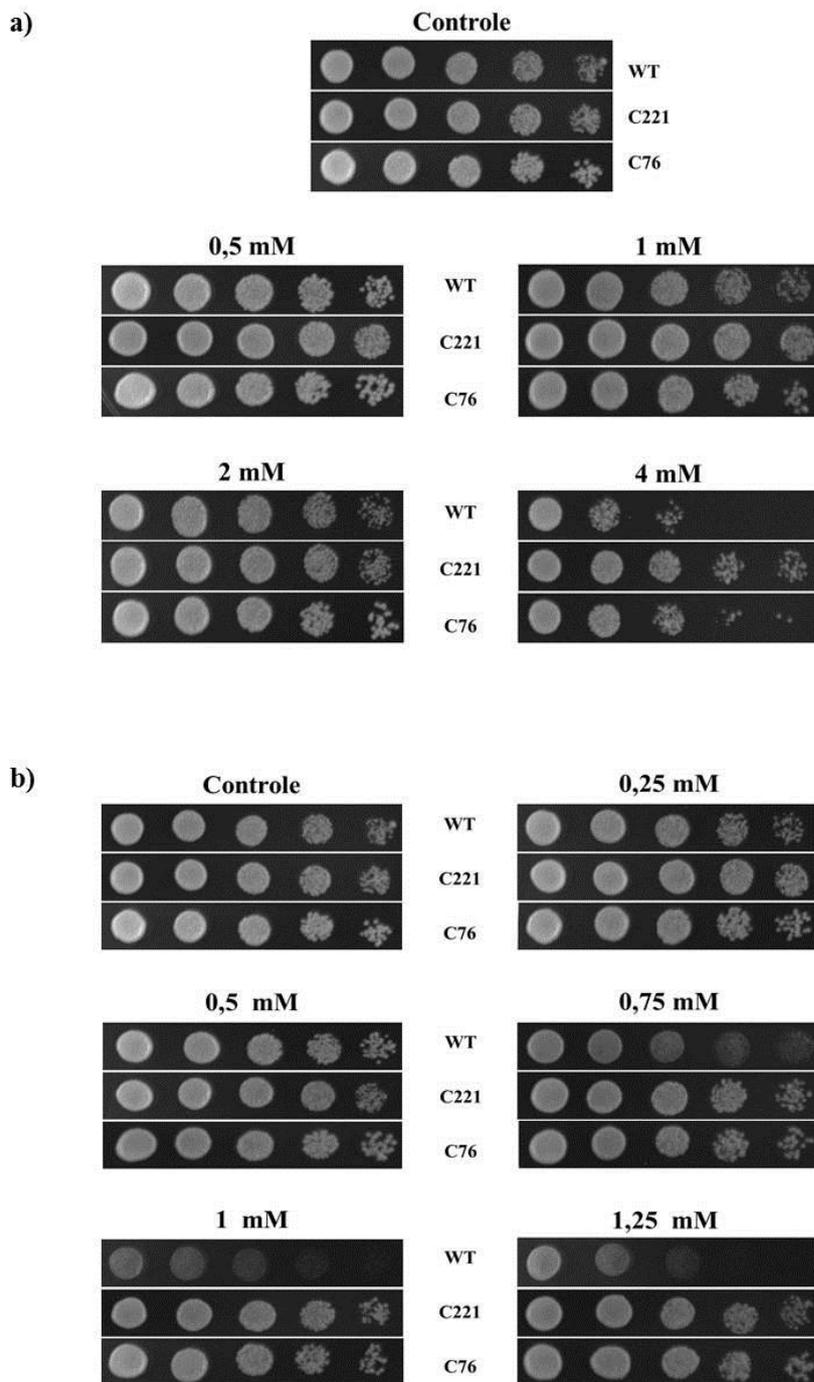


Figura 32. Ensaio de viabilidade por diluição seriada comparando a sensibilidade das linhagens ao estresse oxidativo. As células foram cultivadas em meio líquido YPD 4% até atingirem a fase estacionária (60 h), e em seguida, foram ajustadas para D.O 0.2, subsequentemente feita uma diluição seriada de 4 diluições de 5X. Posteriormente, 5 μ L de cada diluição foram aplicados em placas com meio sólido YPD 4% contendo diferentes concentrações (indicada acima) de H₂O₂ (a) (OHARA, 2015), e, peróxido orgânico (b), previamente aplicadas e espalhadas na superfície das placas imediatamente antes da aplicação das células. As placas foram mantidas em estufa a 30 °C por 48 horas. Dados representativos de três experimentos independentes.

Envelhecimento cronológico das linhagens

O envelhecimento cronológico pode ser definido como o resultado do acúmulo de danos irreversíveis em componentes intracelulares durante a fase estacionária prolongada, comprometendo a integridade celular e assim, direcionando a morte e autólise celular. Assim, o ensaio de envelhecimento cronológico é capaz de medir o tempo de vida que uma célula consegue sobreviver a partir de uma cultura de células pela capacidade de formação de colônias. Os ensaios abaixo foram realizados por OHARA (2015). As células das linhagens selvagem e mutantes C221 e C76 foram inoculadas em meio mínimo WO e crescidas em diferentes intervalos de tempo, onde a cada 48 horas de crescimento, 100 células da cultura foram semeadas em placas de YPD, e após 48 horas de incubação na estufa a 30 °C, as colônias foram contadas e avaliadas quanto à capacidade de formação de colônias. Como pode ser observado na **Figura 33**, a linhagem C221 apresentou maior longevidade, corroborando com os dados anteriores onde, a linhagem C221 mostrou maior tolerância ao estresse oxidativo em comparação a selvagem. Em contrapartida, a linhagem C76, que apresenta dificuldade no crescimento, mostrou um tempo de vida menor.

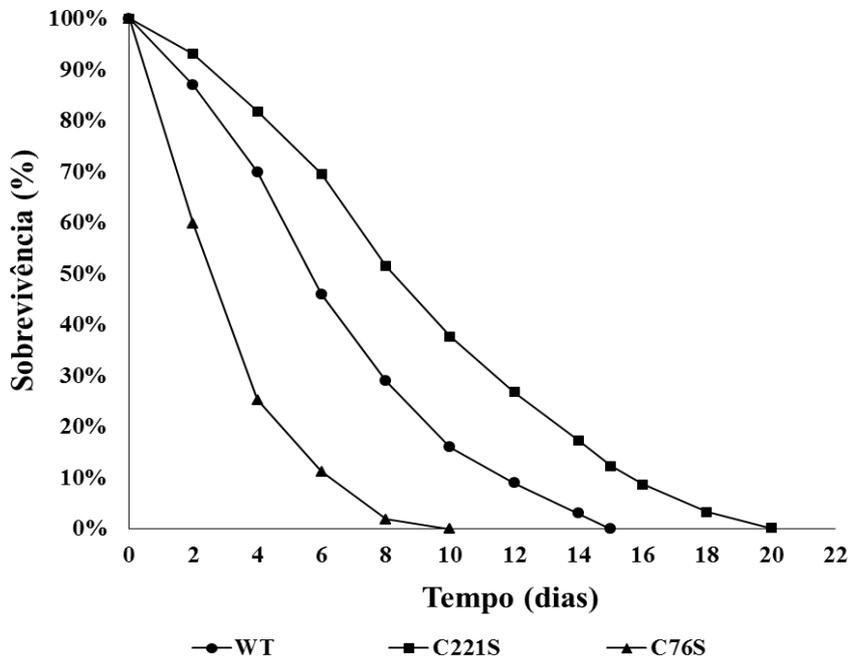


Figura 33. Ensaio de envelhecimento cronológico das linhagens. As células foram cultivadas em meio mínimo WO e crescidas em diferentes intervalos de tempo conforme indicado. Posteriormente, as células foram analisadas quanto à capacidade de formação de colônias (Adaptado de OHARA, 2015).

V. Discussão

As proteínas são as executoras das funções genéticas, e dentro de uma célula o nível de uma proteína é determinado pela sua taxa de síntese e processos que estabilizam sua conformação estrutural, pois para manter a funcionalidade e a viabilidade celular é importante que as proteínas adquiram e mantenham um dobramento definido correto. Quando isso não ocorre, as proteínas danificadas, modificadas, deformadas ou proteínas que se tornaram "desnecessárias" devem ser reconhecidas e degradadas. Nas últimas três décadas, tornou-se cada vez mais claro que a proteólise seletiva é um mecanismo fundamental não só no controle de homeostase celular, mas também na regulação de função proteica. Em eucariontes, 80-90% das proteínas intracelulares regulatórias de vida ultra-curta e curta, deformadas ou danificadas são degradadas pelo proteassomo (GOLDBERG, 2003). O sistema proteassomal consiste de uma unidade catalítica 20S (20SPT) e de um conjunto de proteínas regulatórias que podem mudar sua atividade e especificidade na degradação de uma ampla variedade de substratos, atuando assim em diversos processos celulares (TOMKO & HOCHSTRASSER, 2013), o que o torna um atrativo alvo de drogas para o tratamento de várias doenças (SCHMIDT & FINLEY, 2014).

Embora o 20SPT destituído de unidades regulatórias seja capaz de degradar proteínas intracelulares, o papel da degradação proteassomal independente de poliubiquitina em qualquer processo de regulação é pouco descrito até agora. Como já sugerido, 20% das proteínas intracelulares em células de levedura e de mamíferos podem ser degradadas pelo 20SPT independente da ubiquitinação do substrato (BAUGH, 2009; BEN-NISSAN & SHARON, 2014; ERALES & COFFINO, 2014). Conforme relatado por BAUGH, 2009 os mesmos substratos encontrados degradados em extratos celulares pelo 20SPT, independentemente de ubiquitinação, foram degradados *in vitro* por preparações de 20SPT purificado.

Há anos o nosso grupo têm focado nos estudos que envolvem a S-glutacionilação do proteassomo, uma modificação química pós-traducional reversível que possui um importante papel funcional atuando principalmente na remoção de proteínas não estruturadas e danificadas oxidativamente (DEMASI *et al.*, 2001; DEMAIS *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2012). Portanto, é de grande interesse compreender esse mecanismo de regulação proteica e a importância desta no processo de modulação da atividade catalítica do proteassomo. O grupo descreveu o mecanismo bioquímico pelo qual ocorre o processo de

glutathionilação do proteassomo (DEMASI *et al.*, 2001 e 2003), e posteriormente, os resíduos de cisteína suscetíveis a essa modificação através de análises *in vivo*, na qual o proteassomo foi purificado de células crescidas até fase estacionária em meio rico (PT-YPD), e, análises *in vitro* onde o proteassomo foi incubado com GSH (PT-SG). Entre as 14 subunidades do 20SPT estão dispersos de um a cinco resíduos de cisteína por subunidade, totalizando 32 resíduos de cisteína por molécula de proteassomo, com exceção das subunidades α_2 , α_3 e β_7 as quais não possuem resíduos de cisteína na sua sequência primária. Contudo, apenas dois foram encontrados glutathionilados em ambas as condições descritas acima, a Cys76 e a Cys221 da subunidade α_5 do 20SPT (SILVA *et al.*, 2012). No entanto, observou-se que esses resíduos de cisteína concentram-se exclusivamente nas subunidades α do 20SPT, e uma das consequências estruturais dessa modificação em subunidades α , além das alterações funcionais sítio-específicas, foi à observação de que, a forma glutathionilada, quando comparada à reduzida, degrada mais eficientemente proteínas oxidadas, e, quando esses resíduos encontram-se glutathionilados, ocorre a abertura da câmara catalítica da unidade 20S (SILVA *et al.*, 2012).

Assim, com o intuito de caracterizar o papel da Cys76 e Cys221 da subunidade α_5 do 20SPT bem como a importância destes resíduos no processo de glutathionilação, neste trabalho foram obtidas linhagens de levedura *S. cerevisiae* com mutações sítio-específicas (α_5 -C76S e α_5 -C221S), e posteriormente, foram realizadas análises comparativas entre o 20SPT da linhagem selvagem e as mutantes avaliando as alterações fenotípicas, funcionais e estruturais oriundas dessa mutação.

A levedura *S. cerevisiae* é amplamente utilizada como modelo eucarioto em estudos biológicos, já que compartilha ciclo de vida e organização celular como os eucariotos mais complexos, além de ser um organismo unicelular, de fácil cultivo e manipulação gênica. Também apresenta estados haploides e diploides estáveis o que permite a análise dos fenótipos dos mutantes com deleção total de genes não essenciais no estado haploide e estudos de complementariedade. No caso de genes essenciais, estudos de complementariedade podem ser realizados após transformações de nocautes no estado diploide, onde ocorre a integração de DNA no genoma da levedura por recombinação homóloga, seguido de indução de meiose (esporulação) (SHERMAN, 2002). Assim, iniciamos avaliando o fenótipo consequente da inativação de um alelo no gene *PUP2* correspondente à subunidade α_5 do 20SPT com o gene repórter *HIS3* na linhagem parental diploide de *S. cerevisiae* W303. A complementação para reversão do fenótipo nesta linhagem diplóide com o gene *PUP2*

selvagem utilizando plasmídeos episomais confirmou que este gene é totalmente essencial para a viabilidade da célula (**Figura S1 e S2**). Posteriormente, a complementação do gene *PUP2* no mutante $\Delta pup2::HIS3$ com as mutações sítio-específicas C221S e C76S observamos a consistente complementação do alelo nulo *pup2::HIS3* tanto por *PUP2*^{C221S} quanto por *PUP2*^{C76S}, ou seja, a complementação do gene *PUP2* em linhagens mutantes é funcional, independentemente das trocas de resíduos, embora durante a obtenção dos mutantes a linhagem $\alpha 5$ -C76S tenha apresentado um retardo no crescimento em todas as condições de cultivo utilizadas para a seleção dos mutantes (**Figura S3 e S4**). Isso é um indicativo da importância deste resíduo, lembrando que a Cys76 é um resíduo conservado desde a levedura ao homem. Já no caso da linhagem duplo mutante $\alpha 5$ -C76S/C221S não houve complementação do mutante nulo *pup2::HIS3* no gene *PUP2* com o plasmídeo portando o alelo duplo mutante *PUP2*^{C76S/C221S}. Contudo, as células da linhagem diploide $\Delta pup2::HIS3$ -*PUP2*^{C76S/C221S} recuperaram a capacidade de crescer após a reversão do fenótipo com um plasmídeo episomal carregando o gene *PUP2* selvagem, confirmando que a ausência de ambos os resíduos torna a célula inviável, indicando um papel funcional de tais cisteínas na viabilidade celular (**Figura S5**).

Todas as proteínas testadas foram degradadas com mais eficiência pelo 20SPT da linhagem mutante C221 nos respectivos ensaios quando comparada ao proteassomo selvagem, apresentando assim uma degradação diferencial de tais proteínas entre as linhagens (**Figura 19**). O aumento da capacidade/velocidade proteolítica aqui observada seria uma consequência da abertura da câmara catalítica do 20SPT. Além disso, os resultados de proteólise mostraram que a capacidade de degradação de ambas as linhagens é afetada na presença de DTT, corroborando com os dados obtidos com o proteassomo selvagem, onde a taxa de degradação proteolítica destas proteínas (não estruturadas e oxidoredutases) aumenta quando o 20SPT está glutacionilado (SILVA *et al*, 2012). Provavelmente essa diminuição ou ausência de degradação proteica na presença de DTT seja oriunda da redução de resíduos de cisteínas glutacionilados e, conseqüentemente, do fechamento da câmara catalítica impedindo assim a entrada do substrato e posterior hidrólise. Na **Figura 20** está mostrado o efeito de DTT na diminuição da frequência de formas abertas do PT20S $\alpha 5$ -C221S. O fato do 20SPT com a mutação $\alpha 5$ -C221S responder ao DTT indica que o resíduo Cys76 nesta linhagem esteja glutacionilado, apresentando assim a sua conformação prevalentemente na forma aberta ($80\% \pm 3$) comparada a selvagem ($65\% \pm 4$), o que permitiria um maior aporte de substrato aos sítios catalíticos intensificando a degradação de proteínas. Isso foi confirmado por

espectrometria de massas (**Figura 24**). Em contrapartida, o 20SPT com a mutação $\alpha 5$ -C76S apresenta-se prevalentemente na forma fechada ($30\% \pm 2$ forma aberta; **Figura 20**). Por outro lado, as modificações estruturais observadas no 20SPT da linhagem C221 corroboram com os resultados discutidos abaixo quanto às alterações na expectativa de vida celular e resistência ao estresse oxidativo, onde interpretamos esses resultados como uma consequência do aumento na frequência de abertura da câmara catalítica. Assim, concluímos que a glutationilação do resíduo Cys221, o único resíduo Cys localizado na superfície (totalmente exposto ao solvente) do 20SPT (SILVA *et al.*, 2012), representa uma regulação negativa da abertura da câmara catalítica do 20SPT uma vez que, sua mutação determina maior frequência de formas abertas, e, que provavelmente restaria o resíduo Cys76 para ser glutationilado e, portanto, é o que estaria de fato regulando a abertura do 20SPT.

As análises proteômicas seguidas à espectrometria de massas utilizando o espectrômetro do tipo MALDI-TOF confirmaram a glutationilação do resíduo Cys76 da subunidade $\alpha 5$ do PT20S. Embora a subunidade $\alpha 5$ tenha sido identificada nas preparações sem DTT e IAA por espectrometria de massa do tipo LC-MS, não foi possível a identificação do resíduo Cys76 glutationilado (**Figura 21a**), diferentemente das preparações tratadas com DTT e IAA (**Figura 21b**). A S-glutationilação protéica é uma modificação pós-traducional reversível envolvida em diferentes funções biológicas reguladas via homeostase redox da célula. No entanto, não são muito bem descritas as características de ionização de peptídeos glutationilados e nem a manutenção da integridade desta modificação peptídica no processo de fragmentação dos peptídeos na câmara de colisão. Métodos bioquímicos convencionais muitas vezes não permitem que tal modificação dissulfeto misto seja identificada de forma confiável em resíduos de cisteína específicos ou ser distinguidos de outras formas oxidadas. Diversos trabalhos na literatura caracterizaram a glutationilação de proteínas, e, identificaram esta modificação por MS ou utilizando glutationa biotinilada, também identificaram por *fingerprinting* as proteínas imunoprecipitadas, porém sem a necessidade da ionização de peptídeos contendo glutationa. Alguns trabalhos demonstraram a S-glutationilação de proteínas por MS/MS (KAMBE *et al.*, 2010; PALMIERI *et al.*, 2010; REGAZZONI *et al.*, 2009). Além disso, CHOU *et al.* (2014) investigaram o padrão de fragmentação MS/MS de peptídeos glutationilados sob vários modos de dissociação utilizando como modelo peptídeos sintéticos derivados da proteína tirosina fosfatase, onde os resultados indicaram que uma alta energia baseada em MALDI CID MS/MS em um TOF/TOF proporciona as características espectrais mais distintas que facilitam a identificação rápida e inequívoca do sítio-específico

da glutathionilação. Contudo, as análises de espectrometria de massas realizadas em um espectrômetro do tipo MALDI-TOF foram suficientes para a identificação do peptídeo da subunidade $\alpha 5$, tanto na forma reduzido quanto glutathionilado (**Figura 24**), onde observamos diversas massas peptídicas, destacando-se os íons 1402,6 e 1708,7. Ambos representam o peptídeo contendo o resíduo C76, porém, o segundo íon apresenta a forma glutathionilada do peptídeo (a diferença de +305 Da entre os íons indica a incorporação da glutathiona ligada ao resíduo de cisteína). Apesar da análise via MALDI ter sido capaz de identificar a modificação pós-traducional neste resíduo, vale a pena ressaltar algumas dificuldades metodológicas encontradas, como a necessidade de índices de cobertura próximos a 100 % para identificar todos os peptídeos possíveis, a intensidade e capacidade de ionização de cada peptídeo, a separação dos peptídeos por UPLC para a seleção dos peptídeos para análise MS/MS e o tamanho dos fragmentos gerados pela digestão com tripsina. Em um trabalho publicado por CHIANG *et al.* (2010) identificaram através da análise de MALDI-MS dois locais glutathionilados na enzima GspSA de *E. coli* tratada com GSSG. Assim, partindo das digestões com tripsina derivadas de amostras de GspSA glutathioniladas *in vitro* (5 mM GSSG), observaram um aumento de massa característico de 305 Da para os peptídeos trípticos contendo a Cys59 e Cys338, que representa o domínio de amidase e sintetase, respectivamente. A S-glutathionilação havia sido estudada principalmente em células eucarióticas, até que CHARDONNET *et al.* (2015), realizaram uma análise proteômica em grande escala da glutathionilação em um procarionte fotossintético, o modelo de cianobactéria *Synechocystis sp.* PCC6803, onde o extrato foi tratado com glutathiona oxidada e biotilada (BioGSSG), e subsequentemente as proteínas foram isoladas por cromatografia de afinidade em colunas de estreptavidina e identificadas por análises LC-MS/MS. Assim, foi possível a identificação de inúmeras proteínas que participam em diversos processos celulares e vias metabólicas (metabolismo de nitrogênio e carbono, divisão celular, resposta ao estresse, e, produção de H₂), sugerindo que a glutathionilação constitui um importante mecanismo de regulação global do metabolismo de cianobactérias sob condições de estresse oxidativo.

Embora a glutathionilação promova um aumento da atividade proteolítica proteassomal, esta modificação pós-traducional parece regular alostericamente os sítios ativos do proteassomo, assim como o reconhecimento e a entrada do substrato a câmara catalítica. Muito provavelmente o mecanismo pelo qual esses substratos específicos são clivados ou degradados pelo 20SPT seja a presença de domínios não estruturados. Nos últimos anos, alguns pesquisadores afirmam que proteínas não-estruturadas intrinsecamente estão propensas

a serem degradadas pelo 20SPT "by default" (TSVETKOV, 2008), que significa degradação automática desde que haja interação proteína - proteassomo. Este conceito opõe-se à ideia de que todas as proteínas são estáveis a menos que desestabilizadas por modificações tais como a poliubiquitinação ou oxidação. A degradação de proteínas oxidadas pelo 20SPT independente de poliubiquitinação tem sido explorada desde a década de 1980 e está bem documentada (JUNG *et al.*, 2013). No caso de proteínas oxidadas, acredita-se que a perda da estrutura secundária e o consequente aumento da exposição de regiões hidrofóbicas têm sido apontados como os fenômenos subjacentes à susceptibilidade dessas proteínas para interação e posterior degradação pelo 20SPT (BAUGH *et al.*, 2009; FERRINGTON *et al.*, 2001; PACIFICI *et al.*, 1993; SHANG & TAYLOR, 2011).

A modificação redox do 20SPT provavelmente seja um importante mecanismo que regula a abertura/fechamento da câmara catalítica do 20SPT, facilitando o processamento proteolítico de proteínas, incluindo as proteínas não estruturadas e oxidadas. Assim, o 20SPT glutationilado prevaleceria na sua conformação aberta e facilitaria o acesso do substrato proteico para a câmara catalítica, aumentando a taxa proteolítica. Os sistemas proteolíticos são fundamentais para a manutenção de proteínas intracelulares, incluindo aquelas que ainda são funcionais, sendo necessários para impedir o acúmulo de proteínas danificadas e suas consequências associadas, como por exemplo, agregação.

Como demonstrado anteriormente, a conformação fechada do 20SPT é mantida por um "emaranhado" formado por interações entre as caudas N-terminal das subunidades α (BAJOREK & GLICKMAN, 2004; GROLL *et al.*, 2000). Estudos realizados por GROLL *et al.* (2000) mostraram que a subunidade $\alpha 3$ é a mais importante nos processos de abertura e fechamento da câmara catalítica, onde a deleção de 9 resíduos de aminoácidos da cauda N-terminal da subunidade $\alpha 3$ foi capaz de promover a desestruturação das caudas das demais subunidades levando a abertura da câmara catalítica do 20SPT, e, conseqüentemente um aumento da atividade peptídica proteassomal. Enquanto que, a deleção da cauda N-terminal da subunidade $\alpha 7$ não foi suficiente para promover a abertura e a ativação do 20SPT, porém, associada à deleção da cauda da $\alpha 3$ promoviam um efeito sinérgico na abertura por estarem diametralmente opostas na estrutura 3D (BAJOREK & GLICKMAN, 2004). Nossa hipótese é de que a S-glutationilação da Cys76 na subunidade $\alpha 5$ poderia promover alterações na dinâmica do N-terminal da subunidade $\alpha 3$, como descrito acima, induzindo a abertura da câmara.

Embora a ativação do 20SPT pela abertura da câmara catalítica esteja pouco descrita, foi demonstrado em células de mamíferos a ativação e a abertura da câmara catalítica do 20SPT por peptídeos específicos que induziram uma diminuição da agregação de proteínas (DAL VECHIO *et al.*, 2014).

A automontagem do 20SPT de células eucarióticas se inicia com a formação de um anel heteroheptamérico contendo as subunidades do tipo α , e em seguida as subunidades do tipo β entram no complexo em uma ordem definida, com propeptídeos de algumas subunidades β os quais têm um papel crucial na sua incorporação. Uma vez que todas as subunidades α e β estejam inseridas, o que resulta em um “meio-proteassomo”, ele se dimeriza e os propeptídeos são removidos, resultando em um 20SPT maduro (CHEN & HOCHSTRASSER, 1996; KRUGER *et al.*, 2001). Várias proteínas acessórias já foram identificadas com o processo de automontagem do 20SPT, com funções semelhantes à chaperonas auxiliando as subunidades em etapas específicas para que se encaixem de forma eficiente adquirindo a maturação correta e assim resultando em um 20SPT funcional. Entretanto, tais proteínas não fazem parte da estrutura madura final do 20SPT (MARQUES *et al.*, 2009; MURATA *et al.*, 2009). Uma destas chaperonas a Ump1 de levedura (hUMP1 ou POMP1 em humanos) é uma proteína de vida-curta e atua nas últimas etapas de montagem. O baixo rendimento nas preparações de 20SPT da linhagem mutante C76 nos levou a pensar na possibilidade de que nesta linhagem não estar ocorrendo a automontagem correta do 20SPT, visto que as chaperonas heterodiméricas Pba3/Pba4 interagem especificamente com a subunidade $\alpha 5$ (KUSMIERCZYK *et al.*, 2008). Portanto, a mutação genética realizada nesta subunidade ($\alpha 5$ -C76S) poderia ter alterado a sua estrutura de modo que dificultasse o reconhecimento por tais chaperonas para associação e direcionamento da automontagem do anel heteroheptamérico α . As chaperonas heterodiméricas Pba1/Pba2 e Pba3/Pba4 (*Proteasome Biogenesis-Associated Factors 1 and 2*) participam dos processos iniciais de montagem do 20SPT (KUSMIERCZYK *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 1998), e uma importante função dessas chaperonas é controlar a incorporação da subunidade $\alpha 3$ entre as subunidades $\alpha 2$ e $\alpha 4$ no 20SPT (KUSMIERCZYK *et al.*, 2008). A subunidade $\alpha 3$ é a única subunidade dispensável do 20SPT de levedura, e, sua deleção causa apenas um pequeno defeito no crescimento. Entretanto, na ausência de $\alpha 3$, uma segunda cópia da subunidade $\alpha 4$ toma o seu lugar em cada anel α (VELICHUTINA *et al.*, 2004). Foi já demonstrado que as linhagens de levedura $\Delta\alpha 3$ -20SPT incubadas em altos níveis de cádmio apresentam uma estrutura alternativa do anel α composto por duas subunidades $\alpha 4$ ($\alpha 4$ - $\alpha 4$). Notavelmente, observou-se

que as células dessa linhagem mutante cresceram mais robustas do que as células selvagens na presença de cádmio. Na ausência de Pba3/Pba4 as células de levedura também produzem proteossomos com a configuração $\alpha 4\text{-}\alpha 4$, apesar da expressão continuada de $\alpha 3$. Contudo, em torno de 20-50% de proteossomos exibiam a configuração $\alpha 4\text{-}\alpha 4$. O mecanismo exato pelo qual a automontagem do anel α é regulado por essas chaperonas ainda não está claro. As células que formam os proteossomos com anéis contendo a configuração $\alpha 4\text{-}\alpha 4$ são mais resistentes ao estresse oxidativo, sugerindo que essa conformação alternativa proporciona uma vantagem seletiva sob condições de estresse oxidativo. Uma possível explicação para este fenótipo poderia ser que a ausência da subunidade $\alpha 3$ facilita a formação do 20SPT na conformação aberta (KUSMIERCZYK *et al.*, 2008). Contudo, tal mudança conformacional do 20SPT na linhagem C221 poderia justificar a alta resistência da linhagem C221 após o tratamento com H_2O_2 , bem como o aumento na velocidade de degradação e/ou também a abertura da câmara catalítica. Assim, verificamos se haveria diferença entre as linhagens selvagem e mutantes ao analisarmos por q-PCR os níveis de expressão de algumas subunidades correspondentes ao 20SPT ($\alpha 5^*$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ e $\beta 4$), a subunidade Rpt1 do 19SPT, a proteína Ump1 (responsável pela dimerização do 20SPT), bem como nas concentrações de 19S e 20S através dos ensaios de imunomarcação, o que não ocorreu (**Figura 25 e 28**). Ainda, realizamos ensaios de imunomarcação com anticorpos específicos para o reconhecimento das subunidades $\alpha 3$ e $\alpha 4$ de levedura (**Figura 29**) em preparações do extrato celular do 20SPT. Como observado nenhuma alteração ocorreu na inserção dessas subunidades. Concluímos que as mutações sítio- específicas das Cys76 e Cys221 não alteraram a automontagem do 20SPT mutado e, portanto, os dados de resistência ao estresse oxidativo observados na linhagem C221 não podem ser explicados por diferenças constitutivas das subunidades α (como discutido acima).

Em relação à estrutura intracelular do proteassomo, ou seja, 20SPT livre (desprovido de unidades regulatórias) ou 20SPT acoplado a uma ou duas unidades regulatórias, dados na literatura mostram que em células de mamíferos e leveduras, o conjunto de 20SPT livre representa mais do que um terço do total de proteassomo (BABBITT *et al.*, 2005; FABRE *et al.*, 2014; HENDIL *et al.*, 1998; TANAHASHI *et al.*, 2000). Em uma publicação recente, ASANO *et al.* (2015) demonstraram por criotomografia eletrônica de células neuronais do hipocampo de ratos que apenas 20% do proteassomo está acoplado em ambas as extremidades o que significa que, a maior parte do 20SPT está livre, sugerindo um possível papel

bifuncional do proteassomo, portanto, a regulação da meia vida de proteínas por ambos os mecanismos, ou seja, independente e dependente de ubiquitina.

Analisando o fenótipo das linhagens selvagem e mutantes, após acompanhar o crescimento dessas linhagens até alcançarem a fase estacionária e também avaliar a sensibilidade de tais ao estresse oxidativo em ensaios de diluição seriada utilizando diferentes concentrações de peróxido inorgânico (H_2O_2) e orgânico (t-BOOH), vimos que a linhagem com a mutação $\alpha 5$ -C76S apresentou um retardo de 40% após 60 horas de crescimento, embora tenha sensibilidade semelhante à selvagem, com exceção quando utilizamos 4 mM de H_2O_2 , já diferentemente em concentrações a partir de 0.75 mM de t-BOOH, onde ainda foi capaz de formar colônias. As células da linhagem com a mutação $\alpha 5$ -C221S mostraram menor sensibilidade em ambos os ensaios com peróxidos, portanto, maior capacidade na formação de colônias, em comparação a selvagem nos ensaios de viabilidade celular sobre condições de estresse oxidativo (**Figura 32**). Acreditamos que a resistência observada na linhagem C221S seja devido à abertura da câmara catalítica do 20SPT. Outros dados obtidos pelo grupo avaliando o tempo de vida cronológico (capacidade de formação de colônias a partir de uma cultura de células) são condizentes com os dados citados aqui anteriormente. Ou seja, a linhagem mutante C221 apresenta tempo de vida cronológico duas vezes maior que a selvagem, e, a linhagem C76 possui claramente menor longevidade (**Figura 33**) (LEME *et al.*, manuscrito em preparação).

A diminuição da atividade proteassomal durante o envelhecimento está bem estabelecida acarretando o acúmulo de proteínas danificadas e conseqüentemente, agregação e diminuição da sobrevivência celular, como demonstrado em diversos tecidos e modelos celulares de envelhecimento (KAUSHIK & CUERVO, 2015; VILCHEZ *et al.*, 2014). Com base nisso, trabalhos pioneiros publicados por CHEN *et al.*, 2004 e 2006, nos quais exploraram o papel do proteassomo na sobrevivência celular, descobriram que tanto um aumento na síntese de proteassomo quanto na montagem do mesmo eram necessários para a sobrevivência da levedura na fase estacionária, bem como para estender o tempo de vida celular. Dados obtidos em estudos realizados entre várias espécies das leveduras aos mamíferos relatam a importância da integridade do proteassomo para recuperar as células do estresse (PICKERING *et al.*, 2012 e 2013) ou para aumentar a longevidade (CHONDROGIANNI *et al.*, 2015; KODAKARAMI *et al.*, 2015; PICKERING *et al.*, 2015; RODRIGUEZ *et al.*, 2014; VILCHEZ *et al.*, 2014).

A princípio pensava-se na S-glutationilação proteica como uma modificação devido ao ambiente celular oxidativo. No entanto, provou ser um mecanismo regulatório da atividade da proteína, bem como de proteção da homeostase de tióis (MYEIAL & CHOCK, 2012). Além disso, os dados obtidos pelo grupo suportam a hipótese de que a glutathionilação do 20SPT é uma modificação pós-traducional que modula a atividade do proteassomo quanto à degradação de proteínas por processo independente de poliubiquitinação. Uma pressão evolutiva sobre as subunidades do 20SPT pode ter selecionado resíduos de cisteína que atuem como gatilhos ou sensores, respondendo a determinadas condições redox, promovendo a abertura da câmara catalítica do 20SPT livre, o que aumentaria a degradação de proteínas oxidadas quando as células perdem transitoriamente a sua capacidade redutora (DEMASI *et al.*, 2014) (**Figura 34**).

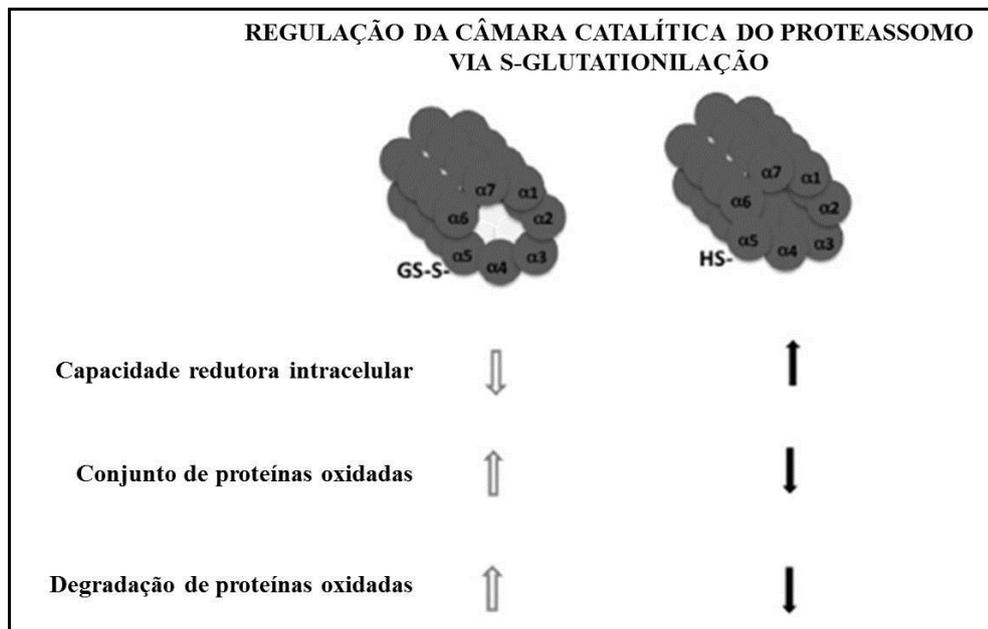


Figura 34. A regulação da glutathionilação do 20SPT no interior das células e a degradação de proteínas oxidadas. De acordo com a nossa hipótese, quando as células passam por um desequilíbrio oxidativo, o que resulta na perda da sua capacidade redutora, aumenta o conjunto de proteínas oxidadas e o 20SPT livre é glutathionilado. Esta modificação do 20SPT permite a abertura da câmara catalítica o que aumenta a degradação de proteínas oxidadas (à esquerda). Condições opostas são prováveis quando as células recuperam possuem aumento na capacidade redutora intracelular (à direita) (Adaptado de DEMASI *et al.*, 2014).

VI. Conclusões

As mutações sítio-específicas no gene *PUP2* (qual codifica para a subunidade $\alpha 5$ do 20SPT), $\alpha 5$ -C76S e $\alpha 5$ -C221S, da levedura *S. cerevisiae* permitiram a caracterização desses resíduos no processo de glutationilação, sendo esta modificação pós-traducional o principal objetivo abordado durante a execução deste projeto. Dentre as principais conclusões obtidas, podemos citar que:

- ✓ A inativação do gene *PUP2* causa a morte celular. No entanto, a complementação deste com o vetor recombinante carregando o gene selvagem ou mesmo o mutante *PUP2*^{C76S}/*PUP2*^{C221S} torna a célula novamente viável, indicando um importante papel de tais resíduos na viabilidade celular;
- ✓ O 20SPT da linhagem C221 exibiu atividade ChT-L aumentada quando comparada a selvagem em ensaios de hidrólise de peptídeos fluorogênicos, além de que a glutationilação do 20SPT promoveu uma hidrólise mais eficiente das proteínas degradáveis independentemente de ubiquitinação. Contudo, a ausência da Cys221 na linhagem mutante parece ser compensada pela atividade aumentada do 20SPT;
- ✓ Um dos possíveis mecanismos pelo qual a glutationilação altera a atividade do 20SPT pode estar correlacionado com a dinâmica de abertura e fechamento da câmara catalítica. Análises por TEM da vista frontal da unidade catalítica demonstraram que o proteassomo glutationilado da linhagem selvagem e da mutante C221 encontra-se em sua conformação predominantemente aberta, sendo imediatamente fechada na presença do redutor DTT. Isso indica que o resíduo Cys76 permanece glutationilado sendo capaz de promover a abertura da câmara catalítica do 20SPT;
- ✓ Após o isolamento das subunidades do 20SPT por 2-DE, identificamos por análise de espectrometria de massa o resíduo Cys76 glutationilado na mutante C221, indicando uma possível regulação positiva deste resíduo quanto à abertura da câmara catalítica;
- ✓ Uma vez que não houve alteração na expressão bem como nas concentrações das subunidades do 20SPT entre as linhagens, concluímos que as alterações fenotípicas observadas não estão relacionadas ao estado redox dessas células, mas provavelmente, à maior eficiência catalítica do 20SPT;
- ✓ A mutação do resíduo $\alpha 5$ -C221 resultou no aumento da longevidade celular coincidentemente com maior frequência de abertura da câmara catalítica do 20SPT

observado nessa linhagem e aumento da atividade proteolítica. Esses dados sugerem que a glutationilação do resíduo Cys221 seja, na verdade, um regulador negativo da abertura da câmara sendo que sua mutação resulta numa estrutura mais eficiente para proteólise;

✓ Em ensaios acompanhando o crescimento das linhagens até alcançarem a fase estacionária, observou-se que a linhagem C221 cresce semelhante a selvagem, aproximadamente 40% a mais do que a mutante C76, diferentemente dos ensaios de viabilidade celular, onde a mutante C221 mostrou-se mais resistente do que a selvagem quando submetidas ao estresse oxidativo com peróxidos;

✓ A abertura do 20SPT tem uma consequência sobre a sobrevivência da célula da levedura *S. cerevisiae* como aqui visto nos ensaios de envelhecimento cronológico. Entretanto, os mecanismos subjacentes a tal associação teria uma incidência sobre a sobrevivência e proteostase celular;

✓ A mutação $\alpha 5$ -C76S no 20SPT gerou uma linhagem com dificuldades de crescimento e queda significativa na expectativa de vida. Vale ressaltar que esse resíduo de cisteína é altamente conservado na escala evolutiva. Portanto, nos parece que a glutationilação deste e, alterações anteriormente observadas e confirmadas neste trabalho sobre a abertura da câmara catalítica e aumento de atividade proteolítica, é uma modificação relevante na manutenção da proteostase intracelular;

✓ Os dados obtidos até então sugerem um interessante papel antioxidante do 20SPT durante desafios oxidativos. Nestas condições ocorreria a glutationilação da unidade catalítica, modulando a atividade proteassomal, removendo mais eficientemente as proteínas oxidadas geradas durante o desafio;

Este trabalho abre uma série de perspectivas para o entendimento da modulação da atividade proteassomal por glutationilação e para o envolvimento desta modificação pós-traducional com o metabolismo redox intracelular. Devido à conservação desta protease e do mecanismo de glutationilação nos mais diversos organismos eucarióticos, estes estudos tornam-se cada vez mais importantes para a compreensão da função intracelular do 20SPT. Entretanto, projeto contribuiu para a elucidação (1) da importância do processo de glutationilação no controle estrutural e funcional do 20SPT e (2) da importância desse processo no metabolismo oxidativo e longevidade celular.

VII. Referências Bibliográficas

- AMERIK, A.Y.; HOCHSTRASSER, M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta*, v. 1695, p. 189–207, 2004.
- ARENDDT, C. S.; HOCHSTRASSER, M. Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly. *EMBO J*, v. 18, p. 3575-85, 1999.
- ARENDDT, C. S.; HOCHSTRASSER, M. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 94, p. 7156–7161, 1997.
- ARRIGO, A. P. *et al.* Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature*, v. 331, p. 192-4, 1988.
- ASANO, S. *et al.* Molecular census of 26S proteasomes in intact neurons. *Science*, v. 347, p. 439-442, 2015.
- ASHER, G. 20S proteasomal degradation of ornithine decarboxylase is regulated by NQO1. *Mol Cell*, v. 17, p. 645-55, 2005.
- AUSUBEL, F. M. *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Caps. 2, 3 e 13, 1994.
- AUSUBEL, F. M. *et al.* *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons Inc, New York, USA, 1989.
- BABBITT, S. E. *et al.* ATP hydrolysis-dependent disassembly of the 26S proteasome is part of the catalytic cycle. *Cell*, v. 121, p. 553-65, 2005.
- BAJOREK, M.; GLICKMAN, M. H. Keepers at the final gates: regulatory complexes and gating of the proteasome channel. *Cell Mol Life Sci*, v. 61, p. 1579–1588, 2004.
- BARRIENTOS, A. Yeast models of human mitochondrial diseases. *IUBMB Life*, v. 55, p. 83-97, 2003.
- BAUGH, J. M. *et al.* Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *J Mol Biol*, v. 386, p. 814-827, 2009.
- BAUMEISTER, W.; LUPAS, A. The proteasome. *Curr Opin Struct Biol*, v. 7, p. 273-278, 1997.
- BEN-NISSAN, G.; SHARON, M. Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway. *Biomolecules*, v. 4, p. 862-84, 2014.
- BIRBOIM, H. C.; DOLLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, v. 7, p. 1513-1523, 1979.
- BOCHTLER, M. *et al.* The proteasome. *Ann Rev Biophys Biomol Struct*, v. 28, p. 295-317, 1999.
- BOSE, S. *et al.* Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon. *Biochem J*, v. 378, p. 177–184, 2004.
- BOSE, S. *et al.* Phosphorylation of proteasomes in mammalian cells. *Mol Biol Rep*, v. 26, p. 11-4, 1999.
- BREUSING, N.; GRUNE, T. Regulation of proteasome-mediated protein degradation during oxidative stress and aging. *Biol Chem*, v. 389, p. 203–209, 2008.
- BUTTERFIELD, D. A. *et al.* Redox proteomics in some age-related neurodegenerative disorders or models thereof. *Neuro Rx*, v. 3, p. 344-357, 2006.

- CHARDONNET, S. *et al.* First proteomic study of S-glutathionylation in cyanobacteria. *Proteome Res*, v. 2, p. 59-71, 2015.
- CHEN, P.; HOCHSTRASSER, M. Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell*, v. 86, p. 961-972, 1996.
- CHEN, Q. *et al.* Proteasome synthesis and assembly are required for survival during stationary phase. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 37, p. 859-868, 2004.
- CHEN, Q. *et al.* Ump extends yeast lifespan and enhances viability during oxidative stress: central role for the proteasome? *Free Radic Biol Med*, v. 40, p. 120-126, 2006.
- CHEN, Z. J.; SUN, L. J. Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell*, v. 33, p. 275-286, 2009.
- CHIANG, B. Y. *et al.* Protein S-thiolation by glutathionylspermidine (Gsp): the role of *Escherichia coli* Gsp synthetase/amidase in redox regulation. *J. Biol. Chem*, v. 285, p. 25345-25353, 2010.
- CHONDROGIANNI, N. *et al.* 20S proteasome activation promotes life span extension and resistance to proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J*, v. 29, p. 611-22, 2015.
- CHOU, C. C. *et al.* Characteristic tandem mass spectral features under various collision chemistries for site-specific identification of protein S-glutathionylation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*, v. 26, p. 120-132, 2015.
- CHOUDURI, A.U. *et al.* Functional and biochemical characterization of the 20S proteasome in a yeast temperature-sensitive mutant, rpt6-1. *BMC Biochem*, v. 9, p. 20, 2008.
- CIECHANOVER, A. *et al.* A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 81, p. 1100-05, 1978.
- CIECHANOVER, A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 6, p. 79-87, 2005.
- CLAIBORNE, A. *et al.* Structural, redox, and mechanistic parameters for cysteine-sulfenic acid function in catalysis and regulation. *Adv Protein Chem*, v. 58, p. 215-76, 2001.
- COSTA, V. *et al.* Protein oxidation, repair mechanisms and proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *IUBMB Life*, v. 59, p. 293-8, 2007.
- COUX, O. *et al.* Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem*, v. 65, p. 801-47, 1996.
- CRAUWELS, M. *et al.* Identification of genes with nutrient-controlled expression by PCR-mapping in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v. 13, p. 973-84, 1997.
- DAL VECHIO, F. H. *et al.* Peptides that activate the 20S proteasome by gate opening increased oxidized protein removal and reduced protein aggregation. *Free Radic Biol Med*, v. 67, p. 304-13, 2014.
- DALLE -DONNE, I. *et al.* Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci*, v. 34, p. 85-96, 2009.
- DAVIES, K. J. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*, v. 83, p. 301-310, 2001.
- DAVIES, K. J. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *Life*, v. 50, p. 279-289, 2000.
- DE DUVE, C. *et al.* Tissue fractionation studies. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J*, v. 60, p. 604-17, 1955.

- DEMASI, M. *et al.* 20S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is S-glutathionylated. *J Biol Chem*, v. 278, p. 679-85, 2003.
- DEMASI, M. *et al.* Glutathiolation of the proteasome proteolytic inhibitors. *Arch Biochem Biophys*, v. 389, p. 254-63, 2001.
- DEMASI, M. *et al.* Redox regulation of the proteasome via S-glutathionylation. *Redox Biology*, v. 2, p. 44-51, 2014.
- DI, C. D. Human erythrocyte contains a factor that stimulates the peptidase activities of multicatalytic proteinase complex. *Italian Journal of Biochemistry*, v. 41, p. 213-224, 1992.
- DING, W. X.; YIN, X. M. Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome. *Autophagy*, v. 4, p. 141-150, 2008.
- DUNLOP, R. A. *et al.* Oxidized proteins: mechanisms of removal and consequences of accumulation. *IUBMB Life*, v. 61, p. 522-7, 2009.
- ERALES, J.; COFFINO, P. Ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biochim Biophys Acta*, v. 1843, p. 216-21, 2014.
- ETLINGER, J. D.; GOLDBERG, A. L. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 74, p. 54-8, 1977.
- FABRE, B. *et al.* Label-free quantitative proteomics reveals the dynamics of proteasome complexes composition and stoichiometry in a wide range of human cell lines. *J Proteome Res*, v. 13, p. 3027-3037, 2014.
- FAROUT, L. *et al.* Distribution of proteasomes and of the five proteolytic activities in rat tissues. *Arch Biochem Biophys*, v. 374, p. 207-212, 2000.
- FELDMANN, H. *Yeast: Molecular and Cell Biology*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p. 334, 2010.
- FERRINGTON, D. A. *et al.* Selective degradation of oxidized calmodulin by the 20S proteasome. *J Biol Chem*, v. 276, p. 937-43, 2001.
- FINLEY, D. *et al.* The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, v. 192, p. 319-360, 2012.
- FORSTER, A. *et al.* The 1.9 Å structure of a proteasome-11S activator complex and implications for proteasome-PAN/PA700 interactions. *Mol Cell*, v. 18, p. 589-599, 2005.
- FORSTER, A. *et al.* The pore of activated 20S proteasomes has an ordered 7-fold symmetric conformation. *EMBO J*, v. 22, p. 4356-64, 2003.
- FOURY, F.; KUCEJ, M. Yeast mitochondrial biogenesis: a model system for humans? *Curr Opin Chem Biol*, v. 6, p. 106-111, 2001.
- GALLOGLY, M. M.; MIEYAL, J. J. Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress. *Curr Opin Pharmacol*, v. 7, p. 381-391, 2007.
- GHEZZI, P. Regulation of protein function by glutathionylation. *Free Radic Res*, v. 39, p. 573-80, 2005.
- GIETZ, R. D.; SUGINO, A. New yeast *Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, v. 30, p. 527-34, 1988.
- GILBERT, H. F. Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability. *Methods Enzymol*, v. 251, p. 8-28, 1995.

- GIUSTARINI, D. *et al.* S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *J Cell Mol Med*, v. 8, p. 201-12, 2004.
- GLICKMAN, M. H. *et al.* The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol*, v. 18, p. 3149-62, 1998.
- GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin–proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, v. 82, p. 373–428, 2002.
- GOFFEAU, A. *et al.* Life with 6000 genes. *Science*, v. 274, p. 563-567, 1996.
- GOLDBERG, A. L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, v. 426, p. 895-9, 2003.
- GOMES, A.V. *et al.* Mapping the murine cardiac 26S proteasome complexes. *Circ Res*, v. 99, p. 372-380, 2006.
- GROLL, M. *et al.* A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol*, v. 7, p. 1062–1067, 2000.
- GROLL, M. *et al.* Molecular machines for protein degradation. *ChemBiochem*, v. 6, p. 222–256, 2005.
- GROLL, M. *et al.* Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, v. 386, p. 463–471, 1997.
- GROLL, M. The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 96, p. 10976-83, 1999.
- GUPTA, V.; CARROLL, K. S. Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime. *Biochim Biophys Acta*, v. 1840, p. 847-75, 2014.
- GUTSCHE, R. M. *et al.* Proximity-based protein thiol oxidation by H₂O₂ -scavenging peroxidases. *J Biol Chem*, v. 284, p. 31532–31540, 2009.
- HANAHAM, D. Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J Mol Bio.*, v. 166, p. 157–163, 1983.
- HATAKEYAMA, S.; NAKAYAMA, K. I. Ubiquitylation as a quality control system for intracellular proteins. *J Biochem*, v. 134, p. 1-8, 2003.
- HEINEMEYER, W. *et al.* The active sites of the eukaryotic 20S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem*, v. 272, p. 25200, 1997.
- HENDIL, K B. *et al.* Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes. *Biochem J*, v. 332, p. 749-754, 1998.
- HERSHKO, A. *et al.* Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 77, p. 1783–1786, 1980.
- HERSHKO, A. *et al.* Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 76, p. 3107-10, 1979.
- HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, v. 67, p. 425-79, 1998.
- HILL, B. G.; BHATNAGAR, A. Protein S-glutathiolation: redox-sensitive regulation of protein function. *J Mol Cell Cardiol*, v. 52, p. 559–567, 2012.
- HILL, C. P. *et al.* The 11S regulators of 20S proteasome activity. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 268, p. 73-89, 2002.
- HIRANO, Y. *et al.* A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature*, v. 437, p. 1381–1385, 2005.
- HIRSCH, C.; PLOEGH, H.L. Intracellular targeting of the proteasome. *Trends Cell Biol.*, v. 10, p. 268-72, 2000.

- HOLM, C. *et al.* A rapid, efficient method for isolating DNA from yeast. *Gene*, v. 42, p. 169-173, 1986.
- HOLMGREN, A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem*, v. 264, p. 13963–13966, 1989.
- HOUGH, R. *et al.* Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem*, v. 262, p. 8303-13, 1987.
- INAI, Y.; NISHIKIMI, M. Increased degradation of oxidized proteins in yeast defective in 26S proteasome assembly. *Arch Biochem Biophys*, v. 404, p. 279-284, 2002.
- IWAFUNE, Y. *et al.* Electrophoretic analysis of phosphorylation of the yeast 20S proteasome. *Electrophoresis*, v. 23, p. 329–338, 2002.
- IWAFUNE, Y. *et al.* Identification of three phosphorylation sites in the alpha7 subunit of the yeast 20S proteasome in vivo using mass spectrometry. *Arch Biochem Biophys*, v. 431, p. 9–15, 2004.
- IWATA, A. *et al.* HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J Biol Chem*, v. 280, p. 40282-40292, 2005.
- JONES, D. P. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol*, v. 348, p. 93–112, 2002.
- JUNG, T. *et al.* The proteasomal system. *Mol Aspects Med*, v. 30, p. 191-296, 2009.
- JUNG, T. *et al.* The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part II - protein oxidation and proteasomal degradation. *Redox Biol*, v. 2C, p. 99-104, 2013.
- JUNG, T.; GRUNE, T. The proteasome and its role in the degradation of oxidized proteins. *IUBMB Life*, v. 60, p. 743–752, 2008.
- JUNG, T.; GRUNE, T. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part I—structure of proteasomes. *Redox Biology*, v. 1, p. 178–182, 2013.
- KAMBE, T. *et al.* Inactivation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I by S-glutathionylation of the active-site cysteine residue. *FESB Lett*, v. 584, p. 2478-84, 2010.
- KAUSHIK, S.; CUERVO, A. M. Proteostasis and aging. *Nat Med*, v. 21, p. 1406-15, 2015.
- KIKUCHI, J. *et al.* Co- and post-translational modifications of the 26S proteasome in yeast. *Proteomics*, v. 10, p. 2769-79, 2010.
- KIMURA, Y. *et al.* N(alpha)-acetylation and proteolytic activity of the yeast 20S proteasome. *J Biol Chem*, v. 275, p. 4635-9, 2000.
- KIMURA, Y. *et al.* N-Terminal modifications of the 19S regulatory particle subunits of the yeast proteasome. *Arch Biochem Biophys*, v. 409, p. 341-8, 2003.
- KIRKIN, V. *et al.* A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell*, v. 33, p. 505-516, 2009.
- KLATT, P.; LAMAS, S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem*, v. 267, p. 4928 –4944, 2000.
- KNECHT, E. *et al.* Intracellular protein degradation in mammalian cells: recent developments. *Cell Mol Life Sci*, v. 66, p. 2427–2443, 2009.
- KOMANDER, D. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans*, v. 37, p. 937–953, 2009.

- KOMATSU, M. *et al.* Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, v. 131, p. 1149-1163, 2007.
- KOPP, F. *et al.* Subunit arrangement in the human 20S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 94, p. 2939-2944, 1997.
- KRUGER, E. *et al.* 20S proteasome biogenesis. *Biochimie*, v. 83, p. 289-293, 2001.
- KUBOTA, H. Quality control against misfolded proteins in the cytosol: a network for cell survival. *J Biochem*, v. 146, p. 609-616, 2009.
- KUEHN, L.; B. DAHLMANN. Proteasome activator PA28 and its interaction with 20S proteasomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 329, p. 87-96, 1996.
- KUSMIERCZYK, A. R. *et al.* A multimeric assembly factor controls the formation of alternative 20S proteasomes. *Nat Struct Mol Biol*, v. 15, p. 237-244, 2008.
- LAM, Y. A. *et al.* A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature*, v. 416, p. 763-767, 2002.
- LE TALLEC, B. *et al.* 20S proteasome assembly is orchestrated by two distinct pairs of chaperones in yeast and in mammals. *Mol Cell*, v. 27, p. 660-674, 2007.
- LI, J. E.; RECHSTEINER, M. Molecular dissection of the 11S REG (PA28) proteasome activators. *Biochimie*, v. 83, p. 373-83, 2001.
- LI, X. *et al.* beta-Subunit appendages promote 20S proteasome assembly by overcoming an Ump1-dependent checkpoint. *EMBO J*, v. 26, p. 2339-2349, 2007.
- LILIENBAUM, A. Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int J Biochem Mol Biol*, v. 4, p. 1-26, 2013.
- LIND, C. *et al.* Identification of S-glutathionylated cellular proteins during oxidative stress and constitutive metabolism by affinity purification and proteomic analysis. *Arch Biochem Biophys*, v. 406, p. 229-240, 2002.
- LIU, C. W. *et al.* Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science*, v. 299, p. 408-11, 2003.
- MA, B. *et al.* PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, v. 17, p. 2337-42, 2003.
- MADIGAN, M. T. *et al.* *Microbiologia de Brock*. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.
- MANN, M.; JENSEN, O. N. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol*, v. 21, p. 255-261, 2003.
- MARQUES, A. J. *et al.* Catalytic mechanism and assembly of the proteasome, *Chem Rev*, v. 109, p. 1509-1536, 2009.
- MATSUDA, N.; TANAKA, K. Does impairment of the ubiquitin-proteasome system or the autophagy-lysosome pathway predispose individuals to neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease? *J Alzheimers Dis*, v. 19, p. 1-9, 2010.
- MAUPIN-FURLOW, J. A. *et al.* Proteasomes from structure to function: perspectives from *Archaea*. *Curr Top Dev Biol*, v. 75, p. 125-169, 2006.
- MEYER, A. J.; HELL, R. Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynth Res*, v. 86, p. 435-57, 2005.
- MONTAGUT, C. *et al.* The proteasome: a novel target for anticancer therapy. *Clin Transl Oncol*, v. 8, p. 313-7, 2006.

- MUNHOZ, D. C.; NETTO, L. E. S. Cytosolic Thioredoxin Peroxidase I and II are important defenses of yeast against organic hydroperoxide insult. *J Biol Chem*, v. 279, p. 35219-27, 2004.
- MURATA, S. *et al.* Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 10, p. 104–115, 2009.
- NANDI, D. *et al.* The Ubiquitin-proteasome system. *J Biosci*, v. 31, p. 137-55, 2006.
- NAVON, A.; GOLDBERG, A. L. Proteins are unfolded on the surface of the ATPase ring before transport into the proteasome. *Mol Cell*, v. 8, p. 1339-49, 2001.
- NELSON, J. E. *et al.* Up-regulation of the proteasome subunit LMP7 in tissues of endotoxemic rats. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 135, p. 324–331, 2000.
- NETTO, L. E. *et al.* Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, v. 146, p. 180-93, 2007.
- NEUHOFF, V. *et al.* Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, v. 9, p. 255-62, 1988.
- NICKELL, S. *et al.* Insights into the molecular architecture of the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 106, p. 11943–11947, 2009.
- OHARA, E. Caracterização da tolerância ao estresse oxidativo, capacidade de remoção de proteínas oxidadas e a expectativa de vida de linhagens da levedura *S. cerevisiae* com mutações sítio-específicas na subunidade $\alpha 5$ do proteassomo 20S: Implicações na prevenção de agregação proteica. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 2015.
- OLIVEIRA, G. A. *et al.* Increased aerobic metabolism is essential for the beneficial effects of caloric restriction on yeast life span. *J Bioenerg Biomembr*, v. 40, p. 381-388, 2008.
- PACIFICI, R. E. *et al.* Hydrophobicity as the signal for selective degradation of hydroxyl radical-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J Biol Chem*, v. 268, p. 15405–15411, 1993.
- PACIFICI, R. E.; DAVIES K. J. A. Protein degradation as an index of oxidative stress. *Methods Enzymol*, v. 186, p. 485–502, 1990.
- PALMER, A. *et al.* Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. *Biochem J*, v. 316, p. 401–7, 1996.
- PALMIERI, M. C. *et al.* Regulation of plant glycine decarboxylase by S-nitrosylation and glutathionylation. *Plant Physiol*, v. 152, p. 1514-28, 2010.
- PANKIV, S. *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*, v. 282, p. 24131-24145, 2007.
- PARK, S. *et al.* Structural defects in the regulatory particle-core particle interface of the proteasome induce a novel proteasome stress response. *J Biol Chem*, v. 286, p. 36652–36666, 2011.
- PERKINS, D. N. *et al.* Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, v. 20, p. 3551-67, 1999.
- PETRUCELLI, L.; DAWSON, T. M. Mechanism of neurodegenerative disease: role of the ubiquitin proteasome system. *Ann Med*, v. 36, p. 315-20, 2004.
- PICKART, C. M.; COHEN, R. E. Proteasomes and their kins: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 5, p. 177–187, 2004.

- PICKART, C. M.; EDDINS, M. J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, v. 1695, p. 55-72, 2004.
- PICKERING, A. M. *et al.* A conserved role for the 20S proteasome and Nrf2 transcription factor in oxidative stress adaptation in mammals, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol*, v. 216, p. 543-553, 2013.
- PICKERING, A. M. *et al.* Life span of mice and primates correlates with immunoproteasome expression. *J Clin Invest*, v. 125, p. 2059-2068, 2015.
- PICKERING, A. M. *et al.* Nrf2-dependent induction of proteasome and Pa28 $\alpha\beta$ regulator are required for adaptation to oxidative stress. *J Biol Chem*, v. 287, p. 10021-10031, 2012.
- PICKERING, A. M. *et al.* The immunoproteasome, the 20S proteasome, and the PA28 proteasome regulator are oxidative stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochem J*, v. 432, p. 585-594, 2010.
- POCSI, I. *et al.* Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv Microb Physiol*, v. 49, p. 1-76. 2004.
- RABILLOUD, T. *et al.* Two-dimensional electrophoresis of human placental mitochondria and protein identification by mass spectrometry: toward a human mitochondrial proteome. *Electrophoresis*, v. 19, p. 1006-1014, 1998.
- RAMOS, P. C. *et al.* Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell*, v. 92, p. 489-499, 1998.
- RAMOS, P. C.; DOHMEN, R. J. PACemakers of proteasome core particle assembly. *Structure*, v. 16, p. 1296-1304, 2008.
- REGAZZONI, L. *et al.* Hemoglobin glutathionylation can occur through cysteine sulfenic acid intermediate: Electrospray ionization LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometry studies. *J. Journal of Chromatography B*, v. 877, p. 3456-3461, 2009.
- RIVETT, A. J. *et al.* Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. *J Histochem Cytochem*, v. 40, p. 1165-72, 1992.
- ROCK, K. L. *et al.* Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, v. 78, p. 761-771, 1994.
- RODRIGUEZ, K. A. *et al.* A cytosolic protein factor from the naked mole-rat activates proteasomes of other species and protects these from inhibition. *Biochim Biophys Acta*, v. 1842, p. 2060-2072, 2014.
- ROSE, M. D. *et al.* *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
- ROTHSTEIN, R. J. One step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol*, v. 101, p. 202-211, 1983.
- SADRE-BAZZAZ, K. *et al.* Structure of a Blm10 complex reveals common mechanisms for proteasome binding and gate opening. *Mol Cell*, v. 37, p. 728-35, 2010.
- SAMBROOK, J. *et al.* *Molecular Cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SCHIESTL, R. H.; GIETZ, R. D. High efficiency transformation of intact cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet*, v. 16, p. 339-346, 1989.
- SCHLESINGER, D. H. *et al.* The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry*, v. 14, p. 2214-8, 1975.
- SCHMIDT, M.; FINLEY, D. Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, v. 1843, p. 13-25, 2014.

- SCHOENHEIMER, R. The dynamic state of body constituents. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 1942.
- SHANG, F.; TAYLOR, A. Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, v. 51, p. 5–16, 2011.
- SHELTON, M. D.; MIEYAL, J. J. Regulation by reversible S-glutathionylation: molecular targets implicated in inflammatory diseases. *Mol Cells*, v. 25, p. 332–46, 2008.
- SHERMAN, F. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* v. 350, 3-41, 2002.
- SHERMAN, F.; HICKS, J. Micromanipulation and dissection of asci. *Methods Enzymol*, v. 194, p. 21-37, 1991.
- SHRINGARPURE, R. *et al.* Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J Biol Chem*, v. 278, p. 311-318, 2003.
- SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*, v. 27, p. 916–921, 1999.
- SILVA, G. M. *et al.* Redox control of 20S proteasome gating. *Antioxid Redox Signal*, v. 16, p. 1183-1194, 2012.
- SIMPSON, M. V. The release of labeled amino acids from the proteins of rat liver slices. *J Biol Chem*, v. 201, p. 143-154, 1953.
- SPENCE, J. *et al.* A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol*, v. 15, p. 1265–1273, 1995.
- STADTMAN, E. R. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res*, v. 40, p. 1250-8, 2006.
- STADTMUELLER, B. M. *et al.* Structure of a proteasome Pba1-Pba2 complex: implications for proteasome assembly, activation, and biological function, *J Biol Chem*, v. 287, p. 37371–37382, 2012.
- STEFANINI, I. *et al.* Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proc Nat Acad Sci USA*, v. 109, p. 13398-13403, 2012.
- TAHARA, E. B. *et al.* Dihydrolipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in *Saccharomyces cerevisiae* aging. *FASEB J*, v. 21, p. 274-283, 2007.
- TANAHASHI, N. *et al.* Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *Biol Chem*, v. 275, p. 14336-14345, 2000.
- TANAKA, K. Molecular biology of the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 247, p. 537-41, 1998.
- TANAKA, K. The proteasome: Overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad, Ser B*, v. 85, p. 12-36, 2009.
- TOMKO, R. J.; HOCHSTRASSER, M. Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Annu Rev Biochem*, v. 82, p. 415-45, 2013.
- TSVETKOV, P. *et al.* Operational definition of intrinsically unstructured protein sequences based on susceptibility to the 20S proteasome. *Proteins*, v. 70, p. 1357-1366, 2008.
- TZAGOLOFF, A. *et al.* Assembly of the mitochondrial membrane system: isolation of nuclear and cytoplasmic mutants of *S. cerevisiae* with specific defects in mitochondrial functions. *Journal of Bacteriology*, v. 122, p. 826-931, 1975.
- VARSHAVSKY, A. Regulated protein degradation. *Trends Biochem Sci*, v. 30, p. 283-286, 2005.
- VELICHUTINA, I. *et al.* Plasticity in eukaryotic 20S proteasome ring assembly revealed by a subunit deletion in yeast. *EMBO J*, v. 23, p. 500–510, 2004.

VIEIRA, J.; MESSING, J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, v. 19, p. 259-68, 1982.

VILCHEZ, D. *et al.* The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. *Nat Commun*, v. 5, p. 5659-5672, 2014.

VOGES, D. *et al.* The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem*, v. 68, p. 1015–1068, 1999.

WEISSMAN, A. M. Themes and variations on ubiquitylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 2, p. 169-178, 2001.

WIGLEY, W. C. *et al.* Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J Cell Biol*, v. 145, p. 481-490, 1999.

WILKINSON, K. D. *et al.* Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem*, v. 255, p. 7529-32, 1980.

WITZE, E. S. *et al.* Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nat Methods*, v. 4, p. 798–806, 2007.

YASHIRODA, H. *et al.* Crystal structure of a chaperone complex that contributes to the assembly of yeast 20S proteasomes. *Nat Struct Mol Biol*, v. 15, p. 228–236, 2008.

ZIEGLER, D. M. Role of reversible oxidation–reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Annu Rev Biochem*, v. 54, p. 305 –329, 1985.

VIII. Anexos

Anexo I

Inativação do gene *PUP2* e análise do fenótipo do mutante

Realizamos a inativação de um alelo no gene *PUP2* correspondente à subunidade $\alpha 5$, através da sua inativação com o gene repórter *HIS3* na linhagem parental diplóide de *S. cerevisiae* W303 para verificar se este gene é essencial. Analisamos os fenótipos desta mutação, esperando que crescessem somente os esporos de tétrades parentais (ou seja, as que não tiveram a inserção do *HIS3* por recombinação homóloga no gene *PUP2*, inativando assim este último). Observamos um fenótipo com segregação mendeliana, ou seja, 2:2. Isso significa que durante a meiose duas tétrades receberam o alelo selvagem *PUP2* (gerando dois haplóides viáveis) e duas tétrades receberam o alelo mutante *pup2::HIS3* (haplóides inviáveis), confirmando assim que este gene é essencial. A linhagem heterozigota $a/\alpha W303\Delta pup2::HIS3$ foi inoculada em YPD com glicerol e adicionada ao estoque no $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após obtermos a linhagem com o alelo mutante $\Delta pup2::HIS3$, a transformamos com o vetor recombinante YEplac181-*PUP2* (este com marca de seleção *LEU2*) para verificar se a complementação na linhagem diplóide com o gene *PUP2* selvagem seria funcional. O fenótipo obtido oriundo da inativação do gene *PUP2* da cepa de *S. cerevisiae* $W303\Delta pup2::HIS3[YEplac181-PUP2]$ confirmou que este gene é totalmente essencial para a viabilidade da célula, e que, a perda do vetor recombinante YEplac181-*PUP2*, confirmados por réplica de placa em meio seletivo, torna a célula inviável (**figura S1**).

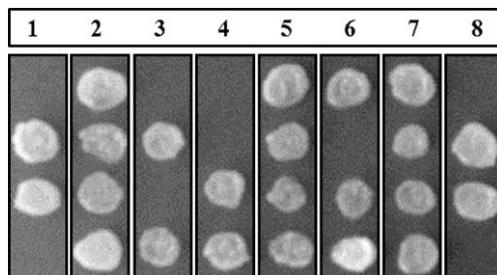


Figura S1. Inativação do gene *PUP2* provoca a morte celular e é complementada por YEplac181-*PUP2*. Dissecção de esporos de 8 tétrades da linhagem $a/\alpha W303\Delta pup2::HIS3[YEplac181-PUP2]$ em placa com meio YPD para verificar o fenótipo da inativação do gene *PUP2*. As tétrades 1, 3, 4 e 8 mostram que a inativação de *PUP2* acompanhada da perda do plasmídeo recombinante YEplac181-*PUP2* torna a germinação do esporo inviável, confirmando se tratar de um gene essencial.

Visando purificar o proteassomo 20S da linhagem mutante obtida foi feito seu cruzamento com a linhagem de *S. cerevisiae* RJD1144, derivada da linhagem JD47-13C, já que esta linhagem possui uma cauda de histidina e a sequência do peptídeo FLAG (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) fusionadas à subunidade *PRE1* (β 4) do proteassomo, estas utilizadas para ensaios de purificação do proteassomo 20S. A complementação das auxotrofias entre as linhagens, gerando um diplóide viável, possibilitou o crescimento das células. Analisamos os fenótipos dessa complementação após a dissecação de tétrades em placa com meio YPD e posterior seleção em meio mínimo e, a linhagem *a/W303 Δ pup2::HIS3*[YEplac181-*PUP2*] foi inoculada em YPD com glicerol e adicionada ao estoque no -80 °C.

Complementação do gene *PUP2* no mutante *Δ pup2::HIS3* com mutações sítio-específicas e análise de fenótipo das linhagens mutantes

A inativação de um alelo no gene *PUP2* correspondente a subunidade α 5, levou o crescimento de apenas dois esporos das tétrades que foram micromanipuladas, indicando ser este um gene essencial à levedura *S. cerevisiae*, o que foi posteriormente confirmado através de ensaios de complementação utilizando plasmídeos episomais para reversão do fenótipo, como mostrado na figura 6. Dessa forma, tornou-se imperativa a obtenção de linhagens portando mutações nas cisteínas, aqui denominadas C76 e C221, bem como a duplo mutante C76/C221.

Construção da linhagem mutante C221 (α 5-C221S)

Como estudos anteriores realizados pelo nosso grupo já haviam demonstrado que a Cys221 do gene *PUP2* está envolvida no processo de glutationilação protéica, iniciamos mutações sítio-específicas no mutante diplóide *Δ pup2::HIS3*, trocando os aminoácidos codificantes para a Cys221 por uma serina.

Os fragmentos gerados a partir da amplificação com os oligonucleotídeos correspondentes a mutação sítio-específica *PUP2*^{C221S} (*PUP2*-5/*PUP2*-2 e *PUP2*-6/*PUP2*1) foram clonados no plasmídeo episomal YEplac181. Após a confirmação desta clonagem por sequenciamento, realizamos a transformação do vetor recombinante YEplac181-*PUP2*^{C221S} na linhagem de *S. cerevisiae* *a/ α W303 Δ pup2::HIS3* para verificar se o alelo *PUP2*^{C221S} é funcional e assim capaz de complementar o mutante nulo *pup2::HIS3*. Foram dissecados ou micromanipulados esporos de tétrades para verificar se a linhagem *a/ α W303 Δ pup2::HIS3*

passaria a crescer após a transformação com a construção citada, e, analisamos os fenótipos dessa complementação em diferentes condições de crescimento, ou seja, em meio fermentativo e respiratório, respectivamente, nos quais pudemos observar a consistente complementação do alelo nulo *pup2::HIS3* pelo plasmídeo YEplac181-*PUP2*^{C221} (**figura S2a**). Concomitantemente, observamos que a inativação do gene *PUP2* da cepa de *S. cerevisiae* *a/αW303Δpup2::HIS3* realmente causa a morte celular, pois a ausência ou perda do vetor recombinante YEplac181-*PUP2* nas tétrades, confirmados por réplica de placa em meio mínimo, torna a célula inviável. Assim, o esperado é que só crescessem os esporos prototróficos para histidina e leucina (**figura S2b**). Embora os esporos das tétrades 2 e 3, como mostrado a seguir, tenham crescido tanto em meio sem histidina como sem leucina as ignoramos, pois a segregação de 2:2 para histidina não se confirmou sugerindo que se tratavam de falsas tétrades. A segregação esperada de esporos para prototrofia de histidina está presente na tétrade 1. As tétrades separadas em placa de YPD foram cruzadas com a linhagem de *S. cerevisiae* RJD1144 para analisar a complementação das auxotrofias entre as linhagens, gerando um diplóide funcional e a linhagem mutante *a/W303Δpup2::HIS3*[YEplac181-*PUP2*^{C221S}] foi posteriormente inoculada em YPD com glicerol e estocada no -80 °C.

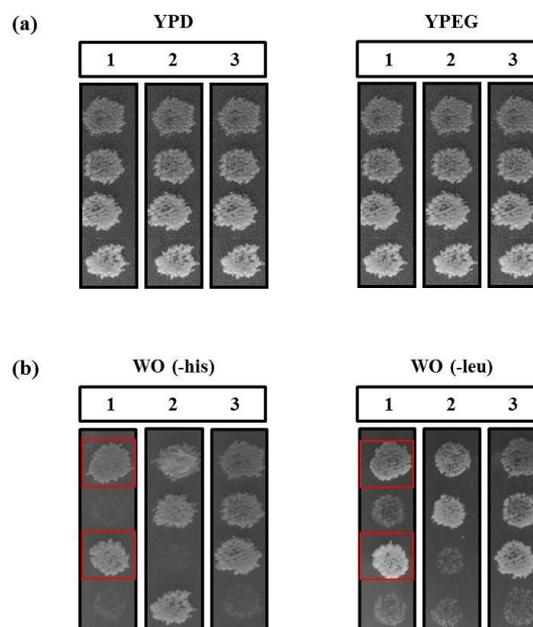


Figura S2. Análise de fenótipo da transformação na linhagem diplóide W303Δpup2::HIS3 de *S. cerevisiae* com o vetor recombinante YEplac181-*PUP2*^{C221S}. (a) Dissecção de esporos de 3 tétrades em placa com meio YPD e posteriormente replicadas em meio YPEG para verificar o fenótipo da inativação e complementação do gene *PUP2* com o vetor recombinante carregando a mutação sítio-específica *PUP2*^{C221S}. (b) Tétrades replicadas em placa com meio seletivo (WO) suplementado com adenina, triptofano e uracila para a seleção de esporos prototróficos para histidina e leucina, conforme indicado pelo quadrado vermelho.

Inicialmente, a clonagem da mutação sítio específica $\alpha 5$ -C221S foi feita em um plasmídeo epissomal (YEplac181) com o intuito de se obter maior número de transformantes. Entretanto, o ideal seria clonar a mesma construção em um plasmídeo integrativo para que esse assegure a mutação de maneira mais eficiente se integrando no genoma da levedura e ali sendo passado de geração para geração; já o outro tipo de plasmídeo pode ser perdido com as divisões celulares. Para tal, utilizamos o plasmídeo integrativo YIp349 (este com marca de seleção *TRP1*), carregando o alelo *PUP2*^{C221S}, seguida da transformação na linhagem heterozigota *W303 Δ pup2::HIS3*. Tal construção foi feita para além de conferir estabilidade da mutação sítio-específica no genoma da linhagem mutante *Δ pup2::HIS3* verificar também a complementação do mutante nulo quando somente uma cópia do alelo *PUP2*^{C221S} está presente por integração no locus *TRP1*. As tétrades das células transformadas com o vetor recombinante YIp349-*PUP2*^{C221S} foram dissecadas em placas com meio YPD e, em seguida analisamos o fenótipo também em meio respiratório (YPEG) (**figura S3a**), e, em meio mínimo para identificar os esporos com prototrofia para histidina e triptofano (**figura S3b**). Cruzamos as tétrades com a linhagem RJD1144, analisamos o fenótipo e fizemos estoques da mesma.

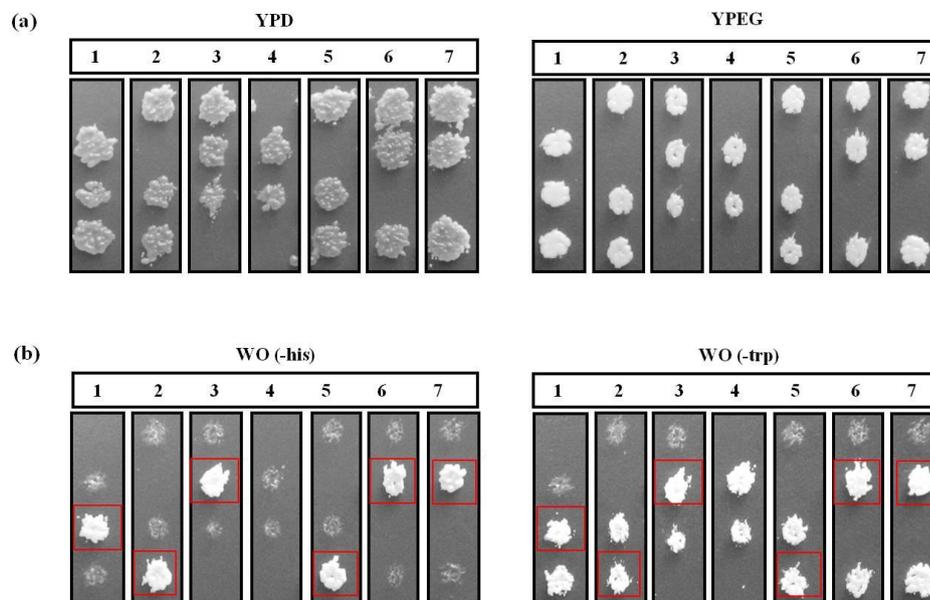


Figura S3. Análise de fenótipo da complementação na linhagem diplóide *W303 Δ pup2::HIS3* de *S. cerevisiae* com o vetor integrativo YIp349-*PUP2*^{C221S}. (a) Dissecção de esporos de 7 tétrades em diferentes condições de crescimento (placa com meio YPD posteriormente replicada em meio YPEG) para verificar o fenótipo da inativação e complementação do gene *PUP2* com o vetor recombinante carregando a mutação sítio-específica *PUP2*^{C221S}. (b) Tétrades replicadas em placa com meio seletivo (WO) suplementado com adenina, leucina e uracila para a seleção de esporos prototróficos para histidina e triptofano, confirmando a viabilidade da complementação, conforme indicado pelo quadrado vermelho.

Construção da linhagem mutante C76 ($\alpha 5$ -C76S)

Paralelamente à obtenção das linhagens citadas acima, observou-se através de análise do alinhamento da sequência primária da subunidade $\alpha 5$ do proteassomo 20S da linhagem selvagem, a Cys76 sendo um resíduo conservado entre diferentes organismos. Surpreendentemente, dentre os 32 resíduos de cisteínas presentes no proteassomo 20S, apenas a Cys76 e a Cys221 encontravam-se glutacioniladas em ambas as condições (ou seja, *in vivo* e *in vitro*). Portanto, resolvemos realizar mutações sítio-específicas não apenas na Cys221, mas também na Cys76, trocando o resíduo de cisteína também por serina. Além da obtenção destes mutantes simples $\alpha 5$ -C76S e $\alpha 5$ -C221S, a construção do duplo mutante $\alpha 5$ -C76S/C221S também se tornou essencial para melhor compreensão de sua influência na viabilidade da levedura.

A construção da linhagem com mutações sítio-específicas $\alpha 5$ -C76S foi realizada através de sucessivas reações de PCR deste gene utilizando os oligonucleotídeos (PUP2-1/PUP2-9 e PUP2-2/PUP2-10) com os aminoácidos trocados. Essa construção também foi feita para verificar a viabilidade da complementação deste gene possuindo mutações sítio-específicas $\alpha 5$ -C76S em linhagens mutantes. Após a confirmação das clonagens dos fragmentos com as mutações sítio-específicas por sequenciamento, os vetores recombinantes YIp349-*PUP2*^{C76S} foram transformados na linhagem diplóide heterozigota *a*/ α W303 Δ *pup2::HIS3*. Desse modo foi possível verificar se a linhagem *a*/ α W303 Δ *pup2::HIS3* passaria a crescer com a transformação da construção citada nas placas com meio YPD após a dissecação de tétrades, posteriormente replicadas em meio YPEG e em meio mínimo sem triptofano, pois neste último só cresceriam os esporos que receberam o plasmídeo YIp349-*PUP2*^{C76S}. Observamos que ao estriarmos os esporos nos meios acima, as tétrades recuperaram a sua capacidade de crescerem em meio fermentativo e respiratório (**figura S4a**), embora apresentassem um crescimento mais lento quando comparada a linhagem selvagem e mutante simples $\alpha 5$ -C221S, indicando sobretudo que a complementação do gene *PUP2* com o plasmídeo YIp349-*PUP2*^{C76S} também é viável (**figura S4b**). Preparamos estoques da linhagem e estocamos a -80 °C.

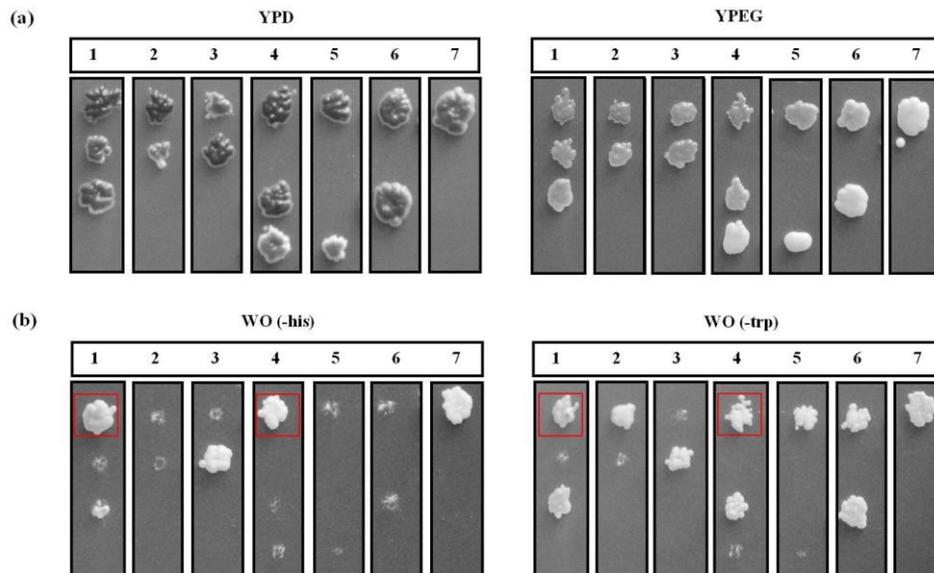


Figura S4. Análise de fenótipo da transformação na linhagem diplóide W303 Δ pup2::HIS3 de *S. cerevisiae* com o vetor recombinante YIp349-PUP2^{C76S}. (a) Dissecção de esporos de 7 tétrades em placa com meio YPD e replicadas em meio YPEG para verificar o fenótipo da inativação e complementação do gene *PUP2* com o vetor recombinante carregando a mutação sítio-específica α 5-C76S em diferentes condições de crescimento. (b) Tétrades replicadas em placa com meio seletivo (WO) suplementado com adenina, leucina e uracila para a seleção de esporos prototróficos para histidina e triptofano, conforme indicado pelo quadrado vermelho.

Construção da linhagem duplo mutante C76/C221 (α 5-C76S/C221S)

Iniciamos a complementação do gene *PUP2* na linhagem mutante a/α W303 Δ pup2::HIS3 com mutações sítio-específicas nos resíduos de cisteínas passíveis de glutationilação, Cys76 e Cys221. Posteriormente à obtenção das linhagens mutantes simples e à análise de fenótipo de ambas indicando que a complementação do gene *PUP2* em linhagens mutantes era funcional, independentemente das trocas de resíduos, demos início a construção de linhagens com mutações sítio-específicas α 5-C76S/C221S. Assim, partimos da construção do vetor recombinante YIp349-PUP2^{C76S}, clonando neste o gene *PUP2*^{C221S}, gerando o duplo mutante YIp349-PUP2^{C76S/C221S}. As mutações sítio-específicas acima foram confirmadas por sequenciamento e os fragmentos transformados na linhagem diplóide heterozigota a/α W303 Δ pup2::HIS3. A linhagem diplóide W303 Δ pup2::HIS3[YIP349-PUP2^{C76S/C221S}] foi inoculada em YPD e adicionada ao estoque no -80 °C.

As células transformantes com o vetor recombinante YIp349-PUP2^{C76S/C221S} foram selecionadas em placa com meio mínimo, induzidas a esporulação e posterior dissecção de esporos de tétrades em meio YPD para analisarmos os fenótipos dessa complementação. Observamos que os esporos se segregavam de maneira mendeliana 2:2, indicando que não há complementação do mutante nulo *pup2::HIS3* no gene *PUP2* com o plasmídeo portando o

alelo duplo mutante *PUP2*^{C76S/C221S}. Conforme verificado anteriormente, a inativação do gene *PUP2*, caso houvesse complementação seria esperado encontrar esporos prototróficos para histidina e triptofano, o que não ocorreu (**figura S5a**).

Posteriormente, realizamos ensaios de reversão do fenótipo na linhagem diplóide W303Δ*pup2*::*HIS3*[YIp349-*PUP2*^{C76S/C221S}] utilizando um plasmídeo epissomal carregando o gene *PUP2* selvagem para confirmar a inviabilidade oriunda da ausência de ambas as cisteínas. Assim, as tétrades transformantes com o vetor YEplac181-*PUP2* foram dissecadas em placas com meio YPD, e posteriormente, replicadas em meio mínimo para análise de fenótipo como nas clonagens anteriores. Notoriamente, os esporos das tétrades micromanipuladas recuperaram a capacidade de crescer em meio mínimo sem histidina e leucina após a complementação desta linhagem com o vetor recombinante YEplac181-*PUP2* indicando um papel funcional de tais cisteínas na viabilidade celular (**figura S5b**).

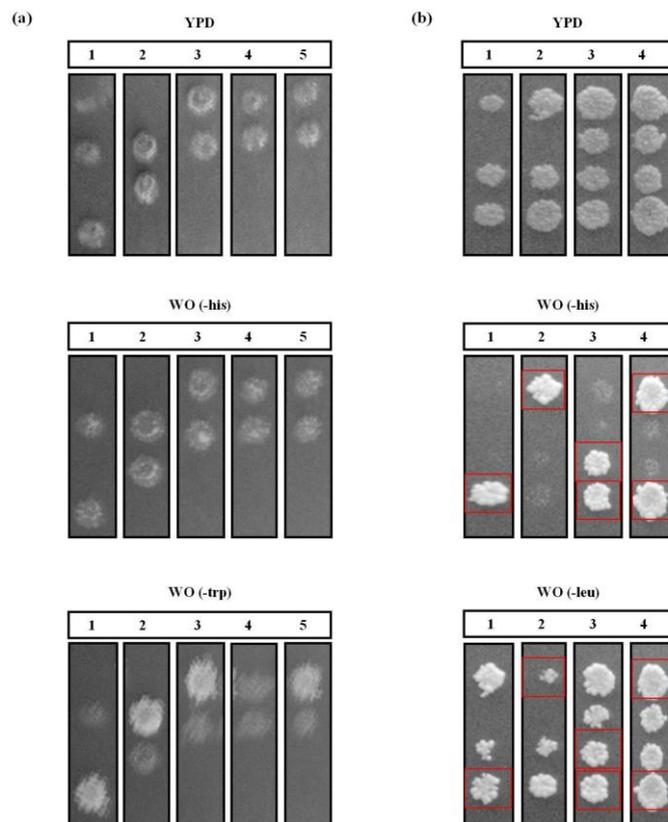


Figura S5. Complementação do gene *PUP2* no mutante diplóide Δ*pup2*::*HIS3* por mutações sítio-específicas α5-C76S/C221S não é viável. (a) Dissecção de esporos de 5 tétrades em placa com meio YPD replicadas em meio mínimo (WO sem histidina ou triptofano, respectivamente) para verificar o fenótipo da inativação e complementação do gene *PUP2* com o vetor recombinante YIp349[*PUP2*^{C76S/C221S}]. **(b)** Dissecção de esporos de 4 tétrades em placa com meio YPD e replicadas em meio mínimo para a seleção de esporos prototróficos para histidina e leucina, conforme indicado pelo quadrado vermelho, para analisar a eficiência da reversão de fenótipo da complementação do gene *PUP2* com o vetor recombinante YEplac181-*PUP2*.

Anexo II

Tabela 12: Peptídeos da subunidade $\alpha 5$ do proteassomo identificados por espectrometria de massas do tipo LC-MS.

Peptídeos *	Razão massa/carga (m/z)	z	Massa observada	Massa teórica	Modificações
K.TAEIK.E	337.6985	2	673.401	673.39	
K.IVEIDR.H	372.716	2	743.4177	743.407	
R.LM(+15.99)SRPF.G	383.6353	2	765.3843	765.368	Oxidação (M)
K.EAELLVLK.I	457.8011	2	913.5484	913.538	
K.EGVVLGVEK.R	465.2754	2	928.5229	928.512	
R.GVSTFSPEGR.L	518.704	2	1035.4985	1035.488	
R.FGEGASGEER.L	519.7264	2	1037.4414	1037.43	
K.LGP(sub S)TAIGIATK.E	521.3193	2	1040.6229	1040.612	Mutação
K.EGVVLGVEKR.A	543.3235	2	1084.624	1084.613	
F.HAEPSTFYR.Y	582.7522	2	1163.5359	1163.525	
R.ATSPLESSEK.I	695.4011	2	1388.7035	1388.693	
R.ATSPN(sub L)LESSEK.I	695.8577	2	1389.6624	1389.651	Mutação
K.LDENNAQLSC(+57.02)IR(sub T).K	716.7946	2	1431.6776	1431.665	Carbamidometilação; Mutação
R.HIGC(+57.02)AMSGLTADAR.S	487.2237	3	1458.6708	1458.658	Carbamidometilação
**R.HIGC(+57.02)AM(+15.99)SGLTADAR.S	492.56	3	1474.6656	1474.648	Carbamidometilação; Oxidação (M)

* Os peptídeos foram gerados após reduzir (DTT) e alquilar (IAA) a amostra.

** Peptideo correspondente ao resíduo C76 (não glutationilado).

Anexo IV

Redox Biol. 2013 Dec 14;2:44-51. doi: 10.1016/j.redox.2013.12.003.

Redox regulation of the proteasome via S-glutathionylation.

Marilene Demasi^{a,b}, Luis E. S. Netto^b, Gustavo M. Silva^{a,b,1}, Adrian Hand^a, Cristiano L. P. de Oliveira^c, Renata N. Bicev^c, Fabio Gozzo^d, Mario H. Barros^e, Janaina M.M. Leme^{a,b}, Erina Ohara^a

a Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

b Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IB-Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

c Departamento de Física Experimental, IF-Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

d Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

e Departamento de Microbiologia, ICB-Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Abstract

The proteasome is a multimeric and multicatalytic intracellular protease responsible for the degradation of proteins involved in cell cycle control, various signaling processes, antigen presentation, and control of protein synthesis. The central catalytic complex of the proteasome is called the 20S core particle. The majority of these are flanked on one or both sides by regulatory units. Most common among these units is the 19S regulatory unit. When coupled to the 19S unit, the complex is termed the asymmetric or symmetric 26S proteasome depending on whether one or both sides are coupled to the 19S unit, respectively. The 26S proteasome recognizes polyubiquitinated substrates targeted for proteolysis. Targeted proteins interact with the 19S unit where they are deubiquitinated, unfolded, and translocated to the 20S catalytic chamber for degradation. The 26S proteasome is responsible for the degradation of major proteins involved in the regulation of the cellular cycle, antigen presentation and control of protein synthesis. Alternatively, the proteasome is also active when dissociated from regulatory units. This free pool of 20S proteasome is described in yeast to mammalian cells. The free 20S proteasome degrades proteins by a process independent of polyubiquitination and ATP consumption. Oxidatively modified proteins and other substrates are degraded in this manner. The 20S proteasome comprises two central heptamers (β -rings) where the catalytic sites are located and two external heptamers (α -rings) that are responsible for proteasomal gating. Because the 20S proteasome lacks regulatory units, it is unclear what mechanisms regulate the gating of α -rings between open and closed forms. In the present review, we discuss 20S proteasomal gating modulation through a redox mechanism, namely, S-glutathionylation of cysteine residues located in the α -rings, and the consequence of this post-translational modification on 20S proteasomal function.

PMID: 24396728 [PubMed - indexed for MEDLINE] PMCID: PMC3881202 Free PMC Article



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Redox Biology

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

Review Article

Redox regulation of the proteasome *via* S-glutathionylation[☆]

Marilene Demasi^{a,*}, Luis E.S. Netto^b, Gustavo M. Silva^{a,b,1}, Adrian Hand^a,
Cristiano L.P. de Oliveira^c, Renata N. Bicev^c, Fabio Gozzo^d, Mario H. Barros^e,
Janaina M.M. Leme^{a,b}, Erina Ohara^a

^a Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil^b Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IB-Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil^c Departamento de Física Experimental, IF-Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil^d Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil^e Departamento de Microbiologia, ICB-Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 October 2013

Received in revised form

4 December 2013

Accepted 5 December 2013

Available online 14 December 2013

Keywords:

Proteasome

S-glutathionylation

Oxidized proteins

Proteasomal gating

Redox regulation

ABSTRACT

The proteasome is a multimeric and multicatalytic intracellular protease responsible for the degradation of proteins involved in cell cycle control, various signaling processes, antigen presentation, and control of protein synthesis. The central catalytic complex of the proteasome is called the 20S core particle. The majority of these are flanked on one or both sides by regulatory units. Most common among these units is the 19S regulatory unit. When coupled to the 19S unit, the complex is termed the asymmetric or symmetric 26S proteasome depending on whether one or both sides are coupled to the 19S unit, respectively. The 26S proteasome recognizes poly-ubiquitinated substrates targeted for proteolysis. Targeted proteins interact with the 19S unit where they are deubiquitinated, unfolded, and translocated to the 20S catalytic chamber for degradation. The 26S proteasome is responsible for the degradation of major proteins involved in the regulation of the cellular cycle, antigen presentation and control of protein synthesis. Alternatively, the proteasome is also active when dissociated from regulatory units. This free pool of 20S proteasome is described in yeast to mammalian cells. The free 20S proteasome degrades proteins by a process independent of poly-ubiquitinylation and ATP consumption. Oxidatively modified proteins and other substrates are degraded in this manner. The 20S proteasome comprises two central heptamers (β -rings) where the catalytic sites are located and two external heptamers (α -rings) that are responsible for proteasomal gating. Because the 20S proteasome lacks regulatory units, it is unclear what mechanisms regulate the gating of α -rings between open and closed forms. In the present review, we discuss 20S proteasomal gating modulation through a redox mechanism, namely, S-glutathionylation of cysteine residues located in the α -rings, and the consequence of this post-translational modification on 20S proteasomal function.

© 2013 The Authors. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

The proteasome.....	45
Protein S-glutathionylation.....	45
Redox control of 20SPT gating.....	46
Proteasome channel gating.....	49
20SPT as the main player in the removal of oxidized proteins.....	49
Final remarks.....	50
Acknowledgements.....	50
References.....	50

Abbreviations: GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; ROS, reactive oxygen species; SAXS, small angle X-rays scattering; 20SPT, 20S proteasome core particle; 26SPT, 26S proteasome; TEM, transmission electron microscopy

[☆]This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

* Corresponding author. Tel.: +55 11 26279745.

E-mail address: marilene.demasi@butantan.gov.br (M. Demasi).

¹ Present address: Center for Genomics and Systems Biology, New York University, New York, USA.

The proteasome

The proteasome is a ubiquitous, intracellular, multimeric, and multicatalytic protease responsible for the degradation of intracellular proteins [1]. It is composed of a central unit called 20SPT. This unit is most often flanked on one or both sides by regulatory units such as 19S, 11S, and/or PA200. The most abundant regulatory complex is the 19S unit, which recognizes poly-ubiquitinated proteins. When coupled to the 19S unit, the proteasome is termed 26SPT. The 26SPT is responsible for quality control of protein synthesis and the degradation of proteins involved in major metabolic pathways related to cell cycle regulation, antigen presentation, and most signaling processes. The poly-ubiquitinated proteins bind to specific subunits of the 19S complex, are deubiquitinated by enzymes present in the 19S unit, are unfolded, and are translocated to the catalytic chamber through the ATPase activity of a hexameric ring located in the base of the 19S unit. The 20SPT comprises two α and two β heptameric rings. The internal β rings are responsible for catalysis, while the peripheral α rings are responsible for the gating of the 20SPT.

Because 20S proteasome free pool lacks regulatory units, the regulation of the gating mechanism between open and closed forms is unclear. We have presented evidence that *S*-glutathionylation of cysteine residues located in the α -rings may represent a redox post-translational regulation of the 20S proteasome.

Protein *S*-glutathionylation

The term *S*-glutathionylation was adopted in this review by taking into account the conclusive criticism on the alternative nomenclature (*S*-glutathiolation), as discussed by Mieyal & Chock [2].

S-glutathionylation is the formation of mixed disulfides between glutathione and cysteine residues of proteins. Originally described as a result of oxidative stress [3], *S*-glutathionylation

was later recognized as a post-translational modification that can play major regulatory functions [3–6]. In the last 10 years, the investigation on protein *S*-glutathionylation was intensified because of the increased understanding on ROS and NO derived species role in signal transduction and most likely by the reversibility of protein *S*-glutathionylation. Either protein thiols or glutathione (GSH) can be activated by oxidants to further react with other sulfhydryls. Therefore, protein *S*-glutathionylation might transduce redox signals generated by ROS and NO derived species [7,8]. Because the intracellular environment is highly reducing, except in some organelles, such as the endoplasmic reticulum, very few protein thiols are prone to be *S*-glutathionylated. Therefore, it is arguable that *S*-glutathionylation occurs in a site- and protein-specific manner. The global susceptibility and site-specific specificity of proteins for *S*-glutathionylation is dependent on the reactivity of their thiol groups. Two relevant factors in protein susceptibility for *S*-glutathionylation may be thiol steric accessibility and thiol pK_a ; these factors depend upon protein folding and vicinity to side chains of basic amino acids, respectively. The specificity of protein *S*-glutathionylation remains an active field of research [5,6,9]. The chemical mechanisms of protein *S*-glutathionylation proposed to date [5,10] are based on either thiol protein or GSH pool redox modifications (Fig. 1). These reactions may be triggered through ROS or NO derived species. The most cited and explored mechanisms of protein *S*-glutathionylation are based on either thiol–disulfide exchange through protein thiolate and glutathione disulfide (GSSG) or the reaction between an oxidized thiol to sulfenic acid with the reduced form of GSH.

Data obtained by new methodologies based on encoded fluorescent protein-glutaredoxin conjugates indicated that intracellular GSH/GSSG ratios could be two orders magnitude higher compared to those previously described [11,12]. Cells most likely can maintain such highly reducing intracellular conditions through elimination of excess GSSG by either extrusion [13] or vacuole uptake [12]. A GSH/

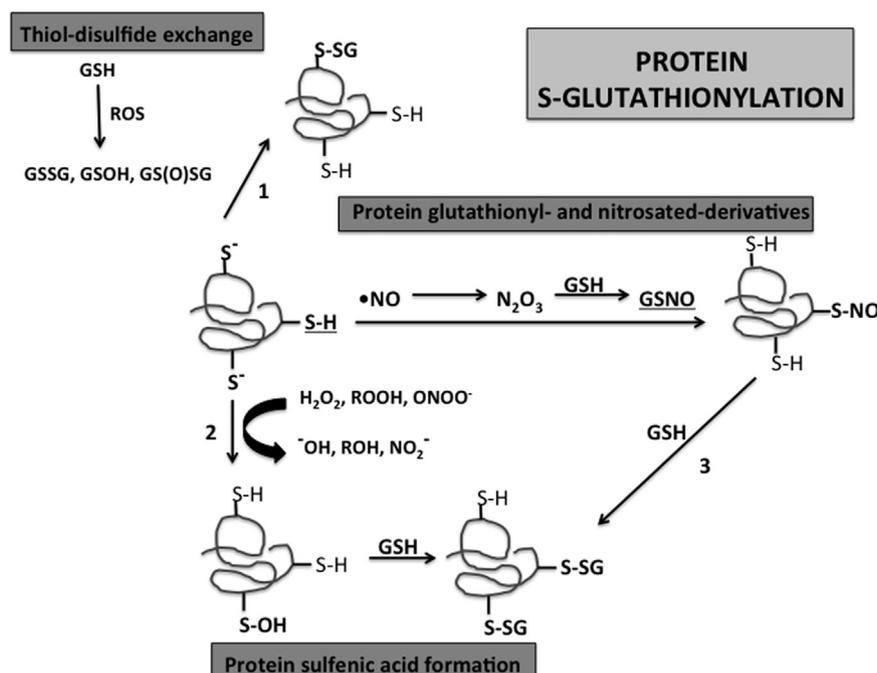


Fig. 1. Major mechanisms of protein *S*-glutathionylation. Route 1 describes the classical mechanism of protein *S*-glutathionylation. This mechanism causes modification through thiol–disulfide exchange. Formation of adduct may be triggered by an increased GSSG pool mediated by intensified ROS formation or the oxidized glutathione species GSOH and GS(O)SG. Route 2 describes mechanisms based on protein sulfenic acid formation through reaction with peroxides or peroxynitrite followed by reaction with GSH. Other physiological oxidants, e.g., hypochlorous acid or chloramine derivatives can also oxidize thiol groups to the sulfenic form [15]. Route 3 describes mechanisms based on nitrosylated protein or glutathionyl derivatives that are formed through reaction with intermediates of NO radical metabolism.

GSSG in the range of 10,000 would suggest that S-glutathionylation through thiol–disulfide exchange is highly specific to selected proteins or even improbable. However, investigation on the unintended consequences on cell biology of adding a genetically encoded fluorescent probe is required. Indeed, expression of some of these probes in fibroblasts resulted in the appearance of a dimer form that exhibited an intermediate excitation fluorescence spectrum between those of oxidized and reduced monomers [14].

Other mechanisms of protein S-glutathionylation are based on protein thiol activation by oxidants such as hydrogen peroxide, peroxynitrite, and others through formation of sulfenic acid (P-SOH; [15]), followed by reaction with GSH (Scheme 1, reaction 2; [16]). However, proteins such as peroxiredoxins and glutathione peroxidases are one million times more reactive towards hydroperoxides than other thiol-proteins, such as protein tyrosine phosphatases [17,18]. Therefore, peroxiredoxins and glutathione peroxidases are the most probable biological sensors of hydroperoxides. These proteins would then have to transmit peroxide binding signals to other redox players, such as thioredoxin [19,20]. However, the mechanisms that connect thiol oxidation by hydroperoxides to protein S-glutathionylation are still elusive.

Many examples of substrates undergoing S-glutathionylation by other specific mechanisms have already been reported [21]; however, this is not the focus of present review. Because non-enzymatic thiol–disulfide reactions are slow [17,22], a challenge is the identification of proteins that add and remove the glutathione moiety. Indeed, some candidates for protein S-glutathionylation, such as glutathione-S-transferase [23] or alternative enzyme-assisted thiol–disulfide exchange [8], have been proposed. Regarding the reversal of protein S-glutathionylation, glutaredoxins (Grxs) are frequently considered as oxidoreductases that catalyze the reduction of protein mixed disulfides. These proposed pathways strengthen the notion that protein S-glutathionylation is either a regulatory post-translational modification and/or a protective mechanism of thiol homeostasis [4,24]. We have accumulated evidence that protein S-glutathionylation is a post-translational modification that regulates 20S proteasome activity, as will be discussed below.

Redox control of 20SPT gating

The first observation of 20SPT redox modification through S-glutathionylation was in preparations of the human proteasome incubated with increasing concentrations of both redox forms of glutathione [25]. In those studies, the peptidolytic chymotrypsin-like (ChT-L) proteasomal activity was shown to be modulated by both glutathione redox forms: micromolar concentrations activated the ChT-L activity and millimolar concentrations inhibited it. Interestingly, it was also observed that inhibition of the 20SPT by irreversible inhibitors increased the incorporation of G^[35S]H into purified human 20SPT preparations. Initially, the thiol–disulfide exchange mechanism for S-glutathionylation (reactions 1 and 2, Scheme 1) was considered because the human 20SPT possesses two S–S bonds. However, it is also possible that GSH reacted with oxidized proteasomal thiol groups (reaction 3), not predicted at that time.



Scheme 1. Proposed mechanisms for the S-glutathionylation of mammalian and yeast 20SPT.

Further studies with preparations of 20SPT purified from *Saccharomyces cerevisiae* demonstrated inhibition of the ChT-L activity only after proteasomal incubation with millimolar concentrations of GSH. A pathway involving the oxidation of proteasomal thiol groups to sulfenic acid by hydrogen peroxide followed by reaction with GSH to form S-glutathionylated proteasomes was supported by data from these studies (Scheme 1, reaction 3; [26]). An increased pool of S-glutathionylated 20SPT was observed in yeast cells incubated with H₂O₂ [26], unraveling the notion of proteasomal S-glutathionylation as a post-translational regulatory mechanism.

20SPT S-glutathionylation is a widespread post-translational modification that has been corroborated through proteomic approaches in various species including plants and mammals [27–29].

S-glutathionylated 20SPT from *S. cerevisiae* was recently investigated by two-dimensional electrophoretic separation of the 14 proteasomal subunits followed by LC-Q-ToF-MS analysis [30]. Two Cys residues of the α5-subunit were found to be S-glutathionylated in the 20SPT preparations purified from yeast cells grown to stationary phase in fermentative medium (glucose as the carbon source). When the same proteasome preparations were incubated *in vitro* in the presence of GSH, four additional S-glutathionylated Cys residues were observed: one each in subunits α5 and α6 and two in subunit α7. Remarkably, five out of the six Cys residues prone to S-glutathionylation were also found through LC-Q-ToF-MS analyses either in the reduced or hyperoxidized sulfenic acid form, evidencing their susceptibility towards oxidation. Additionally, these findings suggested that S-glutathionylation occurs after oxidation of Cys residues to the sulfenic form followed by reaction with reduced glutathione (Scheme 1, reaction 3). Two of these Cys residues (α5-C76 and α7-C42) are highly conserved, from *S. cerevisiae* to humans.

Large-scale structural movements were verified through small angle X-ray scattering (SAXS) experiments that compared yeast proteasomal preparations where both Cys residues in the α5-subunit were S-glutathionylated or unmodified (Fig. 2 and Ref. [30]). A profound structural re-modeling was observed during transition of the S-glutathionylated to the DTT-reduced 20SPT form. When S-glutathionylated, the 20SPT is in the open gate conformation whereas after treatment with sulfhydryl reductants, such as DTT, its gate is closed. These results were confirmed by TEM evaluation of the same 20SPT preparations (Fig. 3 and Ref. [30]).

Unpublished findings from our group involving yeast strains harboring either the α5-C76S or the α5-C221S mutations have revealed that the conserved α5-C76 residue is directly involved in gating regulation, as the closed conformation is prevalent in 20SPT preparations from the α5-C76S strain. However, over 90% of 20SPT are in the open conformation in the α5-C221A strain. It seems that α5-C221, the only Cys residue located on the surface of the yeast 20SPT [30], is responsible for negative regulation of the gating mechanism. This residue most likely functions as a firsthand sensor of loss of the intracellular reducing ability regarding proteasomal functionality.

Growing yeast in either fermentative or respiratory media using glucose or glycerol/ethanol, respectively, promotes different intracellular redox conditions [31]. Glucose represses genes related to mitochondrial biogenesis and antioxidant defenses, while growth under respiratory conditions increases the expression of genes related to antioxidant defenses despite an increased production of ROS. Purified 20SPT from yeast cells grown in either fermentative or respiratory media was analyzed by SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-GSH antibody. The results of this experiment indicated that 20SPT in cells grown in glucose-rich medium were preferentially S-glutathionylated [32]. The labeling of the α5-subunit in proteasome preparations from cells grown in glucose, but not of those grown in glycerol/ethanol, was confirmed by the separation of the 20SPT subunits by 2D electrophoresis followed by anti-GSH

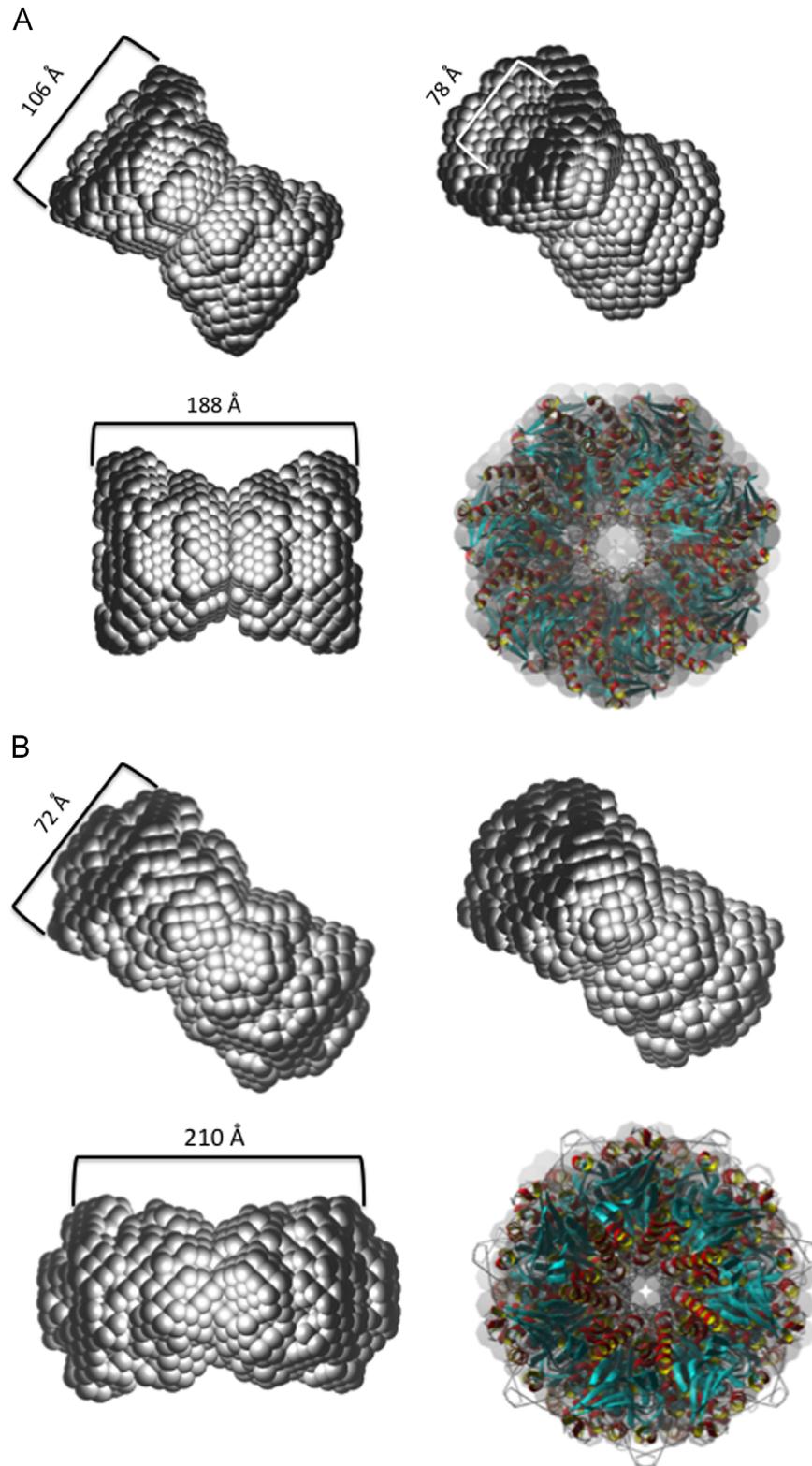


Fig. 2. Modeling of the 20SPT redox forms according to SAXS analyzes. (A) Top (left) and front (right) views of the 20SPT purified from yeast cells grown under conditions that promote fermentation; (B) same preparations after treatment with DTT. Internal and external diameters of the catalytic chamber (upper models) and the length of the 20SPT (bottom left models) in both redox conditions were obtained through SAXS measurements [30]. Modeling of S-glutathionylated 20SPT (A) indicated a decreased length and a concave surface. The opposite conformation was deduced from DTT-treated 20SPT (B). Colored models are alternative modelings highlighting the gate conformation.

immunoblotting (Demasi et al., unpublished). By comparing both preparations through TEM, 85% of the 20SPT purified from cells grown in glycerol/ethanol were in the closed conformation compared with 30% of the 20SPT from cells grown in glucose. Taken

together, these results indicate S-glutathionylation of the $\alpha 5$ -Cys residues depends on intracellular redox conditions.

Variable diameters of the open 20SPT gate were observed by TEM analysis of wild-type 20SPT extracted from yeast cells grown in

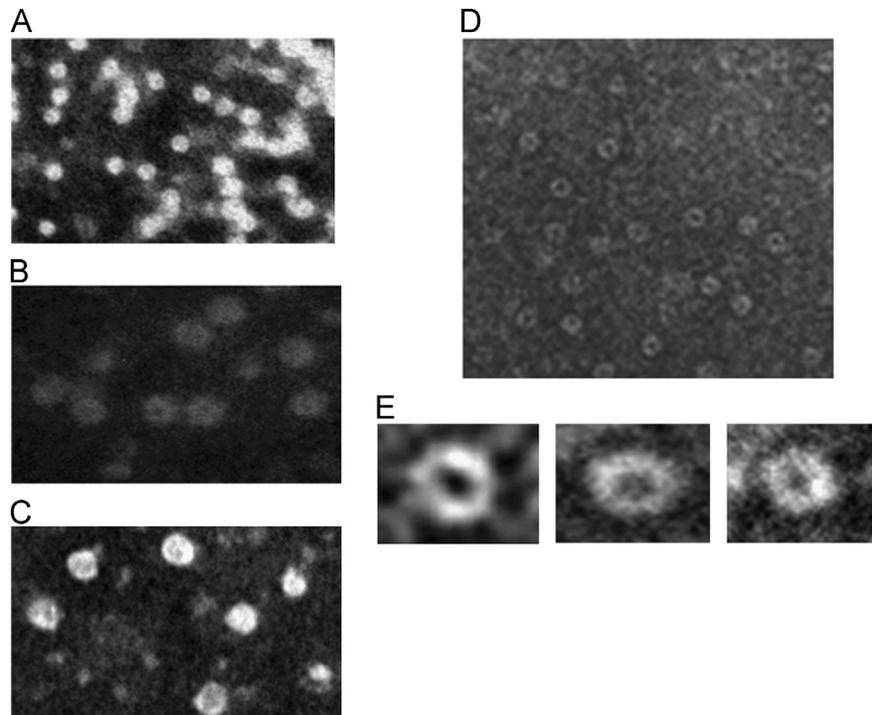


Fig. 3. TEM images of the yeast 20SPT top view. (A)–(C) are panels representative of the closed conformation of 20SPT purified from (A) cells grown in respiratory medium where the closed conformation prevails (Demasi et al., unpublished); (B) strains carrying the $\alpha 5$ -C76S mutation and, (C) cells grown in fermentative conditions after treatment with DTT that reduces S-glutathionylated or oxidized Cys residues to the sulfenic acid. (D) and (E) are images representative of the 20SPT open conformation: (D) preparations obtained from strains carrying the mutated $\alpha 5$ -C221S 20SPT; (E) image of the 20SPT obtained from the $\alpha 5$ -C221S strain (left) and wild type 20SPT from cells grown in fermentative glucose-rich (middle) and -synthetic media (right).

REGULATION OF PROTEASOME GATING VIA S-GLUTATHIONYLATION

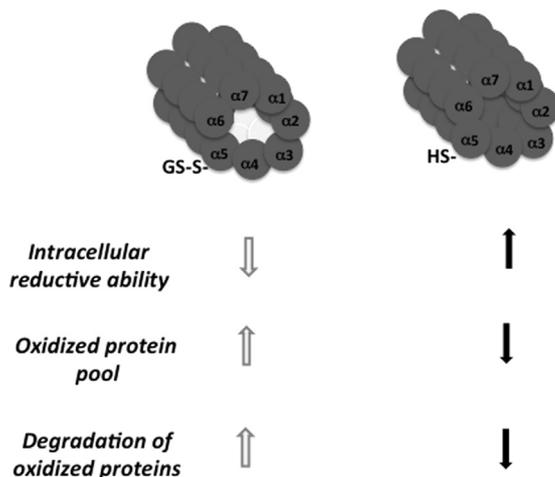


Fig. 4. The regulation of the 20SPT S-glutathionylation inside cells and the degradation of oxidized proteins. According to our hypothesis, when cells go through an oxidative imbalance, which results in the loss of their reducing ability, the pool of oxidized proteins increases and free 20SPT is S-glutathionylated. This modification of the 20SPT allows gate opening which increases the degradation of oxidized proteins (left). Opposite conditions are likely when cells possess increased reducing ability (right).

glucose-rich, synthetic, or glycerol/ethanol media or $\alpha 5$ -C221S and $\alpha 5$ -C76S mutants extracted from yeast cells grown in glucose-rich medium (Fig. 3E; unpublished results). Most likely, gate opening is a stepwise process starting with oxidation of specific sulfhydryl groups followed by S-glutathionylation of a few Cys residues. It seems that the maximum diameter of the open conformation is achieved when the $\alpha 5$ -Cys76 residue is S-glutathionylated. Analysis

of 20SPT dimensions by SAXS is underway by our group to confirm these results.

S-glutathionylation of $\alpha 5$ -C221 and -C76 residues as observed in extracts from yeast cells grown to stationary phase in glucose-rich medium, degraded oxidized proteins at an increased rate [30]. Decreased protein degradation was observed in 20SPT preparations obtained by treatment with sulfhydryl reductants (DTT or TCEP). Moreover, yeast cells presented a decreased pool of oxidized proteins, a decreased ratio of 20S to 19S complexes and increased pool of the 20SPT in open configuration when grown in medium that triggers fermentative metabolism. Opposite results were observed in cells presenting increased reductive ability, such as those grown in respiratory conditions (Demasi et al., unpublished).

The data obtained thus far supports the hypothesis that 20SPT S-glutathionylation is a post-translational modification that modulates proteasome activity toward oxidized proteins. The gate opening of the free 20SPT pool would increase the degradation of oxidized proteins when cells transiently lose their reductive ability (Fig. 4).

The deglutathionylation of the yeast 20SPT was investigated *in vitro* with the yeast recombinant oxidoreductases Grx2, Trx1 and Trx2 as potential deglutathionylating enzymes [32]. These three enzymes were equally competent for 20SPT deglutathionylation, as identical molar ratios of 20SPT:oxidoreductases produced similar results. However, these enzymes are easily degraded *in vitro* by the 20SPT. Because the substrate moieties of the oxidoreductases are located on the external proteasomal surface ($\alpha 5$ -C221), in the α -pocket ($\alpha 5$ -C76), and out of the catalytic chamber (internal β -rings), their activity as proteasomal deglutathionylating enzymes is reliable. However, the physiological meaning of their role in the regulation of 20SPT redox modulation needs further investigation.

The 19S regulatory unit was also shown to go through redox modification via S-glutathionylation. The S-glutathionylation of the Rpn1 and Rpn2 subunits of the 19S regulatory complex was shown to induce the loss of ChT-L proteasomal catalytic activity in mammalian cells [33]. Interestingly, oxidoreductases associate with the 19S complex in both fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* (Txn1) and mammalian (Txn1) cells; however, this process is not yet well understood [34,35]. It is unclear whether these proteins function as disulfide reductants of proteasomal substrates, of the proteasome itself, or of proteasomal co-factors.

Proteasome channel gating

The relationship between 20SPT channel gating and the coupling of regulatory units 19S, 11S and the PA200 has been extensively studied [36–38]. Of the regulatory units, the 19S is most abundant. Binding of this unit to the 20S core particle results in gate opening and substrate degradation. Proteolysis is a coordinate process involving binding of the poly-ubiquitinated substrate, deubiquitination by 19S activity and binding of ATP to the 19S ATPase hexameric ring. Gating is dependent on the coupling of both units (20S and 19S) and on binding of ATP to the hexameric ring located in the base of the 19S unit. However, stabilization of the 20SPT open conformation and substrate unfolding and translocation are dependent on the poly-ubiquitinated substrate binding to the 19S unit and ATP hydrolysis, respectively. The 19S regulatory particle and 20SPT interact through the 19S ATPase hexameric ring and the 20SPT α -heptameric ring. A perfect fitting between these rings is impossible because of their diverse symmetries. The 19S unit undergoes conformational changes depending on the nucleotide state of its ATPase subunits allowing interaction with the 20SPT α -ring [38]. Pockets between α -subunits on the 20SPT participate in interactions between 19S and 20SPT.

In the closed 20SPT conformation, the N-termini of the α -subunits form an intricate lattice of interactions that block access to the catalytic chamber through the so called α -annulus, located just below the surface of the α -heptameric ring. This conformation supposedly maintains a fixed opening of 13–20 Å allowing the entrance of only small peptides [39]. The N-terminal of the α 3 subunit of yeast proteasome was shown to be essential for the closed conformation as it causes the stabilization of the neighboring tails of the α -ring. Deletion of the α 3 N-terminal causes gate opening as deduced from its activation whereas deletion of the N-termini of both α 3 and α 7 was shown to promote permanent open conformation of the 20SPT [40]. It has been shown that α 3-subunit knockout yeast strains incubated in high levels of the pro-oxidant cadmium induced the formation of an alternative α -ring structure composed of a double α 4-subunit [41]. Remarkably, these mutated strains grew more robustly than the wild type in the presence of cadmium, suggesting that the alternative conformation provides a selective advantage under oxidative stress. A possible explanation for this phenotype might be that the absence of the α 3-subunit facilitates formation of the 20SPT open conformation.

Some treatments such as exposure to minute amounts of detergents, hydrophobic peptides, and medium at low ionic strength promote disordering of the blocking α -N-termini allowing substrate entry [42].

Interestingly, 20SPT represents 20–30% of the total proteasome pool in mammal and yeast cells [43–46]. However, there is no systematic study addressing the gate conformation of the free physiological 20SPT pool. As will be discussed below, the free 20SPT pool is likely crucial for the degradation of oxidized proteins.

20SPT as the main player in the removal of oxidized proteins

Proteins can oxidize by ROS and NO derived species through a variety of pathways [47]. Oxidative protein damage results in chemical modification of the side chain of amino acid residues [48]. Proteins are poorly repaired in comparison to other macromolecules. Only the sulfur-containing amino acids Met and Cys can be reduced from sulfoxide and some oxidized forms, respectively. Since the middle 1980s, protein degradation has been proposed as the main mechanism of cells to cope with oxidative modification [49,50]. This mechanism was first observed in the ATP-independent degradation of oxidatively damaged proteins in extracts of red blood cells, whereas the non-oxidized forms of the model proteins were not degraded under same conditions [49]. Moreover, the degradation of mildly oxidized proteins by 20SPT was extensively investigated *in vitro* [51]. Since that time, the 20SPT has been proposed to be the preferential system to degrade oxidized proteins. The degradation of oxidized proteins was demonstrated in mammal and yeast cellular models to be independent of poly-ubiquitinylation. These results precluded degradation by the 26SPT pool [52–54].

Indeed, the most important data to date linking degradation of oxidized proteins to a free pool of 20SPT inside cells is indirect: uncoupling between the 19S and 20S particles during oxidative stress [54–56], transient inactivation of enzymes involved in the ubiquitinylation and deubiquitinylation of proteins [57–59], higher susceptibility of the 19S to oxidation as compared to the 20S [55,60], and no preference for the ubiquitinylation of oxidized proteins [61]. In addition, 26SPT decoupling was shown to be dependent on the proteasome-interacting protein Ecm29 in budding yeast [54]. Strains lacking this protein are more sensitive to oxidative stress. Their recovery from it is also delayed. In mammalian cells, a similar mechanism of decoupling under oxidative challenge was described as being mediated by HSP70 [56]. These data suggest that when cells experience oxidative imbalances, there is an adaptive response to increase the pool of free 20SPT.

An important criticism against degradation of oxidized proteins by free 20SPT is that the closed gate does not support the entrance of folded proteins [42]. However, it is known that oxidized proteins interact with the 20SPT through hydrophobic patches exposed on the protein surface due to partial unfolding upon oxidation [62–64]. It is thought that proteasomal interaction with the hydrophobic protein surface would trigger 20SPT gating [1]. This mechanism is supported by the observation that proteasome opening is triggered by the C-terminal hydrophobic motif HbYX (hydrophobic residue, conserved penultimate tyrosine and a variable C-terminal residue) of three 19S ATPase subunits that interact with the α -subunits of the 20SPT [65]. Notably, peptides containing the motif trigger proteasomal opening independent of 19S unit coupling. Many other reports in the literature show increased peptidolytic proteasomal activity upon incubation with hydrophobic compounds, suggesting that hydrophobic interactions activate the 20SPT. Some structured proteins can be degraded independently by the 20SPT, supposedly through hydrophobic interactions [64,66].

Indeed, there is no extant systematic study reporting the gate conformation of the free 20SPT pool. It is currently assumed that free 20SPT would be in a latent form, which usually means the closed conformation, allowing the entrance of only peptides [67]. The most conclusive data supporting this assumption are related to crystallographic studies of the yeast and mammal 20SPT [68,69]. However, the presence of inhibitors, the yeast growth conditions, and the addition of thiol reductants in the extraction buffers utilized for proteasomal purification make it impossible to infer the conformation of the 20S proteasomal gate *in vivo*.

A major question to be addressed regarding preferential degradation of oxidized proteins inside cells is whether such proteins are ubiquitinated and are therefore subject to 26SPT proteolysis. Related to this question is whether proteolysis by free 20SPT, which bypasses ubiquitination, is kinetically favored. During oxidative stress, proteins already ubiquitinated or being ubiquitinated that are also being oxidized may be reliably degraded after 26SPT recognition. In addition, mild oxidation of specific proteins may augment their ubiquitination because oxidation-induced conformational changes might expose specific ubiquitination targets, as predicted by the N-end rule [70,71]. The energy and time costs of degrading ubiquitinated substrates by the 26S proteasome was recently explored [72], showing it to be dependent on protein length and how tightly the protein is folded among other variables involving 26S proteasomal properties and the ubiquitination process. By comparing two substrates differing in length and folding, these authors demonstrated that the molar ratio between ATP consumption and protein substrate could vary from 50 to 160. The time course for degradation increased proportionally with increased protein length. According to these data, degradation of ubiquitinated substrates is a process that consumes large amounts of energy.

The notion that oxidized proteins might promptly interact with the free 20SPT pool is attractive, as the process is most likely kinetically favored. The rate-limiting step of the preferential degradation of oxidized proteins by the 20SPT free pool would be the availability of active 20SPT. Strengthening this hypothesis are the observations that 20SPT uncouples from the 19S regulatory particle during oxidative stress [54,56] and that S-glutathionylation stabilizes the 20SPT active open conformation [30]. Therefore, more accurate approaches are needed to measure the kinetics of degradation of oxidized proteins inside cells.

Final remarks

This review presents data regarding S-glutathionylation as a potential regulatory mechanism for 20SPT [2]. Four main observations supporting this notion were reviewed: (1) modification of specific Cys residues under physiological conditions (high GSH/GSSG ratio); (2) conformational changes of the modified protein; (3) reversibility of the reaction; and (4) concomitant change of the physiological response, e.g., the increased degradation of oxidized proteins. Therefore, we hypothesize that 20SPT S-glutathionylation plays a regulatory role that allows cells to cope with increased oxidative stress (Fig. 4).

There are few studies on proteasomal S-glutathionylation resulting in structural and functional modifications, and thus many questions remain unaddressed. One important question is whether S-glutathionylation would trigger 26S uncoupling *per se* during oxidative stress. Additionally, two open questions are why and how oxidized proteins interact with 20SPT. Peptide fragments generated by both redox forms of 20SPT are also predicted to differ, as the peptidolytic activities of both forms differ [25,26]. Finally, additional unresolved questions are whether S-glutathionylation is enzymatically regulated and whether oxidized protein degradation through the free S-glutathionylated 20SPT presents a kinetic advantage over degradation *via* 26SPT.

It is noteworthy that the number of Cys residues in the proteasome core particle evolved from 32 in yeast to 54 in human. No disulfide bond is present in yeast 20SPT but there are two in human 20SPT. As demonstrated previously, the ChT-L activity of the human 20SPT is modulated by both glutathione redox states and at a broad glutathione concentration range [25]. This observation contrasts with yeast 20SPT which is modulated only by the reduced glutathione form. Whether the increased number of Cys

residues in the mammal proteasome would be a functional evolutionary advantage is an intriguing open question.

Acknowledgements

I am grateful to the authors for their important contributions to the work described here. The studies by our group cited in the present review were supported by FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), the Instituto Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação de Processos Redox em BioMedicina (Redoxome; CNPq, FAPESP, CAPES), and the Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq).

References

- [1] T. Jung, T. Grune, The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part I—Structure of proteasomes, *Redox Biol.* 1 (2013) 178–182.
- [2] J.J. Mielal, P.B. Chock, Posttranslational modification of cysteine in redox signaling and oxidative stress: focus on s-glutathionylation, *Antioxid. Redox Signal.* 16 (2012) 471–475.
- [3] D.M. Ziegler, Role of reversible oxidation–reduction of enzyme thiols–disulfides in metabolic regulation, *Annu. Rev. Biochem.* 54 (1985) 305–329.
- [4] M.M. Gallogly, J.J. Mielal, Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress, *Curr. Opin. Pharmacol.* 7 (2007) 381–391.
- [5] I. Dalle-Donne, R. Rossi, G. Colombo, D. Giustarini, A. Milzani, Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans, *Trends Biochem. Sci.* 34 (2009) 85–96.
- [6] B.G. Hill, A. Bhatnagar, Protein S-glutathionylation: redox-sensitive regulation of protein function, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52 (2012) 559–567.
- [7] P. Klatt, S. Lamas, Regulation of protein function by S-glutathionylation in response to oxidative and nitrosative stress, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 4928–4944.
- [8] M. Gutschler, M.C. Sobotta, G.H. Wabnitz, S. Ballikaya, A.J. Meyer, Y. Samstag, T.P. Dick, Proximity-based protein thiol oxidation by H₂O₂-scavenging peroxidases, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 31532–31540.
- [9] A. Malvezzi, P.M. Higa, A. T-do Amaral, G.M. Silva, F.C. Gozzo, E.S. Ferro, L.M. Castro, L. de Rezende, G. Monteiro, M. Demasi, The cysteine-rich protein thimet oligopeptidase as a model of the structural requirements for S-glutathionylation and oxidative oligomerization, *PLoS One* 7 (2012) e39408.
- [10] A. Martínez-Ruiz, S. Cadenas, S. Lamas, Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms, *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2011) 17–29.
- [11] H. Østergaard, C. Tachibana, J.R. Winther, Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol, *J. Cell Biol.* 166 (2004) 337–345.
- [12] B. Morgan, D. Ezeriqa, T.N. Amoako, J. Riemer, M. Seedorf, T.P. Dick, Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis, *Nat. Chem. Biol.* 9 (2013) 119–125.
- [13] N. Le Moan, G. Clement, S. Le Maout, F. Tacnet, M.B. Toledano, The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols: contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways, *J. Biol. Chem.* 81 (2006) 10420–10430.
- [14] D.D. Sarkar, S.K. Edwards, J.A. Mauser, A.M. Suarez, M.A. Serowoky, N.L. Hudok, P.L. Hudok, M. Nuñez, C.S. Weber, R.M. Lynch, O. Miyashita, T.S. Tsao, Increased redox-sensitive green fluorescent protein reduction potential in the endoplasmic reticulum following glutathione-mediated dimerization, *Biochemistry* 52 (2013) 3332–3345.
- [15] Gupta V., Carroll K.S. Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime. *Biochim. Biophys. Acta* doi:p11: S0304-4165(13)00244-4. 10.1016/j.bbagen.2013.05.040.
- [16] D. Pimentel, D.J. Haeussler, R. Matsui, J.R. Burgoyne, R.A. Cohen, M.M. Bachschmid, Regulation of cell physiology and pathology by protein S-glutathionylation: lessons learned from the cardiovascular system, *Antioxid. Redox Signal.* 16 (2012) 524–542.
- [17] C.C. Winterbourn, M.B. Hampton, Thiol chemistry and specificity in redox signaling, *Free Radic. Biol. Med.* 45 (2008) 549–561.
- [18] L. Flohé, The fairy tale of the GSSG/GSH redox potential, *Biochim. Biophys. Acta* 1339–42 (1830) 2013.
- [19] C.A. Tairum Jr, MA de Oliveira, BB Horta, FJ Zara, LE Netto, Disulfide biochemistry in 2-cys peroxiredoxin: requirement of Glu50 and Arg146 for the reduction of yeast Tsa1 by thioredoxin, *J. Mol. Biol.* 424 (2012) 28–41.
- [20] A.M. Day, J.D. Brown, S.R. Taylor, J.D. Rand, B.A. Morgan, E.A. Veal, Inactivation of a peroxiredoxin by hydrogen peroxide is critical for thioredoxin-mediated repair of oxidized proteins and cell survival, *Mol. Cell* 45 (2012) 398–408.
- [21] C.L. Grek, J. Zhang, Y. Manevich, D.M. Townsend, K.D. Tew, Causes and consequences of cysteine s-glutathionylation, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 26497–26504.
- [22] M. Kemp, Y.M. Go, D.P. Jones, Non equilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology, *Free Radic. Biol. Med.* 44 (2008) 921–937.

- [23] D.M. Townsend, Y. Manevich, L. He, S. Hutchens, C.J. Pazoles, K.D. Tew, Novel role for glutathione S-transferase pi. Regulator of protein S-Glutathionylation following oxidative and nitrosative stress, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 436–445.
- [24] E.M. Allen, J.J. Mielal, Protein-thiol oxidation and cell death: regulatory role of glutaredoxins, *Antioxid. Redox Signal.* 17 (2012) 1748–1763.
- [25] M. Demasi, R. Shringarpure, K.J. Davies, Glutathiolation of the proteasome is enhanced by proteolytic inhibitors, *Arch. Biochem. Biophys.* 389 (2001) 254–263.
- [26] M. Demasi, G.M. Silva, L.E. Netto, 20 S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is S-glutathionylated, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 679–685.
- [27] D.P. Dixon, M. Skipsey, N.M. Grundy, R. Edwards, Stress-induced protein S-glutathionylation in Arabidopsis, *Plant Physiol.* 138 (2005) 2233–2244.
- [28] S.K. Niture, R.N. Bicev, C.F. Klitzke, M.C. Sogayar, M. Demasi, Redox mimicry: quantitative and kinetic analysis of redox status of protein cysteines by glutathione-affinity chromatography, *Arch. Biochem. Biophys.* 444 (2005) 174–184.
- [29] C. Zong, G.W. Young, Y. Wang, H. Lu, N. Deng, O. Drews, P. Ping, Two-dimensional electrophoresis-based characterization of post-translational modifications of mammalian 20S proteasome complexes, *Proteomics* 8 (2008) 5025–5037.
- [30] G.M. Silva, L.E. Netto, V. Simões, L.F. Santos, F.C. Gozzo, M.A. Demasi, C.L. Oliveira, R.N. Bicev, C.F. Klitzke, M.C. Sogayar, M. Demasi, Redox control of 20S proteasome gating, *Antioxid. Redox Signal.* 16 (2012) 1183–1194.
- [31] D.J. Jamieson, Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 14 (1998) 1511–1527.
- [32] G.M. Silva, L.E. Netto, K.F. Discola, G.M. Piassa-Filho, D.C. Pimenta, J.A. Bârcena, M. Demasi, Role of glutaredoxin 2 and cytosolic thioredoxins in cysteinyl-based redox modification of the 20S proteasome, *FEBS J.* 275 (2008) 2942–2955.
- [33] J.W. Zmijewski, S. Banerjee, E. Abraham, S-glutathionylation of the Rpn2 regulatory subunit inhibits 26 S proteasomal function, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 22213–22221.
- [34] K.M. Andersen, L. Madsen, S. Prag, A.H. Johnsen, C.A. Semple, K.B. Hendil, R. Hartmann-Petersen, Thioredoxin Txn1/TRP32 is a redox-active cofactor of the 26S proteasome, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 15246–15254.
- [35] K.M. Andersen, C. Jensen, F. Kriegenburg, A-MB Lauridsen, C. Gordon, R. Hartmann-Petersen, Tx11 and Tx1 are co-factors of the 26S proteasome in fission yeast, *Antioxid. Redox Signal.* 14 (2011) 1601–1608.
- [36] X. Li, G.N. Demartino, Variably modulated gating of the 26S proteasome by ATP and polyubiquitin, *Biochem. J.* 421 (2009) 397–404.
- [37] S. Bar-Nun, M.H. Glickman, Proteasomal AAA-ATPases: structure and function, *Biochim. Biophys. Acta* 67–82 (1823) 2012.
- [38] P. Sledz, F. Förster, W.J. Baumeister, Allosteric effects in the regulation of 26S proteasome activities, *Mol. Biol.* 425 (2013) 1415–1423.
- [39] B.M. Stadtmueller, C.P. Hill, Proteasome activators, *Mol. Cell.* 41 (2011) 8–19.
- [40] M. Groll, M. Bajorek, A. Köhler, L. Moroder, D.M. Rubin, R. Huber, M.H. Glickman, D. Finley, A gated channel into the proteasome core particle, *Nat. Struct. Biol.* 7 (2000) 1062–1067.
- [41] A.R. Kusmierczyk, M.J. Kunjappu, M. Funakoshi, M. Hochstrasser, A multimeric assembly factor controls the formation of alternative 20S proteasomes, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 153 (2008) 237–244.
- [42] M. Bajorek, M.H. Glickman, Keepers at the final gates: regulatory complexes and gating of the proteasome channel, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2004) 1579–1588.
- [43] T. Shibatani, E.J. Carlson, F. Larabee, A.L. McCormack, K. Fruh, W.R. Skach, Global organization and function of mammalian cytosolic proteasome pools: implications for PA28 and 19S regulatory complexes, *Mol. Biol. Cell* 17 (2006) 4962–4971.
- [44] S.E. Babbitt, A. Kiss, A.E. Deffenbaugh, Y.H. Chang, E. Bailly, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, T. Buranda, L.A. Sklar, J. Baumlner, E. Gogol, D. Skowyra, ATP hydrolysis-dependent disassembly of the 26S proteasome is part of the catalytic cycle, *Cell* 121 (2005) 553–565.
- [45] N. Tanahashi, Y. Murakami, Y. Minami, N. Shimbara, K.B. Hendil, K. Tanaka, Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 14336–14345.
- [46] K.B. Hendil, S. Khan, K. Tanaka, Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20S proteasomes, *Biochem. J.* 332 (1998) 749–754.
- [47] Höhn A., König J., Grune T. Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *J. Proteomics* doi:pii: S1874-3919(13)00021-3. 10.1016/j.jprot.2013.01.004.
- [48] E.R. Stadtman, Protein oxidation and aging, *Free Radic. Res.* 40 (2006) 1250–1258.
- [49] K.J. Davies, A.L. Goldberg, Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 8227–8234.
- [50] K.J. Davies, M.E. Delsignore, Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 9908–9913.
- [51] K.J. Davies, Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 9895–9901.
- [52] Y. Inai, M. Nishikimi, Increased degradation of oxidized proteins in yeast defective in 26 S proteasome assembly, *Arch. Biochem. Biophys.* 404 (2002) 279–284.
- [53] R. Shringarpure, T. Grune, J. Mehlhase, K.J. Davies, Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 311–318.
- [54] X. Wang, J. Yen, P. Kaiser, L. Huang, Regulation of the 26S proteasome complex during oxidative stress, *Sci. Signaling* 3 (2010). (ra88).
- [55] T. Reinheckel, O. Ullrich, N. Sitte, T. Grune, Differential impairment of 20S and 26S proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress, *Arch. Biochem. Biophys.* 377 (2000) 65–68.
- [56] T. Grune, B. Catalgol, A. Licht, G. Ermak, A.M. Pickering, J.K. Ngo, K.J. Davies, HSP70 mediates dissociation and reassociation of the 26S proteasome during adaptation to oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2011) 1355–1364.
- [57] J. Jahngen-Hodge, M.S. Obin, X. Gong, F. Shang, T.R. Nowell Jr, J. Gong, H. Abasi, J. Blumberg, A. Taylor, Regulation of ubiquitin-conjugating enzymes by glutathione following oxidative stress, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 28218–28226.
- [58] M. Obin, F. Shang, X. Gong, G. Handelman, J. Blumberg, A. Taylor, Redox regulation of ubiquitin-conjugating enzymes: mechanistic insights using the thiol-specific oxidant diamide, *FASEB J.* 12 (1998) 561–569.
- [59] F.M. da Cunha, M. Demasi, A.J. Kowaltowski, Aging and calorie restriction modulate yeast redox state, oxidized protein removal, and the ubiquitin-proteasome system, *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2011) 664–670.
- [60] T. Reinheckel, N. Sitte, O. Ullrich, U. Kuckelkorn, K.J. Davies, T. Grune, Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress, *Biochem. J.* 335 (1998) 637–642.
- [61] M. Kästle, S. Reeg, A. Rogowska-Wrzesinska, T. Grune, Chaperones, but not oxidized proteins, are ubiquitinated after oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.* 53 (2012) 1468–1477.
- [62] R.E. Pacifici, Y. Kono, K.J. Davies, Hydrophobicity as the signal for selective degradation of hydroxyl radical-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, *proteasome, J. Biol. Chem.* 268 (1993) 15405–15411.
- [63] D.A. Ferrington, H. Sun, K.K. Murray, J. Costa, T.D. Williams, D.J. Bigelow, T.C. Squier, Selective degradation of oxidized calmodulin by the 20S proteasome, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 937–943.
- [64] J.M. Baugh, E.G. Viktorova, E.V. Pilipenko, Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination, *J. Mol. Biol.* 386 (2009) 814–827.
- [65] D.M. Smith, S.C. Chang, S. Park, D. Finley, Y. Cheng, A.L. Goldberg, Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's α ring opens the gate for substrate entry, *Mol. Cell.* 27 (2007) 731–744.
- [66] C.W. Liu, M.J. Corboy, G.N. De Martino, P.J. Thomas, Endoproteolytic activity of the proteasome, *Science* 299 (2003) 408–411.
- [67] E. Kish-Trier, C.P. Hill, Structural biology of the proteasome, *Annu. Rev. Biophys.* 42 (2013) 29–49.
- [68] M. Groll, L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, M. Bochtler, H.D. Bartunik, R. Huber, Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution, *Nature* 386 (1997) 463–471.
- [69] M. Unno, T. Mizushima, Y. Morimoto, Y. Tomisugi, K. Tanaka, N. Yasuoka, T. Tsukihara, The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution, *Structure* 10 (2002) 609–618.
- [70] A. Varshavsky, The N-end rule pathway and regulation by proteolysis, *Protein Sci.* 20 (2011) 1298–1345.
- [71] T. Tasaki, S.M. Sriram, K.S. Park, Y.T. Kwon, The N-end Rule Pathway 81 (2012) 261–289.
- [72] A. Peth, J.A. Nathan, A.L. Godberg, The ATP Costs and Time Required to Degrade Ubiquitinated Proteins by the 26S Proteasome, *J. Biol. Chem.* (2013). (Epub ahead of print).