VERÔNICA FEIJOLI SANTIAGO

**“Análise proteômica diferencial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* após
mutações sítio-específicas de resíduos de Cys do Proteassomo 20S:
Implicações com o tempo de vida celular”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador: Dra. Marilene Demasi

Versão Corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

SÃO PAULO

2018

RESUMO

SANTIAGO, V.F. **Análise proteômica diferencial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* após mutações sítio-específicas de resíduos de Cys do Proteassomo 20S: Implicações com o tempo de vida celular.** 2018. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A oxidação de proteínas é um fenômeno metabólico e a degradação de proteínas oxidativamente modificadas confere uma proteção para a célula, evitando acúmulo e a agregação das mesmas. A ineficiência na remoção destas proteínas está relacionada ao processo de envelhecimento e ao aparecimento de doenças neurodegenerativas. A unidade catalítica do proteassomo, denominada de 20S (PT20S), é a principal via de degradação de proteínas danificadas pela oxidação sem que haja gasto de ATP, acoplamento de subunidades regulatórias ou poli-ubiquitinação do substrato proteico. A unidade PT20 por sua vez, pode sofrer modificação pós-traducional chamada de S-glutathionilação, que aumenta a velocidade de degradação proteica por processo independente de poli-ubiquitinação. Em levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), foram identificados apenas dois resíduos de Cys glutathionilados, ambos na subunidade $\alpha 5$ ($\alpha 5$ -76 e $\alpha 5$ -221). A S-glutathionilação ocasiona a abertura da câmara catalítica e uma maior eficiência na degradação de proteínas. Mutações sítio-específicas foram realizadas nessas Cys pela substituição por Ser. As consequências estruturais e funcionais dessas mutações foram o aumento da frequência da conformação fechada da câmara catalítica no $\alpha 5$ -76S-PT20S e $\alpha 5$ -221S-PT20S. As linhagens que carregam essas mutações apresentaram menor tempo de vida cronológico. Uma dupla mutação randômica na subunidade $\alpha 5$ (S35P / C221S) induziu a abertura da câmara catalítica do 20SPT e esta linhagem apresentou tempo de vida cronológico significativamente aumentado e , aumento na resistência ao estresse oxidativo em paralelo ao aumento da atividade catalítica do 20SPT. O objetivo neste projeto de pesquisa foi realizar uma análise proteômica quantitativa no extrato celular das linhagens mutantes, com o objetivo de identificar proteínas que possam estar relacionadas com a regulação da longevidade celular. Foram selecionadas as linhagens que carregam as mutações: $\alpha 5$ -76S e $\alpha 5$ -S35P/C221S uma vez que apresentaram expectativa de vida oposta em relação à linhagem selvagem, além de queda e aumento da frequência da conformação aberta da câmara catalítica, respectivamente. A partir da quantificação sem marcação (*Label-free quantification*), foram identificadas 723-1000 proteínas nas amostras das linhagens

selvagem e mutantes. Dentre elas, destacam-se as proteínas 3-isopropilmalato isomerase e argininossuccinato sintase, envolvidas na síntese de leucina e arginina, respectivamente, aumentadas na linhagem mutante C76S e reduzidas na linhagem S35P/C221S. O metabolismo de ambos os aminoácidos está relacionado com a via de sinalização TOR que, por sua vez, está envolvida com o tempo de vida cronológico em levedura.

Palavras-chave: Proteassomo 20S. Tempo de vida cronológico. Análise proteômica.

ABSTRACT

SANTIAGO, V.F. **Differential proteomic analysis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* after site-specific mutations of Cysteine residues in the 20S proteasome: Implications in the life span.** 2018. 76f. Dissertation (Masters thesis in Morfofunctional Science). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The protein oxidation is a metabolic phenomenon and the degradation of oxidatively modified proteins confers a protection to cell, avoiding accumulation and aggregation of these proteins. The inefficiency in the removal of these proteins is related to aging process and neurodegenerative diseases. The catalytic unit of the proteasome, named 20S (PT20S) is the main degradative pathway of oxidized proteins in an ATP-independent manner, without proteasomal regulatory units assembly or protein polyubiquitination. The PT20 unit undergoes a post-translational modification named S-glutathionylation, which increases the protein degradation by the ATP-independent process. In yeast, only two Cys residues were identified glutathionylated, both in the $\alpha 5$ subunit ($\alpha 5$ -C76 e $\alpha 5$ -C221). The S-glutathionylation causes opening of the catalytic chamber and higher efficiency of protein hydrolysis. Site-specific mutations were performed in those Cys residues by their replacement to Ser. The structural and functional consequences of mutations were the increased frequency of the closed conformation of the catalytic chamber in the $\alpha 5$ -76S-PT20S and $\alpha 5$ -221S-PT20S. The strains carrying those mutations presented shorter chronological life span. A double random mutation in the $\alpha 5$ subunit (S35P / C221S) induced the opening of 20SPT catalytic chamber together to extended chronological life span and, increased resistant to oxidative stress in parallel to increased catalytic activity of the 20SPT. The goal of this project was to perform a label-free quantitative proteomic analysis in the mutant strains to identify proteins that could be related with the regulation of cellular lifespan. From that quantification, 723 - 1000 proteins were identified in the samples of the wild-type and mutant strains. Among these proteins, 3-isopropylmalate isomerase and argininesuccinate sintase, involved in the leucine and arginine biosynthesis, respectively, were found increased in the C76S mutant strain and reduced in the S35P/C221S mutant strain. The metabolism of both amino acids is related with TOR signaling that, in turn,modulates chronological lifespan in yeast.

Keywords: 20S Proteasome. Chronological Life Span. Proteomic Analysis.

1 INTRODUÇÃO

O proteassomo é uma peptidase multicatalítica responsável pela degradação de proteínas intracelulares e sua atividade é fundamental para a manutenção da homeostase celular. É constituído por uma unidade catalítica central 20S (700 kDa) e por complexos regulatórios sendo o 19S o mais abundante. O 19S acopla-se a uma ou ambas as extremidades da unidade catalítica, formando o proteassomo 26S (26SPT). O 26SPT reconhece e degrada substratos poliubiquitinados, como as proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, regulação da transcrição e tradução (Rivett, 1998).

Após o reconhecimento da proteína na unidade regulatória, esta é deubiquitinada, desenovelada e encaminhada à câmara catalítica da unidade 20S (Glickman *et al.*, 1998; Navon e Goldberg, 2001; Tanaka *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2009). A unidade catalítica 20S de mamífero possui 160Å de comprimento e 100Å de diâmetro e é composta por 4 anéis heptaméricos posicionados na sequência $\alpha\beta\beta\alpha$, cada um destes contendo sete subunidades distintas de baixa massa molecular (20-35 kDa). Os anéis externos são formados por sete diferentes subunidades α e são responsáveis pela abertura da câmara catalítica, além da interação com a unidade regulatória 19S (Groll *et al.*, 2000; Coux *et al.*, 1996; Glickman *et al.*, 1998). Os anéis internos, constituídos por subunidades β , integram os sítios catalíticos com atividades tipo quimotripsina, tripsina e caspase, como apresentado na figura 1 (Tanaka, 1995; 1998; Jung *et al.*, 2009; Löwe *et al.*, 1995; Tanaka, 2009).

Figura 1. Representação da unidade 20S acoplada à unidade regulatória 19S nas extremidades

Fonte: Tanaka (2009)

A ubiquitina é um polipeptídeo constituído por 76 resíduos de aminoácidos altamente conservado na escala evolutiva, presente de leveduras até mamíferos. Possui sete resíduos de lisina, que podem se ligar às outras ubiquitinas para formação de uma cadeia de poliubiquitina. A ligação via K48 é a mais abundante para a formação de cadeias ligadas à proteína substrato de degradação. A ubiquitina liga-se covalentemente às proteínas para marcação destas durante eventos metabólicos. Esta ligação ocorre entre C-terminal da gly76 presente na ubiquitina e o grupo amino da cadeia lateral do resíduo de lisina da proteína alvo de marcação (Wilkinson *et al.*, 1995).

A ubiquitinação é um processo dinâmico, caracterizado como uma modificação pós-traducional que direciona as proteínas para degradação proteassomal. Também está relacionada com outros processos celulares, como reparo de DNA, regulação da transcrição, regulação da interação entre proteínas, entre outros. A ubiquitinação pode envolver a ligação de uma ou mais moléculas de ubiquitina (Wilkinson *et al.*, 1995). A poliubiquitinação proteica requer a ação de três enzimas denominadas ativadoras (E1), conjugadoras (E2) e ligases (E3) de ubiquitina (Goldstein, 1975; Glickman *et al.*, 2002; Goldberg, 2003). A enzima E1 catalisa a reação de ativação da ubiquitina e utiliza a energia proveniente da clivagem da molécula de ATP, formando o intermediário E1-tioester-ubiquitina. A ubiquitina ativada é, então, transferida para a enzima E2 para ser conjugada à proteína alvo (Ciechanover *et al.*, 1980; 2005; Hershko *et al.*, 1983; 2000). A conjugação das unidades de ubiquitina à região ϵ -amino do resíduo de lisina da proteína alvo é essencial para o reconhecimento pelo proteassomo 26S (Schlesinger *et al.*, 1975; Wilkinson *et al.*, 1980). Assim, o processo de marcação de proteínas realizado pela ubiquitina, o reconhecimento da proteína ubiquitinada e degradação pelo proteassomo 26S constituem o sistema ubiquitina-proteassomo. A estrutura da ubiquitina e o esquema do processo de ubiquitinação e degradação proteica estão representados na figura 2.

Figura 2. A) Representação da estrutura da molécula de ubiquitina. B) Esquema representativo do mecanismo de ubiquitinação e degradação proteica proteassomal

Fonte: Pickart e Eddins (2004)

O sistema ubiquitina-proteassomo é altamente seletivo e possui atividade tanto citoplasmática como nuclear (Rivett *et al.*, 1992, Palmer *et al.*, 1996; Wigley *et al.*, 1999). O controle de qualidade proteica no lúmen do retículo endoplasmático é dependente de ubiquitina (Rivett, 1998).

1.1 Degradação de proteínas oxidadas

O processo de oxidação de proteínas é um fenômeno intracelular constitutivo. As proteínas podem ser oxidadas durante todos os processos intracelulares e, principalmente, durante condições de desafios e estresse oxidativo (Davies, 2000; Ferrington *et al.*, 2001). Tendo em vista não haver sistema de reparo proteico (exceto da metionina sulfóxido redutase que reduz sulfóxido de metionina e de algumas formas oxidadas de Cys), a degradação de proteínas oxidadas é considerada como processo de defesa intracelular para prevenção de agregação proteica (Pacifici e Davies, 1990; Davies, 2000; Varshavsky, 2005). O acúmulo de proteínas oxidadas devido ao aumento de processos redox e/ou na ineficiência na sua remoção pela célula está relacionado ao processo de envelhecimento e ao aparecimento de doenças degenerativas (Butterfield *et al.*, 2006; Stadtman, 2006). A degradação pelo 20SPT, que representa a principal via de remoção de proteínas modificadas oxidativamente, atua por um processo independente de ATP e poli-ubiquitinação. A importância do 20SPT na degradação de proteínas

oxidadas *in vivo* confirma-se por inúmeros dados indiretos mostrando inativação da atividade de ubiquitinação e do 26SPT e o desacoplamento entre unidades 20S e 19S mediante estresse oxidativo moderado (Reinheckel *et al.*, 1998 e 2000; Wang *et al.* 2010; Kästle *et al.*, 2012; Livnat-Levanon *et al.*, 2014). Esse processo foi extensivamente abordado *in vitro* (Davies, 2000).

O mecanismo pelo qual as proteínas oxidadas interagem com o 20SPT não é conhecido. No entanto, o aumento de hidrofobicidade superficial das proteínas oxidadas parece ser uma característica importante para permitir a interação da proteína ao 20SPT (Pacifici *et al.*, 1993; Inai e Nishikimi, 2002; Shringarpure *et al.*, 2003; Baugh *et al.*, 2009).

1.2 Glutathionilação

Diversas modificações pós-traducionais do 20SPT já foram descritas (Fig. 3) e dentre elas a glutathionilação, ou seja, adição de glutatona a resíduos de cisteína do 20SPT, atua como um mecanismo de regulação redox da atividade de diversas proteínas, fornecendo proteção às proteínas contra oxidação irreversível dos seus resíduos de Cys como também servindo como transdutor de sinal redox (Shelton e Mieyal, 2008). A glutatona é um tri-peptídeo (γ -Glu-Cys-Gly) encontrado em algumas eubactérias e presente em todos os organismos eucarióticos, existindo em alta concentração intracelular (1 a 10 mM) dependendo do tecido e organela celular.

Figura 3. Modificações pós-traducionais no proteassomo descritas na literatura

Fonte: Hirano *et al.* (2016)

A glutathionilação de proteínas durante desafio oxidativo já foi considerada apenas um processo antioxidante no qual as sulfidrilas proteicas seriam protegidas de hiperoxidação irreversível através da formação de dissulfetos mistos com a glutathiona (Gilbert, 1995). Atualmente, a glutathionilação é tida como uma importante modificação pós-traducional atuando de maneira regulatória sobre a atividade de diversas enzimas (Giustarini *et al.*, 2004; Ghezzi *et al.*, 2005).

1.3 Glutathionilação do Proteassomo

A glutathionilação do 20SPT foi primeiramente observada em células de mamíferos (epitélio hepático de ratos) incubadas com inibidores irreversíveis e específicos do proteassomo (lactacistina, NLVS e β -lactona; Demasi *et al.*, 2001). Em 2003, Demasi e colaboradores descreveram o mecanismo *in vitro* pelo qual ocorre o processo de glutathionilação do 20SPT em levedura (*S. cerevisiae*). Os resultados demonstraram que durante o estresse oxidativo, resíduos de cisteínas do 20SPT são oxidados a Cys-SOH seguido de glutathionilação pela forma reduzida de glutathiona (Fig. 4). A reversibilidade da glutathionilação foi vista por Silva *et al* (2008), onde foi possível desglutathionilizar o 20SPT por oxidoredutases (glutarredoxina 1 e tiorredoxinas 1 e 2).

Em 2012, Silva e colaboradores analisaram as 14 subunidades do proteassomo da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) após crescimento até fase estacionária em meio contendo glicose como fonte de carbono. Foram identificados, via espectrometria de massas, apenas dois resíduos de cisteína glutathionilados, ambos localizados na subunidade $\alpha 5$ que compõe a unidade catalítica 20S. Considerando que o proteassomo 20S possui 32 cisteínas, a glutathionilação possui especificidade *in vivo* no processo de regulação redox. Uma das modificações estruturais identificadas pela glutathionilação foi a abertura da câmara catalítica e consequente maior eficiência na degradação de proteínas oxidadas.

Figura 4. Representação do mecanismo de glutathionilação do proteassomo 20S

O resíduo de Cys é oxidado em ácido sulfênico e glutathionilado por uma molécula de glutatona
Fonte: Silva (2010)

1.4 Consequências estruturais das mutações sítio-específicas na subunidade $\alpha 5$ do 20SPT

Para desvendar as consequências da glutathionilação nos resíduos $\alpha 5$ -C76 e $\alpha 5$ -C221 na estrutura proteassomal e no fenótipo celular, foram obtidas duas linhagens de levedura com as mutações sítio-específicas nestes resíduos glutatíoláveis com a substituição do resíduo de cisteína por serina, devido à similaridade entre as cadeias laterais destes aminoácidos (C76S e C221S). Entretanto, durante a construção destes mutantes, foi identificada uma mutação randômica, além da mutação sítio-específica na Cys221, localizada no resíduo de Serina na posição 35, a qual foi substituída por um resíduo de prolina. Desta forma, o mutante foi denominado S35P/C221S. Vale ressaltar que a dupla mutação das duas Cys gerou linhagem inviável.

Os experimentos realizados com estas linhagens mutantes demonstraram que na linhagens C76S assim como na C221S, comparadas à linhagem selvagem, o proteassomo 20S apresenta a conformação da câmara catalítica predominantemente fechada. Em relação à degradação de proteínas poliubiquitinadas, foi identificada uma menor concentração nesta linhagem. Em contrapartida, o proteassomo da mutante S35P/C221S está com a câmara catalítica preferencialmente aberta, como mostrado na figura 5.

Figura 5. Abertura da câmara catalítica do proteassomo 20SPT nas linhagens selvagem e S35P/C221S e predominância da câmara catalítica na conformação fechada na linhagem mutante C76S

(Leme *et al.*, manuscrito em preparação).

As diferenças observadas na frequência de conformação da câmara catalítica do 20SPT entre as linhagens mutantes e selvagem, discutidas acima, tiveram como consequência alterações da atividade catalítica medida pela hidrólise *in vitro* de fluoropeptídeos e de proteínas modelo (caseína; glutarredoxina2 e α -sinucleína) (Tabela 1; Figura 6). Sabe-se que a degradação dessas proteínas pelo 20SPT ocorre de maneira ubiquitina-independente, como observado por Silva *et al.* (2012).

Figura 6 Capacidade proteolítica do 20SPT selvagem e mutante S35P/C221S

Foram incubadas 5 μ g de preparações de proteassomo selvagem e mutante α 5-C221S com 15 μ g de Grx 2 durante 120 minutos, na presença e na ausência de DTT como indicado; (B) 5 μ g de α -sinucleína foram incubadas com 20 μ g das preparações de 20SPT durante 120 minutos. (C) 20 μ g de β -caseína foram incubadas com 5 μ g dos proteassomos purificados durante 15 minutos; As incubações foram realizadas à 37 °C sob agitação a cada 5 min. As amostras de B e C foram filtradas em microfiltros Microcon-100 (Millipore) para remover o 20SPT. Os filtrados foram misturados ao tampão de amostra contendo 10 mM DTT e aplicados em SDS-PAGE 12,5-15%. Os resultados mostrados são representativos de ensaios realizados em tampão 20 mM Tris pH 7,5 acrescido de (A) 20 mM KCl e 5 mM MgCl₂; (B) 5 mM MgCl₂ e (C) sem adição iônica. Os géis mostrados em D são representativos de preparações do 20SPT e servem de controle da pureza das preparações obtidas. Preparações com o mesmo grau de pureza foram utilizadas para as medidas das atividades sítio-específicas como mostrado na Tabela 1 (Ohara, 2015).

Tabela 1. Atividade sítio-específica do proteassomo 20S

	WT	$\alpha 5$ -C76S	$\alpha 5$ -C221S	$\alpha 5$ -S35P/C221S	$\alpha 5$ -S35P
ChT-L (s-LLVY-AMC)	98 $\pm$ 3	101 $\pm$ 4	104.5 $\pm$ 4.5	132 $\pm$ 3*	129 $\pm$ 4*
T-L (z-ARR-AMC)	31 $\pm$ 0.5	27 $\pm$ 2	29.5 $\pm$ 0.5	ND	ND

Preparações dos 20PT das linhagens selvagem (WT), C76S, C221S, S35P/C221S e S35P foram ressuspensas em tampão 20 mM Tris-HCl pH 7,5 por 5 minutos a 37 °C. Em seguida, 125 μ M de substrato suc-LLVY-AMC e 500 μ M z-ARR-AMC foram adicionados às amostras e a fluorescência foi medida a cada 5 minutos durante 45 minutos. Os resultados são expressos em unidades arbitrárias de fluorescência por minuto (AUF/min) e são referentes a três experimentos independentes e cada experimento foi realizado em triplicata. **ND**: não determinado.

*p<0.00035(ANOVA) comparado à linhagem selvagem.

Vale ressaltar que a C76 é altamente conservada ao longo da escala evolutiva (levedura ao homem). Os dados anteriores fazem parte de um manuscrito em preparação.

1.5 Consequências das mutações sítio-específicas no 20SPT nos tempos de vida replicativo e cronológico

Na levedura *Saccharomyces cerevisiae* dois tipos de envelhecimento são caracterizados: replicativo e cronológico. O envelhecimento replicativo é modulado pela tradução. Logo, a partir da deleção de determinados genes que expressam subunidades ribossomais é possível aumentar a longevidade celular (Kaeberlein e Kennedy, 2010). Em contrapartida, a extensão do tempo de vida cronológico está diretamente associada à maior resistência ao estresse oxidativo (Fabrizio *et al.*, 2003). Os mecanismos moleculares responsáveis pela modulação de ambos os tipos de envelhecimento são objetos de intensa investigação (Longo *et al.*, 2012). Como já demonstrado, a extensão de ambos os tempos de vida (replicativo e cronológico) pode ocorrer ou por inibição da via de TOR ou pela exposição celular à droga rapamicina (inibidor de TORC1) (Medvedik *et al.*, 2007; Ha e Huh, 2011).

No tempo de vida replicativo (RLS) é contabilizado o número de células-filhas geradas por uma célula-mãe. No tempo de vida cronológico (CLS), avalia-se o tempo em que a célula se mantém viável após atingir a fase estacionária durante a depleção de

nutriente (Finch, 1990; Charlesworth *et al.*, 2000).

A relação entre os tempos de vida replicativo e cronológico não está completamente elucidada, entretanto, experimentos de manipulação genética mostram que o aumento do RLS não resulta na alteração do CLS (Kaeberlein *et al.* 1999). Em alguns casos, verificou-se um efeito oposto nos ensaios de tempos de vida replicativo e cronológico (Harris *et al.* 2001, 2003; Fabrizio *et al.* 2004). Isso não implica que estes tempos não estejam interligados, uma vez que células cronologicamente envelhecidas apresentam redução no tempo de vida replicativo (Ashrafi *et al.* 1999). O tempo de vida cronológico compartilha com o tempo de vida replicativo diversas vias metabólicas responsáveis pela sua extensão, como a redução da sinalização de TOR e PKA. Entretanto, outras vias metabólicas promovem diferentes respostas em CLS e RLS. A deleção de *SIR2* resulta na redução do tempo de vida replicativo e no aumento do tempo de vida cronológico. Em contrapartida, a deleção de *RAS2* provoca a extensão do tempo de vida replicativo e a redução do tempo de vida cronológico (Sun *et al.*, 1994; Fabrizio *et al.*, 2005).

Nos ensaios aqui apresentados de tempo de vida cronológico, as duas linhagens mutantes C76S e S35P/C221S apresentaram diferenças na capacidade de manterem-se viáveis após alcançarem a fase estacionária, opostas em relação à linhagem selvagem. A linhagem mutante C76S apresentou redução de aproximadamente 30% na sobrevivência, enquanto a linhagem mutante S35P/C221S sobreviveu 30% de tempo além da linhagem selvagem (Figura 6). Entretanto, nos ensaios de tempo de vida replicativo, ambas as linhagens mutantes obtiveram um número reduzido de células-filhas comparativamente à linhagem selvagem. As linhagens mutantes S35P/C221S e C76S mostraram redução de 18% e 33%, respectivamente, na capacidade replicativa (Ohara, 2015) (Figura 7).

Figura 7. Tempos de vida cronológico (à esquerda) e replicativo (à direita) das linhagens selvagem e mutantes

Os experimentos de tempo de vida cronológico e replicativo foram realizados em triplicata biológica.
Fonte: Ohara (2015)

Dentre os dados obtidos, consideramos relevantes àqueles que relacionam a abertura da câmara catalítica do proteassomo 20S com a expectativa de vida cronológica: frequência aumentada da conformação aberta associada ao aumento da expectativa de vida na linhagem S35P/C221S em oposição à linhagem C76S, na qual a frequência da forma aberta diminui assim como a expectativa de vida (Figura 5). Os resultados a serem discutidos posteriormente neste trabalho se baseiam na alteração do tempo de vida cronológico identificada nas duas linhagens mutantes estudadas pelo grupo.

1.6 O sistema ubiquitina- proteassomo no envelhecimento e longevidade

A manutenção da proteostase envolve mecanismos de estabilização de proteínas pelo enovelamento, além de mecanismos de degradação via lisossomo ou proteassomo (Hartl *et al.*, 2011; Koga *et al.*, 2011). À medida que a célula envelhece, a proteostase é alterada devido ao declínio da atividade dos principais sistemas proteolíticos: lisossomo-autofagia e sistema ubiquitina-proteassomo (Lichtenberg *et al.*, 2011; Tomaru *et al.*, 2012).

Tanto o sistema ubiquitina-proteassomo como a autofagia são importantes vias de manutenção do *pool* de aminoácidos intracelulares durante a privação nutricional,

pois a degradação proteica para disponibilidade de aminoácidos requer um menor custo energético em comparação com a síntese *de novo* de aminoácidos (Lilienbaum, 2013). O Sistema ubiquitina-proteassomo é responsável pela degradação de aproximadamente 80% das proteínas intracelulares, dentre elas, as desnaturadas, anormais e proteínas danificadas (Rock *et al.*, 1994).

A redução na atividade do sistema ubiquitina-proteassomo durante o envelhecimento pode ser provocada por diversos fatores, dentre eles: a redução na expressão de subunidades do proteassomo, como também pela redução nos níveis de ATP, que pode interferir na ubiquitinação, desdobramento e translocação do substrato para a câmara catalítica (Keller *et al.*, 2000; Vernace *et al.*, 2007).

Por outro lado, a ativação do sistema ubiquitina-proteassomo é uma das estratégias antienvhecimento celular (Chondrogianni e Gonos, 2008). Além das unidades regulatórias 19S e 11S, a atividade proteassomal pode ser regulada via regulação genética ou através de reguladores químicos e naturais.

Modificações na estrutura do proteassomo afetam a atividade proteassomal através da alteração da conformação da unidade 20S. Ácidos graxos e SDS são capazes de estimular a atividade do proteassomo *in vitro* pela abertura da câmara catalítica, enquanto cloreto de potássio provoca o efeito oposto na atividade proteassomal ao promover o fechamento da câmara catalítica (Dahlmann *et al.*, 1985; Kohler *et al.*, 2001). A oleuropeína, composto fenólico encontrado no extrato da folhe de *Olea europaea*, promove alterações estruturais nos anéis α , de maneira similar aquele provocado pelo SDS. A ativação do proteassomo tem impacto na resistência celular à ação de oxidantes, além de estender o tempo de vida celular (Katsiki *et al.*, 2007).

A ativação proteassomal também ocorre após o tratamento com antioxidantes, como ditioletona e sulforafano, cuja ação aumenta a expressão das subunidades proteassomais através da via Keap1-Nrf2 (Kwak *et al.*, 2003; Kwak *et al.*, 2007).

1.7 Sinalização via TOR (Target Of Rapamicin)

TOR é uma serino/treonino kinase atípica que foi inicialmente identificada na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Em *S. cerevisiae* há dois genes homólogos para TOR (TOR1 e TOR2) (Heitman *et al.*, 1991). Ambas as proteínas expressas pelos genes

TOR1 e TOR2 em levedura possuem função relacionada com a regulação do crescimento celular, através da regulação da biogênese ribossomal e controle da iniciação da transcrição e autofagia. TOR1 e TOR2 possuem 67% de identidade na sequência de aminoácidos (Helliwell et al., 1994). A atividade destas proteínas é regulada pela disponibilidade de nutrientes intracelular. Ademais, TOR2 controla o ciclo celular através da polarização da actina (Jacinto e Hall, 2003; Loewith *et al.*, 2004). TOR pode ser localizado na membrana plasmática, no endossomo, na membrana vacuolar ou no núcleo (Rohde *et al.*, 2008).

As proteínas da via de TOR desempenham funções distintas e estão agrupadas em complexos: complexo TOR 1 (TORC1), formado pelas proteínas Tor1 ou Tor2, KOG1, LST8 e TCO89, e complexo TOR 2 (TORC2), composto pelas proteínas Tor2, AVO1, AVO2, AVO3, LST8 e BIT61 como mostrado na figura 8 (Loewith *et al.*, 2002; Reinke *et al.*, 2004). Estes complexos sinalizam diferentes eventos intracelulares, além de apresentarem diferença de sensibilidade à rapamicina (Loewith *et al.*, 2002; Jacinto *et al.*, 2004; Sarbassov *et al.*, 2004). A inibição de TORC1 por rapamicina é dependente da proteína FKBP12 para formação do complexo FKBP12-rapamicina, que se liga a TORC1, provocando sua inibição (Loewith *et al.*, 2002). Somente TORC1 é responsivo à rapamicina.

Figura 8. Composição dos complexos TOR1 (TORC1) e TOR2 (TORC2) de *S. cerevisiae*

Fonte: Inoki *et al.* (2005)

A atividade de TORC1 e TORC2 está diretamente envolvida com o controle temporal e espacial do crescimento celular. TORC1 é responsável pelo controle temporal do crescimento regulando as vias de sinalização que determinam o acúmulo de massa. Este complexo é sensível à disponibilidade de nutrientes, como fonte de nitrogênio e carbono, estresses, disponibilidade energética e oxigênio (De Virgilio e Loewith, 2006). Estudos recentes demonstram que TORC1 também tem função no controle espacial do tamanho da célula e no crescimento celular, uma vez que

Las2/Kog1 (componentes de TORC1) estão envolvidas com o arranjo espacial de actina (Araki *et al.*, 2005). Este complexo também regula a localização nuclear de dois cofatores de transcrição, SFP1 e CRF1, envolvidos na expressão de genes de proteínas ribossomais (Marion *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2004). TORC2 também está envolvido no controle espacial do crescimento celular através da regulação da via RHO GTPase (Loewith *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003).

O aspecto chave da regulação do crescimento celular mediado por TORC1 é a biossíntese ribossomal, pois, além do fato dos ribossomos serem necessários para o crescimento, sua biossíntese demanda um alto custo energético para a célula (Warner, 1999; Nomura, 2001; Jorgensen *et al.*, 2004). Desta forma, TOR tem um papel importante na regulação da transcrição de genes ribossomais e a transcrição destes genes é reduzida após tratamento com a droga rapamicina, pela inibição de TOR (Zaragoza *et al.*, 1998; Powers e Walter, 1999; Schmelzle *et al.*, 2004). O mecanismo pelo qual TOR regula a transcrição destes genes ribossomais ainda é desconhecido, mas sabe-se que a redução da transcrição de genes ribossomais induzida por rapamicina é suprimida pela ativação da via RAS-cAMP-PKA (Schmelzle *et al.*, 2004).

A atividade de TOR é regulada pela disponibilidade de nutrientes intracelular, sendo esta atividade inibida pela privação nutricional. Este efeito é mimetizado pelo tratamento com a droga rapamicina. A rapamicina forma um complexo com a proteína FKBP12 (12 kDa) e este complexo bloqueia a interação entre FKBP12 e TOR (Crespo e Hall, 2002). O esquema da regulação da sinalização de TOR pela disponibilidade nutricional e por rapamicina está representado na figura 9.

Figura 9. Esquema da regulação da atividade da via TOR pela disponibilidade de nutrientes e pelo tratamento com a droga rapamicina

Com a disponibilidade de nutrientes no meio, TOR está ativa e desligada da FKBP. Entretanto, na presença de rapamicina, o complexo FKBP-rapamicina se liga a TOR, inativando-a. A inativação de TOR também ocorre durante a limitação nutricional (Crespo e Hall, 2002).

Alguns trabalhos em *S. cerevisiae* e *D. melanogaster* relacionam a sinalização de TOR com o tempo de vida através da inibição da tradução (Kaeberlein e Kennedy, 2010). Especificamente TORC1 regula processos celulares importantes, como: tradução de mRNA e síntese ribossomal e inibição da autofagia. Em células de mamíferos, a regulação da tradução e síntese ribossomal ocorre via fosforilação direta das kinases ribossomais S6 (S6K) 1 e 2 e do fator de iniciação eucariótico eIF-4E. A fosforilação e consequente ativação de S6K1 impacta diretamente o crescimento celular, uma vez que esta kinase controla a tradução via fosforilação da proteína ribossomal S6 40S e a atividade da S6K1 está diretamente associada ao controle do crescimento celular (Pende et al., 2004).

Desta forma, a inibição de TORC1 reduz a tradução e síntese ribossomal ao mesmo tempo em que promove a ativação da autofagia. Tanto a redução da tradução e síntese ribossomal como o aumento da autofagia são processos que estão relacionados com o controle da longevidade (Mehta *et al.*, 2010; Vellai e Takacs-Vellai, 2010).

Harrison et al., (2009) demonstraram que a rapamicina estende o tempo de vida em camundongos via inibição da sinalização de mTOR. Em levedura, o tratamento com rapamicina durante a fase log de crescimento aumenta a respiração mitocondrial e, consequentemente, promove o aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS). O aumento de ROS resulta na ativação dos mecanismos de defesa antioxidante que aumentam a viabilidade celular durante a fase estacionária (Pan *et al.*, 2012).

1.7.1 Regulação de TOR pela disponibilidade de aminoácidos

Alguns nutrientes são capazes de interferir na duração e intensidade da atividade de TORC1, refletindo na alteração do fenótipo celular (De Virgilio e Loewith, 2006; Stracka *et al.*, 2014). TORC1 interliga a disponibilidade de nutrientes com o crescimento celular através da ativação de processos anabólicos, como a síntese proteica e biossíntese ribossomal e, paralelamente, inibe processos catabólicos como a autofagia (Figura 8). Em levedura, há um complexo denominado EGO (EGOC: EGO Complex) envolvido na ativação de TORC1 a partir da disponibilidade de aminoácidos (Binda *et al.*, 2009). O EGOC, em levedura, é constituído pelas proteínas Ego/Meh1, Ego/Slm4, Gtr2 e Gtr1, que sinalizam a presença de aminoácidos e regula positivamente TORC1 (Gao *et al.*, 2005; Gao e Kaiser, 2006). O complexo EGO é importante para o reestabelecimento do crescimento celular após tratamento com rapamicina. Tanto a perda deste complexo como de subunidades de TORC1 (Tco89) resultam na perda da capacidade de recuperação do crescimento após exposição da célula à rapamicina (Dubouloz *et al.*, 2005).

A sinalização do complexo TORC1 ocorre em resposta à diversos tipos de estresses e estímulos do meio, e um dos mecanismos de regulação deste complexo é pela disponibilidade de aminoácidos (Figura 10).

Figura 10. Sinalização da via TOR

Reproduzido de Otsubo *et al* (2017)

As proteínas Rag GTPases (constituintes da família Ras-related GTP-binding proteins) são altamente conservadas desde levedura até humanos e em *S. cerevisiae* são denominadas Gtr1 e Gtr2. Estas proteínas (Gtr1 e Gtr2) formam heterodímeros, controlam as aminoácido-permeases (como Gap1) e microautofagia, são essenciais para a sinalização de TOR (Sancak et al., 2008; Kim et al., 2008). A regulação da atividade de TORC1 via Gtr1/Gtr2 é dependente do estado do nucleotídeo que se liga a Gtr1 e Gtr2. Por exemplo, dímeros Gtr1^{GTP} / Gtr2 ou Gtr1/Gtr2^{GDP} ativam TORC1, enquanto que Gtr2^{GTP} / Gtr1 inibe a atividade de TORC1. Curiosamente, Gtr1^{GDP} independentemente do tipo de nucleotídeo ligado à Gtr2, também inibe TORC1. Ou seja, Gtr1^{GTP} e Gtr2^{GDP} ativam e Gtr1^{GDP} e Gtr2^{GTP} inibem TORC1 (Binda et al., 2009). Este status de ligação de nucleotídeo citado (GTP ou GDP) é regulado pelo fator Vam6 (guanine nucleotide exchange factor), que colocaliza com o complexo EGO/TORC1 na membrana do vacúolo (Binda et al., 2009).

Em células de mamíferos os aminoácidos essenciais L-triptofano, L-fenilalanina, L-arginina e especialmente L-leucina regulam a atividade de TORC1 após serem

transportados para dentro da célula (Nicklin *et al.*, 2009). A inibição de TORC1 pela retirada destes aminoácidos por 1-2h do meio parece ser regulada pela ativação da kinase GCN2. Após a ativação, essa kinase fosforila o fator de iniciação de transcrição eIF-2 α e induz o aumento da tradução de um mRNA específico que codifica GCN4, um ativador transcricional da biossíntese de enzimas envolvidas na biossíntese de aminoácidos. A ativação de GCN4 ocorre tanto em situação de privação de aminoácidos como limitação de glicose (Natarajan *et al.*, 2001).

1.7.2 A sinalização TOR e a longevidade

A atividade de TOR está diretamente relacionada com a longevidade celular, uma vez que a inibição de TOR implica no aumento da sobrevivência em diferentes organismos. A redução da atividade de TORC1 está relacionada com o aumento da respiração mitocondrial durante a fase log de crescimento, na qual há um aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Pan *et al* (2011) descrevem a relação entre a atividade mitocondrial com TOR, ROS e tempo de vida. A superexpressão de superóxido dismutase bloqueia o aumento de ROS, o que provoca uma redução na capacidade de extensão do tempo de vida pela inibição de TOR. A ativação da sinalização de TOR interfere na resposta ao estresse durante a entrada da célula na fase estacionária, via inibição dos fatores de transcrição de resistência ao estresse Msn2p/Msn4p e Gis1p (Cameroni *et al.*, 2004).

Tanto a sinalização por TOR-SCH9 ou via Ras-adenilato ciclase- Proteína kinase A (Ras-AC-PKA) são ativadas pela disponibilidade de glicose, aminoácidos e outros nutrientes e a deleção de componentes destas vias retardam o envelhecimento cronológico. Fatores de transcrição de resposta ao estresse, como Msn2p/Msn4p, reduzem a atividade de Ras-AC-PKA na extensão do CLS (Fabrizio *et al.*, 2001).

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, acreditamos que as diferenças observadas dentre as linhagens mutantes relativamente à expectativa de vida cronológica (CLS), estariam associadas à sinalização por TOR e autofagia, uma vez que houve alterações nos níveis de proteínas relacionadas com a biossíntese de aminoácidos que regulam diretamente a atividade de TOR. Esses dados estão sendo validados por experimentos de expressão gênica (RT-PCR). Estamos no momento realizando experimentos no sentido também de validar a participação dessa importante via de regulação da longevidade celular de leveduras: western blot para análise da atividade da via de sinalização de TOR por meio da verificação dos alvos fosforiláveis de TOR, aplicação da técnica de CRISPR/Cas9 para deleção de genes que codificam as proteínas de biossíntese de aminoácidos (arginina e leucina) que regulam a atividade de TOR; além da superexpressão destes mesmos genes para análise do fenótipo celular. A deleção e superexpressão terão por objetivo avaliar se após os procedimentos os fenótipos seriam revertidos, confirmando assim a importância dos genes na regulação do CLS no modelo aqui estudado. Esses experimentos trariam os subsídios necessários para a confecção de um manuscrito para publicação.

REFERÊNCIAS

- ARAKI T.; UESONO Y.; OGUCHI T.; TOH-E A. LAS24/KOG1, a component of the TOR complex 1 (TORC1), is needed for resistance to local anesthetic tetracaine and normal distribution of actin cytoskeleton in yeast. **Genes Genet. Syst.** v. 80, p. 325–343. 2005.
- ASHRAFI, K. et al. Passage through stationary phase advances replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 16, p. 9100-9105, 1999.
- BAUGH, J. M.; VIKTOROVA, E. G.; PILIPENKO, E. V. Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. **J. Mol. Biol.**, v. 386, p. 814-827, 2009.
- BINDA, M. et al. The Vam6 GEF controls TORC1 by activating the EGO complex. **Mol Cell**. v. 35, n. 5, p. 563-573, 2009.
- BOY-MARCOTTE, Emmanuelle et al. High cAMP levels antagonize the reprogramming of gene expression that occurs at the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 142, n. 3, p. 459-467, 1996.
- BUTTERFIELD, D. A.; ABDUL, H. M.; NEWMAN, S.; REED, T. Redox proteomics in some age-related neurodegenerative disorders or models thereof. **NeuroRx**, v. 3, n. 3, p. 344-357, 2006.
- CAMERONI, E. et al. The novel yeast PAS kinase Rim15 orchestrates G0-associated antioxidant defense mechanisms. **Cell cycle**, v. 3, n. 4, p. 460-466, 2004.
- CHARLESWORTH, B. Fisher, Medawar, Hamilton and the evolution of aging. **Genetics**, v. 156, n. 3, p. 927-931, 2000.
- CHOI, J. H.; LOU, W.; VANCURA, A. A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 45, p. 29915-29922, 1998.
- CHONDROGIANNI, N; GONOS, E. S. Proteasome activation as a novel antiaging strategy. **IUBMB life**, v. 60, n. 10, p. 651-655, 2008.
- CIECHANOVER, A. *et al.* ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 3, p. 1365-1368, 1980.
- CIECHANOVER, Aaron. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 6, n. 1, p. 79-87, 2005.

COUX, O.; TANAKA, K., GOLDBERG, A. L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. **Annu.Rev. Biochem.**, v. 65, p. 801-847, 1996.

CRESPO, J. L.; HALL, M. N. Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 4, p. 579-591, 2002.

DAHLMANN, B. et al. Purification and characterization of a multicatalytic high-molecular-mass proteinase from rat skeletal muscle. **Biochemical Journal**, v. 228, n. 1, p. 161-170, 1985.

DAVIES, K. J. A. Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems, **Life**, v. 50, n. 4-5, p. 279–289, 2000.

DEMASI, M.; SHRINGARPURE, R.; DAVIES, K. J. Glutathiolation of the proteasome proteolytic inhibitors. **Arch Biochem Biophys.**, v. 389, n.2, p. 254-263, 2001.

DEMASI, M.; SILVA, G. M.; NETTO, L. E. 20S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is S-glutathionylated. **J Biol Chem.**, v. 278, n.1, p. 679-685, 2003.

DEMASI, M. *et al.* Redox regulation of the proteasome via S-glutathionylation. **Redox Biol.**, v. 2, p. 44–51, 2014.

DE VIRGILIO C., LOEWITH R. The TOR signalling network from yeast to man. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v.38, p. 1476–1481. 2006.

DRABIK, A.; SILBERRING, J. Quantitative Measurements in Proteomics: Mass Spectrometry. In: **Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (Second Edition)**. 2016. p. 145-160.

DUBOULOZ, F. et al. The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. **Mol. Cell**, v.19. p. 15-26. 2005.

FABRIZIO, Paola et al. Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. **Science**, v. 292, n. 5515, p. 288-290, 2001.

FABRIZIO, P; LONGO, V. D. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. **Aging cell**, v. 2, n. 2, p. 73-81, 2003.

FABRIZIO, P. et al. Chronological aging-independent replicative life span regulation by Msn2/Msn4 and Sod2 in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS letters**, v. 557, n. 1-3, p. 136-142, 2004.

FABRIZIO, P. *et al.* Sir2 blocks extreme life-span extension. **Cell**, v. 123, n. 4, p. 655-667, 2005.

FARKAS, I. *et al.* Two glycogen synthase isoforms in *Saccharomyces cerevisiae* are coded by distinct genes that are differentially controlled. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 24, p. 15602-15607, 1991.

FERRINGTON, D. A., *et al.* Selective degradation of oxidized calmodulin by the 20S proteasome. **J Biol Chem.**, v. 276, n.2, p. 937-943, 2001.

FINCH, C.E. Longevity, Senescence, and the Genome. Chicago, University of Chicago Press, 1990.

GAO, X. D; WANG, J.; KEPLER-ROSS, S.; DEAN, N. ERS1 encodes a functional homologue of the human lysosomal cystine transporter. **FEBS J.**, v. 272, p. 2497-2511. 2005.

GAO, M; KAISER, C.A. A conserved GTPase-containing complex is required for intracellular sorting of the general amino-acid permease in yeast **Nat. Cell Biol.**, v.8. p. 657-667. 2006.

GHEZZI P. Oxidoreduction of protein thiols in redox regulation. **Biochem Soc Trans.**, v.33, n. Pt 6, p.1378-1381, 2005.

GILBERT, H. F. Thiol/dissulfide 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, n. 2, p. 201-212, 2004.

GLICKMAN, M. H., *et al.* The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. **Mol. Cell. Biol.**, v. 18, n. 6, p. 3149-3162, 1998.

GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiological reviews**, v. 82, n. 2, p. 373-428, 2002.

GOLDBERG, A. L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 895-899, 2003.

GOLDSTEIN, G. *et al.* Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 1, p. 11-15, 1975.

GRANOT, David; SNYDER, Michael. Glucose induces cAMP-independent growth-related changes in stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 13, p. 5724-5728, 1991.

GROLL, M. *et al.* A gated channel into the proteasome core particle. **Nat Struct Biol.**, v.7, p. 1062-1067, 2000.

HA, C. W.; HUH, W. The implication of Sir2 in replicative aging and senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. **Aging (Albany NY)**, v. 3, n. 3, p. 319, 2011.

HARDY, T. A.; HUANG, D.; ROACH, P. J. Interactions between cAMP-dependent and SNF1 protein kinases in the control of glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 45, p. 27907-27913, 1994.

HARRIS, N. *et al.* Increasing *Saccharomyces cerevisiae* stress resistance, through the overactivation of the heat shock response resulting from defects in the Hsp90 chaperone, does not extend replicative life span but can be associated with slower chronological ageing of nondividing cells. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 265, n. 2, p. 258-263, 2001.

HARRIS, N. *et al.* MnSOD overexpression extends the yeast chronological (G0) life span but acts independently of Sir2p histone deacetylase to shorten the replicative life span of dividing cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 12, p. 1599-1606, 2003.

HARRISON, D. E. *et al.* Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. **nature**, v. 460, n. 7253, p. 392, 2009.

HARTL, F. U.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 324, 2011.

HEITMAN J, MOVVA NR, HALL MN: Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. **Science**. v. 253, p. 905-909. 1991.

HELLIWELL, S. B. *etal.* TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. **Molecular biology of the cell**, v. 5, n. 1, p. 105-118, 1994.

HERSHKO, A. *et al.* Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 13, p. 8206-8214, 1983.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A.; VARSHAVSKY, A. The ubiquitin system. **Nature medicine**, v. 6, n. 10, p. 1073-1081, 2000.

HIRANO, H.; KIMURA, Y.; KIMURA, A. Biological significance of co- and post-translational modifications of the yeast 26S proteasome. **Journal of proteomics**, v. 134, p. 37-46, 2016.

INAI, Y.; NISHIKIMI, M. Increased degradation of oxidized proteins in yeast defective in 26S proteasome assembly. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 404, n.2, p. 279-284, 2002.

JACINTO, E, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. **Nat Cell Biol.** 6:1122-1128. 2004.

JORGENSEN, P; TYERS, M; WARNER, J.R. Forging the factory: ribosome synthesis and growth control in budding yeast. In Cell growth. Control of cell size. **Cold Spring Harbor Laboratory Press.** p. 329-370. 2004

JUNG, T.; CATALGOL, B.; GRUNE, T. The proteasomal system. **Mol Aspects Med.**, v. 30, n.4, p. 191-296, 2009.

KAEBERLEIN, M; MCVEY, M.; GUARENTE, L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. **Genes & development**, v. 13, n. 19, p. 2570-2580, 1999.

KAEBERLEIN, M; KENNEDY, B. K. Hot topics in aging research: protein translation and TOR signaling. **Aging cell**, v. 10, n. 2, p. 185-190, 2010.

KÄSTLE, M.; REEG, S.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; GRUNE, T. Chaperones, but not oxidized proteins, are ubiquitinated after oxidative stress. **Free Radic Biol Med.**, v. 53, n.7, p. 1468-1477, 2012.

KATSIKI, M. et al. The olive constituent oleuropein exhibits proteasome stimulatory properties in vitro and confers life span extension of human embryonic fibroblasts. **Rejuvenation Research**, v. 10, n. 2, p. 157-172, 2007.

KELLER, J. N.; HANNI, K. B.; MARKESBERY, W. R. Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 75, n. 1, p. 436-439, 2000.

KIM, D.H, et al. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. **Mol Cell.** v. 11, p. 895-904. 2003.

KIM, E., et al. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. **Nat Cell Biol.** v. 10, p.935–945, 2008.

KOGA, H; KAUSHIK, S; CUERVO, A. M. Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. **Ageing research reviews**, v. 10, n. 2, p. 205-215, 2011.

KÖHLER, A. et al. The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. **Molecular cell**, v. 7, n. 6, p. 1143-1152, 2001.

KWAK, M. K. et al. Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. 23, p. 8786-8794, 2003.

KWAK, M. K. et al. Role of increased expression of the proteasome in the protective effects of sulforaphane against hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity in murine neuroblastoma cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 5, p. 809-817, 2007.

LEME, J. M. M. 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. 2016. 133 p. Tese. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2016.

LICHTENBERG, M. *et al.* The Parkinson's disease protein LRRK2 impairs proteasome substrate clearance without affecting proteasome catalytic activity. **Cell death & disease**, v. 2, n. 8, p. e196, 2011.

LILLIE, S. H.; PRINGLE, J. R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. **Journal of bacteriology**, v. 143, n. 3, p. 1384-1394, 1980.

LILIENBAUM, A. Relationship between the proteasomal system and autophagy. **International journal of biochemistry and molecular biology**, v. 4, n. 1, p. 1, 2013.

LIU, H.; SADYGOV, R. G.; YATES, J. R. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. **Analytical chemistry**, v. 76, n. 14, p. 4193-4201, 2004.

LIVNAT-LEVANON N, *et al.*, Reversible 26S proteasome disassembly upon mitochondrial stress. **Cell Rep.**, v.7, n.5, p.1371-1380, 2014.

LOEWITH, R. et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. **Mol. Cell**. v.10, p. 457–468. 2002.

LOEWITH, R; HALL, M.N. TOR signaling in yeast: temporal and spatial control of cell growth. In Cell growth – control of cell size. Edited by Hall MN, Raff M, Thomas G: **Cold Spring Harbour Laboratory Press**. p. 139-165. 2004.

LONGO, V, *et al.*, Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell Metab.**, v. 16, p. 18-31. 2012.

LÖWE, J., *et al.* Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. **Science**. v. 268, n. 5210, p. 533-539, 1995.

MARION, R. M. et al. Sfp1 is a stress-and nutrient-sensitive regulator of ribosomal protein gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 40, p. 14315-14322, 2004.

MARTIN, D. E.; SOULARD, A.; HALL, M. N. TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor FHL1. **Cell**, v. 119, n. 7, p. 969-979, 2004.

MEDVEDIK, O. *et al.* MSN2 and MSN4 link calorie restriction and TOR to sirtuin-mediated lifespan extension in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS biology**, v. 5, n. 10, p. e261, 2007.

MEHTA, R. *et al.* Regulation of mRNA translation as a conserved mechanism of longevity control. In: **Protein Metabolism and Homeostasis in Aging**. Springer, Boston, MA, p. 14-29. 2010.

NATARAJAN, K. *et al.* Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. **Molecular and cellular biology**, v. 21, n. 13, p. 4347-4368, 2001.

NAVON, A.; GOLDBERG, A. L. Proteins are unfolded on the surface of the ATPase ring before transport into the proteasome. **Mol. Cell.**, v. 8, n.6, p. 1339-1349, 2001.

Nomura, M. Ribosomal RNA genes, RNA polymerases, nucleolar structures, and synthesis of rRNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 66, p. 555-565. 2001.

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. 2015. 74p. Dissertação. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2015.

OLD, W. M. *et al.* Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. **Molecular & cellular proteomics**, v. 4, n. 10, p. 1487-1502, 2005.

OTSUBO, Y. *et al.* TORC1-dependent phosphorylation targets in fission yeast. **Biomolecules**, v. 7, n. 3, p. 50, 2017.

PACIFICI, R. E.; DAVIES K. J. A. Protein degradation as an index of oxidative stress. **MethodsEnzymol.**, v. 186, p. 485–502, 1990.

PACIFICI, R. E.; KONO, Y.; DAVIES, K. J. Hydrophobicity as the signal for selective degradation of hydroxyl radical-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex proteasome. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 21, p. 15405-15411, 1993.

PALMER, A., *et al.* Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. **Biochem J.**, v. 316, n. Pt 2, p. 401–407, 1996.

PAN, Y *et al.* Metabolic regulation, mitochondria and the life-prolonging effect of rapamycin: a mini-review. **Gerontology**, v. 58, n. 6, p. 524-530, 2012.

PARROU, J. L.; TESTE, M. A.; FRANÇOIS, J. Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. **Microbiology**, v. 143, n. 6, p. 1891-1900, 1997.

PENDE, Mario *et al.* S6K1^{-/-}/S6K2^{-/-} mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 8, p. 3112-3124, 2004.

PICKART, C. M.; EDDINS, M. J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1695, n. 1-3, p. 55-72, 2004.

POWELL, D W. *et al.* Cluster analysis of mass spectrometry data reveals a novel component of SAGA. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 16, p. 7249-7259, 2004.

POWERS, T; WALTER, P. Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Biol Cell**. v. 10, p. 987-1000. 1999.

REINKE, A. *et al.* TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.** v. 279, p. 14752–14762. 2004.

REINHECKEL, T *et al.* Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. **Biochem J**, v. 335, n. Pt 3, p. 637-642, 1998.

REINHECKEL, T; ULLRICH, O. SITTE, N; GRUNE, T. Differential impairment of 20S and 26S proteasome activities in human hepatopoietic K562 cells during oxidative stress. **Arch Biochem Biophys**, v. 377, n. 1, p. 65-68, 2000.

RIVETT, A. J.; PALMER, A. & KNECHT, E. Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. **J Histochem Cytochem.**, v. 40, n.8, p. 1165-1172, 1992.

RIVETT, A. J. Intracellular distribution of proteasomes. **Current opinion in immunology**, v. 10, n. 1, p. 110-114, 1998.

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, n. 5, p. 761-771, 1994.

ROHDE, J. R. *et al.* Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 2, p. 153-160, 2008.

SANCAK, Y. et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. **Science**, v. 320, n. 5882, p. 1496-1501, 2008.

SARBASSOV, D. et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. **Curr Biol**, v.14, p.1296-1302. 2004.

SCHLESINGER, D. H.; GOLDSTEIN, G.; NIALL, H. D. The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. **Biochemistry**. v. 14, n.10, p. 2214-2218, 1975.

SCHMELZLE, T; BECK, T; MARTIN, D.E; HALL, M.N. Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. **Mol Cell Biol**. v. 24, p. 338-351. 2004.

SCHMELZLE, Tobias; HALL, Michael N. TOR, a central controller of cell growth. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 253-262, 2000.

SHELTON, M.D.; MIEYAL, J. J. Regulation by reversible S-glutathionylation: molecular targets implicated in inflammatory diseases. **Mol Cells**, v. 25, n.3, p. 332-346, 2008.

SHRINGARPURE, R. *et al.* Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n.1, p. 311-318, 2003.

SILVA, G.M., *et al.* Role of glutaredoxin 2 and cytosolic thioredoxins in cysteinyl-based redox modification of the 20S proteasome. **FEBS J**. v. 275, n.11, p. 2942-2955, 2008.

SILVA, G. M. Estudo e caracterização do processo de glutatilação e desglutatilação da unidade 20S do proteassomo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*: Implicações na regulação do metabolismo redox intracelular e na geração de peptídeos. Tese de Doutorado. 2010. 159 p. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

SILVA G.M, *et al.* Redox control of 20S proteasome gating. **Antioxid Redox Signal**. v. 16, n.11, p. 1183-1194, 2012.

STADTMAN, E.R. Protein oxidation and aging. **Free Radic Res.**, v. 40, n. 5074, p. 1250-1258, 2006

STRACKA, D. et al. Nitrogen source activates TOR (target of rapamycin) complex 1 via glutamine and independently of Gtr/Rag proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 36, p. 25010-25020, 2014.

SUN, J. *et al.* Divergent roles of RAS1 and RAS2 in yeast longevity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 28, p. 18638-18645, 1994.

- TADI, D. et al. Selection of genes repressed by cAMP that are induced by nutritional limitation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 15, n. 16, p. 1733-1745, 1999.
- TANAKA, K. Molecular biology of proteasomes. **Mol Biol Rep.**, v. 21, n.1, p. 21-26, 1995.
- TANAKA, K. The proteasome: Overview of structure and functions. **Proc. Jpn. Acad., Ser. B.**, v. 85, n.1, p. 12-36, 2009.
- TOMARU, U. *et al.* Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. **The American journal of pathology**, v. 180, n. 3, p. 963-972, 2012.
- VARSHAVSKY, A. Regulated protein degradation. **Trends Biochem.Sci.**, v. 30, n.6, p. 283-286, 2005.
- VELLAI, T.; TAKÁCS-VELLAI, K. Regulation of protein turnover by longevity pathways. In: **Protein Metabolism and Homeostasis in Aging**. Springer, Boston, MA, p. 69-80. 2010
- VERNACE, Vita A. et al. Aging perturbs 26S proteasome assembly in *Drosophila melanogaster*. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 11, p. 2672-2682, 2007.
- WARNER, J.R. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. **Trends Biochem Sci.** v. 24, p. 437-440. 1999.
- WANG, X.; YEN, J. KAISER, P.; HUANG, L. Regulation of the 26S proteasome complex during oxidative stress. **Science Sign.** v. 3, n.151, p. ra88, 2010.
- WERNER-WASHBURNE, M. et al. Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular microbiology**, v. 19, n. 6, p. 1159-1166, 1996.
- WIGLEY, W. C., *et al.* Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. **J Cell Biol.**, v. 145, n.3, p. 481-490, 1999.
- WILKINSON, K. D. et al. Metabolism of the polyubiquitin degradation signal: structure, mechanism, and role of isopeptidase T. **Biochemistry**, v. 34, n. 44, p. 14535-14546, 1995.
- ZARAGOZA, D; GHAVIDEL, A; HEITMAN, J; SCHULTZ, M.C. Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. **Mol Cell Biol.** v. 18, p. 4463-4470. 1998
- ZYBAILOV, B. *et al.* Statistical analysis of membrane proteome expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of proteome research**, v. 5, n. 9, p. 2339-2347, 2006.