

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Fernanda Menezes Cerqueira

**Conseqüências da expressão da enzima Cu,Zn-superóxido
dismutase (SOD1) e sua mutante G93A em neuroblastomas.**

Implicações para a esclerose lateral amiotrófica.

São Paulo

09/02/2007

Fernanda Menezes Cerqueira

Conseqüências da expressão da enzima Cu,Zn-superóxido dismutase (SOD1) e sua mutante G93A em neuroblastomas. Implicações para a esclerose lateral amiotrófica.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências
(Bioquímica)

Orientadora: Profa. Dra. Ohara Augusto

São Paulo

2007

Fernanda Menezes Cerqueira

Conseqüências da expressão da enzima Cu,Zn-superóxido dismutase (SOD1) e sua mutante G93A em neuroblastomas. Implicações para a esclerose lateral amiotrófica.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Aos meus pais, Manoel e Regina

Agradecimentos

À Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida e ao Conselho nacional de desenvolvimento tecnológico (CNPq-Projeto Milênio Redoxoma).

Agradeço de todo o coração aos meus familiares, especialmente às minhas queridas irmãs Elvira e Livia, aos professores que contribuíram para a minha formação, com os quais tive a honra de aprender muito (Marisa Medeiros, Ivan Schumacher, Mara Reis, Margareth Veloso, Cirano José Ulhoa, Kátia Flávia Fernandes, Bayardo Torres, Marilene Demasi, Clélia Ferreira, Regina Baldini, Iolanda Cuccovia) e aos funcionários do Instituto de Química, especialmente aos meninos da secretaria (Milton, Emiliano e Marcelo) e às técnicas do laboratório (Edlaine e Berê).

Com grande alegria agradeço aos inúmeros colegas e amigos dos vários laboratórios do Instituto de Química (lab da profa. Marisa Medeiros, lab da profa. Alicia Kowaltowski, lab do prof. Francisco Laurindo, lab do prof. Hugo Armelin, lab do prof. Paolo di Mascio, lab da profa. Aline, lab do prof. Walter Coli e Maria Júlia Manso, lab. da profa Mari Cleide Sogayar, lab do prof. Ronaldo Quaggio), do Instituto Butantan (lab da profa. Marilene Demasi) e do ICB (lab prof. Rui Curi e lab prof. Gustavo Amarante-Mendes) com os quais pude contar sempre, desde reagentes emprestados a discussões científicas políticas e filosóficas.

Agradeço também aos meus amigos. Ah, meus amigos.... Primeiro agradeço a Deus por ter conhecido pessoas como vocês e também agradeço a mim por ter me permitido viver as mais profundas e belas experiências de amizade. Alguns são amigos antigos, outros bem recentes, mas cada um faz parte do que sou Dona Érica Isabel (minha Ericucha), senhorita Livea (a bailarina mais linda do mundo), Heloisa (helô, a elegante), Cláudia Brochini, Giselle Cerchiaro e o marido Arthur (o casal mais figura), Fabrício (artista em múltiplas versões), Lucas Guerra (Luquito, eu te

amo ...até aqui na folha de agradecimentos), Daniel Trindade (sem palavras), Renata Ogusucu (é sempre bom ter uma amiga que sabe sobre um monte de coisa...inacreditável), Jacqueline Salotti, Rita Figueredo, Adriano Sartori, Diórges, Alliny Naves (a amiga foca, ah-ah-ah), Adriana Latorraca, Roberto Nascimento, Samanta, aos queridos amigos do Crusp (Vital, Evandro, Luciana, Eptácio), aos amigos do Instituto Lin Pin Chuan que nem sabem que são meus amigos, mas são (e como são), aos amigos lesionários (uhhh Verão.....) e aos profissionais da balada (PDBs, o prazer foi todo meu). Amo muito todos vocês.

Por último e, com certeza mais importante, é o agradecimento à minha orientadora, a profa. Ohara. É o mais importante porque sem ela o restante não existiria. Nunca saberei expressar minha gratidão e admiração, neste caso apenas agradeço imensamente por tudo.

"Nosso medo mais profundo não é o de não sermos bons o suficiente. O nosso medo mais profundo é o de sermos poderosos além das medidas. É a nossa luz, e não a nossa escuridão o que mais tememos. Por isso nos perguntamos: Quem somos para nos considerarmos brilhantes, maravilhosos, talentosos, fabulosos? Nós somos crianças de Deus. A nossa falsa humildade não vai servir o mundo. Não há nada de iluminado nesse encolher-se para que outros não se sintam inseguros à nossa volta. Estamos todos aqui para irradiar como fazem as crianças, e a medida em que deixamos a nossa luz brilhar, inconscientemente damos aos outros permissão para que brilhem também. A medida que nos liberamos do nosso próprio medo, a nossa presença, automaticamente libera outros para que façam o mesmo." (Nelson Mandela)

RESUMO

Cerqueira, F. M. **Conseqüências da expressão da enzima Cu,Zn-superóxido dismutase (SOD1) e sua mutante G93A em neuroblastomas. Implicações para a esclerose lateral amiotrófica.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Cerca de 20 % dos casos familiares de esclerose lateral amiotrófica (ELAf) são causados por mutações na enzima Cu,Zn-superóxido dismutase (SOD1). Inicialmente se supôs que as enzimas mutantes teriam a atividade SOD comprometida, entretanto isto não foi comprovado. Atualmente, considera-se que as enzimas mutantes adquiram propriedades tóxicas. Quais seriam estas propriedades e como levariam à degeneração do neurônio motor são questões ainda não respondidas. Neste trabalho, comparamos neuroblastomas humanos transfectados com SOD1 G93A associada à ELAf (SH-SY5Y^{G93A}), e SOD1 selvagem (SH-SY5Y^{WT}) com células parentais (SH-SY5Y) em relação ao crescimento, viabilidade, produção basal de oxidantes, atividades SOD e peroxidásica e modificações estruturais da SOD. As células transfectadas apresentaram aumento na taxa de crescimento e na produção basal de oxidantes. As células SH-SY5Y^{WT} e SH-SY5Y^{G93A} mantiveram a expressão de SOD1 e atividade consistente com o aumento esperado de duas vezes, em estágios iniciais de cultura. A atividade peroxidásica do homogenato da célula SH-SY5Y^{G93A} foi maior. Após quatro semanas, a linhagem SH-SY5Y^{G93A} manteve a expressão de SOD1, mas as atividades dismutásica e peroxidásica diminuíram. A expressão de SOD1 aumentou a proporção de formas alteradas de SOD1, como enzima reduzida, múltímeros formados por ponte dissulfeto e formas insolúveis em detergente, particularmente na linhagem SH-SY5Y^{G93A}. Entre estas formas insolúveis, identificamos um dímero covalente de SOD. Estas formas alteradas provavelmente são responsáveis pela ativação do proteassomo e estresse do retículo endoplasmático, verificados nas células transfectadas. Concluindo, a superexpressão da SOD1 foi suficiente para elevar as formas imaturas e oligomerizadas de SOD1 e a oxidação basal, e a mutação G93A ressaltou estes processos. **Palavras-chave:** SOD1, agregação protéica, ligação dissulfeto, dímero covalente de SOD, ELA.

ABSTRACT

Cerqueira, F. M. **Some consequences of SOD1 and G93A mutant expression in neuroblastomas. Implications for amyotrophic lateral sclerosis (ALS).** Masters Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Some familial ALS (fALS) are caused by mutations in the Cu,Zn-superoxide dismutase enzyme (SOD1). It was thought that the mutated enzymes would have impaired SOD activity, but this has not been corroborated so far. Presently, it is more accepted that the mutated enzymes acquire a new toxic function. What this new toxic function is and how it relates to the degeneration of motor neurons remains debatable. Here, we compared human neuroblastoma cells transfected with fALS mutant G93A (SH-SY5Y^{G93A}) or wild-type SOD1 (SH-SY5Y^{WT}) with parent cells (SH-SY5Y) in regard to growth, viability, basal oxidant production, SOD and peroxidase activities, and SOD forms. Transfected cells presented increased growth rate and basal oxidant production. SH-SY5Y^{WT} and SH-SY5Y^{G93A} cells in early culture stage showed SOD expression and activity consistent with the expected two-fold increase; SH-SY5Y^{WT} homogenates showed increased peroxidase activity. After four weeks, SH-SY5Y^{G93A} maintained SOD1 expression levels but peroxidase and dismutase activities were lower. SOD1 expression increased the levels of altered SOD1 forms such as the reduced enzyme, disulfide multimers and detergent-insoluble forms, particularly in SH-SY5Y^{G93A} cells. Among the insoluble forms a covalent SOD dimer was identified. These altered SOD forms are probably responsible for proteasome activation and endoplasmic reticulum stress response verified in transfected cells. In conclusion, SOD1 over-expression was sufficient to increase intracellular immature and oligomerized SOD1 forms and basal oxidation and the G93A mutation enhanced these processes. **Keywords:** SOD1, protein aggregation, disulfide bond, SOD covalent dimer, ALS.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – adenosina trifosfato
Bac-LRR-MCA – N-t-bac-leucina-arginina-7-anidro-4-metilcoumarina
BiP – *binding immunoglobulin protein*
BSA- albumina sérica bovina
Cu,Zn-SOD – superóxido dismutase de cobre e zinco
Cu,E-SOD- superóxido dismutase de cobre e zinco desprovida de zinco
DEMEM/HAM F2 – Meio dulbeco MEM com nutriente F-12
DTPA – dietilenetriaminapenta acético
DCF – diclorofluoresceína
DHR – dihidrorodamina 1,2,3
DNA – ácido desoxiribonucléico
DTT - ditioneitol
ELA – esclerose lateral amiotrófica
e-ELA – esclerose lateral amiotrófica esporádica
ELA-FTP – esclerose lateral amiotrófica com demência frontal-temporal
ELA-FTPD- esclerose lateral amiotrófica com demência frontal-temporal associada à doença de Parkinson
GSH – glutationa reduzida
GSSG – glutationa oxidada
HE - hidroetidina
H₂DCF-DA – diclorodihidrofluoresceína diacetato
KDEL – lisina-aspartato-glutamato-leucina
LLVY-MAC - succinil-leucina-leucina-valina-tirosina-amido-4-metilcoumarina
Mn-SOD- superóxido dismutase de manganês
NBT – azul de nitrotetrazolium
PAGE – gel de poliacrilamida
RNA- ácido ribonucléico
SOD 1– superóxido-dismutase de cobre e zinco citosólica
SOD WT – superóxido dismutase selvagem
SDS – dodecil sulfato de sódio
TEMED – N, N, N', N'-tetrametileno-diamina

Sumário

1	Introdução	12
1.1	Esclerose lateral amiotrófica (ELA)	12
1.2	SOD1 e mutações associadas à ELA	16
1.2.1	A SOD1	16
1.2.1	Mutações na SOD1 associadas à ELA	19
1.3	Degeneração dos neurônios motores	24
2	Objetivos	29
3	Material e métodos	30
3.1	Materiais	30
3.2	Métodos	31
3.2.1	Cultura de células	31
3.2.2	Curva de crescimento	32
3.2.3	Produção de espécies oxidantes intracelulares	32
3.2.4	Viabilidade celular	33
3.2.5	Monitoramento de apoptose	34
3.2.5.1	Fragmentação do DNA	34
3.2.5.2	Inversão de fosfatidilserina	35
3.2.6	Obtenção de homogenato celular	36
3.2.7	Dosagem de proteína	37
3.2.8	Western Blotting anti-SOD	37
3.2.9	Atividade superóxido dismutásica	39
3.2.10	Atividade peroxidásica	39
3.2.11	Estresse do retículo endoplasmático	41
3.2.12	Atividade do proteassomo	41
4	Resultados e discussão	43
4.1	Características dos neuroblastomas SH-SY5Y, SH-SY5Y ^{WT} e SH-SY5Y ^{G93A}	43
4.1.1	Curva de crescimento	43

	11
4.1.2 Expressão da SOD1	44
4.1.3 Produção de oxidantes intracelulares	45
4.1.4 Medidas de viabilidade e apoptose	46
4.2 Atividades superóxido-dismutásica e peroxidásica dos extratos celulares	50
4.3 Formas imaturas e oligomerizadas de SOD1 nos lisados celulares	56
4.4 Respostas celulares às formas imaturas e oligomerizadas de SOD1: Estresse do retículo endoplasmático e ativação do proteassomo	62
5 Considerações finais	68
6 Conclusão	72
Referências bibliográficas	73
Súmula curricular	83

1 Introdução

1.1 Esclerose Lateral Amiotrófica

Há 135 anos o neurologista Jean-Martin Charcot descreveu a esclerose lateral amiotrófica (ELA) como uma paralisia progressiva de membros superiores e inferiores em decorrência da degeneração e morte seletiva de neurônios motores da medula espinhal, tronco e córtex cerebral (Goetz, 2000). Charcot identificou pacientes com fraqueza muscular sem dificuldades sensoriais, comprometimento do intelecto, epilepsias ou outros movimentos involuntários (Goetz, 2000).

Além do diagnóstico, Charcot descreveu precisamente a evolução da ELA. Embora com algumas exceções, inicialmente ocorre paralisia de membros superiores sem perda de sensação, acompanhada de rigidez muscular resultante de espasmo e deformação muscular por contratura. Posteriormente, os membros inferiores são acometidos de espasmos intermitentes e rigidez, tornando-se inaptos à caminhada. A atrofia muscular é geralmente mais lenta que a dos braços e mãos e não há o comprometimento dos músculos da bexiga e reto. Na última fase, o quadro já estabelecido piora e surgem sintomas bulbares. Há paralisia da língua, que evolui para a incapacidade de falar. A paralisia da úvula e da laringe levam à disfagia. Finalmente o nervo vago é afetado, dificultando a respiração e a circulação, e levando à morte a pessoa já fraca e mal-nutrida (Rowland, 2001).

Após o início da doença os eventos evoluem rapidamente e a morte ocorre dentro de 2-3 anos na maioria dos casos (Rowland, 2001). Em cerca de 10 % dos pacientes a progressão é mais lenta e a sobrevivência pode se estender por mais de 10 anos (Turner *et al.*, 2003).

Investigações científicas atuais têm demonstrado o envolvimento de partes extramotoras do sistema nervoso central, como por exemplo o trato sensorial e espinho-cerebral e injúria celular de grupos neurais da substância negra e de células granulares do hipocampo. Verifica-se

demência em 2-3% dos pacientes e testes neuropsicológicos demonstram mudanças neurofisiológicas em cerca de 30 %, particularmente na função frontal. A partir destas evoluções, a ELA tem sido considerada uma doença multi-sistêmica, na qual os neurônios motores são afetados no estágio inicial e de forma mais proeminente (Ince, 1998).

Inicialmente conhecida como doença de Charcot e atualmente chamada de ELA ou doença do neurônio motor e de doença de Lou Gehrig nos Estados Unidos, é a doença neuro-motora mais comum, com incidência (frequência de novos casos por ano) e prevalência (proporção de indivíduos afetados em uma população) de 1-2 e 4-6 indivíduos em 100.000, respectivamente. Estudos epidemiológicos sugerem um aumento da incidência da doença, devido ao aumento da população idosa (Maalsita *et al.*, 2001).

A distribuição mundial da ELA é uniforme, com exceção de ocorrência muito maior na Ilha de Guam (Pacífico oeste) e na península de Kii no Japão (Maalsita *et al.*, 2001). Geralmente se desenvolve na fase adulta, após os 50 anos, embora existam casos raros de ELA juvenil. Os homens são mais atingidos que as mulheres numa relação de 1,6:1 (Shaw, 2005).

Os casos de ELA são em grande parte eventos isolados, chamados casos esporádicos e cerca de 10 % são familiares. A identificação dos cromossomos que contêm a mutação levou à classificação da ELA familiar nos subtipos ELA1-ELA8, ELA com demência frontal-temporal (ELA-FTD) e ELA-FTD acoplada à doença de Parkinson (ELA-FTDP) (Tabela 1). Embora todos os subtipos tenham em comum o comprometimento dos neurônios motores, os paciente dos subtipos ELA-FTD e ELA-FTDP apresentam adicionalmente demência e distonia. Apenas os genes responsáveis por ELA1, ELA8 e ELA-FTDP foram identificados (Boillée, 2006).

Tabela 1. Características genéticas da ELA familiar (Shaw, 2005; Boillée, 2006).

<i>Subtipo</i>	<i>Locus</i>	<i>Proteína alterada (função)</i>	<i>Hereditariedade</i>	<i>Idade do início do desenvolvimento</i>
ELA típica				
ELA1	21q22.1	SOD1 (converte o ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio e água)	dominante**	adulta
ELA3	18q21	desconhecida	dominante	adulta
ELA6	16q12	desconhecida	dominante	adulta
ELA7	20p13	desconhecida	dominante	adulta
ELA com demência				
ELA-FTD	9q21-22	desconhecida	dominante	adulta
ELA-FTDP	17q21.1	proteína tau (estabiliza o microtúbulo)	dominante	adulta
ELA atípica				
ALS8	20q13.3	proteína B associada à membrana vesicular (pode estar envolvida no tráfico vesicular)	dominante	adulta
Doença do neurônio motor inferior	2p13	subunidade dinactina p150 (transporte axonal de organelas celulares e proteínas)	dominante	adulta
Outros subtipos				
ELA2	2q33	alsina (dinâmica endossomal)	recessiva	desenvolvimento juvenil
ELA4	9q34	senataxina (provável helicase)	dominante	juvenil
ELA5	15q15.1-q21.1	desconhecida	recessiva	juvenil

* Adaptado de Shaw (2005) e Boillée (2006) ** Exceção no caso da mutação D90A (Jonsson *et al.*, 2002).

A descoberta de mutações na Cu,Zn-SOD citossólica (SOD1) em 20 % dos casos familiares (Rosen *et al.*, 1993) e em aproximadamente 2-7% dos casos esporádicos (Andersen *et*

al., 1995) indica que fatores genéticos também estejam envolvidos nos casos esporádicos. De fato, outras mutações já foram identificadas como fatores de risco (Tabela 2).

Tabela 2. Fatores genéticos de risco potencial para esclerose lateral amiotrófica esporádica e modificadores genéticos em ELA familiar*.

<i>Gene</i>	<i>Variante genética</i>	<i>Associação</i>
Cadeia pesada do neurofilamento	KSP deleção	esporádica
Apolipoproteína E		esporádica
Subunidade do citocromo c	microdeleção	esporádica
Transportador de aminoácido excitatório 2	Expressão reduzida	esporádica/familiar
Subunidade do receptor de glutamato AMPA	Alteração na edição do RNA	esporádica
Fator neurotrófico ciliar	Alelo nulo	familiar
Fator de crescimento vascular endotelial	Polimorfismos no promotor	esporádica

* Adaptado de Shaw (2005).

Apesar dos diferentes fatores genéticos envolvidos em ELA familiar e esporádica os casos são clinicamente similares, sugerindo que os diferentes fatores convergem para mecanismos comuns de comprometimento do neurônio motor. A partir desta premissa, acredita-se que modelos animais e celulares de ELA familiar ajudarão a compreensão das vias que levam à morte seletiva do neurônio motor e ao desenvolvimento de terapias que beneficiarão a maioria dos pacientes, independente da história familiar ou esporádica.

O maior avanço na área nos últimos 12 anos foi a descoberta do envolvimento de mutações na SOD1 (ELA familiar subtipo 1) (Simpson & Al-Chalabi, 2006). Desde então os modelos animais e celulares deste subtipo de ELA vêm sendo desenvolvidos. Os pesquisadores perceberam com entusiasmo que os modelos animais desenvolvem alterações celulares e sinais

clínicos muito similares aos apresentados pelos pacientes (Wong *et al.*, 1995; Nagai *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002), apesar da severidade da doença depender de um nível elevado de expressão das proteínas mutadas nos modelos (Bruijn & Cleveland, 2004). Modelos celulares, especialmente neurônios, neurônios motores e astrócitos, também têm contribuído para avanços na área e reproduzem muitas das características verificadas nos neurônios motores e astrócitos dos pacientes (Allen *et al.*, 2003; Menzies *et al.*; 2002; Sala *et al.*, 2005; Carri *et al.*, 1997).

1.2 SOD1 e mutações associadas à ELA

1.2.1 A SOD1

Até 1969 acreditava-se que a SOD1, então chamada cupreína, tinha a função de armazenar íons de cobre, mas McCord e Fridovich descreveram como sua função catalítica a capacidade de dismutar o ânion radical superóxido (McCord & Fridovich, 1969; revisado em Augusto, 2006).

Presente em todas as células eucarióticas, a SOD1 é bastante abundante, correspondendo a aproximadamente 1% do total de proteína celular (Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001). Ela localiza-se no citossol, núcleo, peroxissomo e espaço intermembrana da mitocôndria (Fridovich, 1997; Okado-Matsumoto, 2001; Sturtz, 2001).

A enzima humana é um homodímero de 32-kDa, com 153 aminoácidos e um íon de cobre e um de zinco por sítio ativo em cada subunidade. A estrutura cristalográfica da SOD1 de várias espécies foi determinada e é bastante conservada. Cada monômero é composto por 8 folhas β anti-paralelas e possui duas alças funcionalmente importantes, a eletrostática e a alça do zinco,

que circundam a região de ligação dos metais localizada no interior de cada subunidade (Bertini, 1998).

O íon de cobre é mantido no sítio catalítico por interações com os nitrogênios do grupo imidazol de quatro histidinas (46, 48, 120 e 63). O íon de zinco interage com o imidazol das histidinas 63, 71, 80 e com o grupo carboxila do aspartato 83 (Figura 1). O imidazol da histidina 63, que faz uma ponte entre os dois íons, fornece os prótons necessários à catálise.

Embora o íon de zinco não atue na catálise, ele é importante para estabilizar a estrutura da enzima. O mesmo ocorre com a ponte dissulfeto intramolecular entre a cisteína 57 e a 146, localizada em uma alça da região de contato entre as subunidades (Derman *et al.*, 1993; Furukawa & O'Halloran, 2005; Wang *et al.*, 2006).

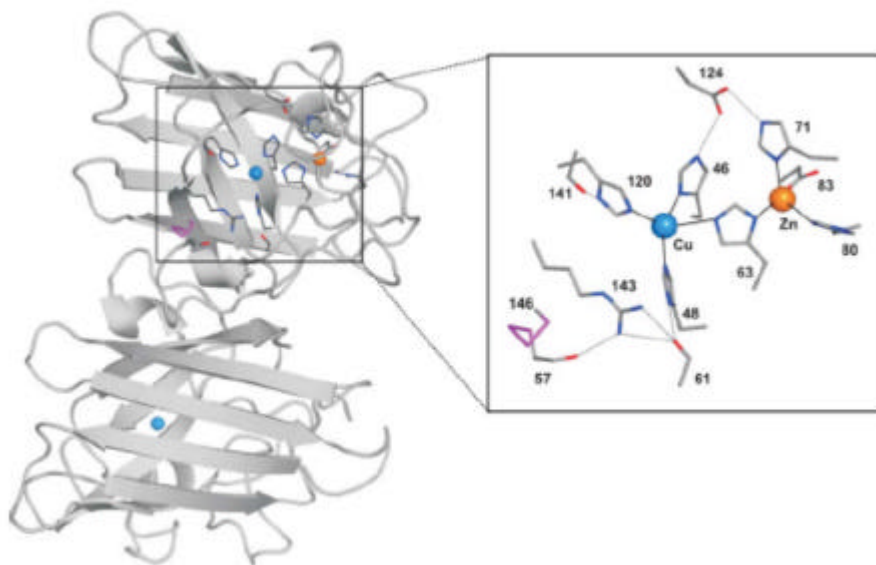
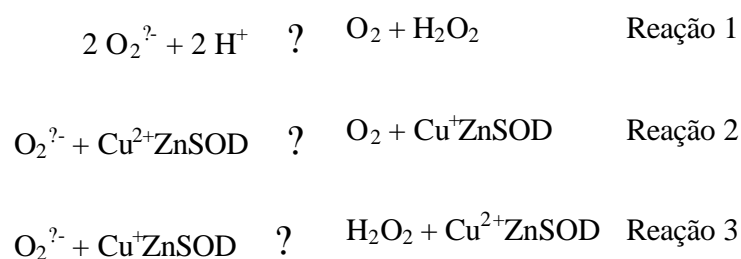


Figura 1. **Estrutura da Cu,Zn-SOD humana com ampliação do sítio ativo.** Os íons de cobre e zinco são mostrados como esferas azul e laranja, respectivamente (Reproduzido de Valentine *et al.*, 2005).

A superfície da SOD1 é constituída por muitos resíduos de aminoácidos com carga negativa que repelem o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e favorecem seu direcionamento ao sítio catalítico através de um canal formado por resíduos carregados positivamente. No sítio ativo ocorre a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ a oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (reação 1). A catálise ocorre em dois passos. Uma molécula de $O_2^{\cdot-}$ reduz o íon cúprico (Cu^{2+}) liberando O_2 (reação 2). Uma segunda molécula de $O_2^{\cdot-}$ reoxida o íon cuproso (Cu^+), formando H_2O_2 (reação 3). A constante de velocidade de dismutação espontânea do ânion radical superóxido é de $5 \times 10^5 M^{-1}.s^{-1}$ a pH 7.0 e varia muito com o pH, diferentemente da constante de velocidade da reação catalisada cujo valor ($10^9 M^{-1}.s^{-1}$) é mantido em uma ampla faixa de pH (5,3 – 9,5) (Halliwell e Gutteridge, 1999; Augusto, 2006).



A descoberta da abundância e eficiência catalítica da SOD1 foi importante para o desenvolvimento da teoria da toxicidade do oxigênio por evidenciar a existência de mecanismos endógenos para eliminação de espécies reativas derivadas dele. Durante a respiração, o $O_2^{\cdot-}$ é o primeiro intermediário produzido a partir da redução do O_2 e é a fonte de outras espécies reativas, embora ele próprio não seja reativo (Halliwell and Gutteridge, 1999; Augusto, 2006).

Os danos que o $O_2^{\cdot-}$ e principalmente as espécies dele derivadas podem causar aos seres vivos justificam a existência das diferentes formas de SOD. Além da SOD1, existe a SOD de manganês

mitocondrial (Mn-SOD) e a Cu,Zn-SOD extracelular. Outros mecanismos de defesa antioxidante incluem peroxidases que eliminam eficientemente o H_2O_2 e proteínas armazenadoras de íons de metais de transição (Halliwell and Gutteridge, 1999; Augusto, 2006).

A despeito da importância da atividade antioxidante da SOD1, estudos realizados *in vitro* e *in vivo* indicam que a perda de sua função dismutásica não está relacionada ao desenvolvimento da ELA. Por exemplo, muitas enzimas mutadas associadas à ELA familiar retêm completa atividade superóxido-dismutásica e os ratos nocautes para SOD1 não desenvolvem ELA. Por outro lado, ratos transgênicos que expressam SOD1 mutadas associadas à ELA desenvolvem a doença mesmo expressando a enzima endógena. Também, a superexpressão da enzima selvagem não alivia os sintomas nos modelos animais da doença. De fato, vários estudos indicam que as proteínas mutadas adquirem uma nova propriedade que é tóxica para as células (Bruijn *et al.*, 1998; Boerchelt, 1994; Bowling, 1995; Jaarsma *et al.* 2001).

1.2.2 Mutações na SOD1 associadas à ELA

Cerca de 114 mutações identificadas na SOD1 estão relacionadas à ELA familiar. A maioria leva à substituição de 1 aminoácido na proteína. Outras levam a deleções, inserções, truncações e alterações na janela de leitura no momento da tradução (Cleveland e Rothstein, 2001; Andersen *et al.*, 2003).

É intrigante o fato de que diferentes mutações, localizadas em diferentes regiões da enzima, levem à mesma doença. Estudos biofísicos sugerem que as mutações podem ser divididas em dois grupos, de acordo com características referentes ao conteúdo de íons metálicos, atividade superóxido-dismutásica e propriedades espectroscópicas. As mutações que se localizam na região de ligação dos íons metálicos, incluindo a alça eletrostática e a alça do Zn (II), são responsáveis

por grandes alterações na capacidade de ligação dos íons metálicos e na atividade superóxido-dismutásica. Ao contrário, as que se encontram espalhadas em outras regiões da proteína são denominadas “*like wild-type*” por possuírem características semelhantes às da enzima selvagem (Hayward, *et al.*, 2002; Rodriguez, *et al.*; 2002).

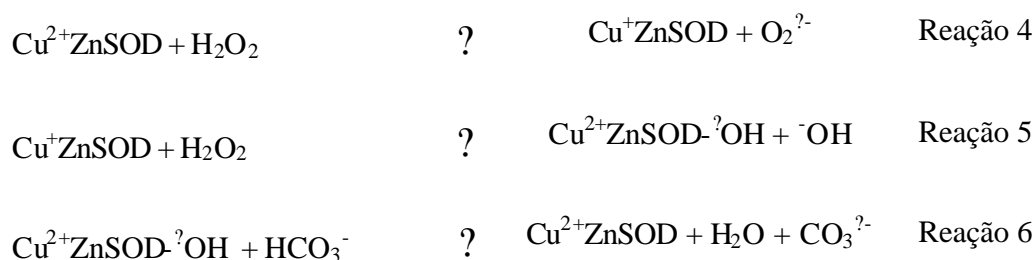
A SOD imatura sofre, além da acetilação do N terminal, pelo menos 4 modificações pós-tradução. Assim, ocorre inserção de Cu (II) e Zn (II), formação da ponte dissulfeto intramolecular e dimerização. Problemas nesses processos levam a formas imaturas de SOD1, com estruturas alteradas. Há indícios de que formas imaturas da SOD estejam envolvidas no ganho de função tóxica pela enzima e de que mutações em proteínas que participam da maturação da SOD1 possam mimetizar a ELA (Rakhit & Chakrabarty, 2006).

Uma relação de glutathione reduzida e oxidada de 30-100 para 1 caracteriza o ambiente citosólico, altamente redutor e que, normalmente, impede a formação de pontes dissulfeto em proteínas localizadas nesta fração celular (Freedman, 1989). Apesar disso, a SOD1 de todos os eucariotos mantém conservada a ponte dissulfeto intramolecular, o que ressalta sua importância na manutenção da estrutura terciária e quaternária da enzima (Derman *et al.*, 1993).

Atividade oxidativa aumentada e propensão à agregação são as principais hipóteses postuladas para a citotoxicidade das enzimas mutadas e elas não são mutuamente exclusivas (Valentine *et al.*, 2005). Entre as atividades oxidativas atribuídas à SOD1 encontram-se a peroxidásica, a superóxido-redutásica e a tiol oxidase (^bLiochev & Fridovich, 2003).

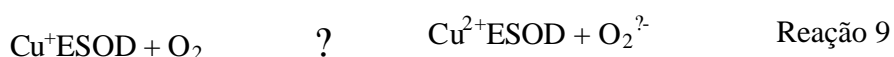
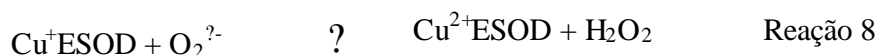
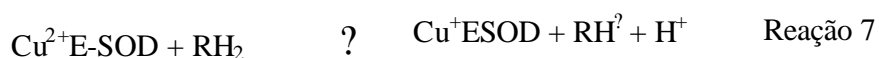
A habilidade da SOD1 promover a oxidação de substratos externos ao sítio ativo utilizando H_2O_2 na presença do ânion bicarbonato (HCO_3^-) é bem conhecida *in vitro*. O mecanismo mais aceito para esta atividade peroxidásica envolve a redução da H_2O_2 pela SOD-Cu(II) para produzir a SOD-Cu(I) (equação 4) que reage com outra molécula de H_2O_2 para produzir um oxidante potente cuja natureza permanece desconhecida mas que pode ser escrito formalmente como um

radical $\cdot\text{OH}$ ligado à SOD-Cu(II) (equação 5). Em presença de HCO_3^- esse oxidante produz o radical carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) (equação 6) que se difunde e oxida moléculas em solução (Bonini *et al.*, 2004; Liochev & Fridovich, 2002; ^aLiochev & Fridovich, 2003; Zhang *et al.*, 2000).



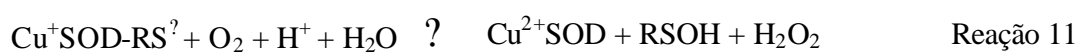
Embora a concentração intracelular de HCO_3^- seja elevada (25 mM), não se sabe a relevância desta atividade *in vivo*. No caso da SOD1 bovina as velocidades das reações 4 e 5 são baixas ($50 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ e $13 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$, respectivamente), bem como a afinidade da enzima por HCO_3^- (K_m 100 mM) (Liochev & Fridovich, 2002). Em contrapartida, alguns estudos *in vitro* sugerem que a atividade peroxidásica possa estar aumentada nas enzimas mutadas (Valentine, 2002; Wiedau-Pazos *et al.*; 1996).

Um menor conteúdo de Zn(II) propicia o aumento de algumas atividades oxidativas da SOD por favorecer o acesso de substratos não usuais ao sítio ativo (Goto *et al.*, 2000). A ausência deste íon metálico torna a enzima tóxica para a célula, independente da presença de mutação, aparentemente por facilitar a redução da enzima por redutores endógenos (equação 7). Isso poderia levar à produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (equação 8) e, em presença de NO^{\cdot} , à produção de ONOO^- (equação 9). O aumento destas atividades pode ser importante para o desenvolvimento de ELA ao se considerar que algumas enzimas mutadas possuem menor afinidade por zinco, o que levaria a maiores níveis intracelulares de Cu,E-SOD (enzima desprovida de zinco) (Goto *et al.*, 2000).



In vitro, demonstrou-se que a atividade superóxido-redutásica da Cu,E-SOD é 3000 vezes maior que a da holo enzima (Estevez *et al.*, 1999). Isto pode ter relevância *in vivo* ao se considerar a depleção de compostos redutores celulares e a formação de radicais livres (Liochev & Fridovich, 2003). Já em relação à produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$, as controvérsias são maiores. Ainda não se comprovou que esteja aumentada na ausência do zinco e que seja uma relevante fonte de ONOO^- *in vivo* (Beckman *et al.*, 2001).

Foi descrita recentemente por Winterbourn *et al.* (2002) a oxidação de tióis de baixo peso molecular catalisada por SOD1. O mecanismo proposto sugere redução do íon cúprico do sítio ativo, oxidação do tiol por oxigênio, produção de H_2O_2 e a formação de dissulfeto entre o intermediário sulfênico e o tiol reduzido (equações 10-12). A SOD1 intracelular em sua eficiência máxima poderia consumir 0,1 mM de cisteína/min, com concomitante produção de H_2O_2 (Karunakaran *et al.*, 2005).





Reação 12

A atividade tiol oxidase pode ser importante para a toxicidade das enzimas mutadas ao se considerar o aumento plasmático de cisteína observado em pacientes com desordens neurológicas, incluindo a ELA (Heafield *et al.*, 1990). Além do que, a ausência do zinco também possivelmente favoreceria esta atividade, tornando-a mais significativa no caso das enzimas mutadas (^bLiochev & Fridovich, 2003).

A real importância destas atividades vem sendo questionada porque todas são dependentes da presença do cobre no sítio catalítico e mesmo substituindo-se os 4 resíduos de histidinas que ligam o cobre (H46R/H48Q/H63G/H120G) a ELA se desenvolveu em ratos transgênicos com mutações na SOD associadas à ELA (Wang *et al.*, 2003).

Vários fatores, ainda não bem compreendidos, parecem contribuir para a menor estabilidade das enzimas mutadas que culminariam na agregação da proteína, como a não-dimerização (Lindberg *et al.*, 2005; Rakhit *et al.*, 2004; Hough *et al.*, 2003) e um aumento da hidrofobicidade (Tiwari *et al.*, 2005). A menor afinidade pelo zinco (Rakhit *et al.*, 2004) e a maior propensão à redução da ponte dissulfeto intramolecular (Wang *et al.*, 2006; Tiwari & Hayward, 2003) são algumas características que vem sendo apontadas como desestabilizadoras da estrutura da SOD1 (Figura 2).

A propensão à agregação não exclui a hipótese oxidativa. Pelo contrário, ambas estão intimamente relacionadas, tendo em vista que a modificação oxidativa da SOD também induz à formação de agregados (Rakhit *et al.*, 2002) e, obviamente, espera-se maior oxidação da SOD numa situação em que a própria seja fonte de espécies oxidantes. Por sua vez, a desestabilização

da estrutura da enzima parece favorecer suas atividades oxidativas (Estevez, *et al.*, 1999; Yim *et al.*, 1996).

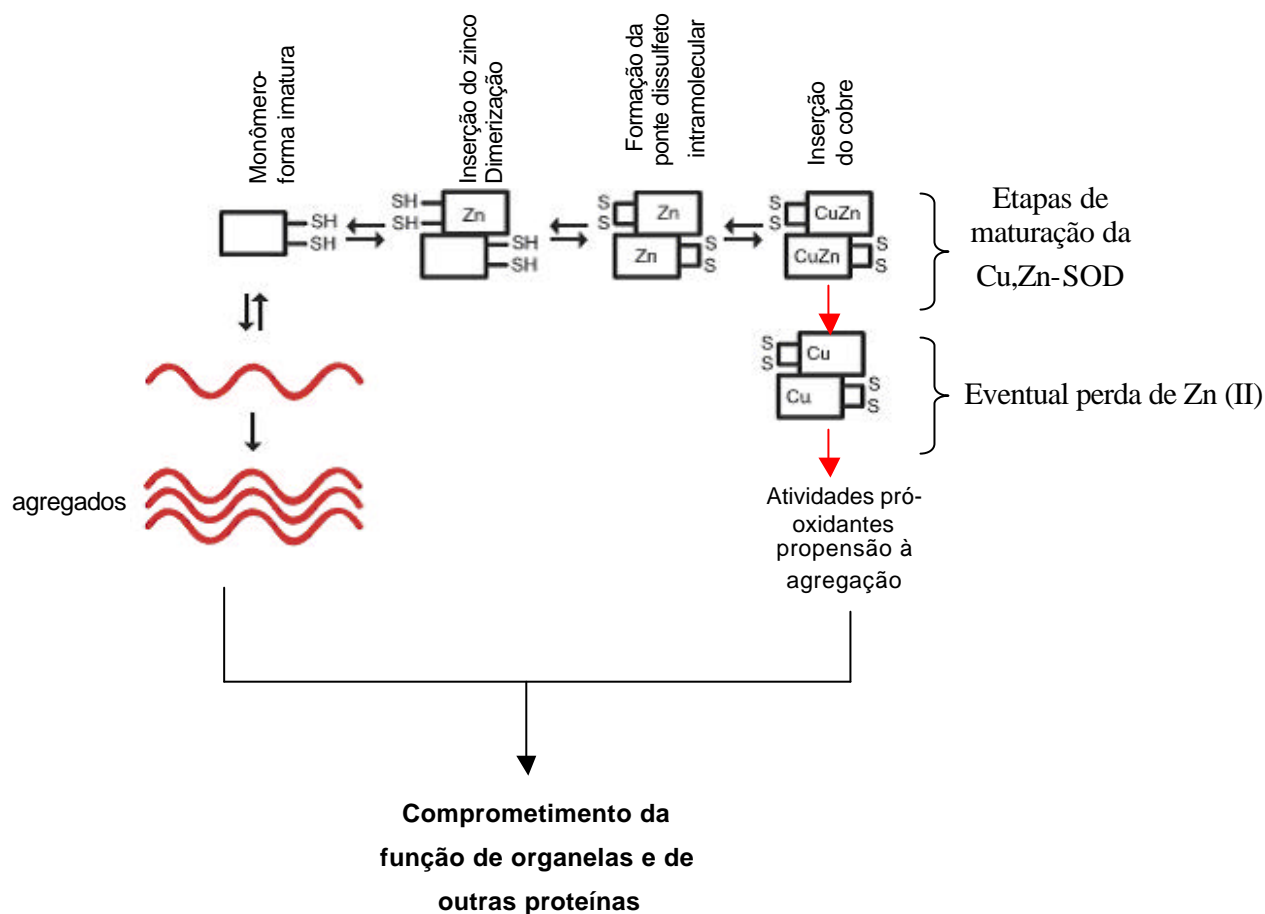


Figura 2. **Mecanismos hipotéticos para a toxicidade das enzimas mutadas associadas à ELA** (Adaptado de Jonsson *et al.*, 2006; Brujin *et al.*, 2004).

1.3 Degeneração dos neurônios motores

As características das SODs mutadas que levam à morte seletiva de neurônios motores são desconhecidas. O conhecimento atual da neurodegeneração em ELA sugere uma complexa

relação entre múltiplos fatores. A importância de cada fator pode variar dentro de cada subgrupo de pacientes, mas há evidências de que, independente dos mecanismos iniciais, a etapa final da morte envolva a ativação de caspases, culminando em apoptose (Shaw, 2005).

Em um primeiro momento é difícil imaginar porque uma mutação presente em todas as células de um organismo leve à morte seletiva de um único tipo celular, como é o caso das SOD mutadas associadas à ELA. Algumas características peculiares dos neurônios motores podem torná-los mais susceptíveis à toxicidade mediada por estas enzimas.

Apesar do comprometimento exclusivo do neurônio motor, evidências apontam para um papel central dos astrócitos no desenvolvimento da ELA. No tecido nervoso *post mortem* de pacientes verifica-se ativação de células da glia que circundam os neurônios motores, sugerindo a participação de mediadores inflamatórios na injúria a estes neurônios (Clement *et al.*, 2003). Surpreendentemente verificou-se também que a expressão de SOD mutante apenas nos neurônios motores não leva à doença em modelos animais. Ao ser expressa nos neurônios motores e nos astrócitos há o desenvolvimento da ELA (Pramatarova *et al.* 2001).

Os neurônios motores também diferem dos outros grupos de células por apresentarem um grande volume (50-60 μ m) e axônio longo (em alguns casos com mais de 1 m). Estas características anatômicas resultam em elevadas demandas energéticas e taxas metabólicas e, portanto, maior atividade mitocondrial (Valentine *et al.*, 2005).

Acredita-se que os efeitos da produção de radicais livres sejam cumulativos, particularmente em células que apresentam taxa de divisão muito baixa, como os neurônios motores. Algumas doenças neurodegenerativas que se desenvolvem com o envelhecimento têm sido associadas ao dano oxidativo aumentado. A ELA parece compartilhar desta característica. O sistema nervoso central *post mortem* de pacientes apresenta indicadores aumentados de lesões oxidativas como

proteínas oxidadas (Ferrante, *et al.*; 1997; Tohgi *et al.*, 1999) e lipídeos oxidados (Smith *et al.*, 1998).

Algumas proteínas importantes para a função do neurônio motor são particularmente sensíveis à oxidação, como os neurofilamentos, receptores de fatores neurotróficos (Beckman *et al.*, 1993) e o transportador de glutamato EEAT2 (Volterra *et al.*, 1992).

Dado o comprimento do neurônio motor, os componentes celulares sintetizados no corpo celular devem ser levados para o axônio, e uma das vias é o transporte anterógrado. As SODm parecem prejudicar este transporte (Williamson *et al.*, 1998). Também, a mutação na proteína dineína, que participa deste transporte, é responsável por outro subtipo de ELA familiar (Tabela 1).

Agregados protéicos, imunoreativos para SOD1, são encontrados em neurônios motores de pacientes de ELA e de modelos animais da doença (Bruijn *et al.*, 2004). A agregação das SODs mutadas pode ser tóxica para o neurônio motor ao comprometer o funcionamento de outras proteínas englobadas nos agregados. Presume-se que nesta situação haja inibição do proteassomo, redução da atividade de chaperonas, desregulação do funcionamento de organelas como complexo de Golgi, retículo endoplasmático e mitocôndria. Particularmente importante no caso do neurônio motor é o fato de que grandes agregados podem constituir uma barreira física ao transporte anterógrado dos componentes celulares destinados ao axônio (Boilé, 2006). Recentemente foi reportado que os agregados constituídos de SODm se acumulam na matriz mitocondrial de neurônios, mas não de outros tipos celulares. Ao se associarem à matriz inibem a cadeia respiratória, reduzem a relação GSH/GSSG e diminuem a produção de ATP (Ferri *et al.*, 2006). Este pode ser outro fator importante para a morte seletiva do neurônio motor, considerando-se que estas células devem ser mais vulneráveis ao déficit energético devido à alta necessidade de energia (Shaw & Eggett, 2005). De fato, o comprometimento das mitocôndrias de

neurônios motores de pacientes é conhecido. Em estudos histopatológicos estas organelas aparecem dilatadas e com vacúolos, com anormalidades nas cristas e nas membranas (Hirano *et al.*, 1984).

O déficit energético causado pela disfunção mitocondrial pode adicionalmente comprometer o neurônio motor por reduzir o potencial de membrana e isto em última instância leva a falha no bloqueio do receptor de glutamato, resultando na superestimulação deste, mesmo em presença de níveis normais do neurotransmissor (Beal *et al.*, 1993).

Vários estudos apontam que a citotoxicidade mediada por glutamato é importante no desenvolvimento de todos os tipos de ELA por superestimulação do receptor (Leigh & Meldrum, 1996; Rothstein, 1995; Shaw & Ince, 1997). Este possivelmente é um ponto de convergência dos diferentes tipos de ELA.

Para dar suporte ao grande comprimento do axônio, os neurônios motores apresentam maior conteúdo de neurofilamentos, envolvidos no transporte axonal, que os outros tipos neurais (Shaw & Eggett, 2005). Nos neurônios motores de pacientes com ELA há um acúmulo destes neurofilamentos no corpo celular e axônio proximal (Hirano, 1991). A implicação deste acúmulo não é bem conhecida, mas uma característica interessante dos neurofilamentos é a grande afinidade pelo íon de zinco. Por isso, poderiam competir com as SODs mutadas por este metal, aumentando a proporção de Cu,Zn-SOD que seria tóxica pelos mecanismos descritos acima (Hirano *et al.*, 1984; Beckman *et al.*, 2001).

As principais alterações observadas no neurônio motor que podem estar relacionadas com as SODs mutadas e com o comprometimento de suas funções estão sumarizadas na Figura 3.

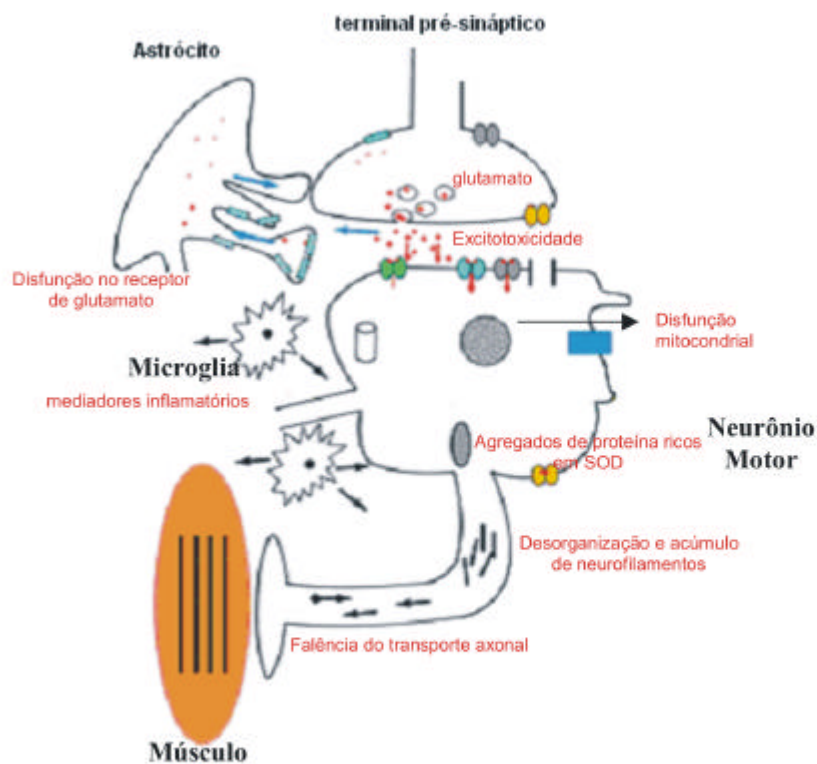


Figura 3. Mecanismos moleculares que podem contribuir para injúria do neurônio motor na **ELA** (Adaptado de Shaw, 2005).

2 Objetivos

O objetivo geral deste projeto foi contribuir para a elucidação dos mecanismos pelos quais SOD1 mutantes associadas a ELA causam citotoxicidade. Optamos por utilizar um modelo celular porque a enzima SOD1 sofre várias modificações pós-tradução e essas são dependentes do ambiente celular. Também, utilizamos um modelo celular transfectado com uma única cópia do gene SOD1 selvagem e mutante (G93A) porque ele mimetiza a situação de pacientes humanos melhor do que os modelos animais disponíveis nos quais as enzimas mutadas são superexpressas (> 10 vezes). Assim, comparamos neuroblastomas humanos transfectados com SOD1 G93A (SH-SY5Y^{G93A}), SOD1 selvagem (SH-SY5Y^{WT}) e células parentais (SH-SY5Y) quanto ao crescimento celular, viabilidade, produção basal de oxidantes, atividades superóxido dismutásica e peroxidásica, formas da SOD1, ativação do proteassomo e estresse de retículo. Os resultados obtidos e suas implicações são aqui apresentados.

3 Material e métodos

3.1 Materials

No presente trabalho utilizou-se neuroblastomas humanos SH-SY5Y transfectados com plasmídeo estável para permitir a expressão constitutiva da SOD selvagem (SOD^{WT}) ou SOD mutada G93A, cedidos pela Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Carri da Universidade Tor Vergata de Roma, Itália. A transformação das células SH-SY5Y encontra-se descrita em Carri *et al.* (1997).

Iodeto de propídio foi adquirido da Molecular Probes. Anexina-V marcada com FITC do Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, acrilamida PAGE da Life Tech, persulfato de amônio da Amershan, acetonitrila da Merck, anti-Cu,Zn-SOD humano produzido em ovelha e anti-IgG de ovelha marcado com peroxidase da Calbiochem, anti-actina produzida em camundongo da Boehringer, reagente de Bradford e marcador de peso molecular (Kaleidoscópico) da Biorad, azul de bromofenol da Acros, DMEM-F12 e soro fetal bovino da Cultilab, Nonidet P40 da USB, catalase da Boehringer, Cu, Zn-SOD bovina da Roche, substrato quimioluminescente para revelação de *Western blot* da Pierce. Os demais reagentes foram obtidos da Sigma.

Todas as soluções foram preparadas com água destilada purificada em sistema Milipore Milli-Q. Os tampões foram pré-tratados com resina Chelex-100 para remoção de possíveis íons metálicos contaminantes.

3.2 Métodos

3.2.1 *Cultura de células*

Os neuroblastomas foram mantidos no banco de células em nitrogênio líquido. Para o cultivo em estufa de CO₂ a 37° foram descongelados e centrifugados a 1200 rpm durante 5 min. No fluxo laminar estéril os sobrenadantes foram descartados, as células ressuspensas em 12 mL de meio de cultura e transferidas para garrafa de cultivo celular de 75 cm².

As células foram cultivadas em meio DMEM/HAM F-12, enriquecido com 15% v/v de soro fetal bovino (v/v), 0,04 g/L de penicilina, 0,1 g/L de sulfato de estreptomicina e 3,7 g/L de bicarbonato de sódio. O meio de cultura para as linhagens transfectadas foi acrescido de 0,2 g/L de geneticina para manter a seleção das células transformadas com o plasmídeo pRc/CMV, utilizado para inserir o gene da SOD1 nativo e mutado.

O repique celular foi realizado sempre que as células atingiram confluência máxima. O procedimento consistiu na aspiração do meio, lavagem das células com 5 mL de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, Na₂HPO₄ 8 mM) por 2 vezes e adição de 1 mL de tripsina 0,03% (p/v) por cerca de 1 min. A tripsina foi inativada pelo soro fetal bovino presente no meio de cultura. O procedimento para o congelamento foi o mesmo, exceto que após a tripsinização as células foram centrifugadas (1200 rpm, 5 min), o sobrenadante descartado e adicionou-se dimetilsulfóxido e meio de cultura, na proporção 1:10 v/v, respectivamente. A suspensão foi dividida em *vials* de 1 mL com concentração aproximada de 2 x 10⁶ células/mL. Após 24 h armazenadas a – 80° C, as células foram transferidas para o nitrogênio líquido.

Todas as soluções usadas no cultivo celular foram esterilizadas em filtro de 0,2 µm.

3.2.2 Curva de crescimento

A partir de garrafas confluentes de cada linhagem, obteve-se células, por meio de tripsinização, para a curva de crescimento. As células foram contadas na câmara hemocitométrica (Neubauer) e inoculadas em garrafas de 25 cm², com concentração final de 1 x 10⁶ células /garrafa. Diariamente contou-se os neuroblastomas de cada linhagem para a estimativa do número de células de cada garrafa. As células mortas foram excluídas por coloração com Azul de tripan (diluição 1:2). O crescimento foi acompanhado por 7 dias e realizado em triplicata. O meio de cultura das garrafas foi trocado no 2^o, 4^o e 6^o dias.

3.2.3 Produção de espécies oxidantes intracelulares

Células cultivadas em multi-placas de 6 poços (2 x 10⁶ células/poço) foram tratadas com 20 μ M de menadiona ou 500 μ M de H₂O₂ em meio de cultura com 15 % de soro fetal bovino em estufa de CO₂ a 37° C. Células não tratadas foram usadas como controle. Após 2 h o meio de cultura foi removido e as células tripsinizadas, centrifugadas a 1.200 rpm durante 5 min, lavadas com PBS, novamente centrifugadas e ressuspensas em PBS com 10 μ M de dihidrorodamina por 30 min à temperatura ambiente, no escuro. A sonda fluoresce ao ser oxidada. O controle negativo foi feito utilizando-se células não tratadas e não incubadas com a sonda. A fluorescência de 10.000 células vivas foi obtida no citometro de fluxo. Utilizou-se o filtro FL-1 para marcação com rodamina. A média de fluorescência de foi obtida no programa Facs Express 2.0.

3.2.4 Viabilidade celular

Células controle e transfectadas foram transferidas para placa multi-poços de 6 poços, numa concentração de 2×10^6 células/poço (confluência máxima) 24 h antes do tratamento. Cada linhagem foi submetida a tratamento com H_2O_2 (500 μM) ou menadiona (20 μM) por 2 h, em meio de cultura com 15% de soro fetal bovino, a 37 °C. Após este período o meio de cultura foi recolhido, as células que permaneceram aderidas foram tripsinizadas, somadas às que estavam em suspensão e centrifugadas a 1200 rpm por 5 min. Após o descarte do sobrenadante, ressuspendeu-se as células em 400 μL de PBS e adicionou-se 2 μL de solução de iodeto de propídio (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) no momento da análise no citometro de Fluxo (FACS Scalibur-Becton Dickinson). Empregou-se o filtro para emissão vermelha FL-3 (585/42 nm).

O iodeto de propídio emite fluorescência ao se ligar ao DNA. A membrana plasmática é impermeável a este marcador fluorescente, que se liga ao DNA em situações de ruptura da integralidade da membrana, portanto em situações de morte celular. Para cada análise foram contadas automaticamente 10.000 células. Como controle foram utilizadas células de cada linhagem não tratadas e o controle negativo foi realizado com células não tratadas e ressuspendidas em PBS sem iodeto de propídio. O experimento foi realizado em triplicata, com as células cultivadas por 2 (8^a passagem) e 4 (12^a passagem) semanas.

A porcentagem de células vivas e mortas foi calculada pelo programa Facs Express 2.0.

3.2.5 Monitoramento da apoptose

3.2.5.1 Fragmentação do DNA

A análise do conteúdo de DNA presente no núcleo celular é um marcador para apoptose bastante utilizado, uma vez que células apoptóticas apresentam fragmentação deste material (Oancea *et al.*, 2006). Dependendo da fase do ciclo celular em que se encontram, células normais deverão apresentar conteúdo de DNA igual a $2n$ ou $4n$, enquanto células em apoptose apresentarão DNA menor que $2n$. Para esta análise, utilizou-se o protocolo descrito por Nicoletti *et al.* (1991) que consiste em recuperar as células tratadas e ressuspê-las em solução hipotônica fluorescente (citrato de sódio 0,1 % p/v, triton-X100 0,1 % v/v e iodeto de propídio 50 μ g/mL).

Os neuroblastomas foram transferidos para multi-placa de 6 poços, na concentração de 2×10^6 células / poço (100 % de confluência). Após 24 h foram tratados com 500 μ M de H_2O_2 ou 20 μ M de menadiona em meio de cultura com 15% v/v de soro fetal bovino, a 37°C. Após 2 h o meio de cultura foi recolhido, as células lavadas duas vezes com PBS, tripsinizadas, somadas às células em suspensão do meio de cultura, centrifugadas a 1200 rpm por 5 min e ressuspensas em 400 μ L da solução hipotônica fluorescente. Este tampão permeabiliza a membrana plasmática, garantindo a entrada do iodeto de propídio em todas as células, contudo é suave o suficiente para que as células não se rompam completamente, permitindo a identificação de cada célula pelo sistema de detecção do citometro de fluxo. Como controle foram utilizadas células de cada linhagem não tratadas e o controle negativo foi realizado com células não tratadas e ressuspensas no tampão sem iodeto de propídio. Após 10 min neste tampão as células foram

analisadas no citometro de fluxo (FACS Scalibur-Becton Dickinson) utilizando-se o filtro para emissão vermelha FL-3 (585/42 nm). A fluorescência do iodeto de propídio é proporcional ao conteúdo de DNA ao qual se ligou. No programa Facs Express 2.0 obtém-se as porcentagens referentes às regiões das células não apoptóticas (DNA íntegro) e das células apoptóticas (DNA fragmentado).

Esta análise foi feita em triplicata das células com 4 semanas em cultura.

3.2.5.2 Inversão de fosfatidilserina da membrana plasmática

Neuroblastomas de cada linhagem (2×10^6), na 4ª passagem (12 semanas de cultivo), foram transferidos para multi-placas de 6 poços 24 h antes do tratamento e, após este período, tratados ou não com H_2O_2 (500 μM) ou menadiona (20 μM), em meio de cultura com soro fetal bovino 15% v/v na estufa de cultivo celular (5 % de CO_2).

Após 2 h de tratamento o meio de cultura foi removido e reservado, as células tripsinizadas com 0,03 % de tripsina, seguindo-se de inibição da tripsina por adição de meio de cultura com 15 % de soro fetal bovino. As células tripsinizadas foram adicionadas ao meio reservado anteriormente, centrifugadas a 1.200 rpm por 5 min e lavadas com o tampão estéril de ligação para Anexina (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM KCL, 1 mM MgCl_2 , 1,8 mM CaCl_2). Centrifugou-se novamente e ressuspendeu-se as células em 100 μL de tampão de ligação acrescido de anexina 1 μM . A incubação foi feita à temperatura ambiente e protegeu-se as amostras da luz. Após 40 min adicionou-se a cada amostra 400 μL de tampão de ligação e 1 μg de iodeto de propídio, analisando-se imediatamente no citometro de fluxo (FACS Scalibur-Becton Dickinson), utilizando-se filtro FL-1 para anexina e FL-3 para iodeto de propídio.

Para análise dos dados foi empregada a opção *contour* do programa Facs Express 2.0. Esta mostra a porcentagem das populações marcadas apenas com anexina e marcadas com iodeto de propídio e anexina, que são classificadas como apoptóticas e necróticas, respectivamente.

3.2.6 Obtenção de homogenato celular

Foram utilizados dois métodos distintos para extração. O primeiro consistiu de incubação de 3×10^7 células em 1 mL de tampão de lise NP40 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150mM, EGTA 1 mM, glicerol 10 % v/v, nonidet P-40 0,5 % v/v, $MgCl_2$ 1 mM), acrescido ou não de iodoacetamida (20 mM) e inibidores de proteases (ortovanadato de sódio 1 mM, PMSF 1mM, aprotinina 2 µg/mL, pepstatina 2 µg/mL, leupeptina 2 µg/mL) por 20 min, seguido de centrifugação a 13.200 rpm por 30 min. O sobrenadante foi usado imediatamente. Quando desejado, o precipitado (pellet) que restou após a centrifugação foi ressuspenso em tampão de amostra (Tris 25 mM; glicina 250 mM; SDS 2 % e DTT 100 mM, pH 8.3).

Para os ensaios espectrofotométricos das atividades superóxido-dismutásica e peroxidásica a extração foi por meio de congelamento-descongelamento, visto que o detergente presente no tampão de lise NP-40 influenciou nestas atividades. Para cada 3×10^7 células foram usados 400 µL de PBS com DTPA (100 µM) e inibidores de proteases. O congelamento foi realizado por imersão de balão volumétrico contendo a suspensão de células em acetona com gelo seco, com o cuidado de se formar uma camada fina na parede do balão, garantindo congelamento homogêneo. Após 10 min descongelou-se em banho a 37° C. Este processo foi repetido 5 vezes e posteriormente o sobrenadante foi centrifugado (13.200 rpm, 30 min), dividido e usado imediatamente.

3.2.7 Dosagem de proteína

A proteína total dos homogenatos foi quantificada por meio do ensaio colorimétrico de Bradford (1976). Albumina sérica bovina (BSA) foi usada para a curva padrão, em concentrações variando de 0 a 5 µg/mL. Para o volume final de 1 mL, adicionou-se 200 µL de reagente de Bradford e após 15 min verificou-se a absorvância a 595 nm em espectrofotômetro (Hitachi U-200).

3.2.8 Western blot anti-SOD

-Gel SDS-PAGE redutor: Extrato celular de cada linhagem obtido nos tempos diferentes de cultivo foi diluído em 20 µL de tampão de amostra (Tris 25 mM; glicina 250 mM; SDS 2 % e DTT 100 mM, pH 8.3), fervido a 100 °C por 5 min e submetido à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (gel de empacotamento 5% - tampão Tris 125 mM pH 6.8; solução de acrilamida/bis-acrilamida 5 % p/v; SDS 0,1 % p/v; persulfato de amônia 0,1 % p/v; TEMED 0,01 % v/v / gel de resolução 15% - tampão Tris 375 mM pH 8.8; solução de acrilamida/bis-acrilamida 15 % p/v; SDS 0,1 % p/v; persulfato de amônia 0,1 % p/v; TEMED 0,01% v/v) a 90 V (fonte Bio-rad), em tampão de corrida (tampão Tris 25 mM pH 8.3; glicina 250 mM e 0,1 % SDS p/v) durante 3 h.

-Gel SDS-PAGE não-redutor: Aplicou-se o mesmo procedimento do gel SDS-PAGE redutor, sem a adição de DTT no tampão de amostra.

-Gel nativo-redutor: 20 µg de proteína total de cada extrato celular foram diluídas em 20 µL de tampão de amostra com 100 mM de DTT, não-fervidas e aplicadas no gel de poliacrilamida (5 %

gel de empacotamento e 12 % gel de resolução), submetido a 90 V em tampão de corrida, durante 3 h. Todas as soluções foram preparadas sem SDS.

Gel nativo-não redutor: aplicou-se o mesmo procedimento do gel nativo redutor, sem a adição de DTT no tampão de amostra.

Após a eletroforese as proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose com o auxílio de tampão de transferência (Tris base 48 mM pH 8.3; glicina 39 mM; SDS 0,037% p/v e metanol 20 % v/v) e do equipamento *semi-dry* (Bio-rad), a 10 V por 50 min. Para garantir a eficiência da transferência, após a eletroforese os géis não redutores foram imersos em tampão de corrida com 5 mM de DTT por 20 min para a redução das pontes dissulfeto (Furukawa *et al.*, 2006) e os géis nativos em tampão de corrida com 1 % de SDS por 1 h (Schimidt *et al.*, 2000).

Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi lavada 3 vezes com TBS (Tris.HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM), bloqueada com 5 % de leite desnatado (p/v) em TBS acrescido de 0,05 % de detergente *tween* (TBST), lavada 3 vezes com TBST e incubada com anticorpo anti-SOD1 produzido em ovelha (1:1500, diluído em TBST). Utilizou-se o anticorpo anti-actina produzido em coelho (1:100, diluído em TBST) para o controle interno da quantidade de proteína aplicada no caso do SDS-PAGE redutor. Neste caso a membrana foi cortada na altura do peso molecular correspondente a 30 kDa. A metade superior foi incubada com anti-actina e a inferior com anti-SOD1. Após incubação *overnight* as membranas foram lavadas 3 vezes com TBST e incubadas com anticorpo secundário. Utilizou-se anti-IgG de ovelha e anti IgG de camundongo marcados com peroxidase (1:7000, diluído em TBST) nas respectivas membranas. Após 1 h foram lavadas 3 vezes com TBST. A revelação foi realizada por meio de quimioluminescência.

3.2.9 Atividade superóxido dismutásica

Análises espectrofotométricas foram realizadas segundo Beauchamp e Fridovich modificado por Oberley (1982). A reação foi realizada em tampão carbonato de sódio 50 mM pH 10,2 acrescido de DTPA 100 μ M, xantina 100 μ M, NBT 56 μ M, catalase 1 U/mL e xantina oxidase em quantidade necessária para uma velocidade de reação do NBT de 0,0120 \pm 0,0002 Abs/min a 37 °C. A atividade dismutásica foi avaliada pela inibição da redução do NBT na presença de homogenato celular (1-80 μ g de proteína total/mL) e SOD1 bovina (10-200 ng/mL). Os ensaios foram realizados com homogenatos obtidos por congelamento e descongelamento após 2, 4 e 8 semanas de cultivo.

Avaliou-se qualitativamente a atividade dismutásica da SOD dos extratos celulares por meio de gel nativo de atividade (Beauchamp e Fridovich, 1971). Proteína total dos extratos celulares (10, 20 e 100 μ g) foram aplicadas em gel de poliacrilamida (5 % gel de empacotamento e 12% gel de resolução) e submetidos à eletroforese em condições não-desnaturantes. Posteriormente o gel foi incubado em solução geradora de superóxido contendo NBT (25 mg/100 mL) e riboflavina (10 mg/100 mL). Após 20 min, solução de TEMED (1 g /100mL) foi adicionada e o gel exposto à luz. O gel adquiriu coloração violeta, exceto nas áreas que continham SOD.

3.2.10 Atividade peroxidásica

Foi monitorada pela oxidação da DHR acompanhada a 500 nm em espectrofotômetro (SLM-Aminco DW 2000) por 20 min a 37 °C (Zhang *et al.* 2002). As incubações continham SOD1 bovina (1-10 μ g) ou homogenatos celulares (100, 200 e 400 μ g), H₂O₂ (3 mM) e DHR (80

µM) em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4), na ausência e presença de HCO₃⁻. A atividade peroxidásica da SOD foi atribuída à diferença entre a oxidação da DHR na presença de HCO₃⁻ e na ausência de HCO₃⁻. Uma unidade de atividade peroxidásica foi definida como a quantidade de SOD bovina ou de proteína do lisado celular que oxidou 1 µM de DHR ($\epsilon_{500} = 78.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) em 1 min.

Rotineiramente retirou-se o espectro da água oxigenada na faixa de comprimento de onda de 190-300 nm para confirmação da concentração da solução estoque ($\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Desenvolveu-se um método para monitorar a atividade peroxidásica em gel não-desnaturante, seguindo o mesmo princípio utilizado para o ensaio no espectrofotômetro (Zhang *et al.* 2002). O método foi testado utilizando-se SOD1 bovina. Diferentes concentrações da enzima bovina (0,7; 1,4; 3,5; 6,3 e 38 µg) foram diluídas em 5 µL de tampão de amostra (Tris 25 mM, glicina 250 mM, pH 8,3) e submetidas a eletroforese em gel não-desnaturante (5% gel de empacotamento e 12 % gel de resolução) a 150 V. Este procedimento foi realizado em duplicata, sendo que os dois géis correram simultaneamente. Após a corrida, cada gel foi incubado em solução contendo tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) e DHR (40 µM). Uma das soluções continha adicionalmente bicarbonato de sódio (50 mM). Após 20 min de incubação adicionou-se 3 mM de água oxigenada nas duas incubações e acompanhou-se a formação das bandas. Após o estabelecimento deste método, o mesmo foi usado para mensurar atividade peroxidásica da enzima SOD1 nos extratos celulares, utilizando-se 400 µg de proteína total. Neste caso aplicou-se 100 µL em cada canaleta.

3.2.11 Estresse do retículo endoplasmático

Avaliou-se a expressão da chaperona BiP (do inglês, *binding immunoglobulin protein*) como indicadora da resposta do retículo endoplasmático ao estresse. Para isto, 40 μ g de proteína total dos homogenatos obtido após 4 semanas em cultura foram aplicadas em SDS-PAGE e em seguida realizou-se *Western blot* anti-KDEL. O anticorpo anti-KDEL reconhece quatro proteínas de pesos moleculares 94, 78, 55 e 40 kDa, as três primeiras correspondem às chaperonas GRP 94, BiP (GRP 78) e PDI, respectivamente. Isto é possível graças à conservação carbóxi-terminal da seqüência KDEL (lisina-aspartato-glutamato-leucina).

As condições da eletroforese e *Western blot* foram iguais às descritas no item 3.3.7, exceto que a concentração de acrilamida do gel de resolução foi 10 %. O anticorpo anti-KDEL produzido em coelho foi diluído 1:10.000 e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho foi diluído 1:1.000.

3.2.12 Atividade do proteassomo

Os homogenatos celulares (12,5, 25, 50 e 100 μ g) foram incubados a 37 °C em 10mM de tampão Tris/HCl (pH 7.8). A reação foi iniciada pela adição de 25 μ M de peptídeos fluorogênicos. Utilizou-se o peptídeo LLVY-MAC (succinil-Leucina-Leucina-Valina-Tirosina-7 amido-4-metilcoumarina) para se determinar a atividade de quimiotripsina do proteassomo ou o peptídeo Boc-LRR-MCA (N-t-boc-Leucina-Arginina-Arginina-7-amido-4-metilcoumarina) para a atividade de tripsina. A atividade inerente a outras proteases foram medidas realizando-se as mesmas incubações na presença de lactasistina (1 μ M) um inibidor clássico do proteassomo (Fenteany *et al.*, 1995). Assumiu-se que a fluorescência obtida na presença de lactasistina foi

devida à atividade de outras proteases e a diferença entre a fluorescência na ausência e na presença do inibidor foi considerada a atividade do proteassomo. A fluorescência foi acompanhada em espectrofluorímetro (emissão 430 nm / absorção 360 nm) por 40 min (Canu *et al.*, 2000; Demasi *et al.*, 2001).

O proteassomo das células em cultura também foi inibido. Aproximadamente 1×10^7 células aderidas em garrafas de 25 cm² (100 % de confluência) foram tratadas com lactasistina (1 μ M) em meio de cultura com 5 % de soro fetal bovino a 37° C em estufa de 5% de CO₂. Após 12 h as células foram lisadas. As proteínas dos homogenatos obtidos foram submetidas a SDS-PAGE redutor e gel nativo redutor, em condições eletroforéticas descritas no item 3.2.8 e posterior *Western blot* anti-SOD1.

4 Resultados e Discussão

4.1 Características dos neuroblastomas SH-SY5Y, SH-SY5Y^{WT} e SH-SY5Y^{G93A}

4.1.1 Curva de crescimento

As linhagens transfectadas com uma cópia do gene da SOD1 selvagem (SH-SY5Y^{WT}) ou com uma cópia do gene da SOD1 G93A (SH-SY5Y^{G93A}) apresentaram algumas características diferentes da linhagem parental SH-SY5Y. Em relação ao crescimento, a taxa de replicação foi maior nas linhagens transfectadas. O tempo de dobramento das linhagens SH-SY5Y, SH-SY5Y^{WT} e SH-SY5Y^{G93A} foi de 12 h (? 1,2), 8 h (? 0,9) e 8 h (? 0,9), respectivamente (Figura 4). Apesar da elevada taxa de replicação, a linhagem SH-SY5Y^{G93A} permaneceu mais tempo na fase *lag* que as outras células.

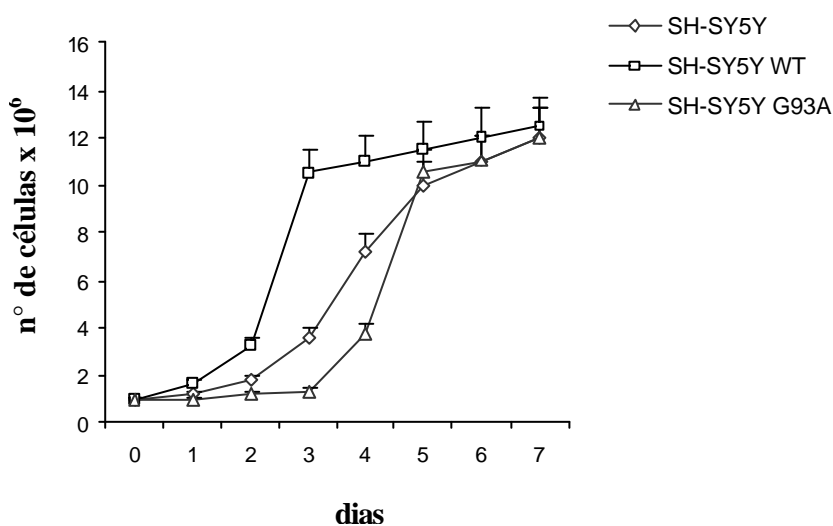


Figura 4. Curva de crescimento das linhagens empregadas.

4.1.2 Níveis de expressão da SOD1

O aumento da expressão da SOD1 nas linhagens SH-SY5Y^{WT} e SH-SY5Y^{G93A} foi confirmada por *Western blot* (Figura 5). Densitometria das bandas marcadas com o anticorpo anti-SOD1 mostrou que a expressão está aumentada em aproximadamente 2,2 vezes nas linhagens transfectadas. Este aumento está de acordo com o descrito pelo grupo que transfectou e cedeu as linhagens. A relação entre o teor de SOD1 dos extratos celulares se manteve, independente do método de lise. As células transfectadas cultivadas por 8 semanas mantiveram a superexpressão de SOD, entretanto verificou-se um pequeno decréscimo na fração solúvel de SOD da célula SH-SY5Y^{G93A}, que passou a ser 1,9 vezes maior que a da célula não transfectada (figura 5).

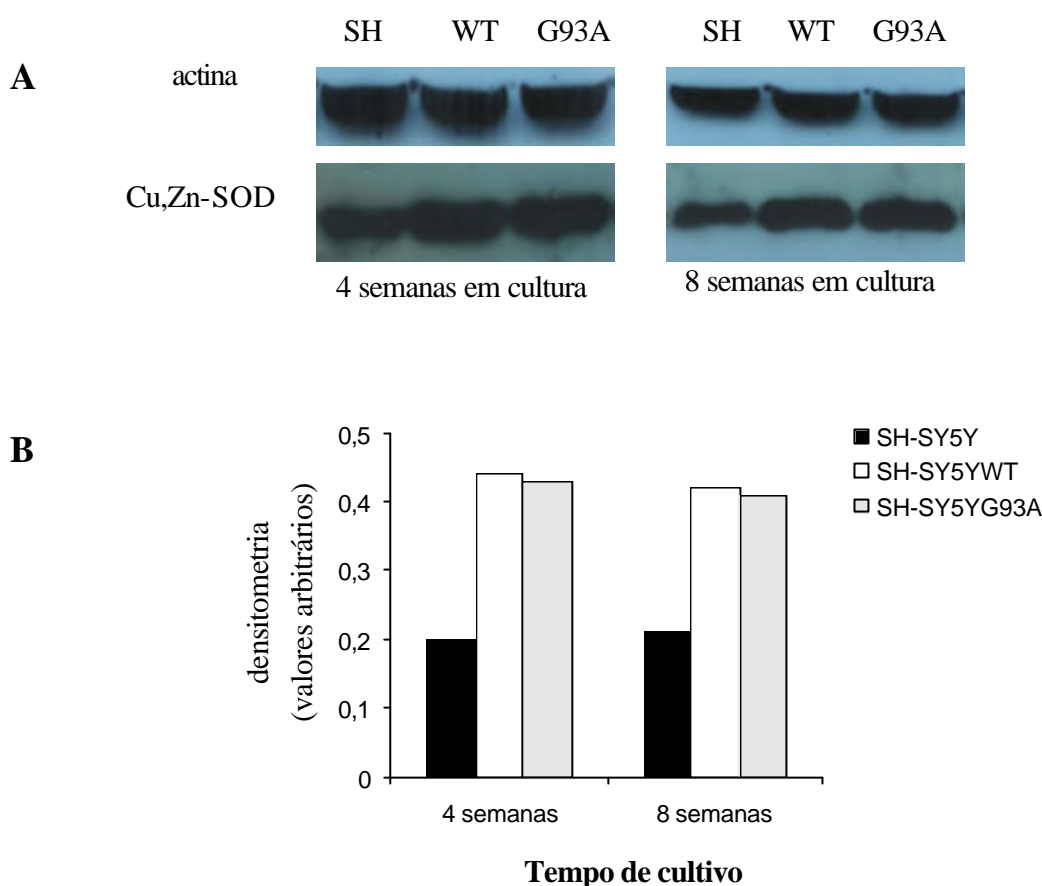


Figura 5. **Expressão da SOD1 nos neuroblastomas em diferentes tempos de cultura.** *Western blot* anti-SOD1 dos lisados celulares. (A) Dez μ g de proteína das células não-transfectada SH-SY5Y (SH) e transfectadas SH-SY5Y^{WT} (WT) e SH-SY5Y^{G93A} (G93A). O controle da quantidade de proteína aplicada foi realizado com anti-actina (parte superior) e a parte inferior refere-se à marcação com anti-SOD1. (B) Relação entre a densitometria das bandas imunoreativas para SOD1 e as imunoreativas para actina (unidades arbitrárias).

4.1.3 Produção de oxidantes intracelulares

A superexpressão da SOD1 *per se* ocasionou uma maior oxidação intracelular da DHR, particularmente na linhagem SH-SY5Y^{G93A} (Figura 6). Isto sugere um ambiente mais oxidante nas células transfectadas, principalmente no modelo celular de ELA.

O tratamento das células com H₂O₂ e menadiona, um gerador intracelular de ânion radical superóxido (Lee, 2001), aumentou a oxidação da DHR em todas as células (Figura 6). As

diferenças observadas sugerem que embora a linhagem SH-SY5Y^{WT} apresente um nível basal mais elevado de espécies oxidantes, está adaptada para se defender de oxidantes externos, enquanto a linhagem G93A parece não estar. O tratamento com menadiona propiciou um aumento considerável na oxidação da DHR no modelo celular de ELA sugerindo comprometimento da atividade superóxido-dismutásica (Figura 6).

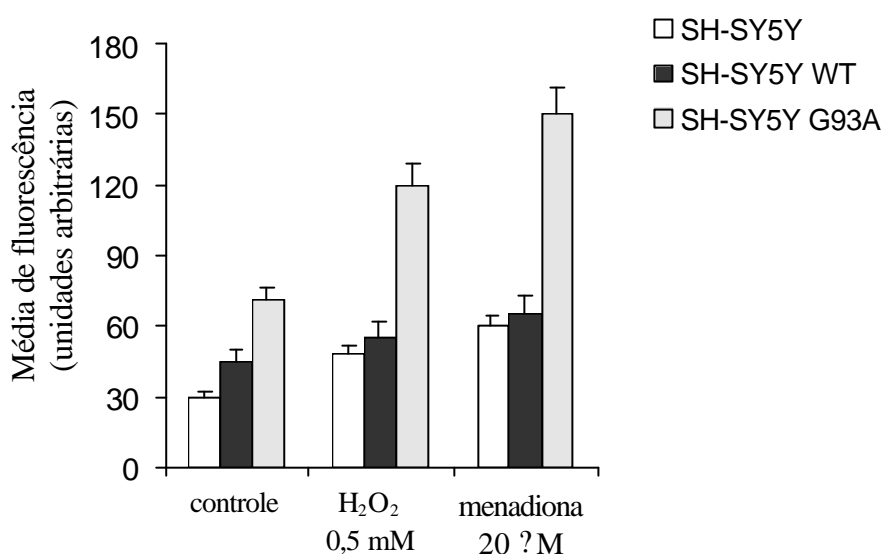


Figura 6. **Oxidação da dihidrorodamina intracelularmente.** Células (2×10^6) de cada linhagem foram tratadas por 2 h com H₂O₂ (0,5 mM) ou menadiona (20 μM). Após este período adicionou-se DHR (10 μM) e em seguida a fluorescência das células viáveis foi mensurada no citometro de fluxo, utilizando-se o filtro FL-1 para rodamina. Os dados são expressos como a média de fluorescência de 10×10^3 células viáveis analisadas.

4.1.4 Medidas de viabilidade e apoptose

O tempo de cultivo celular influenciou na viabilidade dos neuroblastomas. Células com pouco tempo de cultivo apresentaram mais de 90 % de viabilidade. O neuroblastoma SH-

SH-SY5Y^{G93A} cultivado por quatro semanas apresentou considerável redução na viabilidade (Figura 7A).

Os tratamentos com H₂O₂ 0,5 mM ou menadiona 20 μ M reduziram a viabilidade das células e novamente o modelo celular de ELA foi o mais susceptível, enquanto a maior expressão da SOD1 selvagem propiciou proteção, especialmente no tratamento com menadiona (Figura 7B).

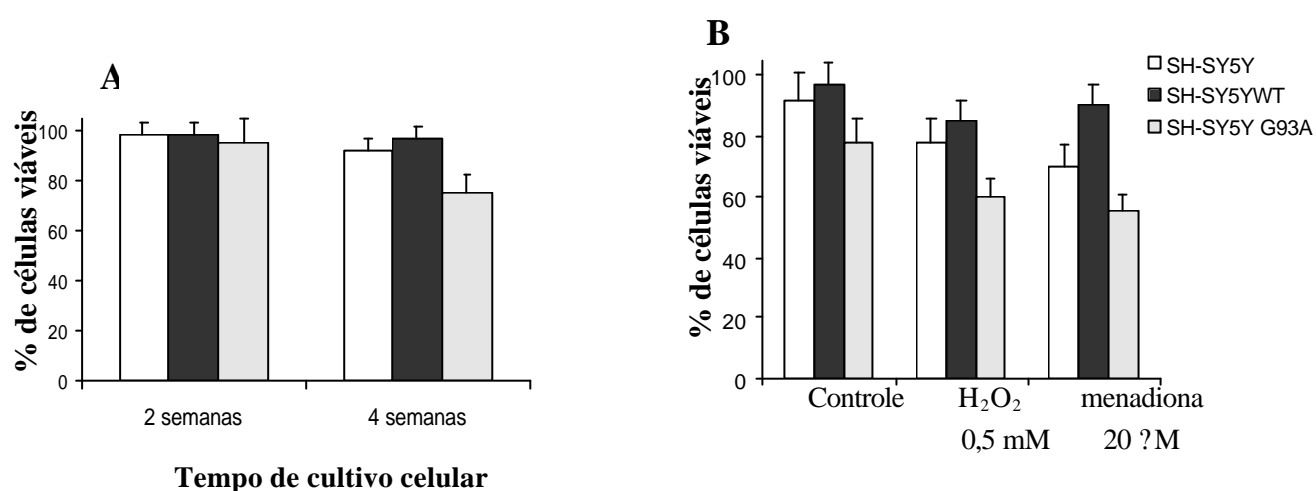
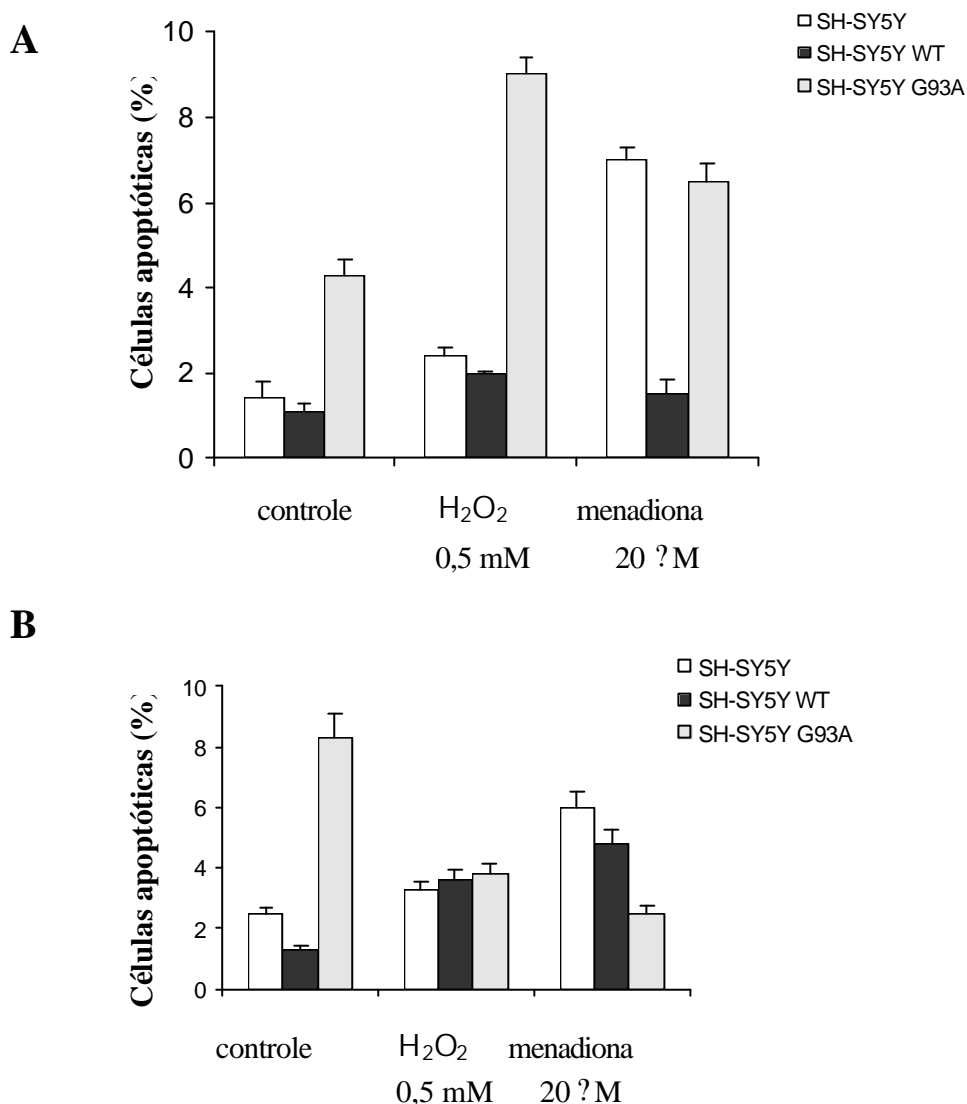


Figura 7. **Viabilidade celular.** Os neuroblastomas SH-SY5Y, SH-SY5Y^{WT} e SH-SY5Y^{G93A} foram incubados com 2 μ g de iodeto de propídio/ 2 x 10⁶ células para análise da viabilidade no FACS após 2 e 4 semanas em cultura (**A**) ou após tratamento com diferentes oxidantes (H₂O₂ 0,5 mM ou menadiona 20 μ M por 2 h) (**B**). Neste caso foram utilizadas células cultivadas por 4 semanas. Os valores estão expressos em porcentagem de células viáveis, ou seja, células que excluíram iodeto de propídio.

Utilizando-se o método da fragmentação do DNA, observou-se que os neuroblastomas SH-SY5Y^{G93A} apresentaram em média três vezes mais células apoptóticas do que as outras linhagens. Após os tratamentos houve um aumento na proporção de células apoptóticas, principalmente na

linhagem SH-SY5Y^{G93A}. A superexpressão da SOD1 selvagem, por sua vez, protegeu as células no tratamento com menadiona (Figura 8 A).

Medidas de exposição de fosfatidilserina confirmaram no geral a resposta das células aos estímulos apoptóticos e a maior porcentagem de células apoptóticas da linhagem SH-SY5Y^{G93A} não tratada. Em relação a esta linhagem, contudo, mostrou que os tratamentos oxidantes reduziram a porcentagem de células apoptóticas, o que parece ser um artefato do método, segundo o qual são consideradas apoptóticas as células que se ligam exclusivamente à anexina (Figura 8 B). Como esta linhagem apresenta maior perda de viabilidade, muitas células que morreram por apoptose ou estão na fase final de apoptose, marcam para iodeto de propídio e, neste caso, foram excluídas da quantificação.



]

Figura 8. **Porcentagem de células apoptóticas.** As células (2×10^6) foram tratadas com H_2O_2 0,5 mM ou menadiona 20 μM por 2 h, em seguida analisou-se a porcentagem de células apoptóticas em citometro de fluxo, usando o método baseado na fragmentação do DNA no qual as células foram incubadas em tampão de lise contendo 1 μg de iodeto de propídio (**A**), ou baseado na exposição da fosfatidilserina, onde as células foram incubadas com Anexina (**B**). Os controles referem-se às células não tratadas.

4.2 Atividades superóxido-dismutásica e peroxidásica dos extratos celulares

A SOD1 bovina foi utilizada para se padronizar o método de determinação da atividade superóxido-dismutásica nos extratos. Ao se adicionar SOD1 no sistema gerador de ânion radical superóxido a redução do NBT por este radical foi gradativamente inibida, como esperado. A atividade específica da enzima bovina foi de 2×10^4 unidades/mg de proteína, valor próximo ao determinado por Beauchamp & Fridovich (1971) para a atividade de SOD1 purificada de eritrócito bovino. A inibição máxima obtida na redução do NBT foi de 90%, como já relatado por Beauchamp & Fridovich (1971) que atribuíram 10% de redução do NBT por interação direta entre este indicador e a xantina oxidase, sem intermédio do ânion radical superóxido. Nos experimentos com os homogenatos celulares a atividade superóxido-dismutásica máxima propiciou a queda de 70 % na velocidade de redução do NBT, provavelmente devido à presença de outros componentes no extrato celular que transferem elétrons para o NBT (Beauchamp & Fridovich, 1971).

Para medir a atividade superóxido-dismutásica dos homogenatos celulares foi necessário que estes fossem obtidos por meio de congelamento-descongelamento em PBS, visto que a presença de detergente no tampão de lise aumentou significativamente a redução do NBT (Liochev *et al.*, 1995).

Os valores de atividades específicas dos homogenatos SH-SY5Y, SH-SY5Y^{WT} e SH-SY5Y^{G93A} foram em média 60, 144 e 139 unidades/mg de proteína, respectivamente, quando obtidos após 2 semanas em cultura (Figura 9 A). O aumento da atividade das células que superexpressam a SOD1 em relação a não-transfectada, de aproximadamente 2,4 e 2,3 vezes, é compatível com o aumento da expressão da enzima verificado por *Western blot* (Figura 5).

As atividades dos homogenatos das linhagens controle praticamente se mantiveram com o aumento do tempo de cultura, enquanto a atividade do lisado da célula SH-SY5Y^{G93A} caiu para 62 e 54 unidades/mg de proteína após 4 e 8 semanas de cultivo, respectivamente (Figura 9A). Ressalta-se que o teor de SOD1 dos extratos usados para atividade superóxido-dismutásica foi acompanhado paralelamente e, independente do tempo de cultura, verificou-se a maior expressão de SOD1 nos neuroblastomas transfectados (Figura 5).

A atividade superóxido-dismutásica revelada em gel nativo confirmou os resultados obtidos por dosagens espectrofotométricas (Figura 9B).

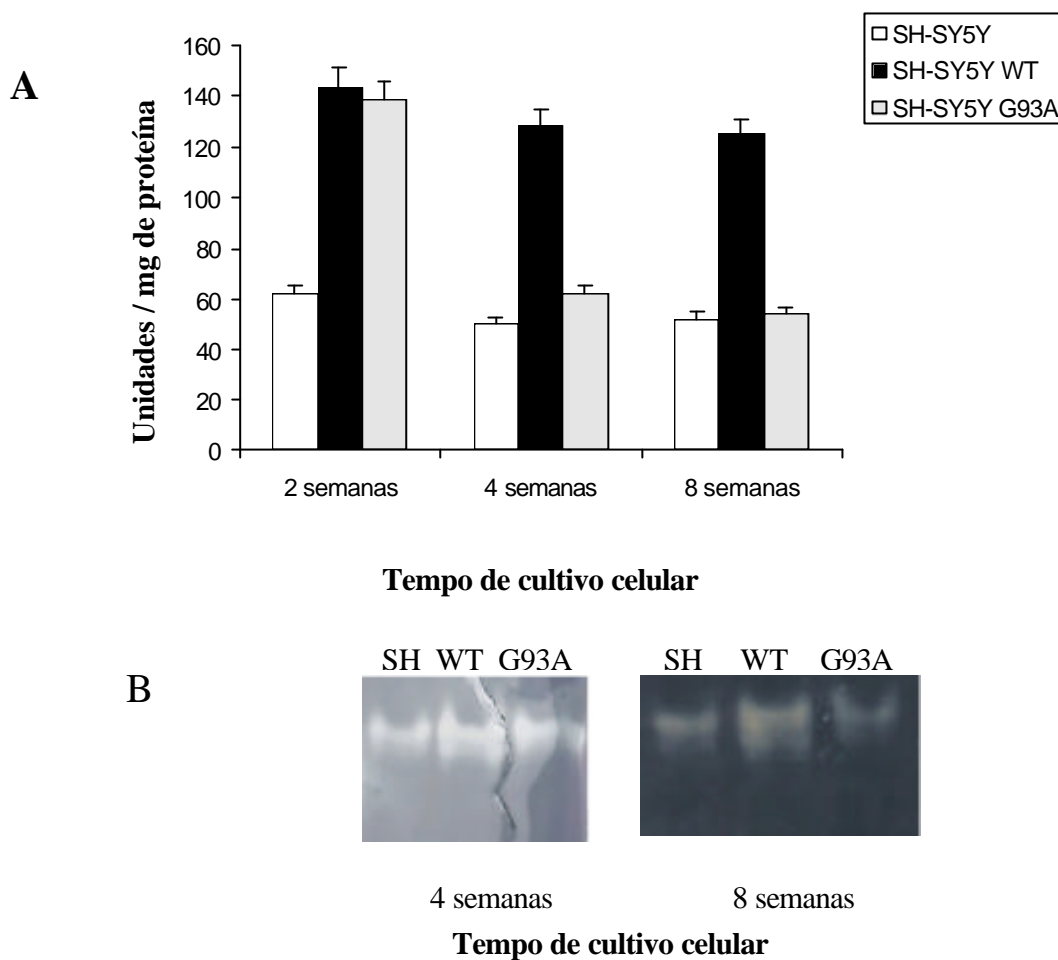


Figura 9. **Atividade superóxido-dismutásica dos homogenatos celulares.** (A) Medidas espectrofotométricas. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de extrato celular que diminuiu em 50 % a velocidade de redução do NBT. (B) Medidas em gel nativo- Aplicou-se 20 μ g de proteína total dos homogenatos obtidos após 4 semanas em cultivo ou após 8 semanas em cultivo em gel não-desnaturante. As áreas claras correspondem à atividade de SOD1 que ao dismutar o superóxido impede a coloração do gel por azul de formazan – produto formado a partir da redução do NBT por ânion radical superóxido.

O trabalho original que descreveu a transfecção destas células apresentou valores de atividade de SOD1 de 10, 22 e 21 U/mg de proteína para os extratos SH-SY5Y, SH-SY5Y^{WT} e SH-SY5Y^{G93A}, respectivamente, utilizando o método do pirogalol. Isso levou à conclusão de que a SOD1^{G93A} neste modelo celular retém completa atividade superóxido-dismutásica (Carrí *et al.*, 1997). Neste mesmo trabalho, entretanto, enfatizou-se que as células SH-SY5Y^{G93A} cultivadas por um período de 8 – 10 semanas rapidamente acumularam lesões e perderam viabilidade. Esta observação, somada aos dados deste trabalho, sugere que algumas mudanças cumulativas ocorrem nesta linhagem e ocasionaram perda da atividade superóxido-dismutásica.

A atividade peroxidásica do homogenato da célula SH-SY5Y^{WT} foi 2 vezes maior que a do lisado da célula SH-SY5Y, como esperado, devido à expressão 2 vezes aumentada da SOD1. A atividade do lisado SH-SY5Y^{G93A} foi 3 vezes maior do que àquela da célula não-transfectada (Figura 10). Após 4 semanas em cultivo a atividade do homogenato da célula SH-SY5Y^{G93A} caiu, equiparando-se àquelas das células controle.

Os valores de atividade obtidos nos homogenatos da célula SH-SY5Y^{G93A} (2 semanas de cultivo) sugerem que a SOD1^{G93A} em células tem maior atividade peroxidásica que a enzima selvagem. Zhang *et al.* (2002) também verificaram maior oxidação de DCF em extratos de medula de rato transgênico SOD1^{G93A} em relação a ratos selvagem, embora a diferença só tenha sido observada após envelhecimento do animal (na fase sintomática da doença). É importante notar que a enzima G93A purificada tem atividade dismutásica e peroxidásica similares às da enzima selvagem (resultados não publicados do estudante Danilo Bilches Medinas do nosso laboratório).

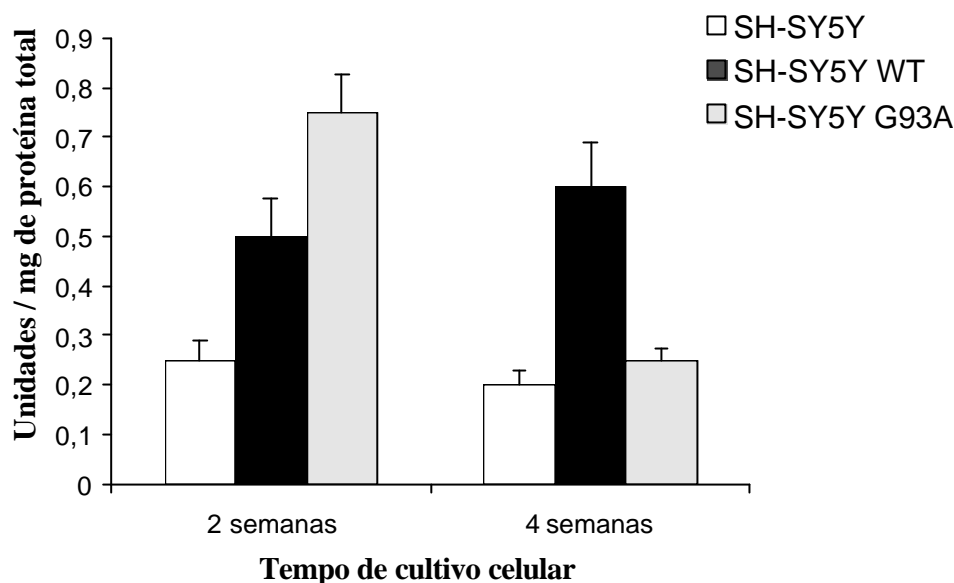


Figura 10. **Atividade peroxidásica dos homogenatos celulares.** Atividade foi monitorada pela oxidação da DHR a 500 nm em tampão fosfato de sódio, pH 7,4 na presença de DRH (80 μ M), HCO_3^- (0 ou 25 mM) e H_2O_2 (3 mM) a 37° C. 1 U = quantidade de proteína total dos lisados que propiciou a oxidação de 1 μ M de DHR/min, considerando a oxidação verificada na presença de 100 mM de HCO_3^- subtraída da oxidação obtida em sua ausência.

As medidas realizadas com extrato celular não mostraram um aumento proporcional à quantidade de extrato celular usada. Os valores apresentados de unidade/mg de proteína foram calculados a partir da oxidação da DHR em ensaios realizados com 100 μ g de proteína total do extrato celular.

Para confirmar as diferenças de atividade peroxidásica entre os lisados, foi desenvolvido um método de análise em gel nativo de proteína, testado com a SOD1 bovina (Figura 11 A) e depois aplicado aos homogenatos celulares (Figura 11 B). As bandas referentes à atividade peroxidásica da SOD1 foram detectadas apenas no gel pré-incubado com solução de bicarbonato de sódio.

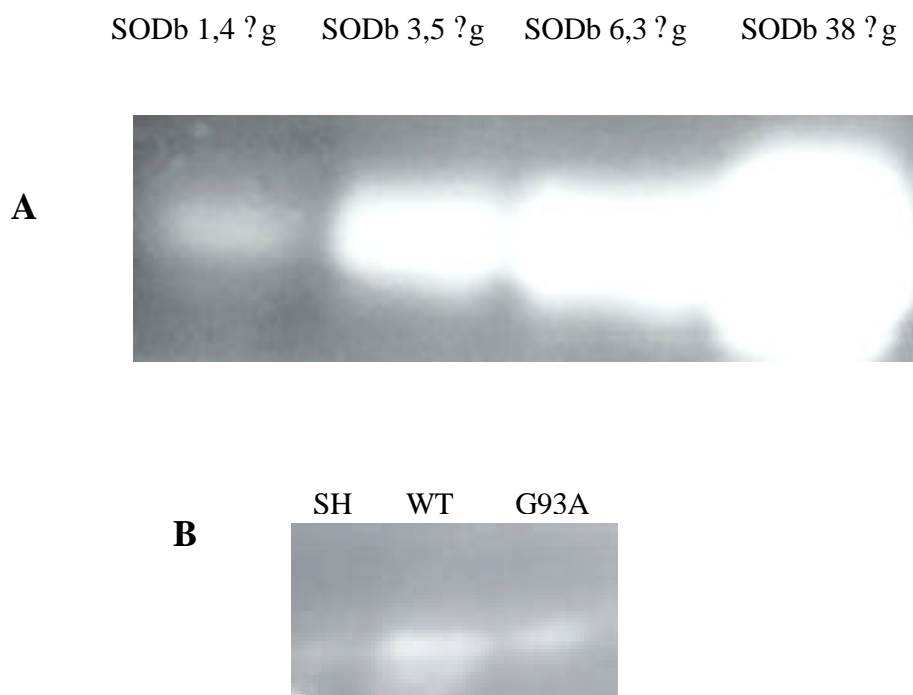


Figura 11. **Atividade peroxidásica em gel nativo de proteína.** Atividade peroxidásica da SOD1 bovina (SODb) (**A**) e dos homogenatos celulares obtidos na 4^a semana de cultura (400 ?g de proteína total) (**B**). Após a eletroforese em condições não desnaturantes os géis foram incubados em tampão fosfato 100 mM com 25 mM HCO_3^- e 80 ?M de DHR. Após 20 min. foram adicionados 3 mM de H_2O_2 . Após 20 min. as bandas foram detectadas.

A atividade superóxido-dismutásica dos lisados das células SH-SY5Y^{G93A} obtidos após 2 semanas em cultivo é compatível com a maior expressão de SOD1, enquanto a atividade peroxidásica é aumentada mais do que o nível de expressão da enzima. Esses dados sugerem que a SOD^{G93A} é mais ativa em consumir H_2O_2 e gerar espécies oxidantes no ambiente intracelular. A redução das duas atividades enzimáticas após 4 semanas em cultivo, apesar da maior expressão de SOD1 ser mantida, sugere fortemente que a capacidade da enzima de catalisar estes processos vai diminuindo com o tempo. Não há alterações nas atividades dos homogenatos das outras

células com o tempo de cultivo celular. Deve-se notar que vários ensaios indicam que a SOD1 é uma proteína bastante estável; a SOD1^{WT} superexpressa em nefrócitos embrionários humanos 293 tem uma meia-vida de mais de 100 h (Hoffman *et al.*, 1996).

4.3 Formas imaturas e oligomerizadas de SOD1 nos lisados celulares

Tiwari & Hayward (2003) foram os primeiros a demonstrar que as enzimas mutadas associadas à ELA são mais susceptíveis à redução da ponte dissulfeto intramolecular *in vitro*.

Os protocolos de obtenção de homogenatos celulares e de separação de suas proteínas geralmente incluem quantidades significativas de redutores como 2-mercaptoetanol ou ditioneitol. A omissão destes agentes evita a redução de pontes dissulfeto, mas por outro lado torna favorável a oxidação das cisteínas. Para prevenir mudanças no estado de oxidação de cisteínas protéicas é usual a adição de agentes alquilantes de tióis como iodoacetemida em excesso durante lise celular. Nos experimentos aqui descritos, iodoacetamida (40 mM) foi adicionada ao tampão de lise.

O monômero de SOD1 com ponte dissulfeto intramolecular migra aproximadamente 2 kDa abaixo do monômero reduzido em SDS-PAGE (Jonsson *et al.*, 2006). Desta forma, foi possível distinguir as formas reduzidas e oxidadas de SOD1 presentes nos homogenatos celulares (Figura 12).

Valores arbitrários de densitometria das bandas de SOD1 para os lisados SH-SY5Y, SH-SY5Y^{WT} e SH-SY5Y^{G93A} foram de 66,7, 130,6 e 124, respectivamente, para a banda oxidada e 12, 22,4 e 14,20, respectivamente, para a banda reduzida (Figura 12A). A relação entre a banda oxidada e a reduzida de 5:1 nos casos das células SH-SY5Y e SH-SY5Y^{WT} indica que há normalmente uma pequena fração da enzima reduzida, e que o aumento na expressão da SOD1

eleva o teor da forma reduzida, mas a proporção entre as formas se manteve. No caso da linhagem SH-SY5Y^{G93A} a relação entre as bandas oxidada e reduzida foi de 8,5:1. Isso todavia não indica menores teores de enzima reduzida porque multímeros ligados por ponte dissulfeto são também visualizados nesses lisados (Figura 12 C). Para assegurar que essas bandas eram consequência da formação de pontes dissulfeto, as mesmas amostras foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante, na presença de DTT. Após o *Western blot* com anticorpo anti-SOD1 verificou-se o aparecimento de uma única banda, correspondente ao monômero reduzido da SOD1 (Figura 12 D).

Em cada monômero da SOD1 há 4 resíduos de cisteína, de números 6, 57, 111 e 146 na seqüência de aminoácidos. Os resíduos 57 e 146 estão envolvidos na formação da ponte dissulfeto intramolecular presente na forma madura da enzima. Em situações nas quais ocorra acúmulo de enzima reduzida, os quatro resíduos podem participar de oligomerizações por pontes dissulfetos (Furukawa *et al.*, 2006). Neste contexto, os resultados da Figura 12 sugerem um acúmulo de formas reduzidas na linhagem que expressa a G93A.

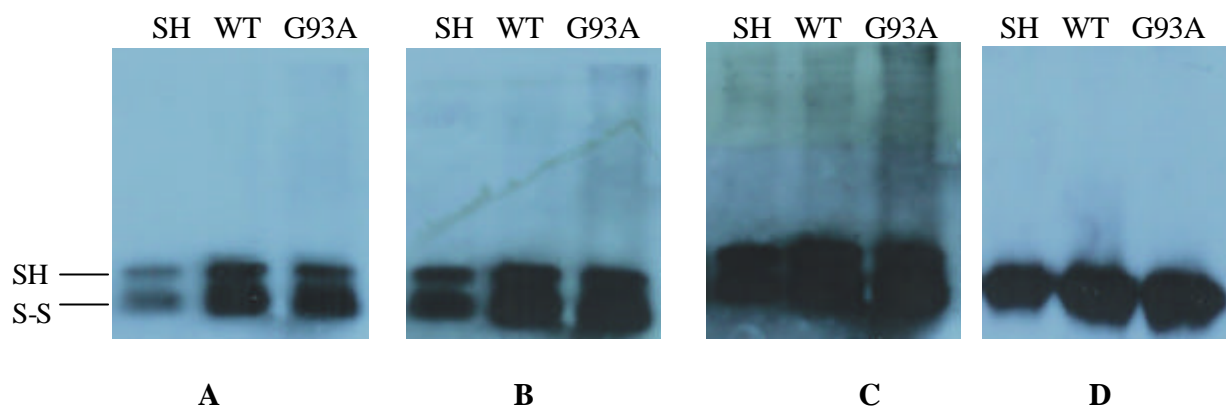


Figura 12. **Monômeros de SOD1 reduzidos (SH), oxidados (S-S) e multímeros ligados multímeros ligados por ponte dissulfeto em diferentes tempos de exposição (A) 0,5 min, (B) 1 min, (C) 5 min.** Lisados celulares (3 μ g) obtidos em tampão NP-40 contendo iodoacetamida 40 mM foram submetidos a eletroforese em condições desnaturantes e não-redutoras (A, B e C) ou desnaturantes e redutoras (D). O *Western blot* com anticorpo anti-SOD1 mostra o monômero de SOD1 com a ponte dissulfeto intramolecular oxidada (banda maior mobilidade eletroforética em A, B e C) e o monômero com a ponte dissulfeto intramolecular reduzida (banda de menor mobilidade em A, B e C e única banda em D). Note-se que com maior tempo de exposição (B e C) são revelados multímeros ligados por ponte dissulfetos principalmente na canaleta correspondente aos lisados de SH-SY5Y^{G93A}.

Outros trabalhos mostraram multímeros constituídos por ponte dissulfeto entre SODs e entre SOD e outras proteínas em extratos de medula espinhal de animais transgênicos (Jonsson *et al.*, 2006; Furukawa *et al.*, 2006). A importância desses multímeros na patogênese da ELA ainda não foi elucidada. Entretanto, é mais uma evidência de que a mutação G93A favorece formas imaturas da enzima.

Para uma melhor caracterização das formas da SOD1 nos lisados celulares, repetimos os experimentos de *Western blot* em condições não-desnaturantes com maiores quantidades de proteínas. Observamos que na ausência de DTT o anticorpo anti-SOD1 revelou várias bandas nos extratos de SH-SY5Y^{WT} e SH-SY5Y^{G93A}, particularmente na última (Figura 13A). Em condições

não-desnaturantes e com DTT, a imunorreatividade para SOD1 reduziu-se a duas bandas, uma correspondendo ao dímero e outra de maior peso molecular (Figura 13B). Como a concentração do gel de resolução usado na eletroforese foi de 10%, o monômero da SOD1 provavelmente saiu do gel (desnaturante e redutor) ao longo da corrida.

Conclui-se que a principal forma de oligomerização da SOD1 ocorre por pontes dissulfeto. Todavia, mesmo em presença de DTT, a banda difusa de alto peso molecular foi mais robusta nos extratos da linhagem G93A (Figura 13B). Isso sugere uma maior propensão à agregação por interação hidrofóbica. De qualquer forma, dobrar a expressão da SOD1 selvagem já aumentou os níveis de oligômeros ligados por pontes dissulfetos ou por interações hidrofóbicas.

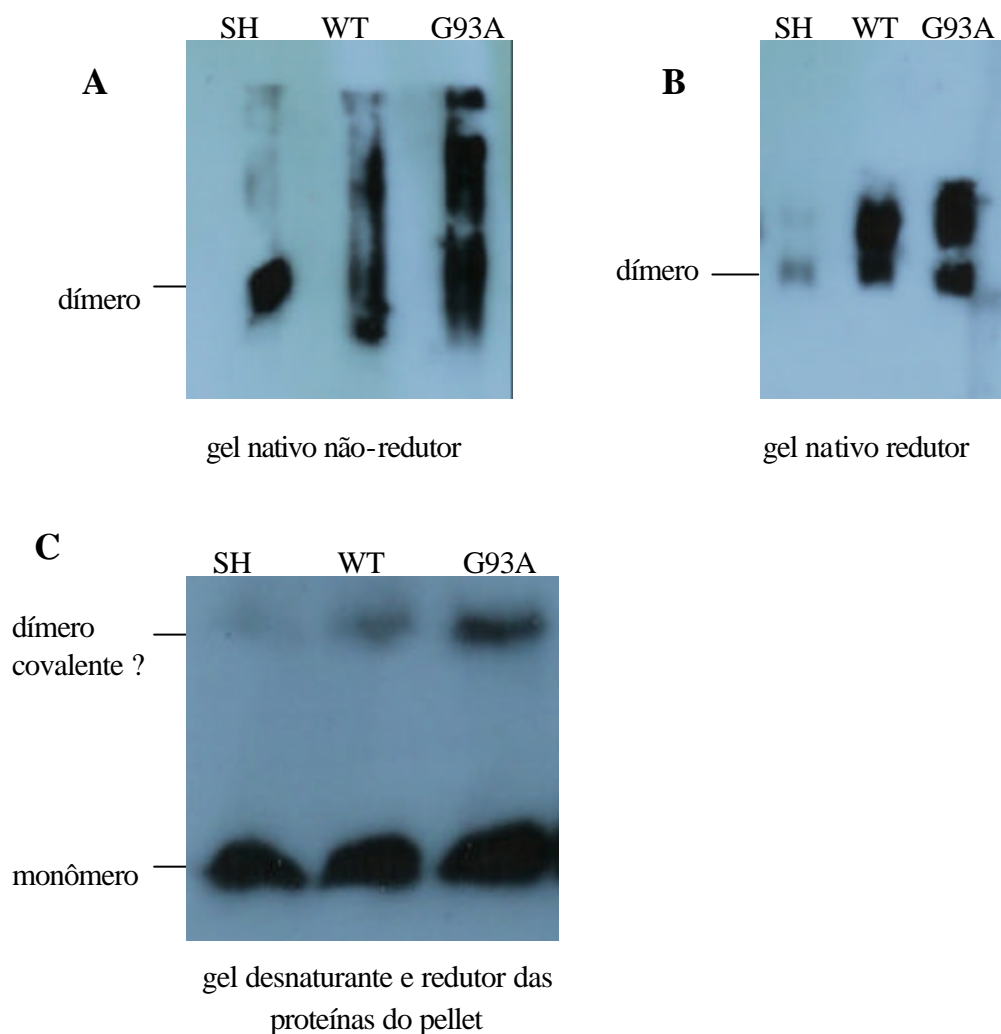


Figura 13. **Oligômeros solúveis e insolúveis da SOD1.** (A) e (B) Proteína total (20 μ g) de cada extrato celular foi submetida a eletroforese em condições não-desnaturantes e não-redutoras (A) e não desnaturantes e redutoras (B). (C) O pellet que restou da extração celular (de 3×10^7 células) foi ressuspenso em tampão de amostra 1:1 e aplicado em gel desnaturante e redutor. Após a eletroforese realizou-se *Western blot* anti-SOD1.

Assumindo-se que parte dos agregados protéicos constituídos por SOD1 possam ser resistentes à lise em detergente aniônico como é o caso do tampão NP-40, o pellet que restou após a lise das células foi ressuspenso em tampão de amostra (1% de SDS), com 100 mM de DTT e fervido por 30 min. Após eletroforese em condições desnaturantes, verificou-se no

Western blot anti-SOD principalmente as bandas correspondentes ao monômero da SOD1 (Figura 13 C). Isso era esperado frente as condições altamente desnaturantes usadas para dissolver o pellet.

A banda do monômero foi mais intensa na canaleta correspondente à amostra G93A, sugerindo que maiores níveis de agregados de SOD1 resistentes a detergente nessas células (Figura 13 C). Surpreendentemente, além do monômero de SOD, apareceu uma banda de peso molecular próxima à do dímero. Tendo em vista as condições desnaturantes e redutoras usadas, infere-se que esta banda seja formada por um dímero covalente de SOD1. Em estudos *in vitro* com a SOD1 selvagem purificada, Zhang *et al.* (2003) verificaram a formação do dímero covalente de SOD e atribuíram sua formação à atividade peroxidásica da enzima. O mecanismo proposto é de que o CO_3^{2-} formado se difunde e oxida o resíduo de triptofano (Trp-32) localizado na superfície da enzima levando à dimerização covalente da enzima.

Embora agregação protéica e multímeros já tenham sido demonstrados em modelos animais e celulares de ELA, dímeros covalentes não foram ainda reportados. Nossos resultados mostram a presença desse dímero no pellet de proteína, sugerindo que ele esteja envolvido na formação de agregados insolúveis em detergentes. O fato das células SH-SY5Y^{G93A} apresentarem maiores níveis do dímero covalente, aparentemente contradiz a menor atividade peroxidásica dos homogenatos após quatro semanas em cultura (Figura 9).

4.4 Respostas celulares às formas imaturas e oligomerizadas de SOD1: Estresse do retículo endoplasmático e ativação do proteassomo

A presença de formas alteradas de SOD1 nos extratos celulares das linhagens que expressam SOD1 selvagem e a mutante G93A tornou relevante examinar as usuais respostas celulares frente a proteínas modificadas, como o estresse de retículo. No retículo endoplasmático ocorre o enovelamento de proteínas destinadas a outros compartimentos celulares. Esta organela controla rigorosamente o envio de proteínas para o Complexo de Golgi, assegurando que proteínas mal-enoveladas ou desenoveladas são retidas e em último caso degradadas (Welihinda, 1999). Situações que levam ao acúmulo de proteínas mal-enoveladas ou desenoveladas levam ao estresse do retículo endoplasmático. Neste caso, há a ativação de uma cascata de sinalização denominada resposta ao mal-enovelamento protéico (UPR, do inglês *unfolding protein response*) (Kaufman, 2002). Para acompanhar essa resposta, utilizamos o anticorpo anti -KDEL como descrito em material e métodos.

A análise do *Western blot* anti-KDEL demonstrou que a superexpressão da SOD1 nas linhagens SH-SY5Y^{WT} e SH-SY5Y^{G93A} levou ao aumento na expressão da BiP em 1,7 e 1,4 vezes, respectivamente, em relação à linhagem não-transfectada (Figura 14). Este aumento pode ser considerado favorável e lógico, tendo em vista a importância de chaperonas para a formação da ponte dissulfeto intramolecular e inserção de Cu(II) na SOD1 (Furukawa *et al.*, 2004). De fato, a maior expressão de BiP leva à modulação positiva na expressão de outras chaperonas (Turano *et al.*, 2002).

A presença de estresse de retículo endoplasmático nas células que superexpressam a SOD sugere que ao menos uma fração destas enzimas encontra-se no retículo endoplasmático. A localização da SOD1 nesta organela foi reportada em outros estudos (Mondola *et al.*, 2003; Atkin

et al., 2006). Embora não se saiba o papel desta localização, supõe-se que seja importante para a formação da ponte dissulfeto antes da exportação da proteína para o citossol (Atkin *et al.*, 2006).

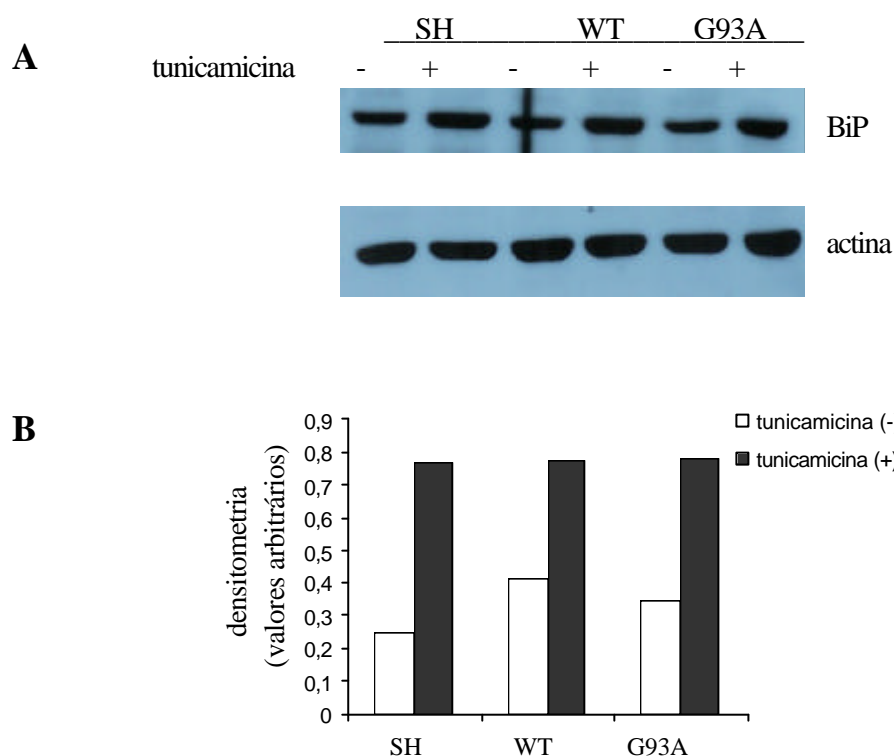


Figura 14. **BiP é mais expressa nas células cuja expressão de SOD1 foi dobrada, independente da mutação.** Os neuroblastomas SH-SY5Y (SH), SH-SY5Y^{WT} (WT) e SH-SY5Y^{G93A} (G93A) na quarta semana de cultivo foram tratados ou não com tunicamicina 2 μ g/mL por 12 h. Após a obtenção dos homogenatos celulares, aplicou-se 40 μ g de proteína total de cada lisado das células em SDS-PAGE, e realizou-se o *Western blot* anti-KDEL e anti-actina (**A**). A relação entre a densitometria das bandas imunoreativas para BiP e das bandas imunoreativas para actina estão representadas no gráfico (**B**).

O tratamento com tunicamicina, um inibidor da glicosilação e, portanto, um agente que leva ao estresse de retículo (Nakagawa & Yuan, 2000), aumentou a expressão da BiP em todas as

linhagens de forma homogênea (Figura 14), confirmando a responsividade do retículo endoplasmático destas células ao mal-enovelamento e agregação protéicas.

Outras respostas celulares examinadas foram as atividades dos proteassomo. Estes são grandes complexos protéicos que degradam proteínas por proteólise dependente de ATP em 3 sítios catalíticos que possuem atividade proteolítica de tripsina, quimiotripsina e caspase (Peters, 1994). Os proteossomos regulam a concentração de algumas proteínas de meia-vida curta e degradam proteínas mal-enoveladas. Geralmente há inserção covalente de moléculas de ubiquitina nas proteínas a serem degradadas pelo proteassomo (Peters *et al.*, 1994). Entretanto, proteínas com estruturas muito alteradas, desenoveladas ou altamente oxidadas são degradadas independentemente de ubiquitinação em certas situações de estresse oxidativo (Shringarpure *et al.*, 2003).

Vários trabalhos demonstraram que as SOD1s mutadas associadas à ELA são degradadas mais rapidamente que a enzima selvagem e os autores sugeriram que a degradação ocorre principalmente via proteassomo (Hoffman *et al.*, 1996; Johnston *et al.*, 2000; Aquilano *et al.*, 2003). Em contrapartida, outros estudos sugerem que o proteassomo se torna indisponível para exercer sua função ao se associar aos grandes agregados protéicos presentes nos tecidos e células de modelos da ELA (Valentine *et al.*, 2005).

Nas nossas linhagens, as atividades de quimiotripsina e tripsina dependentes do proteassomo foram similares entre as células cultivadas por duas semanas (Figura 15). Após quatro semanas em cultivo houve um aumento de aproximadamente 50 % na atividade de quimiotripsina das células que superexpressam a SOD1 (Figura 15 A), mas não na atividade da tripsina (Figura 15 B). Esses resultados indicam que não ocorreu síntese do proteassomo, mas sim que sua atividade foi modulada positivamente. A ativação da atividade quimiotripsina pelo estado redox intracelular já foi descrita (Kretz-Remy & Arrigo, 2003).

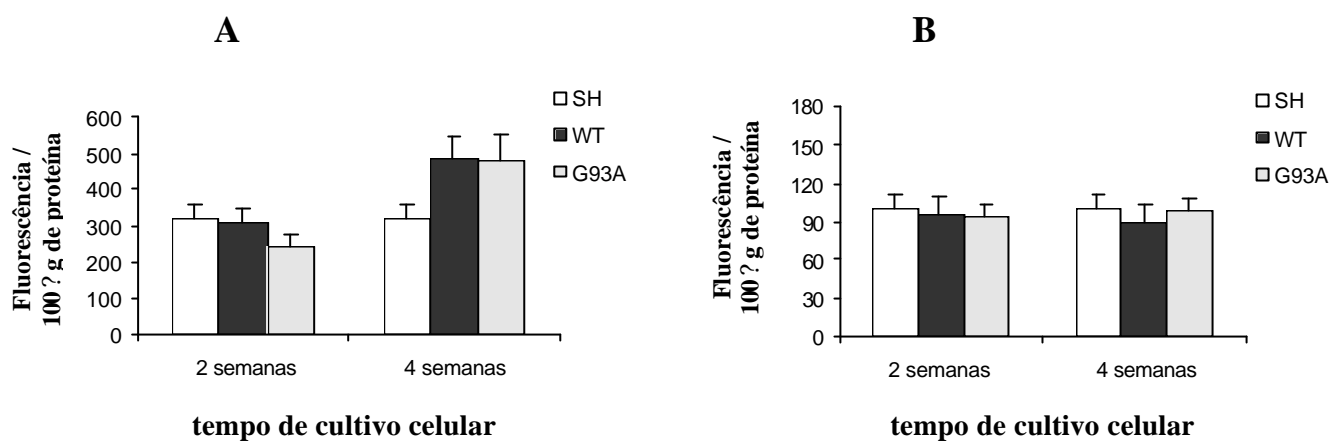


Figura 15. **Atividades do proteassomo dos neuroblastomas.** A atividade de quimi tripsina (**A**) e tripsina (**B**) foram determinadas pelo acompanhamento da clivagem dos peptídeos fluorogênicos LLVY-MCA (25 μ M) e ARR-MCA (25 μ M), respectivamente. Para estimar a atividade específica do proteassomo, as incubações dos homogenatos celulares com os peptídeos foram realizadas na ausência ou presença de 1 μ M de lactasistina. Os dados são apresentados como a diferença entre a atividade na ausência e presença de lactasistina e expressos como fluorescência (unidades arbitrárias)/100 μ g de proteína.

Pode-se supor que nossos dados, em relação à linhagem G93A, estejam subestimados, visto que na quarta semana de cultivo verificou-se maior propensão à agregação protéica da SOD1. Assumindo-se que o proteassomo possa participar destes agregados, a atividade verificada seria devida ao proteassomo solúvel, que poderia estar presente em menores concentrações do que nas outras linhagens.

Nossos resultados contrariam estudos anteriores que descreveram atividades de tripsina e quimi tripsina significativamente aumentadas na linhagem SH-SY5Y^{G93A}, em relação às linhagens SH-SY5Y e SH-SY5Y^{WT} (Aquilano *et al.*, 2003). Neste trabalho, o aumento na

expressão da SOD1 selvagem também foi relacionado a uma menor atividade do proteassomo. Esta aparente discrepância deve refletir as mudanças de ocorrem com as células paralelamente ao tempo de cultivo celular (ver item 4.2).

Uma outra estratégia para examinar a influência da atividade do proteassomo sobre as formas de SOD1 foi inibi-lo com lactasistina. O tratamento com lactasistina parece aumentar o conteúdo de SOD1 solúvel nos lisados das células SH-SY5Y e SH-SY5Y^{WT}, mas não das células SH-SY5Y^{G93A} (Figura 16 A e B). Nestas, ocorreu um aumento significativo da banda de proteínas insolúveis (pellet) principalmente na fração de peso molecular próxima ao do dímero de SOD1 (Figura 16 C e D). Estes resultados corroboram a hipótese de que o dímero covalente está associado às formas insolúveis em tampão NP-40.

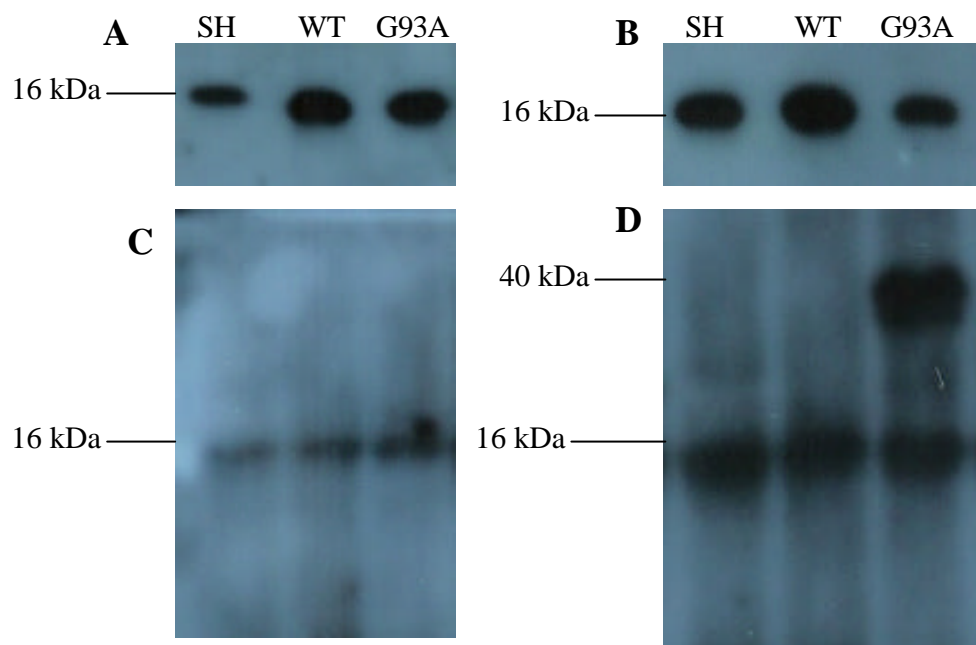


Figura 16. **Efeitos da inibição do proteassomo sobre as formas de SOD1 presentes nos neuroblastomas.** Os homogenatos celulares obtidos de células não-tratadas (**A**) ou tratadas com lactacistina (1 μ M, 12 h) (**B**) foram usados para análise de *Western blot* de SOD (1 μ g de proteína total de cada lisado). Os pellets que restaram da lise celular foram incubados em tampão de amostra com 100 mM de DTT a 100°C por 1 h e 20 μ g de proteína obtida deste procedimento foram usadas para *Western blot* anti-SOD para se estimar a SOD1 insolúvel (**C** e **D**), sendo **C** correspondente ao *Western blot* feito a partir de homogenatos de células não tratadas com lactacistina e **D** de células tratadas.

5. Considerações finais

Comparar ao longo do tempo de cultura algumas das características dos neuroblastomas humanos parentais (SH-SY5Y) com aquelas dos transfectados com uma única cópia do gene SOD1 selvagem (SH-SY5Y^{WT}) ou mutante (G93A) (SH-SY5Y^{G93A}) forneceu informações importantes. Por exemplo, os resultados mostraram que dobrar a expressão da enzima selvagem é suficiente para ocasionar uma maior produção basal de oxidantes (Figura 6), apesar da reconhecida função antioxidante da SOD1. Atividades oxidantes da SOD1 (peroxidásica, superóxido-redutase e tiol oxidase) já foram descritas *in vitro*, mas suas ocorrências *in vivo* são contestadas. Nossos resultados mostram que dobrar a já alta concentração intracelular da SOD1 pode favorecer essas atividades. O aumento basal de espécies oxidantes está provavelmente relacionado ao aumento da taxa de dobramento das linhagens SH-SY5Y^{WT} e SH-SY5Y^{G93A} (Figura 1). Muitos genes são induzidos em resposta a oxidantes, incluindo genes de fatores de transcrição, proteínas de replicação, proteases e de proteínas que regulam proliferação celular (Janssen et al., 1993). Nossos resultados indicam que a expressão aumentada de SOD1 em indivíduos que apresentam trissomia do cromossomo 21 (síndrome de Down) poderia estar relacionada ao aumento de lesões oxidativas detectadas nesses pacientes (Kowald & Klipp, 2004). Evidentemente, não se poderia atribuir a um único gene todas as alterações verificadas na síndrome de Down. Por outro lado, vários estudos em outros modelos neuronais indicam que a superexpressão de SOD1 protege contra diferentes agentes oxidantes (Schwartz & Coyle, 1998). Dessa forma, mais estudos serão necessários para elucidar as circunstâncias e os mecanismos pelos quais a SOD1 pode atuar como um pró-oxidante celular (ver, também, abaixo).

Além de mostrarem que dobrar as concentrações intracelulares de SOD1 aumenta a produção basal de oxidantes, nossos resultados mostram que esse aumento é consideravelmente

maior no caso da expressão da SOD^{G93A}, uma enzima associada à ELAF. As células SH-SY5Y^{G93A} também foram mais susceptíveis ao tratamento com oxidantes exógenos (Figura 7), o que está de acordo com outros estudos em modelos animais e celulares da doença (Valentine *et al.*, 2005). Ao contrário da linhagem SH-SY5Y^{G93A}, a SH-SY5Y^{WT} parece adaptar-se ao aumento basal de oxidantes como evidenciado pela manutenção da sua viabilidade (Figura 7A) e resistência a tratamentos com oxidantes exógenos (Figura 7B). A adaptação de células a baixos níveis de oxidantes é um fenômeno bastante estudado na literatura (Vallis & Wolf, 1996; Augusto, 2006). Possivelmente, os danos oxidativos na linhagem SH-SY5Y^{G93A} são mais severos, impedindo a resposta adaptativa. Em concordância com essa hipótese, os níveis basais de células apoptóticas foram maiores na linhagem SH-SY5Y^{G93A} (Figura 8). Esses dados também ressaltam que vários fatores envolvidos na cascata apoptótica são responsivos a oxidantes (Ryter *et al.*, 2007).

Nos tempos iniciais de cultura (2 semanas), a linhagem SH-SY5Y^{G93A} apresenta maior atividade peroxidásica que a linhagem SH-SY5Y^{WT} (Figura 10), embora os níveis de expressão da enzima selvagem e mutante sejam similares (Figura 5), e as enzimas purificadas tenham a mesma atividade peroxidásica (resultados não publicados). Esses resultados sugerem que no ambiente celular, a SOD1 selvagem e mutante sofrem modificações que alteram suas atividades peroxidásicas. Relevantemente, a linhagem SH-SY5Y^{G93A} perde parte de suas atividades SOD (Figura 9) e peroxidásica (Figuras 10 e 11) com o tempo de cultura, sugerindo que mudanças cumulativas vão inativando a enzima. As menores atividades observadas suportam a hipótese de que as enzimas mutadas são mais susceptíveis a agregação (Lynch *et al.*, 2004; Stathopoulos *et al.*, 2003; Auchere *et al.*, 2003) e a modificações oxidativas (Kurahashi *et al.*, 2001; Alvarez *et al.*, 2004; Potter & Valentine, 2003). De fato, na quarta semana de cultivo verificamos na linhagem G93A, maiores níveis de oligômeros ligados por pontes dissulfeto que contém SOD1, bem como

formas insolúveis em NP40, incluindo um dímero covalente que pode ser atribuído à oxidação do Trp32 da enzima durante sua atividade peroxidásica (Zhang et al, 2004). Todavia, ainda não temos dados confirmando a estrutura do dímero de SOD1 presente nos extratos dos neuroblastomas. Também, não determinamos as atividades dismutásica e peroxidásica das formas diméricas covalentes e oligomerizadas da SOD1 selvagem e mutante. Pelo nosso conhecimento, as atividades enzimáticas dessas formas ainda não foram descritas na literatura. Todavia, esses dados seriam importantes para estabelecer se as formas imaturas e alteradas de SOD1 possuem maior capacidade de gerar oxidantes do que a enzima nativa. Essa capacidade poderia explicar o aumento de oxidantes celulares com o aumento dos níveis de expressão da enzima.

A maior atividade de quimiotripsina do proteossomo e os maiores níveis da chaperona BiP das linhagens transgênicas são evidências adicionais de que aumentar a expressão da SOD1 aumenta os níveis de formas imaturas da enzima e de oligômeros contendo SOD1. Particularmente relevante, foi demonstrar que a inibição do proteossomo aumenta consideravelmente os níveis do dímero covalente nas células SH-SY5Y^{G93A} (Figura 16). Esses resultados indicam que modificações oxidativas em sítios específicos como o Trp32 ocorrem durante o “turnover” da SOD1 marcando-a para degradação pelo proteossomo (Valentine et al, 2005). Também, indicam que o processo é bem mais acentuado na mutante G93A. Acima de tudo, esses resultados sugerem que a atividade peroxidásica da SOD1 parece relevante em *in vivo*, pelo menos em modelos celulares. Muito recentemente, foi descrito que a expressão transitória de SOD1 mutantes relacionadas à ELAf em células de neurônios motores leva a associação das mutantes às mitocôndrias comprometendo a função dessas organelas. Todas as mutantes testadas se associaram mais do que a SOD1 selvagem, num processo que parece depender da oxidação do resíduo Cys111 das enzimas (Ferri et al, 2006). Esses estudos também suportam a ocorrência da atividade peroxidásica da SOD1 *in vivo*, à medida que o radical

carbonato oriundo dessa atividade produzido poderia oxidar a Cys111 (Augusto et al, 2002; Bonini et al, 2004), além do Trp32 (Zhang et al, 2004). A oxidação da Cys11 durante a atividade peroxidásica da SOD1 precisa ainda ser demonstrada.

Em conclusão, nossos resultados indicam que a atividade peroxidásica da SOD1 e mutantes associadas à ELAf podem ter um papel na citotoxicidade dessas proteínas e precisam ser melhor estudadas *in vitro* e *in vivo*.

6 Conclusões

Um aumento de dois na expressão da SOD1 aumentou a produção de oxidantes intracelulares e a taxa de crescimento celular. Dobrar a expressão da SOD1 selvagem protegeu as células de tratamentos oxidantes, mas não a expressão da SOD^{G93A}.

A SOD1 apresentou maior atividade peroxidásica, entretanto foi inativada ao longo do cultivo celular.

A maior expressão da SOD1 propiciou a formação de agregados, de forma mais acentuada na linhagem SH-SY5Y^{G93A}, principalmente constituídos por ponte dissulfeto. Agregados insolúveis também foram mais formados nesta célula e apenas na fração insolúvel detectou-se o dímero covalente de SOD1. As células transfectadas apresentaram respostas iguais às formas oligomerizadas e imaturas da SOD1, no que se refere à atividade do proteassomo e ao estresse do retículo endoplasmático.

Referências bibliográficas

- Allen S, Heath PR, Kirby J, Wharton SB, Cookson MR, Menzies FM, Banks RE, Shaw PJ. Analysis of the cytosolic proteome in a cell culture model of familial lateral sclerosis reveals alterations to the proteasome, antioxidant defenses, and nitric oxide synthetic pathways. *J Biol Chem (Baltimore)* 2003;278 (8):6371-83.
- Alvarez B, Demicheli V, Duran R, Trujillo M, Cervenansky C, Freeman BA, Radi R. Inactivation of human Cu,Zn-superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidinyl radical. *Free Radic Biol Med (San Diego)* 2004;37(6):813-22.
- Andersen PM, Nilsson P, Ala-Hurula V, Keranen ML, Tarvainen I, Haltia T, Nilsson L, Binzer M, Forsgren L, Marklund SL. Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an Asp90Ala mutation in Cu,Zn-superoxide dismutase. *Nat Genet (New York)* 1995;10(1):61-66.
- Andersen PM, Sims KB, Xin WW, Kiely R, O' Neill G, Ravits J, Piro E, Harati Y, Brown RD, Levine JS, Heinicke HU, Seltzer W, Boss M, Brown RH Jr. Sixteen novel mutations in the Cu,Zn-superoxide dismutase gene in Amyotrophic lateral sclerosis: a decade of discoveries, defects and disputes. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord (London)* 2003;4(2):62-73.
- Aquilano K, Rotilio G, Ciriolo MR. Proteasome activation and nNOS down-regulation in neuroblastoma cells expressing a Cu,Zn-superoxide dismutase mutant involved in familial ALS. *J Neurochem (Oxford)* 2003;85(5):1324-35.
- Atkin JD, Farg MA, Turner BJ, Tomas D, Lysaght JA, Nunan J, Nagley P, Beart PM, Cheema SS, Horne MK. Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein disulfide isomerase with superoxide dismutase 1. *J Biol Chem (Baltimore)* 2006;281(40):30152-65.
- Augusto O, Lopes de Menezes S, Linares E, Romero N, Radi R, Denicola A. EPR detection of glutathionyl and hemoglobin-cysteinyl radicals during the interaction of peroxynitrite with human erythrocytes. *Biochemistry (Washington DC)* 2002;41(48):14323-8.
- Augusto O. Radicais livres: bons, maus e naturais. São Paulo: Oficina de textos; 2006.
- Beal MF, Hyman BT, Koroshetz W. Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases? *Trends Neurosci (Amsterdam)* 1993;16(4):125-31.
- Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem (New York)* 1971;44(1):276-287.
- Beckman JS, Crow JP. Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem Soc Trans (London)* 1993;21(2):330-34.
- Beckman JS, Estevez AG, Crow JP, Barbeito L. Superoxide dismutase and the death of motor neurons in ALS. *Trends Neurosci. (Amsterdam)* 2001;24(11, Suppl):15-20.
- Bertini I, Mangani S, Viezzoli MS. *Advances in inorganic Chemistry*. San Diego: Academic press; 1998.

Boillée S, Velde CV, Cleveland DDW. ALS: A disease of motor neurons and their nonneural neighbors. *Neuron* (Cambridge) 2006;52(1):39-59.

Bonini MG, Miyamoto S, Di Mascio P, Augusto O. Production of the carbonate radical anion during xanthine oxidase turnover in the presence of bicarbonate. *J Biol Chem* (Baltimore) 2004;279(50):51836-43.

Bowling AC, Barkowski EE, Mckenna-Yasek D, Sapp P, Horvitz HR, Beal MF, Brown, RH Jr. Superoxide dismutase concentration and activity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* (Oxford) 1995;64(5):2366-69.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal Biochem* (New York) 1976;72:248-54.

Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* (Washington DC) 1998;281(5384):1851-54.

Bruijn LI, Miller TM, Cleveland DW. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Ann Rev Neurosci* (Palo Alto) 2004;27:723-49.

Canu N, Barbato C, Ciotti MT, Serafino A, Dus L, Calissano P. Proteasome involvement and accumulation of ubiquitinated proteins in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J Neurosci* (Baltimore) 2000;20(2):589-99.

Carri MT, Ferri A, Battistoni A, Famhy L, Gabbianelli R, Poccia F, Rotilio G. Expression of a Cu,Zn-superoxide dismutase typical of familial sclerosis induces mitochondrial alteration and increased of cytosolic Ca²⁺ concentration in transfected neuroblastoma SH-SY5Y cells. *FEBS Lett* (Amsterdam) 1997;414(2):365-8.

Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMorm AP, Doucette, W, Siwek, D, Ferrante RJ, Brown RH Jr, Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* (Washington DC) 2003;302(5642):113-17.

Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* (London) 2001;2(11):806-19.

Demasi M, Shringarpure R, Davies KJA. Glutathiolation of the proteasome is enhanced by proteolytic inhibitors. *Arch Biochem Biophys* (New York) 2001;389(2):254-63.

Derman AI, Prinz WA, Belin D, Beckwith J. Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* (Washington DC) 1993;262(5140):1744-47.

Estevez AG, Crow JP, Sampson JB, Reiter C, Zhuang Y, Richardson GJ, Tarpey MM, Barbeito L, Beckman JS. Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. *Science* (Washington DC) 1999;286(5449):2498-2500.

Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi C, Corey EJ, Schreiber SL. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* (Washington DC) 1995;268(5211):726-31.

Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, McGanvey U, Kowal, NW, Brown RH Jr, Beal MF. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* (London) 1997;69(5):2064-74.

Ferri A, Cozzolino M., Crosio MN, Casciati A, Gralla EB, Rotilio G, Silverstone V, Carrí MT. Familial ALS-superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A* (Washington DC) 2006;103(37):13860–13865.

Freedman RB. Protein disulfide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. *Cell* (Cambridge) 1989;57(7):1069-1072.

Fridovich I. Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and their related matters. *J Biol Chem* (Baltimore) 1997;272(30):18515-17.

Furukawa Y, Torres AS, O'Halloran TV. Oxygen-induced maturation of SOD: A key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS. *Embo J* (Oxford) 2004;23(14):2872-81.

Furukawa Y, O'Halloran TV. Amyotrophic lateral sclerosis mutations have the greatest destabilizing effect on the apo, reduced form of SOD1, leading to unfolding and oxidative aggregation. *J Biol Chem* (Baltimore) 2005;280(17):17266-74.

Furukawa Y, Fu R, Deng H, Siddique T, O'Halloran TV. Disulfide cross-linked protein represents a significant fraction of ALS-associated Cu,Zn-superoxide dismutase aggregates in spinal cords of model mice. *Proc Natl Acad Sci U SA* (Washington) 2006;103(18):7148-53.

Goetz CG. Amyotrophic lateral sclerosis: Early contributions of Jean-Martin Charcot. *Muscle Nerve* (New York) 2000;23(3):336-343.

Goto JJ, Zhu H, Sanchez J, Nersissian A, Gralla EB, Valentine JS. Loss of in vitro metal ion binding specificity in mutant copper-zinc superoxide dismutase associated with familial Amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* (Baltimore) 2000;275(2):1007-14.

Halliwell B, Gutteridge JMV. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford: University Press; 1999.

Hayward LJ, Rodriguez JA, Kim JW, Tiwari A, Goto JJ, Cabelli DE, Valentine JS, Brown RH Jr. Decreased metallation and activity in subsets of mutant superoxide dismutases associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* (Baltimore) 2002;277(18):15923-31.

Heafield MT, Fearn S, Steventon GB, Waring RH, Williams AC, Sturman GA. Plasma cysteine and sulfate levels in patients with motor-neurone, Parkinson's and Alzheimer's disease. *Nerosci Lett* (Amsterdam) 1990;110(1-2):216-20.

Hirano A, Nakano I, Kurland LT, Mulder DW, Holley PW, Saccomano G. Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* (Baltimore) 1984;43(5):471-80.

Hirano A. Cytopathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol* (New York) 1991;56:91-101.

Hoffman EK, Wilcox HM., Scott RW, Siman R. Proteasome inhibition enhances the stability of mouse Cu/Zn superoxide dismutase with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* (Amsterdam) 1996;139(1):15-20.

Hough MA, Hasnain SS. Structure of fully reduced bovine copper zinc superoxide dismutase at 1.5 Å. *Structure* (London) 2003;11(8):937-46.

Ince PG, Tomkins J, Slade JY, Thatcher NM, Shaw, PJ. Amyotrophic lateral sclerosis associated with genetic abnormalities in the gene encoding Cu/Zn superoxide dismutase: molecular pathology of five new cases, and comparison with previous reports and 73 sporadic cases of ALS. *J Neuropathol Exp Neurol* (Baltimore) 1998;57(10):895-904.

Jaarsma D, Rognoni F, van Duijn W, Verspaget HW, Haasdijk ED, Holstege JC. CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta Neuropathol* (Berlin) 2001;102(4):293-305.

Janssen YM, van Houten B, Borm PJ; Mossman BT. Cell and tissue response to oxidative damage. *Lab Invest* (Philadelphia) 1993;69(3):261-74.

Johnston JA, Dalton MJ, Gurney ME, Kopito RR. Formation of high molecular weight complexes of Cu₂Zn-superoxide dismutase in a mouse model for a familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* (Washington DC) 2000; 97(23):12571-76.

Jonsson PA, Backstrand A, Andersen PM, Jacobson J, Parton M, Shaw C, Swingler R, Shaw PJ, Robberecht W, Ludolph AC, Siddique T, Skvortsova VI, Marklund SL. Cu₂Zn-superoxide dismutase in D90A heterozygotes from recessive and dominant ALS pedigrees. *Neurobiol Dis* (Oxford) 2002;10(3):327-33.

Jonsson PA, Graffmo KS, Andersen PM, Brannstrom T, Lindberg M, Oliveberg M, Marklund SL. Dissulfide-reduced superoxide dismutase 1 in CNS of transgenic amyotrophic lateral sclerosis models. *Brain* (London) 2006;129(Pt2):451-64.

Karunakaran, C.; Zhang, H.; Joseph, J.; Antholine, W. E.; Kalyanaraman, B. Thiol oxidase activity of copper, zinc superoxide dismutase stimulates bicarbonate-dependent peroxidase activity via formation of a carbonate radical. *Chem Res Toxicol* (Washington DC) 2005; 18(3):494-500.

Kaufman RJ. Orchestrating the unfold protein response in the health and disease. *J Clin Invest* (New Haven) 2002;110(10):1389-98.

Kowald Y, Klipp E. Alternative pathways might mediate toxicity of high concentrations of superoxide dismutase. *Ann Acad Sci* (New York) 2004;1019:370-4.

Kretz-Remy C, Arrigo A. Modulation of the chymotrypsin-like activity of the 20S proteasome by intracellular redox status: effects of glutathione peroxidase-1 overexpression and antioxidant drugs. *Biol Chem (Berlin)* 2003;384(4):589-95.

Kurahashi T, Miyazaki A, Suwan S, Isobe M. Extensive investigations on oxidized amino acid residues in H₂O₂-treated Cu,Zn-SOD protein with LC-ESI-Q-TOF-MS for de determination of the copper-binding site. *J Am Chem Soc (Washington DC)* 2001;123(38):9268-78.

Lee JL, Bae ON, Chung SM, Lee MY, Chung JH. Menadione induces endothelial dysfunction mediated by oxidative stress and arylation. *Chem Biol Interact (Amsterdam)* 2001;37(2):169-83.

Leigh PN, Meldrum BS. Excitotoxicity in ALS. *Neurology (Minneapolis)* 1996;47(6 suppl4):221-227.

Lindberg MJ, Byström R, Boknas N, Andersen PM, Oliveberg M. Systematically perturbed folding patterns of amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-associated SOD1 mutants. *Proc Natl Acad Sci USA (Washington)* 2005;102(28): 9754-59.

Liochev SI, Fridovich I. Copper, zinc superoxide dismutase and H₂O₂. Effects of bicarbonate on inactivation and oxidation of NADPH and urate, and on consumption of H₂O₂. *J Biol Chem (Baltimore)* 2002;277(38):34674-78.

Liochev SI, Batinic-Haberle I, Fridovich I. The effect of detergents on the reduction of tetrazolium salts. *Arch Biochem Biophys (New York)* 1995;324(1):48-52.

^aLiochev SI, Fridovich I. Reversal of the superoxide dismutase reaction revisited. *Free Radic Biol Med (New York)* 2003;34(7):908-10.

^bLiochev SI, Fridovich I. Mutant Cu,Zn-superoxide dismutases and familial amyotrophic lateral sclerosis: evaluation of oxidative hypotheses. *Free Radic Biol Med (New York)* 2003;34(11):1383-89.

Lynch SM, Boswell SA, Colo W. Kinetic stability of Cu/Zn-superoxide dismutase is dependent on its metal ligands: Implications for ALS. *Biochemistry (Washington DC)* 2004;43(51):16525-31.

Maasilta P, Jokelainen M, Loytonen M, Sabel CE, Gattrell AC. Mortality from amyotrophic lateral sclerosis in Finland, 1986-1995. *Acta Neurol Scand (Copenhagen)* 2001;104(4):232-5.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. A enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem (Baltimore)* 1969;244(22):6049-55.

Menzies FM, Cookson MR, Taylor RW, Turnbull DM, Chrzanowska-Lightowler ZMA, Dong L, Figlewicz DA, Shaw PJ. Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain (London)* 2002;125(Pt7):1522-33.

Mondola P, Ruggiero G, Seru R, Damiano S, Grimaldi S, Garbi C, Monda M, Greco D, Santillo M. The Cu,Zn-superoxide dismutase in neuroblastoma SK-N-BE cells is exported by a microvesicles dependent pathways. *Brain Res Mol Brain Res (Amsterdam)* 2003;110(1):45-51.

Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, Kato M, Pasinelli P, Kasai N, Brown RH Jr, Itoyama, Y. Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J Neurosci (Baltimore)* 2001;21(23):9246-54.

Nakagawa T, Yuan J. (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol (New York)* 2000;150(4):887-94

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci, MC, Grignani F, Riccardi, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods (Amsterdam)* 1991;139(2):271-9.

Oancea M, Mazumder S, Crosby ME, Almasan A. Apoptosis assays. *Methods Mol Med (Totowa)* 2006;129:279-90.

Oberley LW. Superoxide dismutase and cancer. In: Oberley LW. Superoxide dismutase, Vol II. Boca Raton: CRC Press; 1982. p127-165.

Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem (Baltimore)* 2001;276(42):3 8388-93.

Peters JM. Proteasome: protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem Sci (Amsterdam)* 1994;19(9):377-82.

Potter SZ, Valentine JS. The perplexing role of copper-zinc superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis (Lou Gehrig's disease). *J Biol Inorg Chem (Berlin)* 2003;8(4):373-90.

Pramatarova A, Laganier J, Brisebois K, Rouleau GA. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice not lead to motor impairment. *J Neurosci (Amsterdam)* 2001;21(10):3369-74.

Rakhit R, Cunningham P, Furtos-Matei A, Dahan S, Qi XF, Crow JP, Cashman NR, Kondejewski LH, Chakrabartty A. Oxidation-induced misfolding and aggregation of superoxide dismutase and its implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem (Baltimore)* 2002;277(49):47551-56.

Rakhit R, Crow JP, Lepock JR, Kondejewski LH, Cashman NR, Chakrabartty A. Monomeric Cu,Zn-superoxide dismutase is a common misfolding intermediate in the oxidation models of sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem (Baltimore)* 2004;279(10):15499-504.

Rakhit R, Chakrabartty A. Structure, folding, and misfolding of Cu,Zn superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta (Amsterdam)* 2006;1762(11-12):1025-37.

Rodriguez JA, Valentine JS, Eggers DK, Roe JA, Tiwari A, Brown, RH Jr, Hayward, LJ. Familial amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations decreased the thermal stability of

- distinctly metallated species of human copper/zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem (Baltimore)* 2002;277(18):15932-37.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz, DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX et al. Mutations in Cu,Zn-superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature (London)* 1993;362(6415):59-62.
- Rothstein JD. Excitotoxic mechanisms in the pathogenesis of Amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol (New York)* 1995;68:7-20.
- Rowland L. How Amyotrophic lateral sclerosis got its name: The clinical-pathologic genius of Jean-Martin Charcot. *Arch Neurol (Chicago)* 2001;58(3):512-15.
- Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, Choi AM. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal (New York)* 2007;9(1):49-89.
- Sala G, Beretta S, Ceresa C, Mattavelli L, Zoia, C., Tremolizzo L, Ferri A, Carri MT, Ferrarese C. Impairment of glutamate transport and increased vulnerability to oxidative stress in neuroblastoma SH-SY5Y cells expressing a Cu,Zn-superoxide dismutase typical of familial lateral sclerosis. *Neurochem Int (Oxford)* 2005;46(3):227-34.
- Schmidt PJ, Kunst C, Culotta VC. Cooper activation of superoxide dismutase 1 (SOD1) in vivo. *J Biol Chem (Baltimore)* 2000;275(43):33771-76.
- Schwartz PJ, Coyle JT. Effects of overexpression of the cytoplasmic copper-zinc superoxide dismutase on the survival of the neurons *in vitro*. *Synapse (New York)* 1998; 29(3):206-12.
- Shaw PJ, Ince PG. Glutamate, excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol (Berlin)* 1997;244(Suppl 2):3-14.
- Shaw PJ, Eggett CJ. Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol (Berlin)* 2000;247(Suppl. 1):17-27.
- Shaw PJ. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry (London)* 2005;76(8):1046-57.
- Shringarpure R, Grune T, Mehlhase J, Davies KJ. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J Biol Chem (Baltimore)* 2003;278(1):311-8.
- Simpson CL, Al-Chalabi A. Amyotrophic lateral sclerosis as a complex genetic disease. *Biochim Biophys Acta (Amsterdam)* 2006;1762(11-12):973-85.
- Smith RG, Henry YK, Mattson MP, Appel SH. Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol (Boston)* 1998;44:696-9.
- Stathopoulos PB, Rumfeldt JA, Scholz GA, Irani AR, Frey HE, Hallewell RA, Lepock, JR, Meiering EM. Cu/Zn superoxide dismutase associated with Amyotrophic lateral sclerosis show

enhanced formation of aggregates in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA (Washington DC)* 2003;100(12):7021-26.

Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem (Baltimore)* 2001;276(41):38084-89.

Tiwari A, Hayward LJ. Familial amyotrophic lateral sclerosis mutants of copper/zinc superoxide dismutase are susceptible to disulfide reduction. *J Biol Chem (Baltimore)* 2003;278(8):5984-92.

Tiwari A, Xu Z, Hayward LJ. Aberrantly increased hydrophobicity shared by mutants of Cu,Zn-Superoxide dismutase in Familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem (Baltimore)* 2005;280(33):29771-79.

Tohgi H, Abe T, Yamazaki K, Murata T, Ishizaki E, Isobe C. Remarkable increase in cerebrospinal fluid 3-nitrotyrosine in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol (Boston)* 1999;46(1):129-31.

Turano C, Coppari S, Altieri F, Ferraro A. Proteins of PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol (Philadelphia)* 2002;193(2):154-63.

Turner MR, Parton MJ, Shaw CE, Leigh PA, Al-Chalabi A. Prolonged survival in motor neuron disease: A descriptive study of the King's database 1990-2002. *J Neurol Neurosurg Psychiatry (London)* 2003;74(7):995-7.

Valentine JS. Do oxidatively modified proteins cause ALS ? *Free Radic Biol Med (New York)* 2002;33(10):1314-1320.

Valentine JS, Doucette PA, Potter SZ. Copper-Zinc Superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annu Rev Biochem (Palo Alto)* 2005;74:563-93.

Vallis KA, Wolf CR. Relationships between the adaptative response to oxidants and stable menadione-resistant in Chinese hamster ovary cell lines. *Carcinogenesis (New York)* 1996;17(4):649-54.

Volterra A, Trotti D, Cassutti P, Tromba C, Salvaggio A, Melcangi RC, Racagni G, Galli G. High sensitivity of glutamate uptake to extracellular free arachidonic acid levels in rat cortical synaptosomes and astrocytes. *J Neurochem (London)* 1992;59(2):600-6.

Wang J, Xu G, Gonzales M, Coonfield M, Fromholt D, Copeland NG, Jenkins NA, Borchelt DR. Fibrillar inclusions and motor neuron degeneration in transgenic mice expressing superoxide dismutase 1 with a disrupted copper-binding site. *Neurobiol Dis (Oxford)* 2002;10(2):128-38.

Wang J, Slunt H, Gonzales V, Fromholt D, Coonfield M, Jenkins NA, Borchelt DR, Copeland NG. Copper-binding site null SOD1 causes ALS in transgenic mice: aggregates of non-native SOD1 delineate a common feature. *Hum Mol Genet (Oxford)* 2003;12(21):2753-76.

Wang J, Xu G, Borchelt DR. Mapping superoxide dismutase 1 domains of non-native interactions: roles of intra and intermolecular disulfide bonding in aggregation. *J Neurochem(London)* 2006;96(5):1277-88.

Welihinda AA, Tirasophon W, Kaufman RJ. The cellular response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum. *Gene Expr (North Chicago)* 1999;7(4-6):293-300.

Wiedau-Pazos M, Goto JJ, Rabizadeh S, Gralla EB, Roe JA, Lee MK, Valentine JS, Bredesen DE. Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science (Washington DC)* 1996;271(5248):515-18.

Williamson TL, Bruijn LI, Zhu Q, Anderson KL, Julien JP, Cleveland DW. Absence of neurofilaments reduces the selective vulnerability of motor neurons and slows disease caused by familial amyotrophic lateral sclerosis –linked-superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA (Washington DC)* 1998;95(16):9631-6.

Winterbourn C, Peskin AV, Parsons-Mair HN. Thiol oxidase activity of copper, zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem (Baltimore)* 2002;277(3):1906-11.

Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron (Cambridge)* 1995;14(6):1105-16.

Yim MB, Kang JH, Yim HS, Kwak HS, Chook PB, Stadtman ER. *Proc Natl Acad Sci USA.* (Washington DC) 1996;93:5709-14.

Zhang H, Joseph J, Felix C, Kalyanaraman B. Bicarbonate enhances the hydroxylation, nitration, and peroxidation reactions catalyzed by copper-zinc superoxide dismutase. Intermediacy of carbonate anion radical. *J Biol Chem (Baltimore)* 2000;275(19):14038-45.

Zhang H, Joseph, J, Gurney M, Becker D, Kalyanaraman B. Bicarbonate enhances peroxidase activity of Cu,Zn superoxide dismutase. Role of carbonate anion radical and scavenging of carbonate anion radical by metalloporphyrin antioxidant enzyme mimetics. *J Biol Med (Baltimore)* 2002;277(2):1013-20.

Zhang H, Andrekopoulos C, Joseph J, Chandran K, Karoui H, Crow JP, Kalyanaraman B. Bicarbonate-dependent peroxidase activity of human Cu,Zn-superoxide dismutase induces covalent aggregation of protein. Intermediacy of tryptophan-derived oxidation products. *J. Biol. Chem. (Baltimore)* 2003;278(26):24078-89.

Zhang H, Andrekopoulos C, Joseph J, Crow J, Kalyanaraman B. The carbonate radical anion-induced covalent aggregation of human copper, zinc superoxide dismutase, and alpha-synuclein: intermediacy of tryptophan- and tyrosine-derived oxidation products. *Free Radic Biol Med (New York)* 2004;36(11):1355-65.