

**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Elisabete Feliciano Silva Fernandes

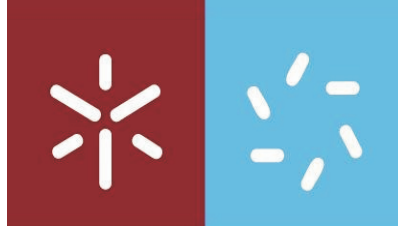
**Compreender a comunicação entre o vacúolo e a mitocôndria durante a apoptose induzida por ácido acético**

Compreender a comunicação entre o vacúolo e a mitocôndria durante a apoptose induzida por ácido acético

Elisabete Fernandes

UMinho | 2014

Outubro de 2014



**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

Elisabete Feliciano Silva Fernandes

**Compreender a comunicação entre o vacúolo  
e a mitocôndria durante a apoptose induzida  
por ácido acético**

Dissertação de Mestrado

**Mestrado em Bioquímica Aplicada**

Trabalho efetuado sob a orientação de

**Professora Doutora Manuela Côrte-Real**

**Doutora Susana Chaves**

## DECLARAÇÃO

**Nome:** Elisabete Feliciano Silva Fernandes

**Endereço eletrónico:** betefsfernandes@hotmail.com

**Telefone:** +351 918 335 429

**Nº Cartão Cidadão:** 13569473

### **Título Original da Tese de Mestrado:**

*Understanding the crosstalk between the mitochondria and the vacuole during acetic acid-induced apoptosis*

### **Título da Tese de Mestrado**

Compreender a comunicação entre o vacúolo e a mitocôndria durante a apoptose induzida por ácido acético

**Orientadores:** Professora Doutora Manuela Côrte-Real

Doutora Susana Chaves

### **Instituição de acolhimento:**

Centro de Biologia Molecular Ambiental (CBMA)

**Ano de Conclusão:** 2014

### **Designação do Mestrado:**

Mestrado em Bioquímica Aplicada – Especialização em Biomedicina

**1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE, APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.**

Universidade do Minho, 31 de Outubro de 2014

---

Elisabete Feliciano Silva Fernandes

### Agradecimentos

A entrega da tese finaliza mais uma etapa findada no meu percurso académico. Apesar dos contratemplos, chegou finalmente o fim. Para esse fim ter sido possível alcançar, tenho de agradecer a:

Primeiramente às minhas orientadoras, Dra. Susana Chaves, pelo acompanhamento, ensinamentos científicos e à Professora Dra. Manuela Côrte-Real pelo carinho demonstrado, palavras queridas, disponibilidade e sabedoria. Muito obrigada por toda a paciência e por toda a vossa compreensão nas alturas menos boas.

Aos colegas de laboratório da Micro.I que muito contribuíram para tornar o local de trabalho num local muito para além disso e mais divertido. Obrigada, pela força, pelas dúvidas que me esclareceram, mesmo as mais banais e óbvias. O meu mais sincero e profundo agradecimento por todo o auxílio, amabilidade e simples palavras da maioria das pessoas que fizeram toda a diferença e capacidade de tornar um dia horrível num dia apenas menos bom. Resumindo, simplesmente por estarem presentes sempre quando mais precisei e pela partilha de conhecimentos 😊

Aos meus amigos de anos, pela paciência, incentivo, por acreditarem em mim, pela amizade constante, por estarem presentes nesta jornada da minha vida que agora finda e que continuem comigo noutras jornadas que por aí se adivinham 😊

À Dani, obrigada pela paciência, longas conversas e pela MUITA FORÇA que me deste. Obrigada bitxinha 😊

À minha família, em especial, aos meus pais e irmão por todo o apoio, por tudo o que representam na minha vida, pelo amor e confiança, e por me ajudarem todos os dias a tonar-me um ser melhor. Um dia hei-de conseguir recompensar-vos por tudo isso e muito mais.

Às crianças da minha vida, meus queridos priminhos Diego, Rúben e Du. Com a vossa simplicidade, sorriso genuíno, amor sincero e simples brincadeiras que tanto alegraram os meus dias e me demonstraram a importância das pequenas coisas da vida.

Ao meu querido amor, Edgar Costa, pelo companheirismo demonstrado, pela MUITA paciência, pelos incentivos, chamadas à razão e por conseguires colocar um sorriso nos meus lábios quando mais ninguém nem nada consegue. Obrigada xuxu 😊

## Resumo

A apoptose é um mecanismo fisiológico, pelo qual a célula comete suicídio, de forma organizada, denominada de auto-destruição celular programada. É um processo fundamental e evolutivamente conservado, que tem um papel essencial para o desenvolvimento normal, pois conduz à remoção de células supérfluas, ectópicas, infetadas, transformadas ou danificadas, ou seja, células que representem uma ameaça à integridade do organismo.

A catepsina D (CatD) é uma das principais proteases aspárticas lisosomais e uma das principais endopeptidases responsáveis pela proteólise de proteínas de vida longa, nomeadamente por endocitose e auto-fagocitose, desempenhando importantes papéis no catabolismo proteico, processamento de antigénios, doenças degenerativas e progressão do cancro. A CatD é abundantemente expressa no cérebro, incluindo no córtex, hipocampo, dopaminérgico (DA) e na substância negra dos neurónios (SNR).

A CatD tem vindo a ser destacada na resposta apoptótica, sendo o seu papel dependente do tipo de células e do seu contexto.

A endopeptidase vacuolar de levedura, Pep4p, é ortóloga da CatD em humanos. Encontra-se predominantemente localizada no lúmen do vacúolo, equivalente ao lisossoma das células de mamíferos, sendo libertada deste para o citosol em células submetidas à indução de apoptose por ácido acético e por peróxido de hidrogénio.

Este trabalho prático teve como objectivo avaliar se a CatD possui um papel semelhante ao Pep4p de forma a compreender melhor a função da CatD no processo de morte celular por apoptose.

A expressão heteróloga de proteínas humanas em leveduras associada à tratabilidade genética e fácil manipulação deste microrganismo revelou-se uma ferramenta poderosa para o estudo de função e mecanismo de regulação de diferentes proteínas humanas, sem a interferência das redes de regulação complexas presentes nos eucariotas superiores. Neste sentido expressamos a CatD humana na levedura *S. cerevisiae* e exploramos este modelo celular neste projeto de tese.

**Abstract**

Apoptosis is a physiological mechanism in which the cell commits suicide in an organized form, called self-programmed cell destruction. It is a fundamental process that is evolutionarily conserved and is essential for normal development, as it removes superfluous, ectopic, infected, transformed or damaged cells; in other words, cells that represent a threat to the integrity of the organism.

CatD is a major lysosomal aspartic protease and the major endopeptidase responsible for proteolysis of long-lived proteins, in particular by endocytosis and phagocytosis, playing important roles in protein catabolism, antigen processing, degenerative diseases and cancer progression. It is abundantly expressed in the brain, including the cortex, hippocampus, dopamine (DA) and in the substantia nigra neurons (SNR) (Deis *et al.*, 1996; Siintola *et al.*, 2006; L. Qiao *et al.*, 2008).

CatD has been a prominent role in the apoptotic response, its role dependent on cell type and context.

The yeast vacuolar endopeptidase, Pep4p, is homologous to human CatD. It is predominantly located in the lumen of the vacuole, the lysosome analogue, and released to the cytosol in cells undergoing apoptosis induction by acetic acid or hydrogen peroxide (Pereira *et al.* 2010; Pereira H. *et al.*, 2013).

The aim of this work was to evaluate whether CatD plays a role similar to Pep4p, and understand the role of CatD in apoptotic cell death. The heterologous expression of human proteins in yeast associated with its genetic tractability and easy manipulation has demonstrated a powerful tool to study their function and regulation mechanisms without the interference of the complex regulatory networks of higher eukaryotes. Therefore, we expressed the human CatD in the yeast *S. cerevisiae* and exploited this cellular model in this thesis project.

## Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Índice.....	vi-vii
Lista de Abreviaturas.....	viii-x
Introdução.....	1
Morte Celular.....	2
Apoptose.....	2-4
A Apoptose em levedura.....	5-7
Papel do lisossoma e vacúolo na apoptose.....	7
Protease.....	7-8
Proteases Aspárticas.....	8
Catepsinas .....	8-9
Catepsina D.....	9-11
Protease vacuolar de levedura Pep4p.....	11-12
Objetivos e Plano de Trabalho.....	15
Material e Métodos.....	16
Reagentes.....	17
Estirpes e Plasmídeo.....	17-18
Amplificação de CatD.....	19
Restrição de pESC/HIS.....	19-20

Transformação de <i>S. cerevisiae</i> .....	20-21
Eletroforese de <i>DNA</i> em gel de agarose.....	20
<i>PCR colony</i> .....	21
Extracção de <i>DNA</i> plasmídico de levedura.....	21
Preparação de células competentes de <i>E.Coli</i> .....	22
Transformação de células competentes de <i>E.Coli</i> .....	22
Extração e purificação de <i>DNA</i> plasmídico de <i>E. coli</i> .....	22
Rastreio de colónias positivas.....	22-23
Preparação de extratos proteicos totais.....	22
<i>SDS PAGE - Western blotting</i> .....	24-25
Indução da autofagia .....	25
Ensaio de viabilidade das estirpes .....	25
Ácido acético e peróxido de hidrogénio.....	25-26
Ensaio de Envelhecimento .....	26
Resultados.....	27
Amplificação De CatD e restrição de pESC/HIS.....	28-33
Complementação do fenótipo da estirpe pep4 $\Delta$ com a expressão de CatD.....	33
Ácido Acético.....	33-35
Peróxido de Hidrogénio.....	35-38
Envelhecimento cronológico.....	38-39
Ensaio de Autofagia.....	40-41
Discussão e Perspetivas futuras.....	42-46
Bibliografia.....	47-54



Lista de Abreviaturas

**AOP1/fas/CD95** – Receptores de Membrana Celular que desencadeiam a apoptose

**Apaf1** – Fator citosólico associado á apoptose

**ATP** – Adenosina Trifosfato

**Bid - BH3** – domínio BH3 que interage com o agonista de morte

**BH 1-4** – domínios de homologia Bcl-2 que condicionam as dimerizações entre os diferentes membros da família bem como com outras proteínas

**CatD** – Catepsina D

**CCR** – Carcinoma colorectal

**c.f.u** - Unidade formadora de colónias

*cit c* - Citocromo c

**DA** – Dopaminérgico

**DNA** – Deoxyribonucleic acid – Ácido Desoxirribonucleico

**DO<sub>600</sub>**- Densidade ótica a 600nm

**dNTP**- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

**EDTA** - Ácido etilenodiaminotetracético

**IUBMB** - *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de Hidrogénio

**MDV1/NET2** – Promovem a morte celular de acordo com seu papel na fissão mitocondrial

**Dnm1p** – Proteína dinâmica

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**Fis1p** – Proteína de levedura que participa na mediação da fissão

**FLIP** – Inibidor de apoptose

HCl - Ácido clorídrico

IgGs- Imunoglobulina G

GFP – Proteína Verde Fluorescente

LB- meio Luria Bertani

LiAc- Acetato de Lítio

kDa- Kilodalton

µL- Microlitro

M6PR – Recetor de manose-6-fosfato

M- Molar

mM- milimolar

ng - nanograma

mL- Mililitros

MgSO<sub>4</sub> - Sulfato de Magnésio

min - Minutos

MOMP – Permeabilização da Membrana Mitocondrial Externa

Msn2p/Msn4p - Fator de transcrição que se liga ao elemento de resposta ao *stresse*

NaCl - Cloreto de Sódio

NaOH - Hidróxido de sódio

O/N - *Overnight*

pb - Pares de bases

PBS- Solução salina de tampão fosfato

PBST- Solução salina de tampão fosfato 0,05% de Tween-20

PCD – Morte Celular Programada

PCR - *Polymerase chain reaction* – Reação em cadeia da polimerase

Pep4p – Endopeptidase vascular de levedura

*pep4Δ* – Mutante de Pep4p

ROS – Espécies Reativas de Oxigénio

RE – Reticulo Endoplasmático

r.p.m. - Rotações por minuto

SC GAL –HIS - Meio sintético completo com galactose como fonte de carbono, sem os aminoácido histidina

SC GAL –HIS – URA - Meio sintético completo com galactose como fonte de carbono, sem os aminoácido histidina e uracilo

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* – Electroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio

SNR – Substância negra dos neurónios

SOB- Meio Super Optical Broth

TB- Meio *Terrific Broth*

TCA- Ácido tricloroacético

TEMED- Tetrametiletilenodiamina

tBid –Bid Truncado

TNF – Fator de Necrose Tumoral

WT– *Wild Type*

YPD - Dextrose Peptonada de Levedura

YPDA - Dextrose Peptonada de Levedura com agar

# Introdução

### Morte Celular

As células podem sofrer pelo menos dois tipos distintos de morte celular: a necrose e a apoptose. A necrose é uma forma violenta, catastrófica e rápida de degeneração que afeta as populações de células vizinhas e é caracterizada, por tumefação do citoplasma e destruição de organelos bem como pela ruptura da membrana plasmática, conduzindo à libertação do conteúdo celular para o meio extracelular. Tal pode levar à inflamação e até mesmo à morte das células vizinhas, sem a contribuição de um programa molecular intrínseco. A apoptose é a forma mais comum de morte celular programada (PCD, do inglês *Programmed Cell Death*) em eucariotas, estando associada a marcadores característicos dependendo do tipo de célula e do organismo. É observada em células individuais, geralmente rodeadas por células vizinhas com aparência saudável. Envolve a retração da célula e consequente diminuição do contacto entre células vizinhas, formação de vacúolos citoplasmáticos, fragmentação da membrana nuclear e do *DNA* condensação da cromatina, despolarização de membrana mitocondrial, e alterações na assimetria de fosfolipídios de membrana plasmática seguido de remoção ordenada da célula através de fagocitose (Azevedo C. *et al.*, 1999; Azevedo M. *et al.*, 2005; Kitagaki H. *et al.*, 2007; Mroczek S. *et al.*, 2008; Carmona-Gutierrez D. *et al.*, 2010;).

### Apoptose

A apoptose é um mecanismo fisiológico, em que a célula recorre ao uso de maquinaria celular especializada para cometer suicídio, sendo descrita como um colapso orquestrado da célula, também, denominada de auto-destruição celular programada. É um processo fundamental que está evolutivamente conservado, sendo essencial para o desenvolvimento normal, uma vez que procede à remoção de células supérfluas, ectópicas, infetadas, transformadas ou danificadas, ou seja, células que representem uma ameaça à integridade do organismo (Appelqvist H., 2012). Este tipo de morte é um processo necessário ao desenvolvimento normal de organismos multicelulares sendo um fenómeno biológico essencial na homeostasia celular bem como nos tecidos adultos. Existem características típicas da apoptose, como condensação nuclear, fragmentação do *DNA*, destruição do citoesqueleto, modificações da membrana citoplasmática com projeções em forma de bolha, exposição da fosfatidilserina terminando na formação e libertação de corpos apoptóticos (Azevedo *et al.*, 1999; Ludovico P. *et al.*, 2002; Gabriela R. *et al.*, 2006; Marque C., 2010; Appelqvist H., 2012).

Estudos em células eucarióticas superiores permitiram a identificação de mediadores moleculares do processo apoptótico, tais como as caspases, e proteínas da família da Bcl-2. A família das caspases de mamíferos engloba várias enzimas proteolíticas, que clivam os seus substratos após resíduos de ácido aspártico específicos, e podem ser divididas, de acordo com a sua estrutura e função, em iniciadoras (pró-caspases 2, 8, 9 e 10) e efetoras (pró-caspases 3, 6 e 7). Uma vez ativadas, as caspases efetoras são responsáveis pelo desmantelamento da célula. A família de proteínas Bcl-2 inclui membros proteicos com efeitos anti-(Bcl-2 e Bcl-xL) ou pró-apoptóticos (Bax e Bak). Estruturalmente, todas compartilham um ou mais domínios de homologia da Bcl-2 (BH1-BH4). As proteínas desta família podem associar-se e formar homo- ou heterodímeros que contribuem para a regulação da permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP, do inglês *mitochondrial outer membrane permeabilization*). Deste modo, controlam a libertação de fatores apoptóticos da mitocôndria, como o citocromo c (*cit c*) (Gross A. *et al.*, 2000; Mroczek S. *et al.*, 2008; Repnik U. *et al.*, 2010).

A apoptose inclui três fases que são a iniciação, a execução e a remoção. A iniciação correspondente à ativação de algumas caspases segundo duas vias, a extrínseca e a intrínseca; a execução corresponde ao ponto em que outras caspases se ligam a componentes celulares críticos e, por fim, a remoção das células apoptóticas tal como dos seus detritos. A apoptose é mediada por duas vias distintas: a via extrínseca e a via intrínseca, como é visível na figura 1. A via extrínseca é ativada por ligações de ligandos específicos a recetores que se encontram à superfície da célula – os recetores da morte. Estes recetores pertencem à família do TNF/ *fas*, principalmente relacionado com as proteínas *fas* (APO/CD95). Esta via é inibida pela FLIP (vírus). A via intrínseca envolve um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, libertando desta forma fatores pró-apoptóticos para o citoplasma. A via mitocondrial é desencadeada por diversos estímulos, tais como danos causados no *DNA* devido à citotoxicidade, *stress* e também pela privação de fatores de crescimento. Nesta via participam as proteínas da família Bcl-2. Através de poros formados pela *Bax* ou *Bak*, o *cit c* é libertado para o citosol, numa fase precoce da apoptose. No entanto, esta libertação requer a presença de outros fatores citosólicos para a propagação deste estímulo, como por exemplo o Apaf-1 e a procaspase 9. Supõe-se que a formação de um complexo com Apaf-1 e procaspase 9, na presença de ATP, leve à ativação desta última e consequentemente da cascata de caspases (Repnik U. *et al.*, 2010). O *cit c* encontra-se ligado à membrana mitocondrial interna por associação com a cardiolipina, lípido encontrado na membrana mitocondrial interna que determina a funcionalidade das enzimas de fosforilação

oxidativa. Na fase final da apoptose mediada pela cascata proteolítica das caspases, dá-se a ativação da caspase 9 e os recetores de morte (via extrínseca) ativam as caspases 8 e 10; ocorre também a quebra do citoesqueleto e de proteínas da matriz nuclear, interferindo com a transcrição, replicação e reparação do *DNA*. Os seus principais pontos são a libertação do *cit c* da mitocôndria e a ativação de caspases. (Azevedo C. *et al.*,1999; Ludovico P. *et al.*, 2002; Pereira C. *et al.*, 2008; Marque C.,2010; Repnik U. *et al.*, 2010).

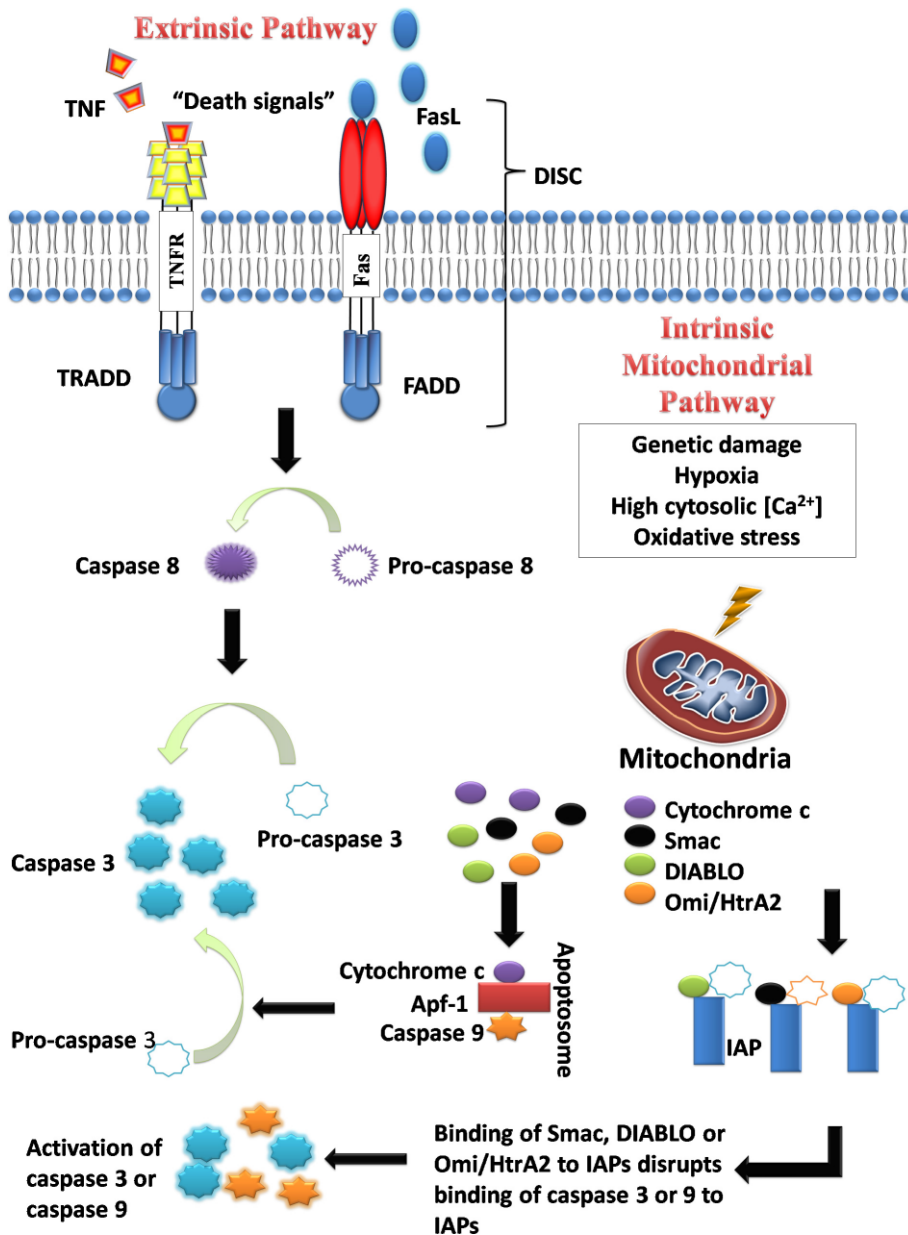


Figura 1 - As vias intrínseca e extrínseca da apoptose (Adaptado de Wong R. S. Y., 2011)

## A apoptose em levedura

Nas últimas décadas, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) evoluiu progressivamente como ferramenta de pesquisa em diversas áreas da biologia celular devido ao seu fácil manuseamento e vantagem funcional em relação às bactérias (Carmona-Gutierrez D. *et al.*, 2010). É um modelo eucariota essencial para estudos da biologia celular e molecular, pois é um organismo geneticamente maleável, sendo o crescimento e a divisão facilmente e rapidamente controlados por manipulação das condições ambientais. O seu genoma está completamente sequenciado e existem bancos de dados correspondentes. É suscetível a modificações genéticas, como marcação e mutação de genes (Sousa M., 2012). Inicialmente, não se pensava que a *S. cerevisiae* possuía um processo de morte celular programada endógeno e foi utilizada como um instrumento para estudar proteínas humanas expressas de forma heteróloga. No entanto desde finais dos anos noventa, diversos estudos têm demonstrado a presença de um programa de apoptose em levedura, tornando-se um modelo útil no domínio da apoptose (Sousa M., 2012). Em resposta a diferentes estímulos, as células de levedura podem morrer mostrando marcadores típicos da apoptose de mamíferos, como a condensação da cromatina, exposição da fosfatidilserina no exterior do folheto da membrana citoplasmática e fragmentação do *DNA*. Outros processos que ocorrem na via apoptótica de mamíferos, incluindo geração espécies reativas de oxigénio (ROS), liberação do *cit c*, fragmentação mitocondrial e a ativação de caspases, foram também descritos em levedura, comprovando a conservação dos processos celulares básicos dos eucariotas superiores em leveduras (Hauptmann P. e Lehle L., 2008; Liang Q. *et al.*, 2008; Chen X.L. e Liu Y., 2013; Sousa M. *et al.*, 2013).

A levedura foi inicialmente utilizada para testar as possíveis interações entre membros da família Bcl-2, nomeadamente, entre a proteína anti-apoptótica Bcl-2 ou Bcl-XL e a proteína pró-apoptótica Bax. Inesperadamente, a proteína quimérica LexA-Bax foi capaz de induzir a morte da levedura, sendo a morte impedida pela co-expressão de proteínas nativas e quiméricas derivadas de Bcl-2 ou Bcl-XL (Pereira *et al.*, 2008). A expressão da proteína pró-apoptótica Bax provoca a paragem do crescimento e a morte da levedura. Nestes estudos de expressão de Bax na levedura, a localização desta proteína era mitocondrial. Verificou-se que a sua capacidade para matar a levedura era maior em condições respiratórias do que fermentativas e que a expressão de Bax na levedura induz a permeabilização da membrana mitocondrial, a produção de ROS e a liberação do *cit c*. A importância dos seus efeitos nas mitocôndrias e o facto de induzir letalidade na levedura



depende da oxidação lipídica mitocondrial e de tratamentos que aumentam a insaturação dos níveis de ácidos gordos. Deste modo, torna-os mais sensíveis à oxidação, aumentando a morte celular induzida por *Bax*. Na levedura, o *cit c* não é um fator fundamental para a morte induzida por *Bax*, uma vez que as células deficientes em *cit c* ainda morrem embora a uma taxa mais lenta (Pereira C. *et al.*, 2008; Jourdain A. *et al.*, 2009). A expressão de *Bax* induz algumas alterações estruturais e funcionais na mitocôndria que também ocorrem durante a apoptose em levedura, em resposta ao tratamento com ácido acético. Estas alterações incluem redução do número de cristas e tumefação mitocondrial, fragmentação e uma hiperpolarização seguida de despolarização mitocondrial, a produção de ROS, diminuição da atividade citocromo-oxidase e MOMP com liberação concomitante do *cit c* (Pereira C. *et al.*, 2010). O processo de remoção de mitocôndrias danificadas possui, aparentemente, um papel protetor em células tratadas com o referido ácido, embora provavelmente não seja o único fator que afeta a viabilidade celular. Em levedura, a remoção seletiva de mitocôndrias foi observada após a expressão heteróloga de *Bax*, disfunções mitocondriais, tumefação induzida por *stress* osmótico bem como em células em fase estacionária. Neste caso, esta remoção é dependente de maquinaria autofágica, e os resultados em termos de sobrevivência adquiridos devido ao bloqueio da degradação mitocondrial variam consoante o estímulo utilizado. Notavelmente, a autofagia não está ativa durante a PCD induzida por ácido acético, pelo que a remoção das mitocôndrias não pode ser efetuada através deste processo (Pereira C. *et al.*, 2010; Sousa M. J. *et al.*, 2011). Na apoptose induzida por diferentes compostos ou por expressão heteróloga de *Bax*, as mitocôndrias também sofrem fragmentação extensa sugerindo que é uma característica geral de apoptose em levedura. Enquanto a ausência de *DNM1* ou *MDV1/NET2* inibe a morte celular, a supressão do *FIS1* aumenta-a. Curiosamente, a deficiência em *Dnm1p* protege as células da morte de forma mais eficiente do que da fragmentação mitocondrial. Isto sugere que a ausência de *Dnm1p* em levedura pode conferir proteção contra a morte celular também por outros mecanismos diferentes dos associados à fissão mitocondrial. Em *S. cerevisiae*, *Fis1p* está uniformemente distribuída ao longo da superfície mitocondrial, onde funciona como um recetor para recrutar *Dnm1p* do citosol para a mitocôndria (James D. I. *et al.*, 2003; Pereira C. *et al.*, 2008; Jourdain A. *et al.*, 2009).

Devido à simplicidade do modelo de levedura, foi possível elucidar processos moleculares básicos da morte celular programada, sem a interferência da regulação multifacetada ou a especificidade celular que muitas vezes ocorrem em estudos que envolvem células de mamíferos. Além disso, os sistemas de expressão heteróloga em leveduras oferecem a oportunidade de

explorar as propriedades funcionais e mecanicistas individuais de reguladores de apoptose de mamíferos (Côrte-Real M. e Madeo F.,2013).

### **Papel do lisossoma e vacúolo na apoptose**

Na última década, tem sido demonstrado que, além da mitocôndria e caspases, também outros organelos e proteases estão envolvidos na regulação de processos de morte celular em mamíferos, tais como os lisosomas e catepsinas (Sousa M. J. *et al.*, 2011).

Os lisosomas possuem um conteúdo elevado de hidrolases, permitindo-lhes atuar como compartimento terminal de degradação das vias endocítica, fagocitária e autofágica. Estes organelos são definidos pelo seu teor de hidrólases ácidas, a falta de receptor de fosfato-6-manose (M6PR) e pH abaixo de cinco. Para além da degradação em massa e de processamento de pré-proteínas, as hidrolases lisossomais estão envolvidas no processamento de antígenos, degradação da matriz extracelular e iniciação da apoptose. As suas proteases são direcionadas para os lisosomas, sobretudo diretamente a partir da rede trans-Golgi para o sistema endossomal, em especial mediados pelo transporte M6PR. A desestabilização da membrana lisossomal, e consequente libertação do conteúdo lisossomal para o citosol, pode iniciar a via apoptótica lisossomal, a qual é dependente da desestabilização das mitocôndrias. A clivagem de BID a t-BID e degradação de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 por catepsinas de cisteína lisossomais foram identificadas como necessárias para a libertação *cit c*, que consequentemente leva à ativação de caspases (Azevedo C. *et al.*,1999; Pereira C. *et al.*, 2008; Repnik U. *et al.*, 2010).

### **Proteases**

As proteases também designadas por peptidases ou enzimas proteolíticas, são um grupo de enzimas com funções celulares importantes. A modernização das técnicas analíticas tem demonstrado que as proteases são capazes de realizar modificações altamente específicas e seletivas de proteínas, como a coagulação do sangue e a lise dos coágulos de fibrina, o processamento e transporte de proteínas secretadas através de membranas. Devido à multiplicidade das proteases, ao contrário da sua especificidade de ação, estas enzimas têm atraído a atenção mundial na expectativa de investigar quais as suas aplicações fisiológicas bem

como biotecnológicas. As proteases encontram-se em diversos organismos desde plantas, a animais e microrganismos. (Rao M. B. *et al.*,1998; Sajid M. e McKerrow J. H., 2002).

As proteases são classificadas de acordo com a *Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* – IUBMB -, como pertencente ao grupo 3, das hidrolases, subgrupo 4. (Barrete A. J. *et al.*, 1994). Elas são divididas em dois grupos principais, as exopeptidases e as endopeptidases, dependendo do local de ação. As exopeptidases clivam a ligação peptídica próxima aos grupos amino ou carboxilo terminais do substrato. As endopeptidases clivam uma ligação peptídica longe da extremidade do substrato. Com base no grupo funcional presente no local ativo, as proteases são ainda classificadas em quatro grupos de destaque, nomeadamente, as proteases de serina, proteases aspárticas, proteases de cisteína, e metalo-proteases (Rao M.B. *et al.*,1998).

### **Proteases Aspárticas**

As proteases aspárticas, também conhecidas por proteases ácidas, pertencem à classe das endopeptidases, as quais dependem de resíduos de ácido aspártico para a sua atividade catalítica, em que dois resíduos do referido ácido constituem a díade catalítica (Beynon e Bond, 1989; Barrett *et al.*, 2004; Handem S., 2013).

Os lisosomas são organelos citoplasmáticos ácidos que estão criticamente envolvidos numa série de processos fisiológicos, incluindo a degradação de macromoléculas e morte celular, e em várias condições patológicas, doenças neurodegenerativas, sendo bastante importantes para a correta função celular. A sua função primária é a degradação de macromoléculas, e para este desígnio, eles possuem mais de 50 hidrolases ácidas, incluindo as fosfatases, nucleases, glicosidases, proteases, peptidases, sulfatases e lipases. Das hidrolases lisossomais, as catepsinas são a família das proteases melhor caracterizada (Appelqvist H., 2012).

### **Catepsinas**

As proteases catepsinas são hidrolases que exercem a sua função a pH ácido, nos lisosomas ou extracelularmente, na matriz celular (Masson O. *et al.*, 2010). São, portanto, uma classe cuja atividade enzimática é conferida por resíduos específicos (Cullen V. *et al.*,2009). Elas participam na degradação de grandes quantidades de proteínas, mas muitas delas têm também

mostrado estar criticamente envolvidas em processos fisiológicos diferentes, como por exemplo a remodelação óssea, a apresentação do antígeno e da iniciação da morte das células (Appelqvist H., 2012).

As catepsinas podem ser divididas em três subgrupos de acordo com o aminoácido catalítico: as proteases aspárticas (catepsinas D e E), proteases de cisteína (catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, T, V, W, e X), e as proteases de serina (catepsinas A e G) (Emert-Sedlak L. *et al.*, 2005; Liaudet-Coopman E. *et al.*, 2006; Masson O. *et al.*, 2010; Appelqvist H., 2012).

### Catepsina D

A catepsina D (CatD) (CE 3.4.23.5) é uma das principais proteases aspárticas lisossomais e uma das principais endopeptidases responsáveis pela proteólise de proteínas de vida longa, nomeadamente por endocitose e autofagocitose. Desempenha papéis importantes no catabolismo proteico, processamento de antígenos, doenças degenerativas (Alzheimer) e progressão do cancro de mama. A CatD é abundantemente expressa no cérebro, incluindo no córtex, hipocampo, dopaminérgico (DA) e na substância negra dos neurónios (SNR), que é uma porção heterogénea do mesencéfalo responsável pela produção de dopamina no cérebro, possuindo uma papel importante na recompensa e vício (Faust L. P. *et al.*, 1985; Baldwin T. E. *et al.*, 1993; Deis P. L. *et al.*, 1996; Garcia M. *et al.*, 1996; Siintola E. *et al.*, 2006; Nolte J., 6<sup>th</sup> edition, 2008; Qiao L. *et al.*, 2008).

A catepsina D é sintetizada no retículo endoplasmático (RE), e durante o seu transporte para os lisossomas, a pré-proenzima inativa de 52 kDa é processada proteoliticamente para formar uma pró-enzima intermédia ativa de cadeia única de 48 kDa (Figura 2). O processamento adicional produz uma protease lisosomal ativa madura, composta por uma cadeia pesada e uma cadeia leve de 34 kDa e 14 kDa, respetivamente. O local catalítico da catepsina D inclui dois resíduos de ácido aspártico críticos, localizados nas cadeias 14 e 34 -kDa, respetivamente (Heinrich M. *et al.*, 1999; Laurent-Matha V. *et al.*, 2005; Masson O. *et al.*, 2010; Appelqvist H., 2012; Laurent-Matha V. *et al.*, 2012).

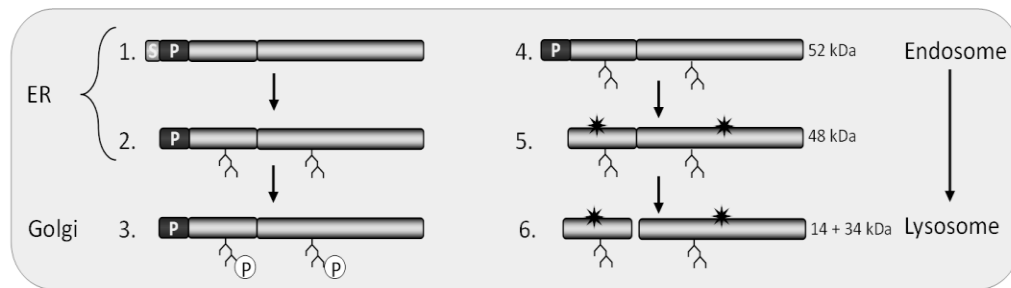


Figura 2- Tráfego e maturação da catepsina D. 1) A catepsina D é sintetizada como uma pré-proenzima no retículo endoplasmático (ER). A pré-proenzima compreende um peptídeo sinal N-terminal de sinal (S) e um pró-peptídeo (P). 2) O péptido sinal é removido, e são ligados os açúcares a dois locais de glicosilação. 3) No complexo de *Golgi*, os açúcares são modificados, e os seus resíduos de manose são fosforilados, gerando resíduos de manose-6-fosfato (M6P). Estes resíduos ligam-se a receptores de M6P na rede *trans-Golgi*, e o transporte de catepsina D para o compartimento lisosomal é dependente, em grande medida, deste reconhecimento. 4) No ambiente de pH ácido dos endossomos, a catepsina D dissocia-se dos receptores de M6P e os grupos fosfato são removidos. 5) O pró-peptídeo é clivado da catepsina D, gerando uma forma de cadeia simples ativa (48 kDa). Os resíduos aspárticos críticos para a actividade catalítica estão indicados por uma estrela (aminoácidos 97 e 293). 6) A forma intermédia é ainda processada na forma de duas cadeias maduras de catepsina D, a qual é composta por uma cadeia leve N-terminal e uma cadeia pesada C-terminal. (Adaptado de Appelqvist H., 2012)

O pH ótimo da CatD é ácido (3.5-4.0), perdendo a sua atividade a valores de pH altos devido à desprotonação de ambos os resíduos de aspartato no local ativo. Nas células que contenham uma grande quantidade de CatD, a CatD pode ser cataliticamente activa, pelo menos transitoriamente, na vizinhança, de lisossomas que perdendo a integridade da membrana, o que conduz à acidificação local do citosol. As catepsinas lisossomais que são libertadas para o citosol após desestabilização da membrana lisossomal podem clivar substratos de proteínas diferentes, e deste modo dar-se a propagação da apoptose (Pereira C *et al.*, 2008; Repnik U. *et al.*, 2010).

O interesse na CatD como alvo de drogas surge devido à sua associação com vários processos biológicos de importância terapêutica. Estudos de cancro de mama primário demonstraram que os níveis elevados de CatD estão correlacionados com um aumento do risco de metástases e menor sobrevivência livre de reincidência. Altos níveis de CatD e outras proteases, como a colagenase, produzido na vizinhança do tumor em crescimento, podem degradar a matriz extracelular e assim promover a fuga de células cancerosas para o sistema linfático e circulatório, permitindo a invasão de novos tecidos (Baldwin T. E. *et al.*, 1993).

Contrariando estes efeitos de promoção do tumor, a CatD também funciona como supressor tumoral. Este papel oposto depende do contexto: se as catepsinas são libertadas no meio intracelular contribuem para a morte das células do cancro, mas caso sejam libertadas

extracelularmente degradam a matriz extracelular, estimulam a angiogénese e a migração. (Beaujouin M. e Liaudet-Coopman E., 2008; Masson O., 2009; Marques C. *et al.*, 2013).

A pro-CatD extracelular induz a proliferação, invasão, angiogénese e metástase. Além disso, foi demonstrado que a inibição da CatD com pepstatina A induz apoptose dependente de caspase em linhas celulares de neuroblastoma e que a sobreexpressão de CatD em xenotransplantes usando linhas de celulares de rato inibe a apoptose. Também foi demonstrado que a regulação negativa de CatD sensibiliza as células de neuroblastoma à apoptose, enquanto o efeito oposto é observado na superexpressão de CatD. Em contraste, CatD medeia a libertação do *cit c* e ativação da caspase em apoptose induzida por estaurosporina em fibroblastos humanos. Assim, o lisossoma está intrinsecamente ligado à apoptose através da libertação de CatD (Sousa M. J. *et al.*, 2011; adaptado do projecto submetido 'Mechanisms underlying the release of Cathepsin D from the lysosome and its role in mitochondrial degradation'). Foi também recentemente demonstrado que inibição de CatD em linhas celulares derivadas de CCR potencia a apoptose induzida por acetato.

A concepção de inibidores potentes e específicos da CatD ajudará a elucidar a função desta enzima em doenças humanas. Um exemplo de um inibidor da CatD humana é a pepstatina A. A pepstatina é um inibidor potente das proteases aspárticas mas relativamente não específico; para além da CatD também inibe a catepsina E, a renina e a pepsina. É um hexapéptido originalmente isolado a partir de culturas de várias espécies de *Actinomyces*. Os seus principais problemas de utilização estão relacionados com a sua fraca solubilidade e a ineficiente penetração na membrana (Baldwin T. E. *et al.*, 1993; Benesa P. *et al.*, 2008; Sousa M. J. *et al.*, 2011; adaptado do projecto submetido 'Mechanisms underlying the release of Cathepsin D from the lysosome and its role in mitochondrial degradation'; Bewley A. M. *et al.*, 2011; Appelqvist H., 2012).

### **Protease vacuolar de levedura – Pep4p**

A endopeptidase vacuolar de levedura, Pep4p, é ortóloga da CatD em humanos, partilhando cerca de 40-60% de identidade. Sabe-se que esta protease se encontra predominantemente localizada no lúmen do vacúolo, um análogo do lisossoma, sendo libertada deste para o citosol em células submetidas à indução de apoptose por ácido acético e por peróxido de hidrogénio, levando no último caso à proteólise de nucleoporinas. Constatou-se que a protease de levedura Pep4p é translocada para o citosol durante a apoptose induzida pelo ácido e

desempenha um papel crucial na degradação mitocondrial, sugerindo que a libertação de uma protease vacuolar durante a morte celular regulada é também conservada em levedura. Foi confirmado por microscopia eletrónica de transmissão que tanto a integridade vacuolar como a da membrana plasmática da levedura são preservadas durante este processo. Portanto, a libertação de Pep4p parece envolver uma permeabilização específica da membrana vacuolar, em alternativa a uma permeabilização extensa típica da morte necrótica. Estes resultados sugeriam que, a Pep4p desempenha um papel na morte celular por apoptose semelhante ao da CatD de mamíferos. Contudo, a supressão de Pep4p conferiu maior suscetibilidade ao ácido acético, indicando que tem uma função na proteção de leveduras, em vez de na execução de morte celular. Consistente com esta hipótese, as leveduras com sobre-expressão de Pep4p exibiram uma maior resistência ao ácido acético sugerindo que a Pep4p pode ter um papel inibidor na morte celular por apoptose, semelhante ao da CatD em mamíferos. No entanto, os mecanismos subjacentes à libertação Pep4p/CatD permanecem ainda desconhecidos. Esta protease na levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem um papel essencial no sistema na degradação de proteínas e na maturação de várias hidrolases vacuolares (Mason D. A. *et al.*, 2005; Pereira C., 2008; Marques C. A., 2010; Pereira *et al.*, 2010; Spedale *et al.*, 2010; Sousa M. J. *et al.*, 2011; Carmona-Gutiérrez D. *et al.*, 2011; Appelqvist H., 2012; Pereira H. *et al.*, 2013).

Como foi referido anteriormente, CCR é uma das principais causas de mortalidade relacionada com o cancro. Recentemente, descobriu-se que o acetato induz a libertação CatD em linhas celulares e que ela pode conferir proteção contra a apoptose induzida pelo ácido, à semelhança do que é observado em levedura, para o ortólogo Pep4p. Além disso, a supressão de Pep4p em levedura e a inibição da atividade enzimática CatD em células de CCR aumenta a sensibilidade ao ácido acético (adaptado do projeto submetido '*Mechanisms underlying the release of Cathepsin D from the lysosome and its role in mitochondrial degradation*'). Foi por isso sugerido que a função anti-apoptótica da CatD poderá estar relacionada com um processo de degradação mitocondrial mediada pela CatD, que pode ter uma função análoga à remoção de mitocôndrias por mitofagia.

É, assim, de extrema importância elucidar os mecanismos de acção da CatD lisossomal, de modo a desenvolver uma estratégia adequada para modular esta protease na terapia do cancro. As alterações induzidas nos lisossomas mediante a transformação são numerosas e, enquanto a maioria são vistas como pró-oncogénicas, os mesmos processos também tornam as células

cancerosas sensíveis à morte celular lisosomal (adaptado do projeto submetido' *Mechanisms underlying the release of Cathepsin D from the lysosome and its role in mitochondrial degradation*').



**Objetivos**

**E**

**Plano**

**de**

**Trabalho**

### Objetivos

O objetivo deste trabalho prático foi avaliar se a CatD possui um papel na morte apoptótica e no envelhecimento cronológico semelhante ao Pep4p, seu ortólogo em levedura. Para este fim, usamos a levedura *S. cerevisiae* como modelo para expressar a CatD.

### Plano de trabalhos:

- I. clonar a CatD num vector que permite a expressão da proteína na levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
- II. de seguida transformar o plasmídeo numa estirpe mutante que não possua a Pep4p;
- III. confirmar a expressão de CatD por Western Blot;
- IV. confirmar a complementaridade funcional da CatD em relação ao Pep4p:
  - a. determinar se a expressão de CatD reverte o fenótipo de sensibilidade ao ácido acético da estirpe Pep4p mutante, usando como controlo o vetor vazio;
  - b. avaliar o papel de CatD no envelhecimento cronológico.

**MATERIAL**

**E**

**MÉTODOS**

### Reagentes

Base azotada de levedura, e triptona bactopectona foram adquiridos à *Disco Laboratories* e o extrato de levedura à *Cultimed*. A fonte de carbono utilizada foi a galactose (*Formedium*). Todos os aminoácidos foram adquiridos à *Formedium*. Para *PCR* usamos  $MgCl_2$  e dNTP's adquiridos à *Roche*. As enzimas de restrição *EcoRI*, e *PstI* e *Taq Polimerase* foram adquiridas à *Fermentas* e a *NotI* à *Roche*.

### Estirpes e Plasmídeo

As estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste estudo estão listados na Tabela I. Os oligonucleótidos usados neste trabalho estão listados na Tabela II. Os plasmídeos foram amplificados na estirpe de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (como descrito a seguir) e purificados utilizando um kit Miniprep (Kit *Plasmid Miniprep GenElute*, Sigma-Aldrich), de acordo com as instruções do fabricante. A correta inserção do fragmento no plasmídeo foi confirmada por digestão com enzimas de restrição específicas, por *PCR Colony* e *Western Blot*.

O plasmídeo pESC/HIS-CatD foi construído por *gap repair*. Resumidamente, a CatD foi amplificada (condições descritas na Tabela III) por Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase chain reaction* (PCR), utilizando o plasmídeo pJP1520CTSD (DNASU, Arizona, USA) como *template* e os oligonucleotídeos, CatD\_GR\_forward e CatD\_GR\_reverse da tabela II. A estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A foi transformada com o plasmídeo pESC/HIS digerido com *EcoRI* e *NotI* e com o fragmento de PCR contendo a sequência codificante da CatD. A correta inserção de CatD em pESC/HIS foi confirmada através de *PCR Colony*, em que o *annealing* ocorre no plasmídeo pESC/HIS e no interior de CatD, sensivelmente a meio, com recurso aos *primers* pESC/HIS\_forward e CatD\_Mid\_reverse, respetivamente registrados na tabela II. A sua inserção foi também confirmada por sequenciação. O processo é descrito em detalhe nas secções seguintes.

Tabela I- Estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho.

<i>ESTIRPE</i>	<i>GENÓTIPO</i>	<i>REFERÊNCIA/FONTE</i>
W303-1A	MATa, ura3-1, trp1-1, leu2-3, 112, his3-11,15 ade2-1, can1-100	R.Rothstein
W303-1A-PYX232 MT-GFP -PESC/HIS	W303-1A alberga pYX232- mt-GFP e pESC/HIS	Neste estudo
W303-1A-PYX232 MT-GFP-PESC/HIS- PEP4P	W303-1A alberga pYX232- mt-GFP e pESC/HIS-Pep4p	Neste estudo
W303-1A-PYX232 MT-GFP-PESC/HIS- CATD	W303-1A alberga pYX232- mt-GFP e pESC/HIS-CatD	Neste estudo
W303-1A ΔPEP4P-PYX232 MT-GFP- PESC/HIS	W303-1A Δpep4p alberga pYX232-mt-GFP e pESC/HIS	Neste estudo
W303-1A ΔPEP4P-PYX232 MT-GFP- PESC/HIS-PEP4P	W303-1A Δpep4p alberga pYX232-mt-GFP e pESC/HIS-Pep4p	Neste estudo
W303-1A ΔPEP4P-PYX232 MT-GFP- PESC/HIS-CATD	W303-1A Δpep4p alberga pYX232-mt-GFP e pESC/HIS-Pep4p	Neste estudo
BY 4741		
BY 4741-PESC/HIS	BY4741 alberga pESC/HIS	Neste estudo
BY 4741-PESC/HIS-PEP4P	BY4741 alberga pESC/HIS-Pep4p	Neste estudo
BY 4741-PESC/HIS-CATD	BY4741 alberga pESC/HIS-CatD	Neste estudo
BY 4741 ΔPEP4P-PESC/HIS	BY4741 ΔPep4p alberga pESC/HIS	Neste estudo
BY 4741 ΔPEP4P-PESC/HIS-PEP4P	BY4741 ΔPep4p alberga pESC/HIS-Pep4p	Neste estudo
BY 4741 ΔPEP4P-PESC/HIS-CATD	BY4741 ΔPep4p alberga pESC/HIS-CatD	Neste estudo

Tabela II - Tabela com os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

<i>Nome</i>	<i>Sequência Oligonucleotídica (5' - 3')</i>
<i>CatD_GR_forward</i>	agaattttgaaaattcgaattcACTAACATGCAGCCCTCCAGCCTTCTG
<i>CatD_GR_reverse</i>	cttgaatccatcgatactagtcggcGAGGCGGGCAGCCTCGGCGA
<i>CatD_Mid_reverse</i>	GTGATGCCTGGCTGCTTGGTGGCCTC
<i>pESC/HIS_seq_forward</i>	ggatatgtatatggtgtaatgccatgta

### Amplificação da CatD

Iniciou-se este trabalho prático com a obtenção de um clone, o pESC/HIS-CatD. Para tal foi necessário amplificar a CatD. Recorremos à técnica de PCR. Foi feita uma *mix*, os reagentes encontram-se listados na tabela III (A), e as condições utilizadas na tabela III (B). O molde utilizado foi o pJP1520-CTSD (DNASU, Arizona, USA) e os *primers* encontram-se na tabela II. Foram realizados 31 ciclos.

Tabela III - Tabela com as quantidades de reagentes (A), condições de PCR (B). Desnaturação inicial foi realizada a 95°C ; 31 ciclos de 30 seg a 95°C para a desnaturação, 30 seg a 50°C para o emparelhamento dos *primers* e 150 seg a 72°C para o alongamento; alongamento final a 72°C durante 10 min.

(A)

10µL Buffer 10x Fermentas
2,0µL MgCl <sub>2</sub> (25 mmol)
2,0µL dNTP's Roche
2,0µL <i>primer CatD_Reverse</i>
2,0µL <i>primer CatD_Forward</i>
2,0µL <i>template pJP1520</i>
3µL <i>Taq Fermentas</i>
77µL H <sub>2</sub> O

(B)

Temperatura	Tempo
94°C	5 minutos
94°C	30 segundos
50°C	30 segundos
72°C	150 segundos
72°C	10 minutos
10°C	∞

### Restrição de pESC/HIS

A restrição do plasmídeo pESC/HIS foi feita com uma *mix* que se encontra discriminada na tabela IV. Sendo a temperatura ótima das duas enzimas 37°C, esta restrição foi incubada *overnight* (o/n), no máximo 16h. Para a inativação das mesmas, recorreu-se ao uso de um termobloco, a 65°C, durante 20 minutos. O plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*.

Tabela IV - Tabela com as quantidades de reagentes necessários para efetuar a restrição do plasmídeo pESC/HIS. A restrição ocorreu O/N a 37°C.

2,5µL <i>Buffer O</i>
1,0µL <i>EcoRI</i>
0,5µL <i>NotI</i>
5,0µL pESC/HIS
16,0µL H <sub>2</sub> O

### Eletroforese de *DNA* em gel de Agarose

Para o gel de agarose foi utilizado 1g de agarose por 100 mL de tampão TAE 1X (50X; 242g de Tris base, 57,1 ml de 100% (v/v) Ácido Acético, 100 ml de 0,5M EDTA). A cada amostra adicionou-se um 1/10 do volume de tampão de corrida 10X (0,21% azul de bromofenol, 0,2 M EDTA, pH 8,0, e 50% glicerol). A eletroforese realizou-se num sistema *Mini-SubCell GT (BioRad)* a 120V durante 40 min, em tampão TAE 1X e os géis foram corados com *GelRed* e analisados num *transiluminador GenoSmart (VWR)*. Como referência foi utilizado o marcador de pesos moleculares *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas)*.

### Transformação de *S. cerevisiae*

Foi utilizado o método do acetato de lítio para a transformação de *S. cerevisiae*. Células das estirpes W303 e BY4741 foram cultivadas, em meio YPD, a 30°C e 200 r.p.m. O/N. No dia seguinte foram diluídas para  $DO_{600}=0,2$  e deixadas crescer até  $DO_{600}=0,8$ . As células foram recolhidas por centrifugação a 5000 r.p.m., durante 3 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado em água estéril e após nova centrifugação, foi ressuspensão em 20µL de 1M LiAc e 180 µL de água pura. As células competentes foram mantidas a 4°C até ao dia seguinte, aquando a sua utilização.

Para cada transformação preparou-se, em tubos *ependorf*, uma mistura listada na tabela V. Incubaram-se os *ependorffs* a 30°C e 200 r.p.m. durante 30min, seguindo-se uma incubação de 30min a 42°C e uma outra de 60min no gelo. Foram adicionados 800 µL de água estéril e conteúdo bem misturado. Seguiu-se uma centrifugação durante 1min a 14500 r.p.m. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 100µL de meio YPD, sendo depois as células

transferidas para placas contendo meio seletivo. As placas foram incubadas durante 2 a 3 dias, a 30°C.

*Tabela V- Mix usada na transformação em levedura. (\*) Somente adicionada na obtenção de pESC/HIS-CatD.*

	Volume (µL)
PEG 50%	225
LiAc 1M	25
Células competentes de Levedura	50
ssDNA(10mg/mL) (DNA de esperma de salmão)	5
Plasmídeo	5
CatD <sup>o</sup>	13

### *PCR colony*

Este PCR foi efetuado utilizando as mesmas condições referidas na tabela III (B) para a referida amplificação da CatD com duas diferenças apenas. Neste é adicionada biomassa de uma colónia isolada, para confirmar se é efetivamente um verdadeiro positivo, e os *primers* utilizados diferem, uma vez que um hibrida no interior da CatD e um outro no plasmídico pESC/HIS, denominado CatD-*Mid\_reverse* e pESC/HIS-*seq\_forward*, respetivamente (tabela II).

### **Extração de *DNA* plasmídico de levedura.**

Para se obter o *DNA* de levedura é necessário quebrar a sua parede celular. Então, para a digestão da parede celular da levedura, uma cultura de 5mL em meio seletivo SC Gal –HIS foi crescida 16h procedemos à recolha das células por centrifugação a 14500 r.p.m durante 1min. De seguida o *pellet* foi ressuspenso em 1mL de *Sorbitol* 1,2M e 5µL de *Zimoliase* (60mg/mL) e inoculado durante 60min a 37°C. Por fim, procedeu-se a nova recolha das células nas mesmas condições anteriormente referidas.



### Preparação de células competentes de *E. coli*

Preparam-se células competentes de *E. coli* da estirpe DH5 $\alpha$ . As células foram inoculadas em 125mL de meio SOB (2% batotritona, 0,5% extrato de levedura, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub> e 10mM MgSO<sub>4</sub>) e foram incubadas a 26°C e 200 r.p.m. até uma DO<sub>600</sub>=0,6. As células foram recolhidas por centrifugação a 3000 r.p.m., 4°C, durante 10 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensado em 20mL de meio TB (10mM Pipes, 55mM MnCl<sub>2</sub>, 15mM CaCl<sub>2</sub> e 250mM KCl, armazenado a 4°C). Após incubação no gelo durante 10 min, seguiu-se uma nova centrifugação nas condições anteriormente referidas. O sobrenadante foi novamente eliminado e o sedimento ressuspensas em 10mL de meio TB, tendo-se adicionado dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração final de 7% (v/v). As células foram incubadas no gelo por mais 10min, foram feitas alíquotas de 200 $\mu$ L, congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80°C.

### Transformação de células competentes de *E. coli*

Para a transformação de células bacterianas com *DNA* plasmídico, utilizou-se o método de transformação por choque térmico. Preparou-se, num tubo de *eppendorf*, uma mistura de 80000ng de células competentes e 2200ng de *DNA* plasmídico e incubou-se no gelo durante 30min. Para o choque térmico, os tubos foram transferidos para um banho-maria a 42°C durante 45 seg e incubados seguidamente no gelo por 2min. Adicionaram-se 800 $\mu$ L de meio LB [0,5% extrato de levedura, 1% bactopectona e 0,5%NaCl] e incubou-se a 37°C e 200 r.p.m. durante 10min. Por fim, as células foram transferidas para placas contendo meio LB com ampicilina (100 $\mu$ g/mL) e incubadas a 37°C, O/N.

### Extração e purificação de *DNA* plasmídico de *E. coli*

Para a extração de *DNA* plasmídico, inoculou-se uma colónia de cada transformante em 5 mL de meio LB-Amp e incubou-se a 37°C e 200 r.p.m., overnight. O *DNA* plasmídico foi extraído de *E. coli* utilizando o *kit GenElute Plasmid Miniprep (Sigma)* de acordo com as instruções do fabricante.

### Rastreo de colónias positivas

A correta inserção da CatD no plasmídeo pESC/HIS foi confirmada por digestão com enzimas de restrição (tabela VI) e comparação com o padrão de restrição esperado. Para tal, foram inoculadas, no total, 5 colónias obtidas dos ensaios de transformação com o plasmídeo pESC/HIS em 5 mL de meio LB + ampicilina (100 µg/ml) e incubadas a 37 °C e 200 r.p.m., O/N. A extração de DNA plasmídico foi efetuada com o *kit GenElute Plasmid Miniprep (Sigma)* de acordo com as instruções do fabricante, referidas anteriormente. O vetor vazio pESC/HIS foi submetido à mesma restrição, sendo utilizado controlo negativo. Por comparação com o padrão de pesos moleculares, determinou-se o tamanho dos fragmentos originados e as amostras sujeitas às restrições resultantes no padrão esperado, foram transformadas em *S. cerevisiae*.

Tabela VI - Volumes (µL) utilizados na restrição de confirmação do clone pESC/HIS-CatD.

	<i>pESC/HIS</i>	<i>pESC/HIS – Pep4</i>	<i>pESC/HIS - CatD</i>
DNA	2	3	4
Buffer	2	2	2
PstI	1	1	1
H <sub>2</sub> O	15	14	13

### Preparação de extratos proteicos totais

Para a extração proteica e preparação de amostras para *Western blotting*, as células foram ressuspensas em 500 µL de água, aos quais foram adicionados 50 µL de uma solução de 7,4% (v/v) 3,5 β-Mercaptoetanol – 1,85N (v/v) NaOH e incubadas no gelo durante 15 min. Foram adicionados 50 µL de 50% (v/v) TCA seguido de uma nova incubação no gelo por 15 min. O precipitado foi centrifugado a 14 500 r.p.m durante 10 min e ressuspenso em 60 µL de tampão *Laemmli* 1x (4X; 0,25M Tris-HCl, 9,2% SDS, 40% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 0,5% azul de bromofenol) e 10 µL de SDS 5%. Os extratos proteicos totais foram então desnaturados a 100 °C durante 5min.

### *SDS PAGE - Western blotting*

Os níveis de expressão proteica foram verificados submetendo as amostras a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Os géis de poliacrilamida foram preparados na concentração de 12,5% (p/v) para o gel de resolução e 4% (p/v) para o gel de concentração, aplicando-se um volume de amostra de 15 a 20  $\mu$ L no gel e utilizando como referência um marcador de pesos moleculares *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas)*. A eletroforese realizou-se num sistema *Mini Protean Tetra Cell I (BioRad)* a 25mA durante aproximadamente 2 horas (a eletroforese termina quando a frente do corante atinge o fundo do gel). O tampão de corrida (10  $\times$ ) continha 0,25M de Tris -base, 1,92M Glicina, 1% de SDS e foi utilizado a uma concentração final de 1  $\times$ . De seguida ocorreu a transferência para membrana *Hybond PVDF (Amersham Biosciences)*, durante 1h:30min a 60mA, num sistema *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad)*, utilizando tampão de Transferência (10 $\times$ ) que continha 0,25M Tris-base, 1,92M Glicina e foi utilizado a uma concentração final de 1  $\times$ , sendo 1/5 do seu volume final completado com metanol a 100%. As membranas foram bloqueadas em 5% de leite em pó dissolvido em TBST 1x (10X; 1,5M NaCl, 100mM Tris-HCl, 0,05 Tween [pH=7,5]) durante 60 min à temperatura ambiente, ou o/n a 4°C. De seguida foram lavadas 3 vezes com TBS 1X durante 5 min cada uma e incubadas em TBS 1X contendo o anticorpo primário durante 60 min à temperatura ambiente. A seguir as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS 1X, para remoção de excesso de anticorpo, e incubadas com o anticorpo secundário. Os anticorpos primários encontram-se listados na tabela VII, assim como os secundários. Os anticorpos secundários utilizados nomeadamente o *goat anti-mouse IgGs*, acoplado a *horseradish peroxidase* (1:5000, *Jackson Laboratories*), foram detetados utilizando o kit *Immobilon Western (Millipore)* O sinal foi quantificado utilizando o software *Bio-Rad Quantity One* e os níveis de PGK1 foram utilizados como controlo da quantidade de proteína.

Tabela VII – Anticorpos primários usados no *Western Blotting*, bem como o seu respetivo peso e condições em que foram usados.

ANTICORPO PRIMÁRIO	PESO	TEMPERATURA	DILUIÇÃO	TEMPO DE INCUBAÇÃO	SOLUÇÃO DE BLOQUEIO	ANTICORPO SECUNDÁRIO
ANTI-FLAG (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY)	52	Ambiente	1:2000	1h	5% leite	<i>mouse monoclonal</i>
ANTI-PGK1 (MOLECULAR PROBES)		Ambiente	1:5000	1h	5% leite	<i>mouse monoclonal</i>
ANTI-CATD	52	Ambiente	1:100	1h	5% leite	<i>mouse monoclonal</i>
ANTI-GFP	27	Ambiente	1:10000	1h	5% leite	<i>mouse monoclonal</i>

### Indução da autofagia

A autofagia foi induzida em *S. cerevisiae*, por privação da fonte de azoto. Para isso, as estirpes contendo o plasmídeo pESC/HIS, com CatD, pep4p ou vazio e a expressar Atg8-GFP foram cultivadas em meio SC GAL-HIS –URA, até à fase exponencial do crescimento ( $DO_{600}=0,8 \sim 1,0$ ) a 30°C e 200 r.p.m. Uma vez atingida esta DO recolheram-se 2ml de cultura correspondente ao tempo 0, que corresponde ao tempo de início da indução de autofagia. A restante cultura é centrifugada, lavada 2 vezes com água estéril e transferida para meio SD (-N) com 2% galactose (p/v) e a uma  $DO_{600}= 0,5$ . As células foram então incubadas a 30°C e 200 r.p.m. e ao fim de 20/24 horas retiraram-se amostras de 1 mL em que a  $DO_{600} \sim 2$  para análise por *Western blotting*.

### Ensaios de viabilidade

#### Ácido Acético e Peróxido de Hidrogénio

Para o ensaio com ácido acético as estirpes eram submetidas a tratamento com uma duração de 180min, para W303 e 120min para BY4741, e a uma concentração de 120mM de AA, a 30°C e 200 r.p.m..

No ensaio de peróxido de hidrogénio, as estirpes eram submetidas a tratamento com uma duração de 180min, para W303 e 120min para BY4741, uma concentração de 1.5mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a 30°C e 200 r.p.m..

Nos dois tratamentos, em determinados momentos específicos, as células foram recolhidas por centrifugação, ressuspendidas em água, diluídas e semeadas em placas de YPDA [YPDA: 2% (p/v) de bactopectona, 1% (p/v) de extrato de levedura, 2% (p/v) de glucose e 1,5% (p/v) de agar]. Após 2 dias de incubação a 30 °C, as unidades formadoras de colónia (UFC) foram contadas. A DO<sub>600</sub> foi medida para cada amostra e em cada ponto de tempo de c.f.u. para que seja feita a normalização tendo em conta a DO<sub>600</sub>. A percentagem de viabilidade foi calculada em relação ao tempo 0 (o que corresponde 100% de viabilidade). Análise estatística e quantificação da viabilidade celular foram realizadas com o *software GraphPad Prism 5*.

### Ensaio de Envelhecimento

Para a realização deste ensaio deixou-se uma pré-cultura de 5mL de meio SC Gal –HIS com biomassa, O/N a 30°C e 200 r.p.m.. No dia seguinte, foram colocados 10mL de meio fresco de SC Gal-HIS num erlenmeyer de 50mL, aos quais foram adicionados 10µL da cultura que ficou O/N. Estas novas culturas foram colocadas a 30°C e 200 r.p.m durante 72h a envelhecer. Ao fim dessas 72h foram recolhidas amostras de 50µL para as diluições (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup>) para semear e em placas YPD para contagem de c.f.u.'s e uma outra de 500µL para medição da DO<sub>600</sub>. Este mesmo procedimento repetiu-se diariamente durante 5dias e depois de 48h em 48h, sendo as amostras recolhidas sempre à mesma hora. As células foram semeadas em placas YPDA, incubadas durante 2 dias a 30°C e os c.f.u. contados. A DO<sub>600</sub> foi medida para cada amostra e em cada ponto de tempo de c.f.u. para que seja feita a normalização tendo em conta a DO<sub>600</sub>. A percentagem de viabilidade foi calculada em relação ao tempo 0 (o que corresponde 100% de viabilidade). Análise estatística e quantificação da viabilidade celular foram realizadas com o *software GraphPad Prism 5*.

# RESULTADOS

As proteases tem vindo a revelar-se importantes e capazes de efetuar modificações altamente específicas e seletivas de proteínas. Entre outras proteases, tem-se destacado uma, protease aspártica denominada catepsina D. Ela desempenha papéis importantes em doenças degenerativas e progressão de cancro, pelo que tem chamado a atenção dos investigadores para o seu uso numa futura terapia de cancro. A protease vacuolar Pep4p é a sua homóloga em levedura, a qual já possui funções anti-apoptóticas descritas e gostaríamos de saber CatD se comporta da mesma forma quando submetidas aos mesmos indutores de apoptose.

Para este fim, iniciou-se o trabalho experimental com a construção do plasmídeo pESC/HIS-CatD, que permite expressar a CatD humana em células de levedura.

### **Amplificação a CatD e restrição do plasmídeo pESC/HIS**

Primeiro procedeu-se à amplificação por PCR do gene CatD e confirmação em gel de agarose, e restrição do vetor vazio pESC/HIS, nas condições descritas em material e métodos. O plasmídeo vazio é caracterizado por surgirem três bandas que correspondem à fase superenrolada, banda de menor tamanho, a isoforma linear, de tamanho intermédio e a conformação circular aberta surge mais próxima do polo negativo, sendo a de tamanho molecular superior. Assim, na figura 3 do lado esquerdo temos o plasmídeo pESC/HIS e do lado direito a amplificação de CatD.

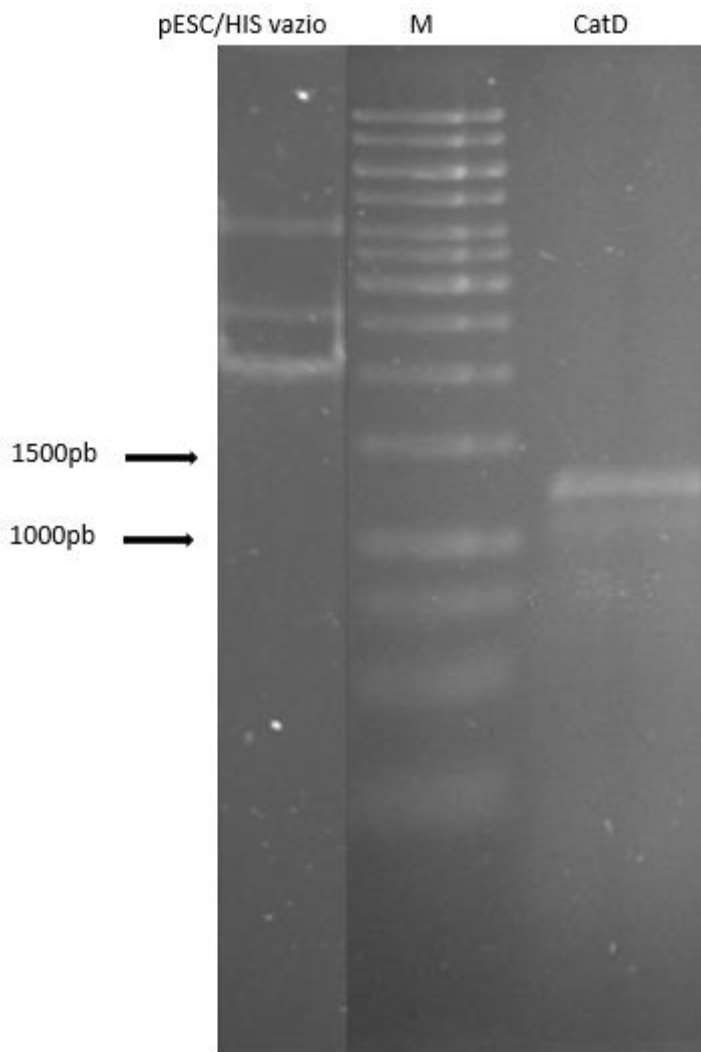


Figura 3- Aqui é visível a amplificação de CatD, com 1239pb, lado direito do marcador e o plasmídeo vazio pESC/HIS do lado esquerdo . As condições de *PCR* utilizadas foram: Desnaturação inicial realizada a 95°C. Foram realizados 31 ciclos de 30 seg a 95°C para a desnaturação, 30 seg a 50°C para o emparelhamento dos *primers* e 150 seg a 72°C para o alongamento. O alongamento final a 72°C durante 10 min. A mix de *PCR* continha *Buffer 10x Home's Taq*, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol), DNTP's Roche, *primer CatD\_Rreverse*, *primer CatD\_Forward*, *template pJP1520* e *Home's Taq*. A duração do *PCR* foi de cerca de 1h:40min.

Depois de se obter a CatD amplificada e o pESC/HIS cotado com as enzimas *EcoRI* e *NotI*, foi necessário que a CatD incorporasse no pESC/HIS. Para tal, recorremos à técnica de *gap repair*, a qual está resumidamente esquematizada na figura 4. A levedura *S. cerevisiae* foi transformada com os dois fragmentos de *DNA* (o pESC/HIS e CatD), e obtiveram-se vários transformantes. Para identificar um positivo, ou seja, com a integração de CatD no plasmídeo recorremos ao *PCR Colony*. Nesses *PCR Colony* teríamos de obter uma banda com um tamanho entre os 750 e os 1000 pb (dados não mostrados), uma vez que os *primers* usados eram o *CatD\_Mid\_reverse* e o



CatD\_GR\_forward. Assim, deste modo tínhamos a certeza que a CatD estava incorporada pois um dos *primers* hibridava no interior de CatD.

Depois de os transformantes positivos identificados, era necessário amplificar o seu *DNA*, recorrendo a uma transformação em *E.Coli*. Depois de se obterem novos transformantes resultantes da amplificação recorremos uma vez mais ao PCR Colony (dados não mostrados) para voltar a confirmar que CatD estava presente.

O passo seguinte foi isolar o nosso clone através da extração e purificação do *DNA* com recurso ao *kit GenElute Plasmid Miniprep (Sigma)* seguindo as instruções do fabricante. Depois do clone isolado, foi quantificada a quantidade de *DNA* presente no mesmo através de um *nanodrop 2000 (Thermo scientific)* (dados não mostrados).

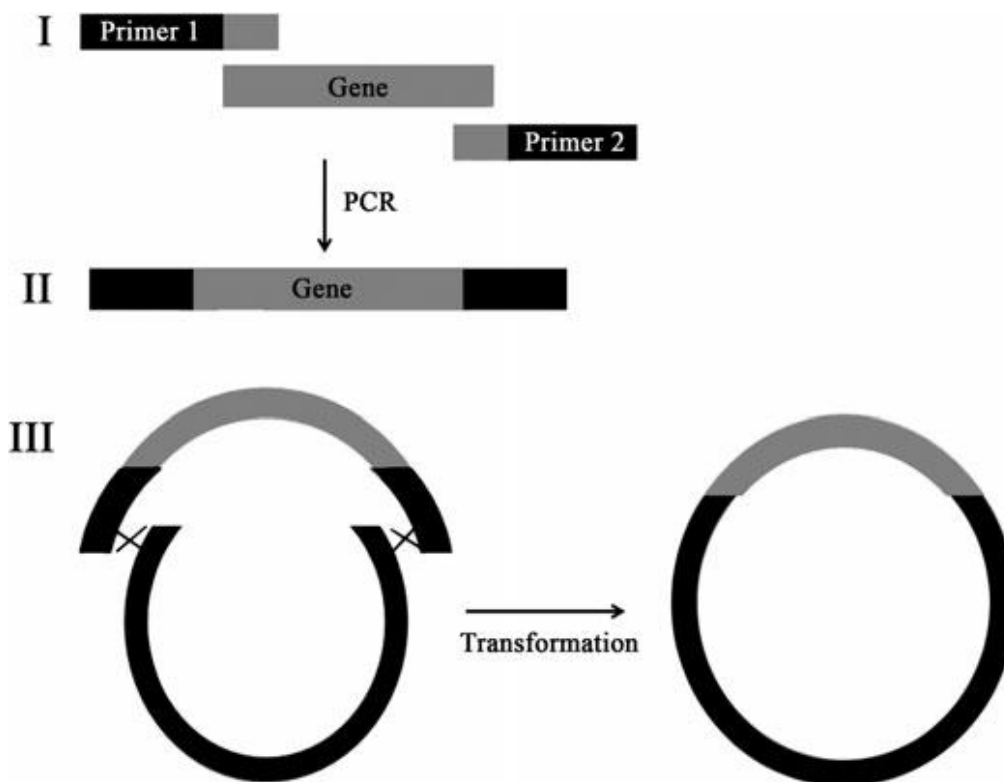


Figura 4 - Representação esquemática do processo de *gap repair*. Em I temos: o gene a ser clonado (CatD) é amplificado utilizando *primers* (*primer 1* corresponde a CatD\_Gv\_Foward e o *primer 2* ao CatD\_Gv\_Reverse) contendo bases homólogas para o vetor (pESC/HIS) no seu local de clonagem (preto) e bases homólogas para a CatD (cinzento). Depois de se efetuar a amplificação como descrito em materiais e métodos, em II obtemos o produto de PCR, que corresponde ao gene flanqueado pelas regiões homólogas ao local de clonagem do vetor. Em III temos o pESC/HIS restringido que irá incorporar o gene de interesse, a CatD, através de uma transformação onde é utilizada a levedura *S. cerevisiae* para transformar o vetor restringido e o resultado do PCR. Após esta co-transformação, ocorre recombinação homóloga entre o plasmídeo e o fragmento amplificado na levedura transformada, o que resulta na construção do vetor recombinante *in vivo* que será posteriormente isolado. (adaptado de Bessa D. *et al.*, 2012)

Para confirmar a inserção de CatD em pESC/HIS recorreremos a uma nova restrição com *Pst*I e também um *Western blotting* para confirmar a expressão de CatD em células em células transformadas com o clone pESC/HIS-CatD.

A restrição do clone foi efetuada com a enzima *Pst*I, durante duas horas a uma temperatura de 37°C, utilizando a mix que continha *DNA*, respetivo *buffer* da enzima, a enzima e água nas proporções indicadas na tabela VI na seção de materiais e métodos. Para se visualizar o resultado desta restrição, o *DNA* foi analisado através de uma corrida eletroforética em gel de agarose 1%.

Como controlo positivo utilizamos o clone já construído, pESC/HIS-Pep4p. Este plasmídeo juntamente com o seu *insert* antes da restrição seria um só fragmento com o tamanho de 7901pb e posteriormente a ela, seriam originados, dois fragmentos, um de 1183pb e um outro de 6653pb, correspondente ao *insert* e ao restante plasmídeo, respetivamente. Na figura 5, os resultados antes e após restrição correspondem, respetivamente, a 1 e 2.

O tamanho do nosso clone anterior à restrição seria um fragmento único de 7922pb e posteriormente iria de originar dois fragmentos, um de 2059pb e um outro de 5862pb, ou seja, um no qual está presente o *insert*, CatD, com uma pequena parte do plasmídeo e o restante pertencente apenas ao plasmídeo. Na figura 5, os resultados antes e após restrição correspondem a 3 e 4, respetivamente.

O plasmídeo vazio foi também submetido a esta restrição. Da restrição efetuada resultam dois fragmentos, um de 23pb, o qual não é observável no gel devido ao seu baixo tamanho, e um outro de 6683pb (dados não mostrados).

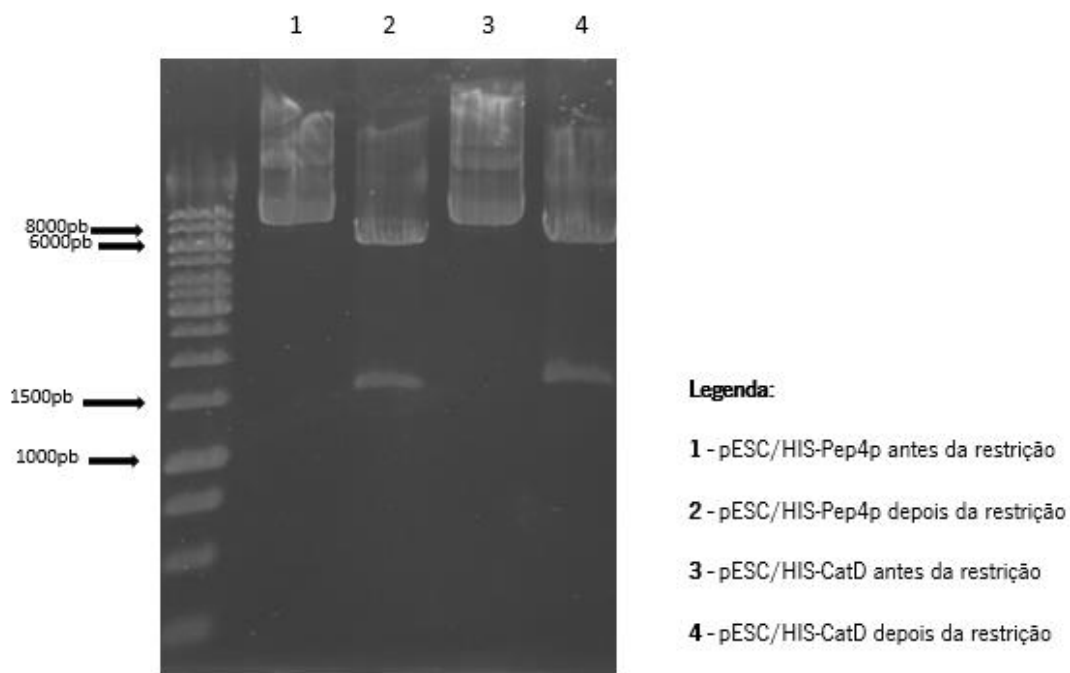


Figura 5- Confirmação da obtenção do clone pESC/HIS-CatD. Em 1 e 3 podemos observar o resultado anterior à restrição respetivamente a pESC/HIS-Pep4p e pESC/HIS-CatD. Em 2 e 4 é possível confirmar a obtenção de pESC/HIS-Pep4p e do clone pESC/HIS-CatD, respetivamente, sendo o primeiro utilizado como controlo positivo. Em cada caso, primeiro está o resultado anterior à restrição que é seguido por esse mesmo.

Na literatura o peso molecular da CatD está descrito por vários autores. Sabe-se que é sintetizada como um precursor de 52kDa (pró-enzima), que sofre um primeiro processamento para uma cadeia única ativa de 48kDa formando uma enzima intermédia, a qual sofre um processamento adicional que produz a protease lisosomal ativa madura, composta por uma cadeia pesada e uma cadeia leve de 34 kDa e 14 kDa, respetivamente (Vickers I. *et al.*, 2007; Masson O. *et al.*, 2010).

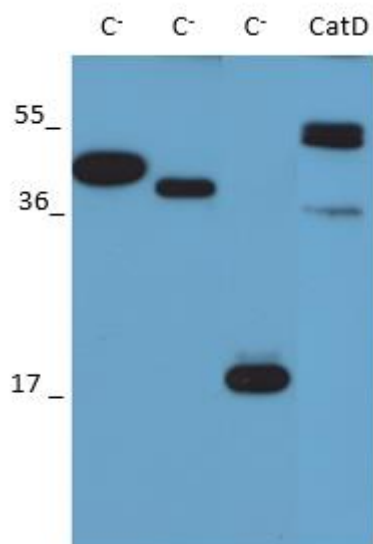


Figura 6- Gel *Western Blotting*. Da expressão de CatD. Os poços 1, 2 e 3 correspondem a controles negativos de 42, 33 e 16kDa respectivamente. No poço 4 encontra-se a CatD. Como cada controlo possui FLAG acoplado, o seu verdadeiro peso é um pouco, mas relativamente pequeno, superior ao referido. Por isso se vêm as bandas acima dos referidos valores

Assim, com a realização do *Western blotting* podemos observar 3 bandas, presumivelmente correspondentes aos fragmentos de 52kDa, 48kDa, e 34 kDa (figura 6). Como controlos negativos um fragmento da região de *PKCepsilon* com actividade cinase ligado a FLAG (kin-FLAG), com um peso de 42kDa, um fragmento da região C1 de *PKCepsilon* ligado a FLAG (C1-FLAG), com um peso de 33kDa, um fragmento de *PKCepsilon* ligado a FLAG (C2-FLAG), com um peso de 16kDa, nos poços, 1, 2 e 3 respectivamente. Como cada controlo possui FLAG acoplado, o seu verdadeiro peso é um pouco, mas relativamente pequeno, superior ao referido. Por isso se vêm as bandas acima dos referidos valores

### Complementação do fenótipo da estirpe *pep4Δ* com a expressão de CatD

#### Em resposta ao Ácido Acético

No nosso modelo de estudo, a levedura *S. cerevisiae* o ácido acético desencadeia um processo de morte celular programada que possui semelhanças com a apoptose em mamífero, tais como fragmentação do *DNA*, condensação da cromatina e exposição de fosfatidilserina (Sousa M. J. *et al.*, 2013). Sabe-se que a morte celular induzida por ácido acético é acompanhada por disfunção mitocondrial com libertação de *cit c* (Ludovico P. *et al.*, 2002). C. Pereira na sua tese

de doutoramento afirmou que a protease vacuolar Pep4p está envolvida na degradação mitocondrial tardia induzida por este ácido e que células deficientes nesta protease exibem um atraso na degradação mitocondrial enquanto que a sua sobre-expressão conduzem a uma aceleração na degradação mitocondrial monitorizada por citometria de fluxo através da quantificação da percentagem de células fluorescentes que expressam mito-GFP.

As estirpes selvagem (WT) transformadas com o vector e  $\Delta pep4$  transformadas com o vector vazio ou a expressar Pep4p ou CatD foram submetidas a tratamento com 120mM de AA durante 180min, sendo retiradas amostras de 60 em 60 min. Deste modo tentamos compreender como se comporta a estirpe na ausência da protease vacuolar Pep4p e na presença de CatD.

Através da figura 7 podemos observar que a ausência de Pep4p na estirpe W303 resulta numa ligeira sensibilidade ao ácido acético no tempo 60, revertida pela sobre-expressão tanto da CatD como de Pep4p. No entanto, nos outros tempos, devido aos elevados desvios, não foi possível observar tendências.

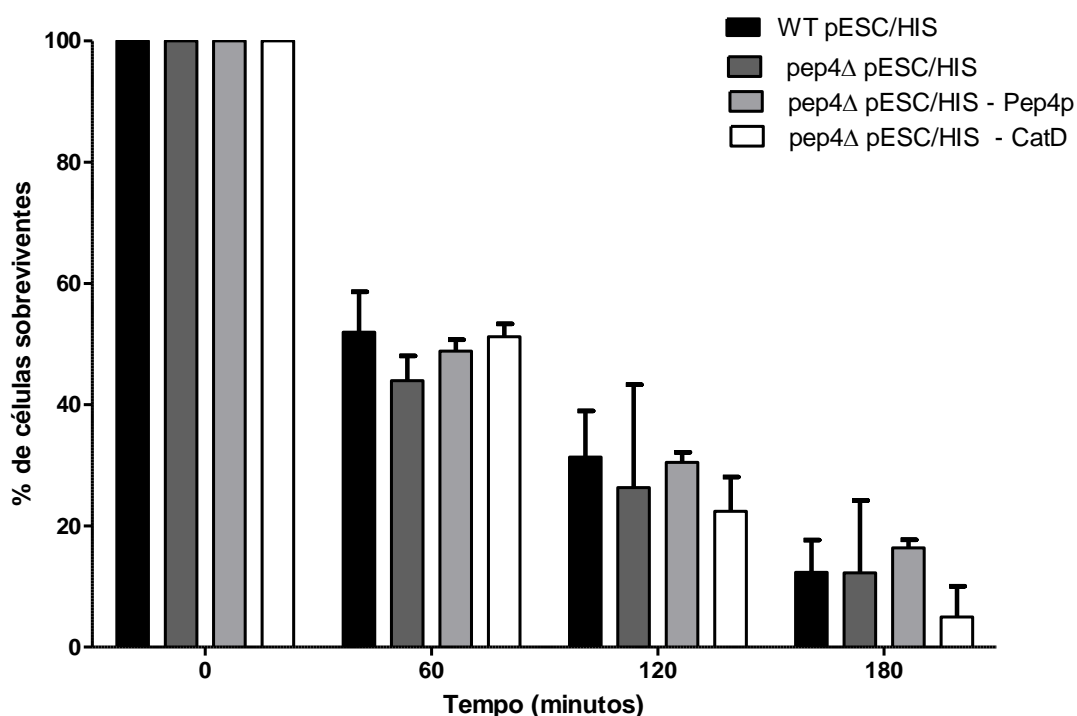


Figura 7- Viabilidade das estirpes selvagem W303, mutante *pep4Δ*, e mutante *pep4Δ* com expressão de Pep4p ou CatD submetidas ao tratamento com ácido acético. As culturas exponenciais foram cultivadas em meio SC Gal -HIS 30°C, foram transferidas para meio SC Gal -HIS fresco, pH=3.0, com 120mM de ácido acético. As células foram incubadas durante 180 minutos a 30°C. As amostras foram retiradas após 0, 60, 120 e 180 min. Para contagem dos c.f.u., diluições foram

plaqueadas em placas de YPD e, incubadas durante 2 dias a 30°C, ao fim dos quais as colónias foram contadas. Os valores representam médias e desvios padrão de três experiências independentes.

Na estirpe BY4741, não foi observada qualquer diferença na viabilidade das estirpes tratadas com ácido acético, como é demonstrado na figura 8.

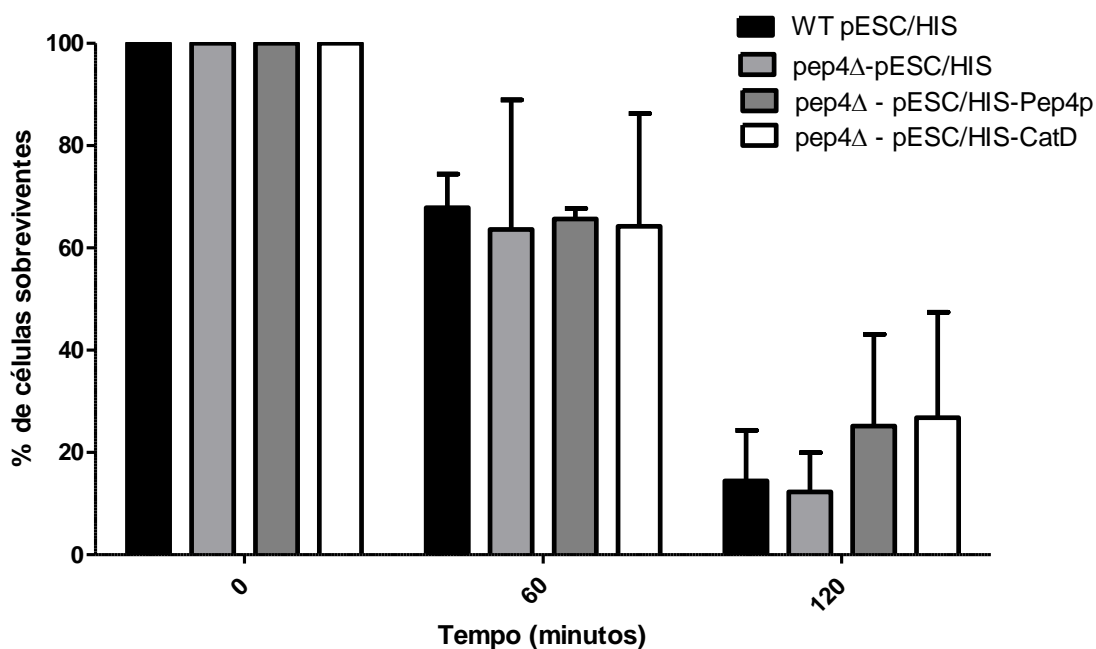


Figura 8 - Sobrevida das estirpes selvagem BY4147, mutante *pep4Δ*, e mutante *pep4Δ* com expressão de CatD submetidas ao tratamento com ácido acético. As culturas exponenciais foram cultivadas em meio SC Gal -HIS 30°C, foram transferidos para meio SC Gal -HIS fresco, pH=3.0, com 120mM de ácido acético. As células foram incubadas durante 180 minutos a 30°C. As amostras foram retiradas após 0, 60, 120 e 180 min. Para contagem dos c.f.u., diluições foram plaqueadas em placas de YPD e, incubadas durante 2 dias a 30°C, ao fim dos quais as colónias foram contadas. Os valores representam médias e desvios padrão de três experiências independentes.

### Em resposta ao peróxido de hidrogénio

O peróxido de hidrogénio forma espécies reativas de oxigénio, descrito como um impulso de alterações morfológicas consistentes com apoptose, a baixas concentrações (Singh M. *et al.*, 2007) sendo capaz de induzir este tipo de morte celular em *S. cerevisiae* bem como em células de mamíferos (Galganska H. *et al.*, 2010). Sabe-se que tratamentos utilizando elevadas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provocam necrose (Cleémenta M. V. *et al.*, 1998) uma vez que as células

apresentam características deste tipo de morte: por exemplo, as estruturas mais intracelulares são destruídas e não apresentam uma extensa condensação da cromatina ao longo do invólucro nuclear, uma característica típica da apoptose (Madeo F. *et al.*, 1999).

Características comumente observada em células de mamíferos em apoptose incitada por este indutor são por exemplo encolhimento celular, condensação da cromatina, vesiculação da membrana celular (Yin L. *et al.*, 2005), a ativação de caspases (Cerella C. *et al.*, 2009), isto é, a caspase-9 e -3, libertação de *cit c* (Singh M. *et al.*, 2007).

Na levedura, o peróxido de hidrogénico induz a apoptose apresentando características como por exemplo, acumulação de ROS (Madeo F. *et al.*, 1999), exposição de fosfatidilserina libertação do *cit c* (Weinberger M. *et al.*, 2003), e fragmentação de *DNA* (Galganska H. *et al.*, 2010).

As mesmas estirpes que foram submetidas ao tratamento com AA foram submetidas a tratamento com 1,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 180min, sendo retiradas amostras de 60 em 60 min. Deste modo tentamos compreender como se comporta a estirpe na ausência da protease vacuolar Pep4p e na presença de Pep4p ou CatD.

Através da figura 9 podemos observar que quando as células W303-1A são submetidas ao tratamento nas condições anteriormente referidas, a estirpe WT possui uma percentagem de morte superior à da estirpe deficiente na protease Pep4p. Podemos observar também que no tempo inicial a percentagem de sobrevivência é equivalente nas estirpes *pep4Δ* sem e com expressão de Pep4p, sendo a mesma interpretação válida para a estirpe com expressão de CatD. Por outro lado, no tempo final do tratamento conseguimos visualizar que a expressão de Pep4p sensibiliza as células ao peróxido de hidrogénio, revertendo o fenótipo para o equivalente ao da estirpe selvagem, o que não se verifica na estirpe em que foi expressa a CatD.

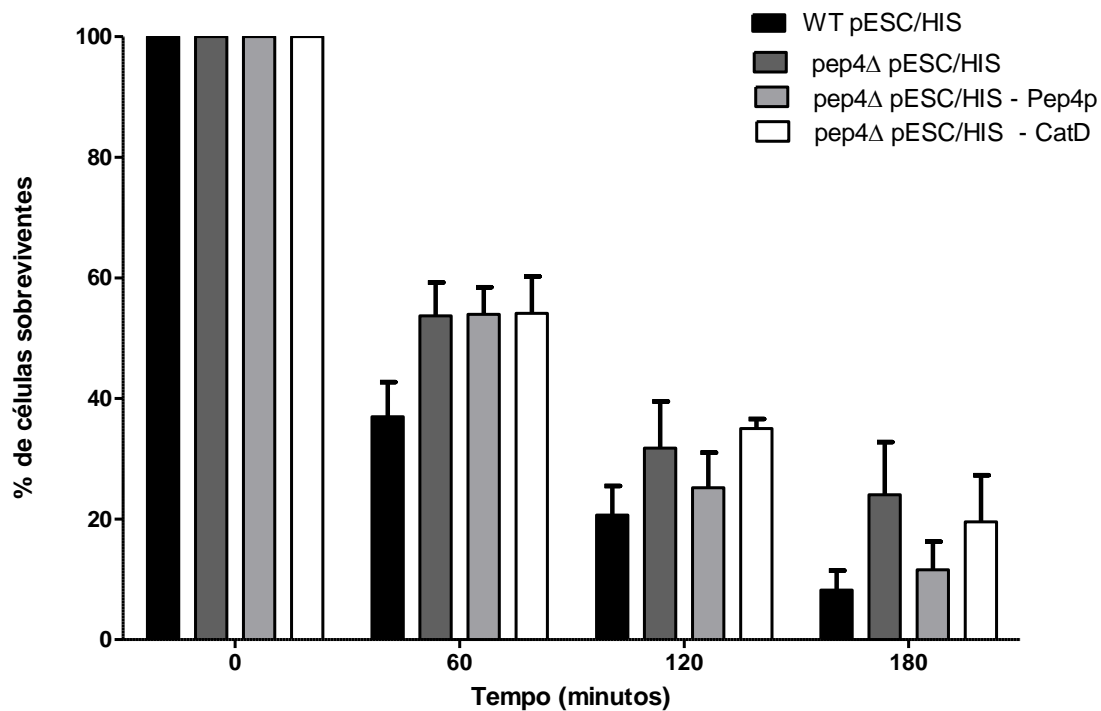


Figura 9- Sensibilidade das estirpes selvagem W303, mutante *pep4Δ*, e mutante *pep4Δ* com expressão de CatD submetidas ao tratamento com peróxido de hidrogénio. As culturas exponenciais foram cultivadas em meio SC Gal -HIS 30°C, foram transferidos para meio SC Gal -HIS fresco, ao qual eram adicionados 1,50mM de peróxido de hidrogénio. As células foram cultivadas durante 180 minutos a 30°C. As amostras foram retiradas após 0, 60, 120 e 180 min. Para contagem dos c.f.u., as diluições foram plaqueadas em placas de YPD, incubadas durante 2 dias a 30°C ao fim dos quais as colónias foram contadas. Os valores representam médias e desvios padrão de três experiências independentes.

Esta mesma tendência foi observada nas estirpes equivalentes construídas no background BY4741, como é possível observar na figura 10.



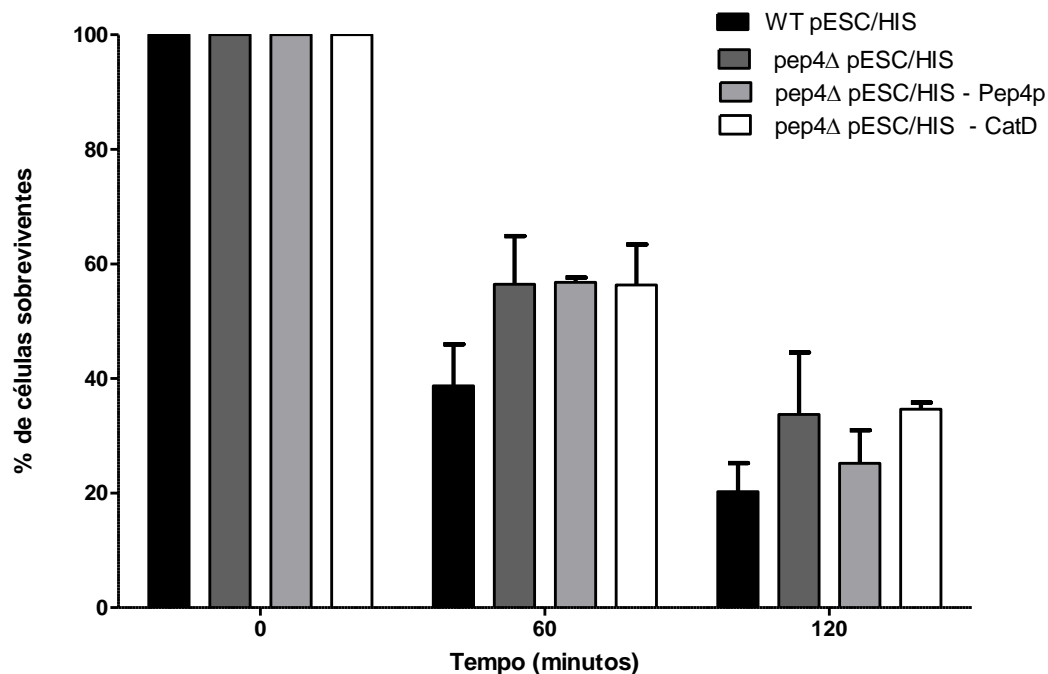


Figura 10- Sobrevivência das estirpes selvagem BY4147 mutante *pep4Δ*, e mutante *pep4Δ* com expressão de CatD submetidas ao tratamento com peróxido de hidrogénio. As culturas exponenciais foram cultivadas em meio SC Gal -HIS 30°C, foram transferidas para meio SC Gal -HIS fresco, ao qual eram adicionados 1,50mM de peróxido de hidrogénio. As células foram cultivadas durante 120 minutos a 30°C. As amostras foram retiradas após 0, 60 e 120min. Para contagem dos c.f.u., as diluições foram plaqueadas em placas de YPD, incubadas durante 2 dias a 30°C ao fim dos quais as colónias foram contadas. Os valores representam médias e desvios padrão de três experiências independentes.

Os resultados obtidos indicam que a CatD não complementa ou apenas complementa parcialmente o fenótipo da deleção de PEP4, no entanto os desvios obtidos foram muito elevados para se poder obter uma conclusão clara. De seguida avaliamos se a expressão de CatD reverte o envelhecimento muito precoce da estirpe *pep4Δ*, um fenótipo anteriormente descrito (Marques M. *et al.*, 2006; Carmona-Gutiérrez D. *et al.*, 2011).

### No envelhecimento cronológico

A levedura tem provado ser um organismo modelo útil para o estudo da genética de modulação de longevidade (Burtner C. *et al.*, 2009). O envelhecimento cronológico da levedura serve como modelo para o envelhecimento das células pós-mitóticas humanas, que representa o tempo que uma cultura permanece viável na fase pós-diauxica e estacionária sob condições de

disponibilidade de nutrientes, que podem ser metabolizados e estimular a sobrevivência das células mais jovens e mais aptas (Carmona-Gutierrez *et al.*, 2010). Deste modo, a sobrevivência da população é sobreposta à sobrevivência individual da célula (Carmona-Gutierrez *et al.*, 2010). Teoricamente, o envelhecimento pode estabilizar o tamanho da população e prevenir a superpopulação, podendo com isto aumentar a diversidade genética, encurtar o ciclo de geração efetiva, e acelerar a adaptação (Sukhanova E. I. *et al.*, 2012).

No ensaio de envelhecimento, apresentado na figura 11, observamos que a sobrevivência das células é favorecida pela presença de Pep4p, estando de acordo com dados anteriormente publicados (Marques M. *et al.*, 2006; Carmona-Gutiérrez D. *et al.*, 2011).

No entanto, o envelhecimento prematuro não foi significativamente revertido pela expressão de CatD do próprio Pep4p.

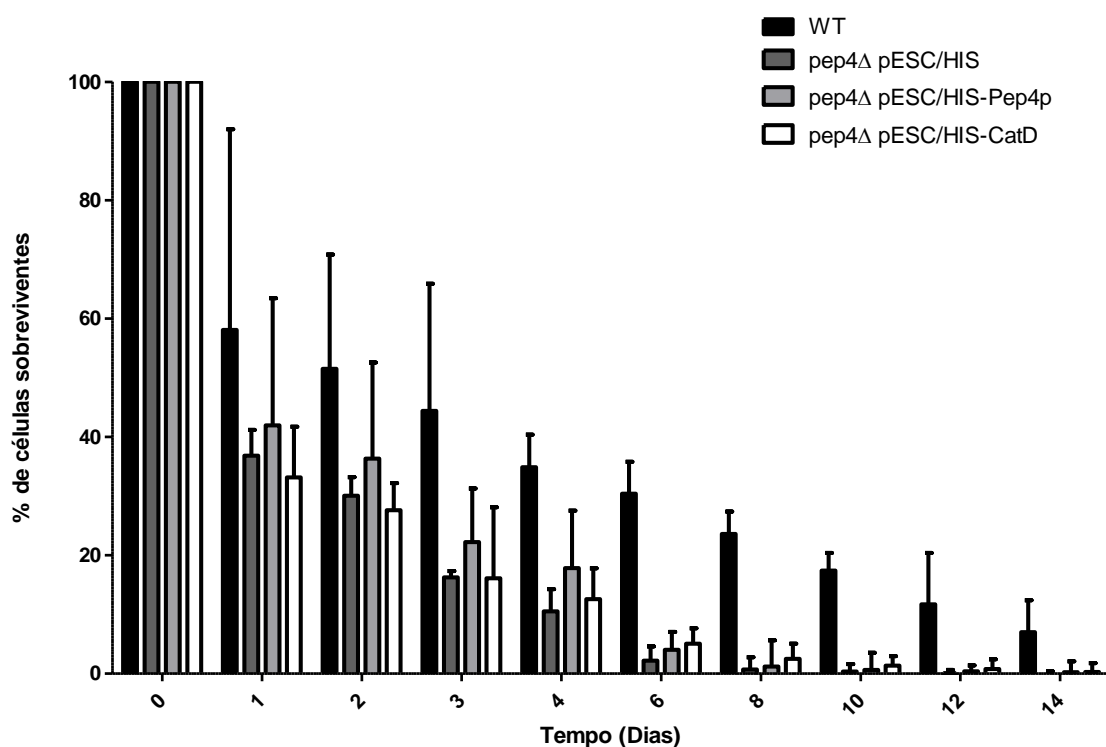


Figura 11- Envelhecimento cronológico em células W303-1A WT, mutante *pep4Δ*, e mutante *pep4Δ* com expressão de CatD. A estirpe WT funciona como controle. Pré-culturas foram cultivadas em meio SC Gal -HIS 30°C, 200 r.p.m. O/N. No dia seguinte foram transferidos para meio SC Gal -HIS fresco, ao qual eram adicionados 10µL da pé-cultura e foram colocadas novamente nas condições referidas anteriormente, para envelhecerem durante 72h. Ao fim das 72h foram retiradas amostras, diariamente durante 5 dias e depois de 48h em 48h com uma duração máxima de 14 dias de ensaio, para diluições e para medição da DO600. Para contagem dos c.f.u., as diluições foram plaqueadas em placas de YPD, incubadas durante 2 dias a 30°C ao fim dos quais as colónias foram contadas. Os valores representam médias e desvios padrão de três experiências independentes.

## Ensaio de Autofagia

A fim de determinar se a expressão de CatD complementa algum dos fenótipos observados na estirpe *pep4Δ* avaliamos se a expressão de CatD a partir do plasmídeo pRS413 reverte o defeito na proteólise de proteínas vacuolares observado na estirpe *pep4Δ*. Para este fim, avaliamos a indução de autofagia através da monitorização dos níveis de Atg8p-GFP por análise de *Western blotting*. Atg8p é a uma proteína necessária para a formação do autofagossoma e o aumento da sua quantificação está relacionada como sendo um marcador de diagnóstico deste processo (Pereira P., 2008; Alves S., 2014)

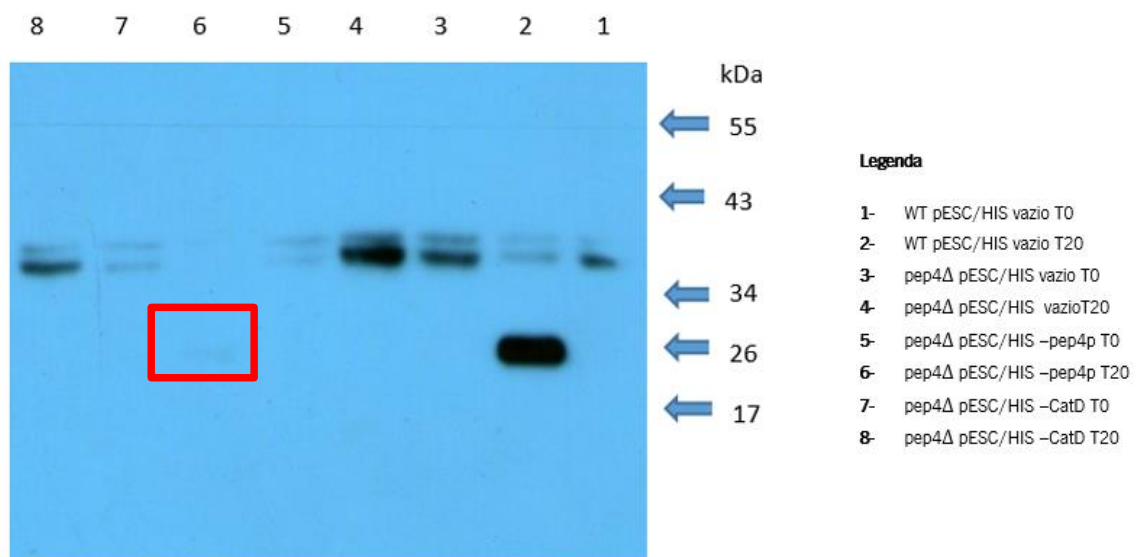


Figura 12 — *Western blotting* com o resultado de autofagia em células de *S. cerevisiae*. A deleção de Atg8p em células *S. cerevisiae* W303-1A carregando o plasmídeo vazio, mutante *pep4Δ*, e mutante *pep4Δ* com expressão de CatD antes (T0) e após 20h (T20) de privação de azoto.

Quando a fusão de Atg8p-GFP, é endereçada para o vacúolo, GFP é proteoliticamente removida de Atg8p, e enquanto este é rapidamente degradado, a proteína GFP permanece relativamente estável no interior do lúmen do vacúolo. Por conseguinte, o aparecimento de GFP livre pode ser utilizado para monitorizar o nível de indução de autofagia (Alves S., 2014). O peso de GFP sozinho é de 27kDa, sendo que significa que o GFP está sozinho no vacúolo. De acordo com o esperado, observamos o aparecimento da banda correspondente ao GFP na estirpe WT após indução de autofagia, mas não na estirpe *pep4Δ*. A expressão de Pep4p parece reverter

parcialmente este fenótipo, mas não a expressão de CatD. No entanto, como neste plasmídeo a CatD não tinha o epítipo FLAG, não foi possível conformar a sua expressão.

Discussão

E

Perspetivas

Futuras

As catepsinas são uma classe de proteases lisossomais que desempenham papéis importantes na proteólise durante processos fisiológicos. Estas estão alegadamente envolvidas em várias doenças, como o cancro, aterosclerose, artrite e doenças neurodegenerativas, sendo por isso de extrema importância a identificação dos substratos nativos e locais de clivagem das catepsinas de modo a se compreender os seus papéis fisiológicos e patológicos (Sun H. *et al.*, 2013) e deste modo ser possível encontrar um tratamento para estas doenças.

A CatD é a principal protease aspartil lisossomal composta por duas cadeias polipeptídicas unidas por ligações dissulfureto, (Emert-Sedlak L. *et al.*, 2005; Cullen V. *et al.*, 2009), que está amplamente distribuída em células de mamíferos. Devido à sua diferente localização celular, no citoplasma, lisossomas e fagossomas, ou segregada para a ECM, participa em vários processos fisiológicos, incluindo a proliferação de células e está também envolvida na apoptose, senescência e homeostase dos tecidos (Sun H. *et al.*, 2013).

Em células de mamíferos, quando a CatD lisossómica é libertada no citosol, muitas vezes desencadeia uma cascata apoptótica mitocondrial, e por conseguinte a disfunção mitocondrial e libertação de proteínas mitocondriais, sendo o seu efeito pró-apoptótico (Pereira C. *et al.*, 2010; Pereira H. *et al.*, 2013). Por outro lado, a CatD também pode ter efeitos anti-apoptóticos em alguns tipos e contextos celulares específicos, sendo de fato geralmente aceite que a subexpressão de CatD desempenha um papel importante nas células cancerosas (Sousa M.J. *et al.*, 2011; Pereira H. *et al.*, 2013)

Pep4p é essencial no sistema vacuolar proteolítico da *S. cerevisiae*, onde é importante tanto para a degradação de proteínas e para a maturação de várias hidrolases vacuolares (Carmona-Gutiérrez D. *et al.*, 2011). A protease Pep4p pertence à classe de proteases aspárticas pepsina, estando predominantemente localizada no vacúolo de levedura. Esta protease é ortóloga da catepsina D humana (Pereira C. *et al.*, 2010). A sua translocação do vacúolo para o citosol tem sido descrita em células sofrendo apoptose desencadeada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta translocação tem sido associado ao aumento da permeabilidade vacuolar, correlacionando-se com a degradação de nucleoporinas e originando um aumento de permeabilidade do poro nuclear (Spedale G. *et al.*, 2010; Pereira C. *et al.*, 2010; Pereira H. *et al.*, 2013). Recentemente, verificou-se que Pep4p também transloca para o citosol em células a sofrer apoptose induzida por ácido acético, envolvendo uma permeabilização parcial da membrana vacuolar típica da morte apoptótica, em vez de uma extensa permeabilização, típica da morte necrótica. Isto sugere que Pep4p poderia

possuir um papel na morte celular por apoptose semelhante ao da CatD humana, a qual, quando libertada do lisossoma para o citosol desencadeia frequentemente uma cascata apoptótica mitocondrial (Sousa M. J. *et al.*, 2011; Pereira H. *et al.*, 2013). No entanto, verificou-se que a Pep4p possui um papel anti-apoptótico na morte induzida por ácido acético. O objetivo deste trabalho foi avaliar se a CatD possui um papel na morte celular semelhante ao de Pep4p, o seu ortólogo em levedura.

C. Pereira, na sua tese de doutoramento em 2008, afirmava que Pep4p possui um papel de pro-sobrevivência durante a apoptose induzida por ácido acético, o que também se verifica nos resultados aqui apresentados, como pode ser visível na figura 6. Com efeito, na sua ausência, a estirpe mutante apresenta um decréscimo na sobrevivência quando comparada com a estirpe WT. Os resultados aqui obtidos estão de acordo com os obtidos por esta autora como na publicação de Pereira H. *et al.*, 2013. O objetivo deste trabalho prático era descobrir se a CatD possui um papel protetor na morte apoptótica induzida por 120mM de ácido acético, semelhante ao seu ortólogo em levedura Pep4p, bem como compreender o seu papel no referido processo de morte. Deste modo a CatD foi transformada numa estirpe sem o seu ortólogo de modo a ser possível comparar com resultados obtidos com o mesmo. Os resultados obtidos parecem indicar uma reversão inicial parcial pela sobre-expressão de CatD. No entanto, devido a uma variabilidade experimental elevada, não foi possível concluir com certeza acerca deste fenótipo.

Para abordar se este ácido também provocava a libertação de Pep4p vacuolar, Clara Pereira adicionou uma proteína fluorescente, GFP, para seguir a libertação de Pep4p. Com o intuito de esperar a fusão de Pep4p-GFP, encontra-se localizada especificamente no vacúolo em células saudáveis, mas após 60min de tratamento com ácido acético começou a ser observável uma fluorescência extravacuolar em algumas células, indicativa de que Pep4p se encontrava no citosol. Sabe-se que estes dados estão de acordo com dados obtidos em células de mamíferos que indicam uma libertação parcial das catepsinas dos lisossomas na fase inicial da apoptose. Assim, no futuro podemos aplicar esta abordagem nas nossas estirpes e deste modo seguir uma vez mais Pep4p mas também CatD e visualizar para onde, de fato, se desloca quando submetida a tratamento com este ácido fraco.

Células expostas ao *stress* oxidativo acumulam moléculas danificadas que têm de ser reparadas ou removidas antes que o crescimento seja reiniciado, sendo necessário para tal compreender os mecanismos moleculares envolvidos na recuperação após indução do *stress*

oxidativo (Marques M. *et al.*, 2006). Expusemos as nossas células a 1,5mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e analisamos a sua viabilidade celular através da contagem de c.f.u. que foram deixados a crescer durante 2 dias a 30°C, em placas de YPDA. Através da utilização deste indutor comum de apoptose obtivemos uma baixa viabilidade celular para a estirpe WT, maior resistência ao tratamento na estirpe em que Pep4p foi deletado. Já na publicação de Pereira C. *et al.*, 2010 a autora, para células com Pep4p mutado, obteve uma sobrevivência celular semelhante à da estirpe WT quando a morte é induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Serão necessários estudos adicionais e repetir estes ensaios mais vezes para verificar se os resultados continuam os mesmos e diminuir erros associados.

Como é óbvio, os mutantes em Pep4p exibem uma reduzida degradação de proteínas e uma considerável perda de viabilidade sob condições de *stress* nutricional. Portanto, avaliou-se a taxa de sobrevivência de mutantes em Pep4p durante o envelhecimento cronológico, em que os nutrientes vão sendo limitados (Carmona-Gutiérrez D. *et al.*, 2011). No ensaio de envelhecimento cronológico, como seria de esperar a estirpe WT foi a que sobreviveu durante mais tempo, obtendo uma sobrevivência perto dos 60% no dia 1 e não existiu a sua perda de viabilidade durante dos 14 dias que o ensaio durou. Pelo contrário, a estirpe mutante em *PEP4* logo no dia 1 do ensaio já apresenta uma viabilidade celular inferior a 40%, sendo que a mesma ao 6º dia já é praticamente nula, indicando um envelhecimento prematuro como também foi constatado por Marques M. *et al.*, 2006. No entanto, o envelhecimento prematuro não foi significativamente revertido pela expressão de CatD, o que indica que a CatD não complementa o fenótipo da estirpe mutante *pep4Δ*. No entanto, também não foi significativamente revertido pela expressão do próprio Pep4p, indicando que os dois genes não estarão a ser significativamente expressos a partir do plasmídeo pESC/HIS durante o tempo de duração do ensaio.

A senescência prematura exibida pelas células deficientes em *pep4Δ* durante o envelhecimento cronológico pode envolver uma redução na proteólise vacuolar com a consequente redução da reciclagem de proteínas sendo Pep4p importante para degradação das proteínas oxidadas e/ou ativação de outras hidrólases vacuolares e determinando a sobrevivência das células em fase estacionária, reciclando células em jejum de azoto (Marques M. *et al.*, 2006; Carmona-Gutiérrez D. *et al.*, 2011).

Para completar este estudo seria interessante completar o teste de sobrevivência e com a medição de marcadores de morte celular característicos (níveis de ROS, a condensação de cromatina, integridade da membrana plasmática e a exposição de fosfatidilserina na membrana



plasmática externa) bem como monitorizar o teor de *cit c* mitocondrial. Seria também interessante verificar o conteúdo de proteínas carboniladas, verificar a atividade de Pep4p e CatD, bem como verificar se a sobre-expressão contribui para o aumento de longevidade.

Em resumo, neste trabalho foram obtidos alguns resultados que indicam que a CatD humana poderá complementar parcialmente a actividade da proteína Pep4p da levedura, em determinadas condições. No entanto serão necessários estudos complementares que validem esta conclusão.

# BIBLIOGRAFIA

- Appelqvist H., *Lysosomal Membrane Stability and Cathepsins in Cell Death.*, Linköping University Medical Dissertations No. 1325, Linköping, 2012. Disertação de Mestrado.
- Alves S., *Impact of mutated KRAS signalling on autophagy regulation in colorectal carcinoma*, Universidade do Minho, Braga, 2014. Disertação de Doutoramento.
- Azevedo, Carlos. 3ª Edição. Loulé: LIDEL, 1999.
- Azevedo M. M. M., *Sistemas poliméricos de liberação controlada utilizando micro e nanopartículas encapsulando violaceína: caracterização, atividade biológica, consequências e perspectivas.*, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP Instituto de Química – IQ Departamento de Físico-Química; 2005. Disertação de Doutoramento.
- Baldwin T. E., Bhat N. T., Gulnik S., Hosur V. M., Sowdwe II C.R., Cachau E.R., Collins J, Silva M. A., Erickson W.J., *Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D: Implications for lysosomal targeting and drug design.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(14): pp.6796-6800.
- Barrett A. J., Woessner J. F., Rawlings N. D., *Handbook of Proteolytic Enzymes.*, London: Academia Press, 2004. Volume 1, Second Edition.
- Barret A. J., *Classification of peptidases.*, Methods in enzymology, 1994. **244**: pp.1–15.
- Beaujouin M., Liaudet-Coopman E., *Cathepsin D overexpressed by cancer cells can enhance apoptosis-dependent chemo-sensitivity independently of its catalytic activity.*, Adv. Exp. Med. Biol., 2008. **617**: pp.453-461.
- Benes P., Vetvicka V., Fusek M., *Cathepsin D—many functions of one aspartic protease.*, Crit Rev Oncol Hematol., 2008. **68**(1): pp.12-28.
- Bessa D., Pereira F., Moreira R., Johansson B., Queirós O., *Improved gap repair cloning in yeast: treatment of the gapped vector with Taq DNA polymerase avoids vector self-ligation.*, Yeast, 2012. **29**: pp.419–423.
- Bewley M. A., Marriott H. M., Tulone C., Francis S. E., Mitchell T. J., Read R. C., Chain B., Kroemer G., Whyte M.K., Dockrell D.H., *A cardinal role for cathepsin d in co-ordinating the host-mediated apoptosis of macrophages and killing of pneumococci.*, PLoS Pathog. 2011. **7**(1).
- Beynon R. J., Bond J. S., *Proteolytic Enzymes: A practical approach.*, England: Oxford University Press, 1989.

- Burtner C. R., Murakami C. J., Kennedy B. K., Kaeberlein M., *A molecular mechanism of chronological aging in yeast.*, Cell Cycle., 2009. **8**(8): pp.1256-1270.
- Carmona-Gutierrez D., Alavian-Ghavanini A., Habernig L., Bauer M. A., Hammer A., Rossmann C., Zimmermann A. S., Ruckenstuhl C., Büttner S., Eisenberg T., Sattler W., Malle E., Madeo F., *The cell death protease Kex1p is essential for hypochlorite-induced apoptosis in yeast.*, Cell Cycle, 2013. **12**(11): pp.1704–1712.
- Carmona-Gutiérrez D., Bauer M. A., Ring J., Knauer H., Eisenberg T., Büttner S., Ruckenstuhl C., Reisenbichler A., Magnes C., Rechberger G. N., Birner-Gruenberger R., Jungwirth H., Fröhlich K. U., Sinner F., Kroemer G., Madeo F., *The propeptide of yeast cathepsin D inhibits programmed necrosis.*, Cell Death Dis. 2011. **2**.
- Carmona-Gutierrez D., Eisenberg T., Büttner S., Meisinger C., Kroemer G., Madeo F., *Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines.*, Cell Death and Differentiation, 2010. **17**: pp.763–773.
- Cerella C., Coppola S., Maresca V., De Nicola M., Radogna F., Ghibelli L., *Multiple mechanisms for hydrogen peroxide-induced apoptosis.*, Ann N Y Acad. Sci., 2009. **1171**: pp.559-563.
- Clément M. V., Ponton A. , Pervaiz S., *Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu.*, FEBS Lett., 1998. **440**(1-2): pp.13-8.
- Côrte-Real M., Madeo F., *Yeast Programed Cell Death and Aging.*, Frontiers in Oncology, 2013. **3**:283.
- Cullen V., Lindfors M., G., Paetau A., Swinton E., Kolodziej P., Boston H., Saftig P., Woulfe J., Feany M. B., Myllykangas L., Schlossmacher M. G., Tynnelä J., *Cathepsin D expression level affects alpha-synuclein processing, aggregation, and toxicity in vivo.*, Molecular Brain, 2009. **2**:5.
- Deiss P. L., Galinka H, Berissi H., Cohen O., Kimchi A., *Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF- $\alpha$ .*, EMBO J., 1996. **15**(15): pp.3861–3870.
- Emert-Sedlak L., Shangary S., Rabinovitz A., Miranda M. B., Delach S. M., Johnson D. E., *Involvement of cathepsin D in chemotherapy-induced cytochrome c release, caspase activation, and cell death.*, Mol Cancer Ther., 2005. **4**(5): pp.733-742.

- Faust L. P., Kornfeld S., John M., *Cloning and sequence analysis of cDNA for human cathepsin D.*, Proc Natl Acad Sci U S A., 1985. **82**(15): pp.4910-4914.
- Garcia M., Platet N., Liaudet E., Laurent V., Derocq D, Brouillet J. P., Rochefort H., *Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis.*, Stem Cells, 1996. **14**(6): pp.642-50.
- Gałgańska H., Karachitos A., Baranek M., Budzińska M., Jordán J., Kmita H., *Viability of Saccharomyces cerevisiae cells following exposure to H2O2 and protective effect of minocycline depend on the presence of VDAC.*, Eur J Pharmacol, 2010. **643**(1): pp.42-47.
- Gross A., Jockel J. R, Pilcher K., Bassik C. M., Blachly-Dyson E., Korsmeyer J. S., Basso E., Forte M., *Biochemical and Genetic Analysis of the Mitochondrial Response of Yeast to BAX and BCL-XL.*, Molecular and Cellular Biology, 2000. **20**(9): pp.3125–3136.
- Handem S. A., *Inibidores de Proteinases Aspárticas com Atividade Antimicrobiana.*, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013. Dissertação de Mestrado
- Hauptmann P., Lehle L., *Glycobiology and Extracellular Matrices: Kex1 Protease Is Involved in Yeast Cell Death Induced by Defective N-Glycosylation, Acetic Acid, and Chronological Aging.*, The Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(27): pp.19151–19163.
- Heinrich M., Wickel M, Schneider-Brachert W., Sandberg C., Gahr J., Schwandner R., Weber T., Saftig P., Peters C, Brunner J, Krönke M, Schütze S., *Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide.*, EMBO J., 1999., **18**(19): pp.5252-5263.
- Kitagaki H., Araki Y., Funato K., Shimoi H., *Ethanol-induced death in yeast exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway.*, FEBS Lett, 2010. **581**(16): pp.2935-2942.
- James D. I., Parone P. A., Mattenberger Y., Martinou J. C., *hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery.*, J. Biol. Chem., 2003. **278**(8): pp.36373–36379.
- Jourdain A., Martinou J. C., *Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis.*, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2009. **41**(10): pp.1884–1889.
- Laurent-Matha V., Huesgen P. F., Masson O., Derocq D., Prébois C., Gary-Bobo M., Lecaille F., Rebière B., Meurice G., Oréar C., Hollingsworth R. E., Abrahamson M., Lalmanach G., Overall C. M., Liaudet-Coopman E., *Proteolysis of cystatin C by cathepsin D in the breast cancer microenvironment.*, FASEB J., 2012. **26**(12): pp.5172-5181.

- Laurent-Matha V., Maruani-Herrmann S., Prébois C., Beaujouin M., Glondu M., Noël A., Alvarez-Gonzalez M. L., Blacher S., Coopman P., Baghdiguian S., Gilles C., Loncarek J., G., Vignon F., Emmanuelle Liaudet-Coopman E., *Catalytically inactive human cathepsin D triggers fibroblast invasive growth.*, J Cell Biol., 2005. **168**(3): pp.489-499.
- Liang Q., Li W., Zhou B., *Caspase-independent apoptosis in yeast.*, Biochim Biophys Acta., 2008. **1783**(7): pp.1311-1319.
- Liaudet-Coopman E., Beaujouin M., Derocq D., Garcia M., Glondu-Lassis M., Laurent-Matha V., Prébois C., Rochefort H., Vignon F., *Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis.*, Cancer Lett., 2006. **237**(2): pp.1617-79.
- Liu Y., Chen X. J., *Adenine nucleotide translocase, mitochondrial stress, and degenerative cell death.*, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2013. **2013**: pp.10.
- Ludovico L., Rodrigues F., Almeida A., Silva M. T., Barrientos A., Côrte-Real M., *Cytochrome c Release and Mitochondria Involvement in Programmed Cell Death Induced by Acetic Acid in Saccharomyces cerevisiae.*, Molecular Biology of the Cell, 2002. **13**: pp.2598–2606.
- Madeo F., Fröhlich E., Ligr M., Grey M., Sigrist S. J., Wolf D. H., Fröhlich K. U., *Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast.*, J Cell Biol. 1999. **145**(4): pp.757-767.
- Marques C. A., *Study the response to acetate in colorectal carcinoma cells harbouring different genetic background: the role of the lysosome*, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2010. Dissertação de Mestrado.
- Marques C., Oliveira C. S. F., Alves S., Chaves S. R., Coutinho O. P., Côrte-Real M., Preto A., *Acetate-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells involves lysosomal membrane permeabilization and cathepsin D release.*, Cell Death and Disease, 2013. **4**.
- Marques M., Mojzita D., Amorim M. A., Almeida T., Hohmann S., Moradas-Ferreira P., Costa V., *The Pep4p vacuolar proteinase contributes to the turnover of oxidized proteins but PEP4 overexpression is not sufficient to increase chronological lifespan in Saccharomyces cerevisiae.*, Microbiology, 2006. **152**(Pt 12): pp.3595-3605.
- Mason D. A., Shulga N., Undavai S., Ferrando-May E., Rexach F. M., Goldfarb S. D., *Increased nuclear envelope permeability and Pep4p-dependent degradation of nucleoporins during hydrogen peroxide-induced cell death.*, FEMS Yeast Research, 2005. **5**(12): pp.1237–1251.

- Masson O., Breast cancer and tumoral micro-environment : *Role of the cathepsin-D protease and its LRP1 receptor in adipocytes.*, Université Montpellier I – UFR Médecine, 2009. Disertação de Doutoramento.
- Masson O., Bach A. S., Derocq D., Prébois D., Laurent-Matha V., Pattingre S., Liaudet-Coopman E., *Pathophysiological functions of cathepsin D: Targeting its catalytic activity versus its protein binding activity ?.*, Biochimie, 2010. **92**(11): pp.1635–1643.
- Mroczek S., Kufel J., *Apoptotic signals induce specific degradation of ribosomal RNA in yeast.*, Nucleic Acids Research, 2008. **36**(9): p.2874-2888.
- Nolte, J. *The Human Brain: An Introduction to its Functional Anatomy.*, Elsevier Health Sciences, 2008. 6th edition
- Paciello L., Alteriis E., Mazzone C., Palermo V., Zucchi J., Parascandola P., *Performance of the auxotrophic Saccharomyces cerevisiae BY4741 as host for the production of IL-1 $\beta$  in aerated fed-batch reactor: role of ACA supplementation, strain viability, and maintenance energy.*, Microbial Cell Factories, 2009. **8**:70.
- Pereira C., Salin B., Manon S., Chaves S., Alves S., Camougrand N., Sousa J. M., Côrte-Real M., *Mitochondrial degradation in acetic acid-induced yeast apoptosis: the role of Pep4 and the ADP/ATP carrier.*, Molecular Microbiology, 2010. **76**(6): pp.1398–1410.
- Pereira C., Silva R. D., Saraiva L., Johansson B., Sousa J. M., Côrte-Real M., *Mitochondria-dependent apoptosis in yeast.*, Biochimica et Biophysica Acta, 2008. **1783**(7): pp.1286–1302.
- Pereira H., Azevedo F., Rego A., Sousa M. J., Chaves S. R., Côrte-Real M., *The protective role of yeast cathepsin D in acetic acid-induced apoptosis depends on ANT (Aac2p) but not on the voltage-dependent channel (Por1p).*, FEBS Lett., 2013. **587**(2): pp.200-205.
- Qiao L., Hamamichi S., Caldwell K. A., Caldwell G. A., Yacoubian T. A., Wilson S., Xie Z. L., Speake L. D., Parks R., Crabtree D., Liang Q., Crimmins S., Schneider L., Uchiyama Y., Iwatsubo T., Zhou Y., Peng L., Lu Y., Standaert G. D., Walls K. C., Shacka J. J., Roth K. A., Zhang J., *Lysosomal enzyme cathepsin D protects against alpha-synuclein aggregation and toxicity.*, Molecular Brain, 2008. **1**:17.
- Rao M. B., Aparna M. Tanksale, Mohini S. Ghatge, Deshpande V. V., *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases.*, Microbiol Mol Biol Rev., 1998. **62**(3): pp.597-635.

- Repnik U., Turk B., *Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death*, Mitochondrion., 2010. **10**(6): pp.662-669.
- Ribeiro F. G., Côrte-Real M., Johansson B., *Characterization of DNA Damage in Yeast Apoptosis Induced by Hydrogen Peroxide, Acetic Acid, and Hyperosmotic Shock.*, Molecular Biology of the Cell, 2006. **17**(10): pp.4584-4591.
- Sajid M., McKerrow J. H., *Molecular and Biochemical Parasitology*, Elsevier, 2002. **120**(1), pp. 1-21.
- Siintola E., Partanen S., Lehesjoki E. A., Strömme P., Tyynela J., Haapanen A., Haltia M., Maehlen J., *Cathepsin D deficiency underlies congenital human neuronal ceroid-lipofuscinosis.*, Brain, 2006. **129**; pp.1438-1445.
- Singh M., Sharma H., Singh N., *Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway.*, Mitochondrion, 2007. **7**(6): pp.367-373.
- Sousa M. R., *Identification of genes involved in the regulation of acetic acid-induced programmed cell death.*, Universidade do Minho, Braga, 2012. Dissertação de Mestrado
- Sousa M., Duarte A. M., Fernandes T. R., Chaves S. R., Pacheco A., Leão C., Côrte-Real M., Sousa M. J., *Genome-wide identification of genes involved in the positive and negative regulation of acetic acid-induced programmed cell death in Saccharomyces cerevisiae.*, BMC Genomics, 2013. **14**:838.
- Sousa M. J., Azevedo F., Pedras A., Marques A., Coutinho P. O., Preto A., Herós H., Chaves S. R., Côrte-Real M., *Vacuole – mitochondrial cross- talk during apoptosis in yeast: a model for understanding lysosomal – mitochondrial – mediated apoptosis in a mammals.*, Biochen Soa Trans, 2011. **39**(5): pp.1533-1537.
- Sousa M. J., Ludovico P., Rodrigues F., Leão C., Côrte-Real M., *Stress and Cell Death in Yeast Induced by Acetic Acid.*, *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology » Cell Metabolism- Cell Homeostasis and Stress Response*, INTECH, 2012. Capítulo 4.
- Spedale G., Mischerikow N., Heck A. J., Timmers H. T., Pijnappel W. W., *Identification of Pep4p as the protease responsible for formation of the SAGA-related SLIK protein complex.*, J. Biol. Chem., 2010. **285**(30): pp.22793-22799
- Sukhanova E. I., Rogov A. G., Severin F. F., Zvyagilskaya R. A., *Phenoptosis in yeasts.*, Biochemistry (Mosc.), 2012. **77**(7): pp.761-775.



- Sun H., Lou X., Shan Q., Zhang J., Zhu X., Zhang J., Wang Y., Xie Y., Xu N., Liu S., *Proteolytic characteristics of cathepsin D related to the recognition and cleavage of its target proteins.*, PLoS One., 2013. **8**(6).
- Vickers I., Reeves E. P., Kavanagh K. A., Doyle S., *Isolation, activity and immunological characterisation of a secreted aspartic protease, CtsD, from Aspergillus fumigatus.*, Protein Expr Purif. 2007. **53**(1): pp.216-224.
- Yin L., Stearns R., González-Flecha B., *Lysosomal and mitochondrial pathways in H2O2-induced apoptosis of alveolar type II cells.*, J Cell Biochem., 2005. **94**(3): pp.433-445.
- Weinberger M., Ramachandran L., Burhans W. C., *Apoptosis in Yeasts.*, IUBMB Life, 2003. **55**(8): pp.467–472.
- Wong R. S. Y., *Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment.*, Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2011. **30**:87.