

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
18650
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

23600

**O papel do metabolismo de ferro no estresse oxidativo
em *Saccharomyces cerevisiae***

Jeanne Maria de Freitas

Tese de doutoramento apresentada ao
Departamento de Bioquímica do
Instituto de Química da Universidade
de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Meneghini

SÃO PAULO

1999

“O Papel do Metabolismo de Ferro no Estresse Oxidativo em *Saccharomyces cerevisiae*”.

JEANE MARIA DE FREITAS

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Prof. Dr. ROGÉRIO MENEGHINI
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. FRANCISCO GORGÔNIO DA NÓBREGA
UNIVAP

Prof. Dr. FRANCISCO LAURINDO
INCOR

Profa. Dra. BEATRIZ AMARAL DE CASTILHO
UNIFESP

Prof. Dr. LUIS SOARES NETTO
IB - USP

SÃO PAULO
26 DE JULHO DE 1999.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rogério Meneghini por me conceder espaço e condições de trabalho em seu laboratório na Universidade de São Paulo (USP). Pela orientação e por todas as discussões científicas.

À Profa. Dra. Joan Selverstrone Valentine por ter me concedido o privilégio de trabalhar em seu laboratório na Universidade da Califórnia (UCLA) por um ano. Pelas brilhantes discussões científicas.

À Dra. Edith Butler Gralla pela orientação e discussões científicas na UCLA.

Aos colegas de laboratório na USP: Clélia Rejane, Sônia Gurgueira, Helotônio Carvalho, Raquel Teixeira, Henrique Teixeira, Mara Benfato, Caio Wendel, Melissa Fessel, Kátia Pastre e mais recentemente ao Nilson Zanchin, Gabriela Couto e a Profa. Carla Oliveira por todas as discussões científicas, pela colaboração e companheirismo.

Aos colegas de laboratório na UCLA: Thomas Lyons, Lee-Loung Liu, Amir Liba, Joy Goto, Erick Shipp, Aram Nessessian, Claudia Lefeber, Vanessa Moi, Hong Bin e Marian, também, pelas discussões científicas, colaboração e companheirismo.

À Maria do Céu Moraes e Irenice Cairo por toda colaboração para o desenvolvimento deste trabalho, pela amizade e companheirismo.

Aos Profs. Dr. Pedro Araújo, Paolo Di Mascio e Ronaldo Quaggio pelas críticas e sugestões feitas a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Ivan Schumacher pelo apoio e utilização do aparelho de FACS (Fluorescence-activated cell sorting).

A todos os professores do Departamento de Bioquímica com os quais eu pude interagir. Agradeço pelas contribuições e discussões.

A todos os funcionários do Instituto de Química pelas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

A Capes, CNPq, FAPESP e NIH pela concessão das bolsas e financiamento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani e Dra. Luisa Lina Villa pelas amplas discussões e questionamentos científicos no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer.

Aos amigos: Ana Cantisani, Margareth Capurro, Eduardo Reis, Sérgio Brochstein, Glaucia Sousa, Cíntia Rocha, Andreas Gombert, Manoel Gomes, Patrícia Brant, Juliana Santos, Raquel Manduca, Clélia Rejane, Sônia Gurgueira, Aline Silva, Lilian Etechebehere, Marilene Demasi e Marcelo Pazos pelas discussões científicas e não científicas nos almoços e nos jantares.

Aos meus queridos pais: Geraldine e Lourenço, e irmãos: Silvia, Rogério, Ana, Carla e Luciana por todo o estímulo, pelo amor e harmonia...

Aos queridos amigos Fernando, Mariana, Júlio e Tônia
Frochtengarten pelo estímulo e afeto da família.

Aos queridos amigos e companheiros Fátima, Silvana, Ana e João
pelo estímulo e carinho.

To Thomas for everything...

ÍNDICE

RESUMO	i
ABREVIATURAS	ii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Espécies reativas de oxigênio, metais e estresse oxidativo	1
1.2. A importância da superóxido dismutase na defesa contra radicais livres de oxigênio	8
1.3. O papel dos metais de transição na desintoxicação celular contra radicais livres de oxigênio	12
1.4. O metabolismo acoplado de Fe e Cu em células de <i>S. cerevisiae</i>	14
2. MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1. Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
2.2. Plasmídeos	21
2.3. Meios de cultura	22
2.4. Cultivo de células de levedura	23
2.5. Transformação de células de levedura	25
2.6. Construção de mutantes deficientes em Fet3 oxidase	26
2.6.1. Extração de DNA de células de levedura	27
2.6.2. Quantificação de DNA	28
2.6.3. Southern Blot	28
2.6.4. Marcação radioativa da sonda utilizada no <i>Southern blot</i>	29
2.7. Obtenção de linhagens expressando o gene da β -galactosidase sob o controle do promotor do gene <i>FET3</i>	30
2.7.1. Determinação da atividade de β -galactosidase	30
2.8. Construção de linhagens que superexpressam <i>SOD</i>	31
2.9. Ensaio de proteção por S1 nuclease	32
2.9.1. Extração de RNA total de levedura	34
2.10. Dosagem de superóxido dismutase	35
2.10.1. Extração de proteínas	36
2.10.2. Dosagem de proteínas	37
2.11. Análise de conteúdo intracelular de metal por espectroscopia de plasma acoplado	37
2.12. Análise de conteúdo intracelular de metal através da dosagem de ^{55}Fe incorporado durante o crescimento	38
2.13. Ensaio de captação de ferro na membrana citoplasmática	39
2.14. Consumo de oxigênio em culturas de levedura	40
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1. Construção de mutantes deficientes em superóxido dismutase e Fet3 oxidase em <i>S. cerevisiae</i>	41
3.1.1. Análise da interrupção do gene <i>FET3</i> por <i>Southern blot</i>	44
3.1.2. Os mutantes <i>sod1</i> Δ <i>fet3</i> Δ não apresentam reversão nos fenótipos ligados à mutação <i>sod1</i> -... ..	46

3.1.3. Suplementação de íons de ferro no meio YPG recupera o crescimento respiratório dos mutantes <i>sod1Δ</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
3.1.4. – Os mutantes <i>sod1Δ</i> apresentam níveis intracelulares de ferro idênticos aos das células selvagens quando crescem por metabolismo respiratório.....	53
3.1.5. Ferro induz crescimento nos mutantes <i>sod1Δ</i>	57
3.1.6. – Os mutantes <i>sod1Δ</i> apresentam aumento dos níveis intracelulares de ferro e zinco quando crescem em SD.	59
3.1.7. – Os mutantes <i>sod1Δ</i> apresentam aumento dos níveis de transcrição do gene <i>FET3</i> e da atividade de Fet3p.	65
3.1.8. – Os mutantes <i>sod1Δ/fet3Δ</i> apresentam aumento dos níveis de transcrição do gene <i>FET4</i>	71
3.1.9. – Os mutantes <i>sod1Δ/coq3Δ</i> apresentam níveis aumentados de transporte de ferro durante todo o crescimento.....	74
3.1.10. - Células superexpressando Cu,Zn-SOD e Mn-SOD apresentam conteúdo de Fe, Cu, Mn e Zn semelhantes aos das células selvagens.....	77
4. DISCUSSÃO GERAL.....	81
5. SUMMARY.....	86
6. BIBLIOGRAFIA.....	87
7. CURRICULUM VITAE.....	101

RESUMO

A superóxido dismutase (*SOD*) tem um papel protetor contra toxicidade do oxigênio por remover radicais superóxido (O_2^-) através da sua dismutação para H_2O_2 e O_2 . Células de levedura apresentam duas *SODs* intracelulares, uma contendo Cu e Zn e outra Mn em seus sítios ativos. Linhagens de *S. cerevisiae* deficientes em *Cu,Zn-SOD* apresentam uma série de defeitos metabólicos associados ao aumento dos níveis intracelulares de O_2^- . O principal dano causado pelo radical O_2^- é a remoção de ferro de grupos prostéticos (*clusters Fe-S*) de enzimas. Nessa reação, o O_2^- oxida um dos ferros dos *cluster Fe-S* levando a desestruturação dos mesmos, inativação reversível de enzimas e liberação de Fe(II) e H_2O_2 , que participam da formação de radicais hidroxila (*OH) na reação de Fenton. O radical *OH é bastante reativo e pode lesar proteínas, lipídeos e DNA. Neste trabalho, nós observamos que células de levedura deficientes em *Cu,Zn-SOD* apresentam metabolismo de ferro alterado. Nossos resultados mostram: a) Aumento do conteúdo intracelular total de Fe nos mutantes *sod1Δ*; b) Aumento dos níveis de transcrição do gene *FET3*, responsável pelo transporte de ferro de alta afinidade na membrana plasmática, nesses mutantes; c) Aumento do transporte de ferro na membrana plasmática nos mutantes *sod1Δ*. Esta é a primeira evidência de alteração em metabolismo de ferro em células deficientes em *SOD*. Nós estamos propondo que os mutantes *sod1Δ* adquirem a capacidade de captar níveis mais altos de íons de ferro para reconstituir *cluster Fe-S* e consequentemente reativar enzimas.

ABREVIATURAS

clusters Fe-S - grupos prostéticos de diferentes enzimas contendo 4 íons de ferro ligados a 4 enxofres

CMD – gene que codifica para a calmodulina

COQ3 - gene que codifica para a Coenzima Q da cadeia respiratória

coq3Δ - mutantes deficientes em Coenzima Q

CTR1 - gene que codifica para a proteína Ctr1p

Cu/Zn-SOD - Cu/Zn-superóxido dismutase

DNA - ácido desoxirribonucléico (*deoxiribonucleic acid*)

DTT - ditioneitol

EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético

Fe-SOD - Fe-superóxido dismutase

FET3 - gene que codifica para a proteína Fet3 oxidase ou Fet3p

Fet3p - proteína responsável pelo transporte de ferro de alta afinidade na membrana plasmática

FET4 - gene que codifica para a proteína Fet4p

Fet4p - proteína responsável pelo transporte de ferro de baixa afinidade na membrana plasmática

fet3Δ - mutantes deficientes em Fet3 oxidase

fet4Δ - mutantes deficientes em Fet4p

HIS3 – gene que codifica para imidazolglicerol-fosfato desidrogenase

IRE - região no mRNA do receptor de transferrina e de outros mRNAs onde se liga a proteína IRP (*iron responsive element*)

IRP1 - proteína reguladora de ferro (*Iron regulatory protein*)

kb – kilobase

LIM – meio carenciado em ferro (*limited iron media*)
Mn-SOD - Mn-superóxido dismutase
OD – densidade óptica (*optical density*)
RNA - ácido ribonucléico (*ribonucleic acid*)
ROS – radicais livres de oxigênio (*reactive oxygen species*)
SD – meio mínimo sintético/glicose (*synthetic dextrose media*)
SDS – dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)
SOD - superóxido dismutase (*superoxide dismutase*)
SOD1 – gene que codifica para Cu/Zn-SOD
SOD2 - gene que codifica para Mn-SOD
*sod1*Δ - mutantes deficientes em Cu/Zn-SOD
*sod2*Δ - mutantes deficientes em Mn-SOD
*sod1*Δ/*fet3*Δ - mutantes deficientes em Cu/Zn-SOD e em Fet3p
*sod1*Δ/*coq3*Δ - mutantes deficientes em Cu/Zn-SOD e em coenzima Q
Tris - tris[hidroximetil]aminometano
TE – Tampão tris-EDTA
TAE – Tampão tris-acetato-EDTA
TBE – Tampão tris-borato-EDTA
YPD – meio rico/glicose (*yeast extract, peptone and dextrose*)
YPG – meio rico/glicerol (*yeast extract, peptone and glycerol*)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Espécies reativas de oxigênio, metais e estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio são produzidas normalmente nas células e organismos como consequência de processos metabólicos (Fridovich, 1984; Halliwell & Gutteridge, 1984). O aumento do nível dessas moléculas reativas pode causar situações de estresse celular, conhecidas como estresse oxidativo, que resultam numa série de danos e modificações nas células e organismos (Wolff *et al.*, 1986; Berlett & Stadtman, 1997; Henle & Linn, 1997; Valentine *et al.*, 1998).

A citotoxicidade causada pelas espécies reativas de oxigênio é bioquimicamente abrangente. Há evidências de que uma série de eventos diretos e indiretos, envolvendo o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), ocorrem em células em situações de estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 1984; Liochev & Fridovich, 1994).

Na natureza, o oxigênio molecular é um excelente receptor de elétrons. O radical superóxido (O_2^-), por exemplo, é produto da redução monoelétrica do oxigênio. Uma série de reações intracelulares são conhecidas como geradoras de O_2^- (Fridovich, 1984; Halliwell & Gutteridge, 1984). Em organismos aeróbicos, como *S. cerevisiae*, a

transferência de um único elétron para a molécula de oxigênio ocorre frequentemente, na mitocôndria, na cadeia de transporte de elétrons pelo citocromo bc1 (complexo III - QH₂:citocromo c) e NADH desidrogenase (complexo I) (Gralla, 1997) (**Figura 1**).

A transferência de um segundo elétron para o radical superóxido implica na formação do peróxido de hidrogênio seja através da dismutação do O₂⁻, catalizada pela enzima superóxido dismutase, ou mesmo através da reação entre O₂⁻ e metais de transição (Liochev & Fridovich, 1994).

Produção de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria

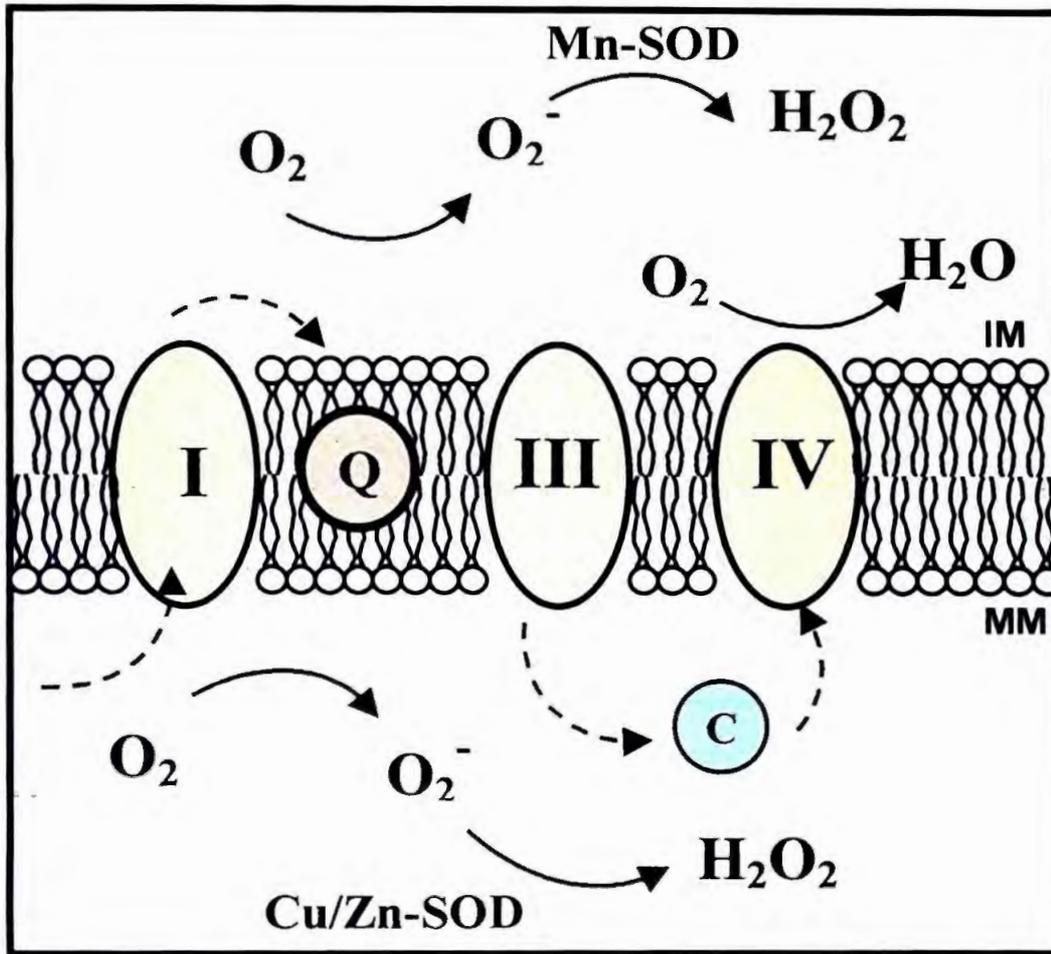
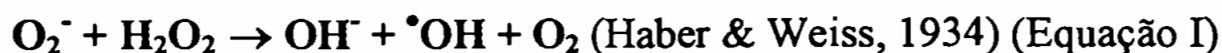


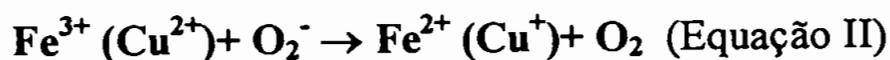
Figura 1 – Representação esquemática da principal fonte geradora de superóxido e peróxido de hidrogênio. Na cadeia de transporte de elétrons acredita-se que a produção de ROS ocorra nas duas faces da membrana interna da mitocôndria. Na cadeia de transporte de elétrons, o complexo I representa a NADH desidrogenase; o complexo III, a coenzima Q: citocromo c oxidase; e IV, citocromo oxidase. Q = coenzima Q; C = citocromo c. A *Mn-SOD* é encontrada no interior da mitocôndria (IM). Há evidências de que a *Cu/Zn-SOD* seja encontrada na matriz mitocondrial (MM) (Gralla, 1997).

A reatividade do radical superóxido com moléculas orgânicas é bastante discutida (Fridovich, 1978; Liochev & Fridovich, 1994, Fridovich, 1997). Tem sido aceito que o radical O_2^- não é a causa direta dos efeitos oxidativos, mas seria um precursor para oxidantes relativamente potentes, como o radical $\cdot OH$, a partir da reação de Haber & Weiss:

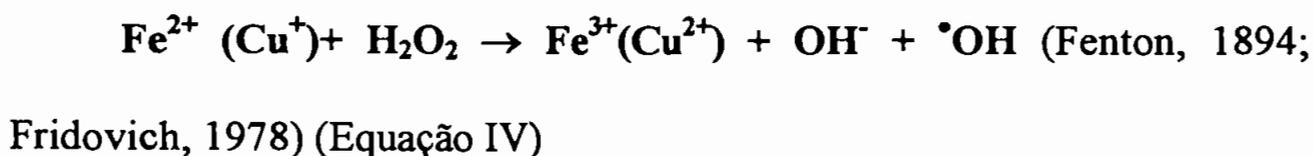


No entanto, a reação direta entre O_2^- e H_2O_2 é um processo extremamente lento (Halliwell & Gutteridge, 1984).

Um caminho mais favorável à formação de radicais $\cdot OH$ envolve metais de transição, ferro ou cobre, como componentes catalíticos. Ferro e cobre podem ser reduzidos (Equação II) ou oxidados (Equação III) por superóxido.



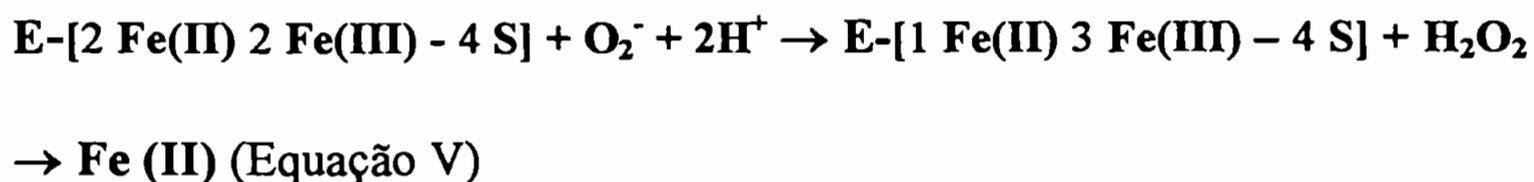
Quando ferro e cobre são reduzidos a Fe^{2+} e Cu^+ , esses metais podem reagir com H_2O_2 numa constante de velocidade relativamente alta, na reação de Fenton, descrita abaixo, e dessa forma geram radicais hidroxila:



De fato, evidências mostram que os radicais hidroxila podem lesar diretamente o DNA, causando fragmentação de açúcares, oxidação de bases nitrogenadas e quebras no DNA (Mello-Filho *et al.*, 1984; Hageman *et al.*, 1992; Bertoncini & Meneghini, 1995; Nascimento & Meneghini, 1995; Teixeira & Meneghini, 1996). Assim, tem sido aceito que a natureza dos efeitos genotóxicos em células em condições de estresse oxidativo é dada principalmente pelo radical $\cdot\text{OH}$.

Todavia, é importante enfatizar que o radical superóxido pode atuar como oxidante sobre componentes intracelulares, como por exemplo, na Equação III, descrita anteriormente, na qual superóxido oxida Fe^{2+} a Fe^{3+} . Seguindo este princípio, uma série de evidências mostram que O_2^- remove ferro de grupos prostéticos de enzimas contendo quatro íons de ferro [2Fe(II) e 2Fe(III)] ligados a quatro enxofres, os chamados *clusters Fe-S* (Flint *et al.*, 1993).

O superóxido oxida um dos ferros dos *clusters Fe-S* e os *clusters* oxidados perdem um dos ferros desestruturando, assim, os *clusters Fe-S* e conseqüentemente causando a inativação reversível das enzimas que contêm esse grupo prostético (Equação V) (Liochev & Fridovich, 1994). O mecanismo bioquímico pelo qual os *clusters Fe-S* são desestruturados ainda não está completamente estabelecido, mas acredita-se que os íons de Fe (III) estejam ligados mais fortemente aos enxofres e o primeiro íon de ferro a se desligar do *clusters Fe-S* seria o Fe (II).



Uma série de enzimas apresentam *clusters Fe-S*, incluindo enzimas do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória (Kuo *et al.*, 1987; Gardner & Fridovich, 1991; Flint *et al.*, 1993, Gardner *et al.*, 1995; Murakami & Yoshino, 1997).

Na reação acima, o radical superóxido além de promover inativação reversível de enzimas contendo *clusters Fe-S*, produz H₂O₂ e libera Fe (II) (Liochev & Fridovich, 1994). Desse modo, o radical superóxido favorece fortemente a formação de radicais [•]OH, por gerar os substratos da reação de Fenton, H₂O₂ e Fe (II). A constante de reação com que o radical O₂⁻ ataca

os *clusters Fe-S* tem sido estimada entre 10^8 a 10^9 $M^{-1}s^{-1}$ (Kuo *et al.*, 1987; Gardner & Fridovich, 1991; Flint *et al.*, 1993).

De fato, dados de literatura mostram que células de *E. coli* mutantes, deficientes nos genes da *Fe-SOD* e *Mn-SOD*, apresentam um aumento nos níveis de lesões oxidativas no DNA, provavelmente devido ao aumento dos níveis de ferro “livre” intracelularmente (Keyer & Imlay, 1996). Além disso, essas células apresentam diminuição da atividade de enzimas contendo *clusters Fe-S*, como por exemplo, a aconitase, fumarase e desidratase (Benov & Fridovich, 1998).

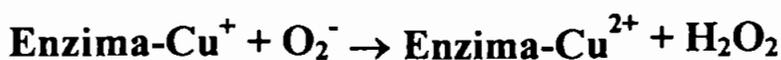
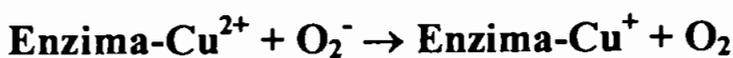
Assim, seguramente o radical O_2^- é um agente de extrema importância na toxicidade em condições de estresse oxidativo.

1.2. A importância da superóxido dismutase na defesa contra radicais livres de oxigênio

A superóxido dismutase (*SOD*) tem um papel protetor contra a toxicidade do oxigênio por manter os níveis do radical superóxido baixos (Fridovich, 1995, 1997).

Leveduras e células de mamíferos contêm duas *SODs* intracelulares, uma delas apresenta manganês e a outra cobre e zinco em seus sítios ativos. A *Mn-SOD* é localizada na matriz mitocondrial, enquanto a *Cu/Zn-SOD* é encontrada no citoplasma, núcleo, lisossomos e peroxissomos (Gralla, 1997). Células de *E. coli* apresentam a *Mn-SOD* e uma *SOD* contendo ferro em seu sítio ativo, a *Fe-SOD* (Fridovich, 1995).

A presença de metais de transição na superóxido dismutase determina a função antioxidante dessa enzima. No caso da *Cu,Zn-SOD*, o zinco é importante na estabilização do sítio ativo, mas o cobre é responsável pela dismutação do radical superóxido (vide esquema abaixo) (Lyons *et al.*, 1996). O mesmo princípio é aplicado no caso da *Mn-SOD* e *Fe-SOD*.



Mutações no gene da Cu/Zn-superóxido dismutase, em humanos, são a causa de 20% dos casos da doença esclerose lateral amiotrófica (*Amiotrophic Lateral Sclerosis – ALS*) (Wiedau-Pazos *et al.*, 1996). Tem sido demonstrado que as proteínas mutantes podem participar da formação de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) ao reagirem com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Yim *et al.*, 1996).

Em *S. cerevisiae* os genes *SOD1* (codifica *Cu/Zn-SOD*) e *SOD2* (*Mn-SOD*) não são essenciais, uma vez que células mutantes apresentando interrupção em um dos genes (*sod1Δ* ou *sod2Δ*) ou em ambos genes são viáveis. No entanto, tem sido observado que os mutantes *sod1Δ* exibem uma série de defeitos metabólicos, e facilmente desenvolvem mecanismos que suprimem esses defeitos genéticos (Gralla, 1997).

Mutantes *sod1Δ* apresentam um crescimento lento em aerobiose, sensibilidade a oxigênio molecular, aumento das taxas de mutações espontâneas, perda rápida da viabilidade na fase estacionária de crescimento, deficiência no crescimento sob metabolismo respiratório e são incapazes de sintetizar lisina, metionina ou cisteína quando crescem em aerobiose (Chang & Kosman, 1990; Gralla & Valentine, 1991; Liu *et al.*, 1992; Longo *et al.*, 1996). Os mutantes *sod2Δ* apresentam fenótipos menos dramáticos, crescem normalmente em aerobiose, apesar de serem sensíveis

a 100% de oxigênio (van Loon *et al.*, 1986). Como esperado, o duplo mutante *sod1Δ/sod2Δ* apresenta a soma dos fenótipos *sod1Δ* e *sod2Δ*.

Supressores genéticos da mutação *sod1Δ* em *S. cerevisiae* têm sido identificados e em grande parte são genes relacionados com metabolismo intracelular de metais de transição. Os supressores foram selecionados com base na reversão dos fenótipos apresentados pelos mutantes *sod1Δ* ou duplos mutantes *sod1Δ/sod2Δ*. O primeiro supressor genético da mutação *sod1Δ* identificado, o gene *PMR1*, codifica para uma ATPase de retículo endoplasmático que transporta íons de cálcio e manganês para o interior do retículo (Tamai *et al.*, 1993; Lapinskas *et al.*, 1995). Neste trabalho, os autores mostraram que mutação no gene *PMR1* leva ao acúmulo de íons de Mn no citoplasma dos mutantes *sod1Δ*.

Um outro supressor genético da mutação *sod1Δ*, o gene *BSD2*, codifica uma proteína de função desconhecida que supostamente participa do transporte intracelular de cobre (Liu & Culotta, 1994; Liu *et al.*, 1997). A mutação *bsd2Δ* leva ao aumento dos níveis intracelulares de cobre.

Mutantes de *S. cerevisiae* nos genes mitocondriais, *COQ3* e *ATP2*, também são considerados supressores da mutação *sod1Δ*, uma vez que apresentam níveis baixos de produção de radicais superóxido (Longo *et al.*, 1996).

Alguns genes quando superexpressos também suprimem defeitos relacionados à mutação *sod1Δ*, como é o caso do gene *CUPI* (codifica para metalotioneína) e *ATX1* (codifica uma proteína de função desconhecida que liga-se a cobre) (Tamai *et al.*, 1993; Lin & Culotta, 1995). Ambos genes codificam proteínas envolvidas no metabolismo intracelular de cobre e os autores acreditam que a superexpressão dessas Cu^{2+} -proteínas determinaria uma atividade de superóxido dismutase.

Um trabalho recente da literatura identifica três novos genes supressores da mutação *sod1Δ* que estão relacionados com o funcionamento da cadeia de transporte de elétrons. Dois dos supressores identificados são genes envolvidos no enovelamento de citocromos, os genes *SSQ1* e *JAC1*, também denominados *HSP70* e *HSP20*. O outro gene identificado, o *NFS1*, é responsável pela montagem dos *clusters Fe-S* em levedura (Strain *et al.*, 1998). Os autores argumentam que mutação nesses genes levaria a diminuição da produção de O_2^- devido a perda de função dos citocromos.

1.3. O papel dos metais de transição na desintoxicação celular de radicais livres de oxigênio

Os supressores da mutação *sod1Δ* descritos anteriormente são genes envolvidos na eliminação da geração do radical O_2^- , como é o caso de mutações em *COQ3*, *ATP2*, *SSQ1*, *JAC1* e *NFS1* ou genes que de alguma forma proporcionam a eliminação do radical O_2^- , seja através da elevação dos níveis de manganês e cobre, como é o caso de mutações em *PMR1*, *BSD2* ou através da superexpressão de metaloproteínas, como por exemplo *ATX1*, *CUP1*.

Seguindo o mesmo princípio, evidências mostram que tratamento de células de leveduras deficientes em *Cu/Zn-SOD* com íons de manganês tornam essas células resistentes a estresse oxidativo (Chang & Kosman, 1989).

Os íons de cobre são responsáveis pela atividade de dismutação do O_2^- na proteína *Cu/Zn-superóxido dismutase* (Lyons *et al.*, 1999). Assim, a especulação de que íons de cobre podem agir como antioxidante parece pertinente. Como o cobre, teoricamente os íons de manganês também poderiam participar da dismutação do radical superóxido *in vivo*.

Um trabalho recente da literatura mostra que tratamento de células de *E. coli* deficientes em *Fe-SOD* e *Mn-SOD* com íons de ferro recupera o crescimento, reativa enzimas que contêm *cluster Fe-S*, e ainda protege

estas células contra paraquat, um gerador de superóxido (Benov & Fridovich, 1998).

Existem alguns dados de literatura que mostram dismutação do radical superóxido por metais de transição, como cobre, manganês e ferro complexados à diferentes compostos, *in vitro* (Liao *et al.*, 1994; Fridovich, 1995). No entanto, as evidências *in vivo*, ainda não são completamente aceitas na literatura.

Evidências de que zinco tenha um papel antioxidante também estão sendo demonstradas (Bray & Bettger, 1990). Embora o mecanismo bioquímico pelo qual isso ocorre não esteja claro, foi observado que zinco previne oxidação de grupos sulfidrilas *in vitro*. Por outro lado, sabe-se que a metalotioneína, uma proteína de função desconhecida, é induzida por estresse oxidativo e apresenta predominantemente zinco ligado em sua estrutura.

1.4. O metabolismo acoplado de Fe e Cu em células de S. cerevisiae

Cobre e ferro compõem sítios ativos de uma série de enzimas, sendo assim, essenciais para sobrevivência das mais diferentes espécies (bactérias, fungos, plantas, mamíferos).

A presença de metais de transição nas células e organismos, apesar de ser extremamente necessária, é bastante controlada, uma vez que o excesso destes pode favorecer situações de estresse oxidativo.

Em células de mamíferos a captação de ferro sofre controle pós-transcricional. O transporte de ferro na membrana citoplasmática é feito principalmente pelo receptor de transferrina (TfR). A transferrina liga-se a ferro e é transportada através do TfR em vesículas de endocitose. A regulação da tradução do RNAm de TfR é coordenada pela interação entre a proteína IRP1 (Iron Regulatory Protein) e a sequência IRE (Iron Responsive Element) no RNAm. A sequência IRE também está presente no RNAm de ferritina, que é a proteína responsável pela estocagem intracelular de ferro (Rouault & Klausner, 1996).

Ferro e cobre são encontrados na natureza em quantidades relativamente homogêneas. No entanto, praticamente todo o ferro encontrado na natureza apresenta-se insolúvel na forma de hidróxido de ferro, uma vez que a atmosfera contém uma concentração relativamente

alta de oxigênio. Assim, alguns organismos têm desenvolvido sistemas complexos para captação de ferro (Kaplan & O'Halloran, 1996).

Em *Saccharomyces cerevisiae* existem dois diferentes sistemas de transporte de ferro na membrana citoplasmática, um transporte de alta afinidade ($K_m = 0,15\mu\text{M}$) e um de baixa afinidade ($K_m = 30\mu\text{M}$). Duas proteínas de membrana plasmática, Fre1p e Fre2p (ferroredutases), reduzem Fe (III) a Fe (II) e Cu (II) a Cu (I). Tem sido proposto que este processo é o passo limitante no transporte, uma vez que a redução de ferro e cobre do meio extracelular implica na liberação desses íons dos diferentes substratos encontrados no ambiente (De Silva *et al.*, 1996) (Figura 2).

Evidências mostram que o Fe (II) é transportado pelo sistema de transporte de baixa afinidade promovido pela proteína integral de membrana, Fet4p (Dix *et al.*, 1997). O sistema de alta afinidade é composto pela função acoplada de duas proteínas complexadas na membrana citoplasmática, Fet3p e Ftr1p. Fet3p oxida Fe (II) a Fe (III), que é transportado pela Ftr1 permease (De Silva *et al.*, 1995, 1996) (Figura 2).

Fet3p é uma cobre-proteína que apresenta alta homologia com a família de proteínas multicobre oxidases, que inclui, ascorbato oxidase, laccases e a ceruloplasmina em células de mamíferos (De Silva *et al.*, 1997). A ceruloplasmina também é envolvida no transporte de ferro em células de mamíferos. A atividade ferroxidase da ceruloplasmina leva a liberação de ferro de ferritina e o ferro é incorporado pela apo-transferrina.

Tem sido mostrado que, a expressão de *FRE1/FRE2* (Ferriredutase), *FET3* (Fet3p) e *FTR1* (Ftr1p) é regulada por concentrações extracelulares de ferro e cobre. O cobre é captado do meio extracelular pelo produto dos genes *CTR1/2/3* e é transportado, no citoplasma, pela proteína Atx1p, que supostamente libera o cobre, à ser transportado para o interior de vesículas secretoras, para uma ATPase de cobre denominada Ccc2p (Fu *et al.*, 1995; Yuan *et al.*, 1995). O íons de cobre são incorporados à Fet3p dentro dessas vesículas secretoras, que posteriormente se fundem à membrana citoplasmática (Figura 2).

Dados de literatura mostram que mutações que levam a inibição do transporte de cobre, seja em Ctr1p ou Ccc2p, conseqüentemente inibem o transporte de ferro (Yuan *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1997).

O transporte de ferro é controlado por fator de transcrição denominado Aft1p (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996). Quando os níveis de ferro extracelular estão baixos, Aft1p é induzido e reconhece sequências específicas no promotor dos genes envolvidos no transporte de ferro de alta afinidade ativando a transcrição dos mesmo, são eles *FRE1/FRE2*, *FET3* e *FTR1*. Embora não se saiba sobre o mecanismo pelo qual Aft1p seja induzido, evidências mostram que carência de ferro e concentrações altas de oxigênio levam ao aumento da atividade deste fator de transcrição (Hasset *et al.*, 1998). Da mesma forma, quando os níveis de cobre

extracelular estão baixos, o fator de transcrição Mac1p é induzido e ativa a transcrição do *CTR1* e *FRE1/FRE2* (Graden & Winge, 1997) (**Figura 2**).

Mutantes de levedura deficientes em Fet3p apresentam baixos níveis de transporte de Fe (III), e conseqüentemente concentrações intracelulares de ferro diminuídas (Dancis *et al.*, 1992). Esses mutantes mostram deficiência no crescimento em meio de cultura carenciado de ferro, pois a Fet3p é extremamente requerida nas condições de limitação desse metal (Askwith *et al.*, 1994). Nos mutantes *fet3Δ*, acredita-se que a captação de ferro na membrana é feita pela Fet4p ou mesmo pela proteína Fet5p (Spizzo *et al.*, 1997).

Os mutantes *fet3Δ* apresentam deficiência no crescimento em fontes de carbono não fermentáveis (Askwith *et al.*, 1994). A razão para isto não está clara. No entanto, é sabido que ferro compõe sítios ativos de inúmeras enzimas e é componente de grupos prostéticos como *clusters Fe-S* e Heme.

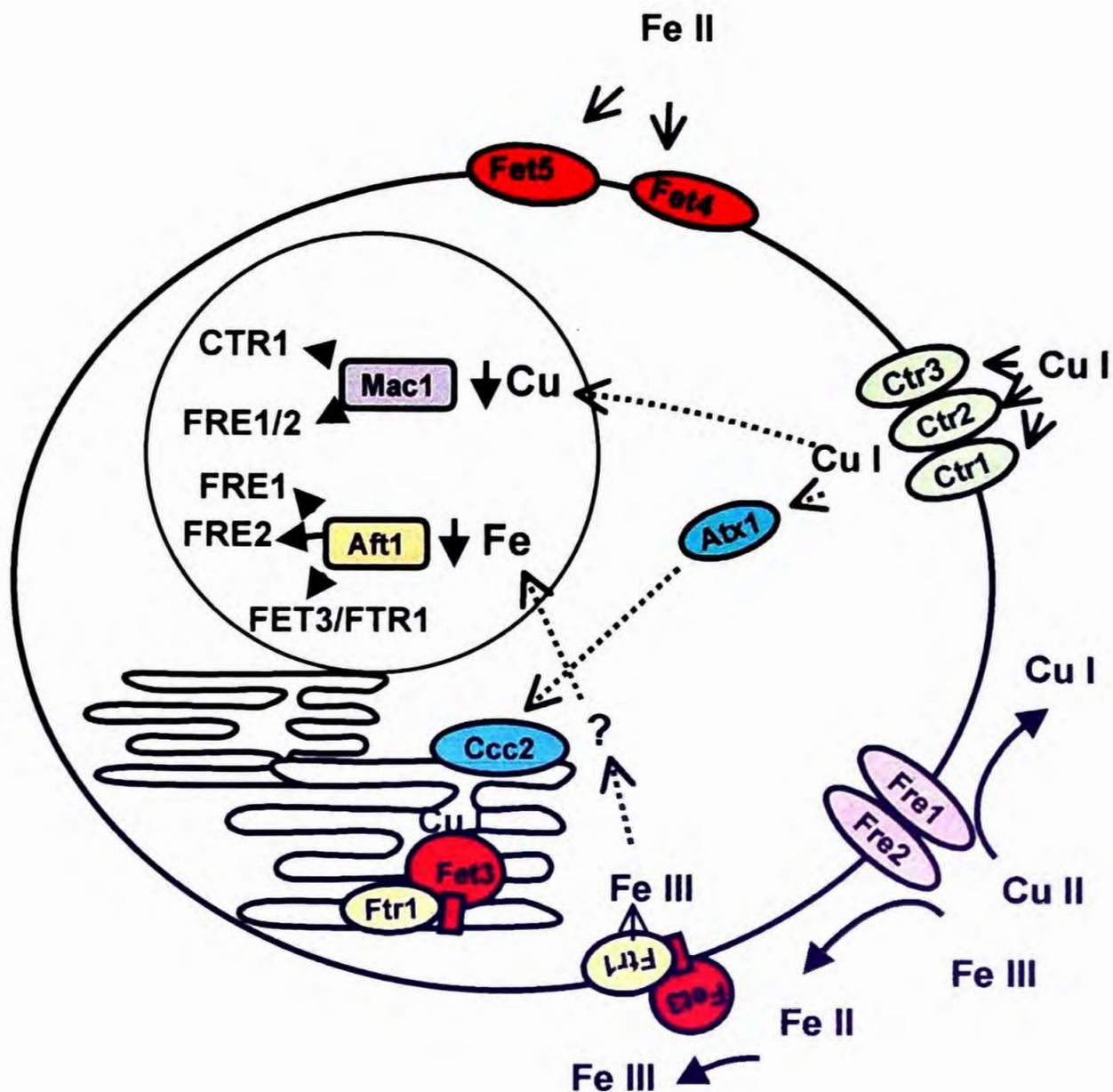


Figura 2 – Representação esquemática do transporte acoplado de ferro e cobre em *S. cerevisiae*. Inicialmente, Fe (III) e Cu (II) são reduzidos pelas redutases de membrana plasmática, Fre1/Fre2p. O Fe (II) e Cu (I) são transportados pela Fet4p e Ctr1p, respectivamente. Cadmio, cobalto e níquel também podem ser transportados pelo sistema de transporte de ferro de baixa afinidade feito por Fet4p. O transporte de ferro de alta afinidade é formado pela função acoplada da Fet3p, que oxida Fe(II) a Fe(III), e Ftr1p (permease). Há evidências de que íons de ferro também podem ser transportados pela proteína Fet5p, mas o mecanismo pela qual ferro é transportado, nesse caso, é desconhecido.

Como discutido anteriormente, ferro e cobre “livres” intracelular participam da formação de radicais $\cdot\text{OH}$, na reação de Fenton. Como se sabe que o radical superóxido causa um aumento dos níveis intracelulares de ferro “livre”, neste trabalho, nós diminuimos os níveis intracelulares de ferro através da interrupção do gene *FET3* em células de levedura deficientes em Cu,Zn-superóxido dismutase, com o objetivo de verificar se a diminuição dos níveis intracelulares de ferro aliviaria o fenótipo apresentados por estas células. Assim, ao contrário do que esperávamos, nós observamos que os mutantes *sod1* Δ requerem ferro. Nossos dados mostram que os mutantes *sod1* Δ transportam altos níveis de ferro devido ao aumento na expressão do gene *FET3*, responsável pelo transporte de ferro de alta afinidade na membrana plasmática. Esta é a primeira evidência de que uma situação de estresse oxidativo altera o metabolismo de ferro em células deficientes em *Cu,Zn-SOD*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Neste trabalho foram utilizadas linhagens haplóides de *S. cerevisiae* selvagens e mutantes, por interrupção gênica, nos genes que codificam para superóxido dismutase (*SOD*), Fet3 oxidase (*FET3*) e coenzima Q (*COQ3*). Também foram utilizadas linhagens que superexpressam a *Cu,Zn-SOD* e *Mn-SOD*.

Tabela I

Linhagens	Genótipos
EG103 (<i>WT</i>)	<i>MAT</i> α , <i>leu2-3, 112 his3</i> Δ 1, <i>trp1-289a</i> , <i>ura3-52</i>
EG118 (<i>sod1</i> Δ)	<i>MAT</i> α , <i>leu2-3, 112 his3</i> Δ 1, <i>trp1-289a</i> , <i>ura3-52</i> , <i>sod1</i> Δ :: <i>URA3</i>
JF242 (<i>fet3</i> Δ)	<i>MAT</i> α , <i>leu2-3, 112 his3</i> Δ 1, <i>trp1-289a</i> , <i>ura3-52</i> , <i>fet3</i> Δ :: <i>HIS3</i>
JF244 (<i>sod1</i> Δ / <i>fet3</i> Δ)	<i>MAT</i> α , <i>leu2-3, 112 his3</i> Δ 1, <i>trp1-289a</i> , <i>ura3-52</i> , <i>sod1</i> Δ :: <i>URA3</i> e <i>fet3</i> Δ :: <i>HIS3</i>
Y144 (<i>WT</i>)	<i>MAT</i> α , <i>leu2-3, 112 his3</i> Δ 1, <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>cup5</i>
Y151 (<i>sod1</i> Δ)	<i>MAT</i> α , <i>leu2-3, 112 his3</i> Δ 1, <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>sod1</i> Δ :: <i>TRP1</i>
CC103 (<i>coq3</i> Δ)	<i>MAT</i> α , <i>leu2-3, 112 his3</i> Δ 1, <i>trp1-289a</i> , <i>ura3-52</i> , <i>coq3</i> Δ :: <i>LEU2</i>
CC118(<i>sod1</i> Δ / <i>coq3</i> Δ)	<i>MAT</i> α , <i>leu2-3, 112 his3</i> Δ 1, <i>trp1-289a</i> , <i>ura3-52</i> , <i>sod1</i> Δ :: <i>URA3</i> e <i>coq3</i> Δ :: <i>LEU2</i>
<i>WT351</i>	<i>MAT</i> α , <i>leu2-3, 112 his3</i> Δ 1, <i>trp1-289a</i> , <i>ura3-52</i> , <i>YE_p</i>
<i>WTSOD1</i>	<i>MAT</i> α , <i>leu2-3, 112 his3</i> Δ 1, <i>trp1-289a</i> , <i>ura3-52</i> , <i>YE_p-SOD1</i>
<i>WTSOD1/SOD2</i>	<i>MAT</i> α , <i>leu2-3, 112 his3</i> Δ 1, <i>trp1-289a</i> , <i>ura3-52</i> , <i>YE_p-SOD1/SOD2</i>

As linhagens EG103, EG118, Y144 e Y151 foram cedidas pela Dra. Edith Butler Gralla do Departamento de Química e Bioquímica da Universidade da Califórnia, Los Angeles (UCLA). As linhagens CC103 e CC118 foram cedidas pela Dra. Catherine Clark do mesmo departamento na UCLA. As linhagens JF242, JF244, *WT351*, *WTSOD1* e *WTSOD1/SOD2* foram obtidas neste trabalho.

2.2. Plasmídeos

O plasmídeo YIp-fet3::*HIS3* foi utilizado para construção dos mutantes deficientes em Fet3 oxidase (Askwith *et al.*, 1994) e o plasmídeo multicópia *FET3::lacZ* contendo o gene *lacZ* sob controle do promotor do gene *FET3* (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995) foi utilizado na transformação das linhagens Y144 e Y151 com a finalidade de se observar a atividade do promotor do gene *FET3*. Estes plasmídeos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Jerry Kaplan do Departamento de Patologia da Universidade de Utah.

Os plasmídeos YEp-*SOD1* e YEp-*SOD1/SOD2* foram utilizados na construção de células superexpressando *SOD*. Estes plasmídeos foram cedidos pela Dra. Edith Gralla.

2.3. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados para crescimento de levedura são descritos por Sherman (1991).

Meios ricos:

YPD – 1 % de extrato de levedura; 2 % de peptona bacteriológica,
2 % de glicose

YPDA – YPD contendo 2 % de ágar

YPG – 1 % de extrato de levedura; 2 % de peptona bacteriológica,
3 % de glicerol

YPGA – YPG contendo 2 % de ágar

Meios mínimos:

SD - Contém 0,67 % de yeast nitrogen base; 2 % de glicose; todos os aminoácidos e bases nitrogenadas necessárias ao crescimento, exceto os que funcionam como marca de seleção.

SDA – SD contendo 2 % de ágar

LIM – idêntico ao SD, exceto que contém 0,67 % de Yeast nitrogen base without Fe (Bio 101/Inc). Cada litro de LIM foi tratado com 50 g de resina Chelex 100 (Sigma) durante a noite para remover todo o ferro contaminante. Em seguida, adicionou-se

CaCl₂, MnCl₂, MgSO₄, ZnSO₄, CuSO₄ às concentrações finais descritas em Sherman, (1991). Este procedimento é necessário porque a resina Chelex também remove esses metais do meio.

2.4. Cultivo de células de levedura

As células de levedura foram estocadas em meio SD ou YPD contendo 50 % de glicerol à -70 °C e cultivadas em placas de Petri contendo meio SDA. Para obtenção de cultura líquida, as células foram coletadas das placas de cultura com ajuda de uma alça de platina e, em seguida, ressuspensas em meio líquido.

O crescimento das linhagens foi feito tanto em baixa aeração como em alta aeração. As pré-culturas foram crescidas em baixa aeração para evitar a seleção de supressores da mutação *sod1Δ*. A partir das pré-culturas foram feitas as culturas em alta aeração tendo-se o cuidado de não ultrapassar 20 horas de crescimento, pois os mutantes *sod1Δ* perdem rapidamente a viabilidade na fase estacionária de crescimento ou desenvolvem supressores genéticos.

O crescimento em baixa aeração foi feito em tubos de 8 cm x 1,5 cm contendo 5 mL de cultura líquida. Este procedimento foi desenvolvido no laboratório da Dra. Edith Butler Gralla na UCLA.

O crescimento em alta aeração foi feito utilizando-se *erlemmeyers* contendo um volume de cultura líquida 5 vezes inferior ao volume dos *erlemmeyers* (p.ex. 10 mL de meio em *erlemmeyers* de 50 mL). Em ambos os casos, o crescimento foi feito à temperatura de 30 °C por agitação de 200 rpm.

O crescimento microaeróbico foi feito a partir da incubação de culturas em placas de Petri em sacos plásticos (Campy Pouch – Microaerophilic system - BBL).

A densidade celular foi determinada através da contagem do número de células viáveis em câmara de Neubauer ao microscópio óptico, após diluição em azul de metileno 0,1 % (corante vital) ou em espectrofotômetro a 600 nm.

Para se obter formação de colônias em meio sólido, alíquotas de culturas líquidas foram diluídas em salina (0,9 % de NaCl), espalhadas em placas de Petri contendo meio sólido e incubadas a 30 °C durante 3 dias (estufa incubadora BOD). A viabilidade celular foi determinada após contagem das colônias formadas.

2.5. Transformação de células de levedura

As células de levedura foram crescidas em 3 mL de meio rico (YPD) em baixa aeração à 30 °C durante a noite. Foi feita uma centrifugação à 14.000 rpm durante 3 minutos e aproximadamente 100 µL de YPD foram adicionados ao precipitado celular. Logo após, 1 µg de plasmídeo foi adicionado e foi feita uma agitação rápida em *vortex*. Em seguida, 500 µL de uma solução contendo 40 % de Polietilenoglicol 4000, acetato de lítio 0.1 M, Tris-Cl 0.1 M (pH 7.5) e EDTA 10 mM foram adicionados, seguido de agitação em *vortex*. Foram adicionados 20 µL de DTT 1M e mais uma vez a mistura foi agitada em *vortex*. Após incubação à temperatura ambiente por 12 horas, as células foram submetidas a um choque térmico de 10 minutos a 42 °C e semeadas em placas de Petri contendo meio mínimo (SDA) sem o aminoácido equivalente a marca de seleção (Elble, 1992).

2.6. Construção de mutantes deficientes em *Fet3* oxidase

O plasmídeo YIp-*fet3::HIS3* contendo o gene *FET3* interrompido pelo gene *HIS3* foi linearizado num sítio ApI situado fora da sequência do gene *FET3* e em seguida foi feita uma transformação das linhagens de levedura (Mat. e Mét. item 2.5).

Para transformação foram utilizados aproximadamente 10 µg de plasmídeo (YIp-*fet3::HIS3*). Após os procedimentos de transformação, as células foram espalhadas em placas de SDA (sem histidina, que é a marca de interrupção contida no plasmídeo) contendo 100 µM de FeCl₃. Após 5-6 dias de incubação em estufa, as colônias crescidas em SD-His, foram selecionadas e semeadas em replica em YPDA, SDA para avaliar-se a viabilidade. Testes foram feitos para verificar se as colônias selecionadas apresentavam fenótipos idênticos aos dos mutantes *fet3Δ* descritos na literatura, que são: inabilidade de formar colônias em meio carenciado de ferro (LIM) e inabilidade de crescer em meio contendo glicerol como fonte de carbono (Askwith *et al.*, 1994). Análise por *Southern blot* foi feita para verificar se as colônias selecionadas apresentariam interrupção no gene *FET3*.

2.6.1. *Extração de DNA de células de levedura*

Células cultivadas em 10 mL de YPD foram coletadas por centrifugação (5.000 rpm/5 min) e ressuspensas em 200 µL de uma solução contendo Triton X-100 2 %, SDS 1 %, NaCl 100 mM, Tris-Cl 10 mM (pH 8.0) e EDTA 1 mM. Em seguida, foram adicionados 200 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) juntamente com 0,1 g de pérolas de vidro de 0,4 mm de diâmetro (*glass beads*). Logo após, foi feita agitação em *vortex* durante 5 minutos com intervalos em gelo. 200 µL de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) foram adicionados. Após centrifugação à 14.000 rpm por 3 minutos, parte do sobrenadante (a fase aquosa) foi coletada e transferida para outro tubo plástico. 1 mL de Etanol absoluto foi adicionado e foi feita uma mistura por inversão, seguida de incubação em freezer (-70 °C) por 15 minutos. Após centrifugação de 15 minutos à 14.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 0,4 mL de TE. 3 µL de uma solução de RNase (10 mg/mL) foram adicionados e foi feita uma incubação à 37 °C por 10 minutos. Em seguida, 10 µL de acetato de amônio (4 M) juntamente com 1 mL de etanol absoluto foram adicionados. Foi feita mistura por inversão e incubação em *freezer* novamente. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco e ressuspenso em água estéril (Elble, 1992)

2.6.2. Quantificação de DNA

A quantificação do DNA foi feita em espectrofotômetro à 260 nm. Medidas à 280 e 230 nm foram obtidas para se estimar contaminação por proteínas e fenol, onde a relação 260/280 deve ser próximo a 2, se a amostra está livre de proteínas, enquanto que a relação 230/260, igual a 2, se a amostra está livre de fenol. Os cálculos são feitos a partir da relação sobre 1 Unidade de absorbância a 260 nm que equivale a 50 µg de DNA.

2.6.3. Southern Blot

Após análise de sítios de restrição do gene *FET3*, aproximadamente 50 µg de DNA extraídos de colônias transformadas, foram digeridos com as enzimas de restrição Sac II e ApI à 37 °C durante 2 horas.

As amostras de DNA digeridas foram separadas em gel de agarose 0,8 % - (TAE) durante 18 horas à 1 V/cm. Em seguida, o gel foi submerso numa solução de desnaturação (NaOH 0,5M, NaCl 1,5M) por 1 hora e depois numa solução de neutralização (Tris 1 M, pH 8,0, NaCl 1,5 M) por mais 1 hora. Logo após, foi montado o sistema de transferência do DNA digerido para membrana de nitrocelulose. A transferência foi feita durante 4 horas. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi removida e incubada à temperatura ambiente por 15 minutos e depois seca em sistema

de vácuo à 80 °C. A hibridização do DNA digerido com uma sonda referente a um produto de PCR do gene *FET3*, marcada radioativamente com ^{32}P , foi feita durante a noite a 68 °C. Após hibridização, a membrana de nitrocelulose foi lavada duas vezes com SSC 2X /SDS 0,1 % (citrato de sódio/cloreto de sódio/SDS) à temperatura ambiente por 20 minutos e duas vezes SSC 0,1X /SDS 0,1 % à 68 °C por 3 horas (Blin & Stafford, 1976).

2.6.4. Marcação radioativa da sonda utilizada no Southern blot

O produto de PCR do gene *FET3* utilizado como sonda de hibridização no *Southern blot* foi gentilmente cedido pelo Dr. Jerry Kaplan do Departamento de Patologia da Universidade de Utah. A sonda foi desfosforilada numa reação utilizando-se fosfatase alcalina (CIAP) e tampão CIAP à 37 °C por 30 minutos. Em seguida, a sonda foi marcada radioativamente por fosforilação utilizando-se γ - ^{32}P ATP (Amersham) e T4 polinucleotídeo quinase após incubação à 37 °C por 1 hora.

2.7. Obtenção de linhagens expressando o gene da β -galactosidade sob o controle do promotor do gene *FET3*

As Linhagens Y144 e Y151 (Tabela I) foram transformadas com o plasmídeo *FET3::lacZ*. A marca de seleção do plasmídeo é URA3. Assim, após a transformação, as colônias crescidas em meio mínimo sem uracila (SD-Ura) foram selecionadas. O ensaio de β -galactosidase foi feito utilizando-se 3 diferentes colônias selecionadas.

2.7.1. Determinação da atividade de β -galactosidase

Células transformadas com o plasmídeo *FET3::lacZ* foram crescidas em 10 mL de meio SD-Ura líquido sob alta aeração. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com um tampão contendo Na_2HPO_4 0,06 M, NaH_2PO_4 0,04 M, KCl 0,01 M e MgSO_4 0,001 M (tampão Z). As células foram ressuspensas em 1 mL de tampão Z gelado e foi adicionado β -mercaptoetanol 0,03 M, juntamente com 50 μL de clorofórmio puro e 50 μL de SDS 1 %. Após agitação forte em *vortex*, foi feita uma incubação a 30 °C por 5 minutos. Logo após, adicionou-se 200 μL de uma solução contendo 4 mg/mL de ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactosídeo), substrato da β -galactosidase. Quando as amostras se tornaram moderadamente amarelas, foram adicionados 500 μL de uma solução contendo 1 M de

Na_2CO_3 para interromper a reação. Após centrifugação das amostras a 14.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi coletado e foi feita a medida colorimétrica em espectrofotômetro à 420 nm. O cálculo da atividade de β -galactosidase baseia-se na equação a seguir: $U=1000 \times \text{OD}_{420} / \text{OD}_{600} \times T$, onde, OD = densidade óptica das amostras no ensaio; OD_{600} = densidade óptica de células em 1 mL de tampão Z; T = tempo de reação (em minutos) (Rose & Botstein, 1983).

2.8. Construção de linhagens que superexpressam SOD

As Linhagens *WTSOD1* e *WTSOD1/2* (Tabela I) foram construídas a partir da transformação de células selvagens (*WT*) com os plasmídeos *YEp-SOD1* e *YEp-SOD1/SOD2*, respectivamente. Como controle, as células selvagens foram transformadas com o mesmo plasmídeo sem o gene *SOD* (*WT351*).

Os plasmídeos *YEp-SOD1* e *YEp-SOD1/SOD2* são multicópia e bifuncionais, replicam em bactéria e levedura. Apresentam resistência a ampicilina como seleção bacteriana e prototrofia para leucina como seleção em levedura.

Após a transformação de linhagens *WT* com os plasmídeos *YEp-SOD1* e *YEp-SOD1/SOD2* foram selecionadas 6 colônias crescidas em placas contendo meio mínimo sem leucina (SDA-Leu), que é a marca

contida no plasmídeo. Essas colônias foram cultivadas e mantidas em meio SD-Leu. A dosagem de superóxido dismutase foi feita de tempos em tempos, como controle, para monitorar a presença do plasmídeo.

2.9. Ensaio de proteção por S1 nuclease

O ensaio de proteção por S1 nuclease utilizado neste trabalho é baseado em Iyer & Struhl (1996). Oligonucleotídeos contendo uma sequência de aproximadamente 30 nucleotídeos dos genes *FET3* (Fet3 oxidase), *FET4* (Fet4p) e *CMD* (calmodulina) (Tabela II) foram fosforilados na extremidade 5' utilizando-se γ -[³²P]ATP e T4 polinucleotídeo quinase. Aproximadamente 10 pM de oligonucleotídeos desfosforilados foram adicionados a um tampão de reação contendo 50 mM de Tris (pH 7.5), 10 mM de MgCl₂, 5 mM de DTT e 50 µg/mL de albumina de soro bovina. A reação foi iniciada pela adição de 35 pM de γ -[³²P]ATP (Amersham) e 20 unidades de T4 polinucleotídeo quinase, seguida de uma incubação à 37 °C por 1 hora. Em seguida, a reação foi interrompida pela adição de igual volume de fenol/cloroformio (25:24) e prosseguiu-se uma centrifugação e coleta da fase aquosa. Os oligonucleotídeos foram precipitados na fase aquosa pela adição de acetato de amônio e cloreto de magnésio à concentração final de 2,5 M e 10 mM, respectivamente.

Tabela II – Sequência de oligonucleotídeos utilizados como sonda

FET3	5'- CCGCTTGTGC TAGCGAGAGC ATCGAGAAAA GCAAAACGGC TATAGAGAGC AAAGCGTCGA CTG - 3'
FET4	5'- CCGAATTCTT CGTACTGTTT GCAGTCAACA GTAGGTGCTC TATGATGAAC GTCAGGCCTA GCACCCAAGC C - 3'
CMD	5'- GGGCAAAGGC TTCTTTGAAT TCAGCAATT GTTCTTCGGT GGAGCC - 3'

Os oligonucleotídeos marcados radioativamente foram hibridizados com RNA total, extraídos de células de levedura, à 55 °C durante a noite. Aproximadamente 0,2 pM de oligonucleotídeos juntamente com 40 µg de RNA total foram adicionados à 50 µL solução contendo 0,3 M de NaCl, 1 mM de EDTA, 38 mM de Hepes (pH 7,0) e 5 µL de Triton X-100 10 %. A reação de hibridização foi feita à 55 °C durante a noite.

Após os procedimentos de hibridização, o RNA total foi submetido à digestão por S1 nuclease. A digestão de RNA de simples fita foi feita utilizando-se 150 unidades de S1 nuclease em 450 µL de um tampão de reação contendo 0,33 M de NaCl, 66 mM de acetato de sódio, 2,2 mM de cloreto de zinco e Triton X-100 0,01 % à 37 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 5 µL de EDTA 0,5 M juntamente com 5 µL de tRNA 10 µg/mL. Em seguida, o RNA hibridizado foi precipitado pela adição de 2 volumes de etanol absoluto gelado seguido de incubação à -80

°C por 1 hora. Após centrifugação à 14.000 rpm por 15 minutos (4 °C), o precipitado foi coletado e seco. O RNA hibridizado foi ressuspenso em tampão contendo 1 mM de EDTA, 0,25 % de azul de bromofenol, 0,25 % de xileno glicol e 50 % de glicerol.

O RNA hibridizado foi separado em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes (8 %). Em seguida, o gel foi submetido a análise e quantificação das bandas em Phosphor-Imager.

2.9.1. Extração de RNA total de levedura

Culturas de células foram coletadas por centrifugação (5.000 rpm/5 minutos). Em seguida, 1 mL de TRIZOL (GIBCO/BRL) foi adicionado para cada $1 \cdot 10^7$ células/mL de cultura. As células foram rompidas com ajuda de pérolas de vidro e agitação em *vortex* por 3 minutos com intervalos em gelo. Logo após, a mistura foi incubada à 30 °C por 5 minutos e cerca de 200 µL de clorofórmio foram adicionados para cada 1 mL de Trizol utilizado. As amostras foram agitadas vigorosamente por 15 segundos e incubadas à 30 °C por 3 minutos. Após centrifugação à 12.000rpm por 15 minutos (4 °C), parte do sobrenadante, a fase aquosa colorida, foi coletada e transferida para um tubo novo. O RNA total foi precipitado na fase aquosa pela adição de 0,5 mL de álcool isopropil para cada 1 mL de Trizol utilizado. A mistura foi incubada à 30 °C por 10

minutos e foi feita centrifugação à 12.000 rpm por 10 minutos (4 °C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi lavado com etanol 75 %. Em seguida, o precipitado de RNA foi seco naturalmente à temperatura ambiente e ressuspensão em água estéril tratada com 0,1 % de DEPC (dietilpirocarbonato).

2.10. Dosagem de superóxido dismutase

O método utilizado para dosagem da atividade de *SOD* nas diferentes linhagens baseia-se em Crapo *et al.*, (1978).

O ensaio é indireto e consiste basicamente de dois componentes: a) um gerador de superóxido, o sistema xantina/xantina oxidase, que produz radical superóxido em taxas controladas; b) um detector de superóxido, a transição do citocromo c oxidado para citocromo c reduzido.

Na ausência de *SOD* o radical superóxido reage com o detector. Todavia, se a *SOD* estiver presente, ela compete com o detector de superóxido. Experimentalmente, acompanha-se a transição do citocromo c oxidado para citocromo c reduzido através da medida da variação da absorvância a $\lambda=550$ nm com o tempo (120 s) a 25 °C. O valor da variação de absorvância por minuto ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$) nestas condições é 0,03.

Todos os reagentes foram preparados a partir de uma solução tampão contendo 50 mM de fosfato de potássio, 0,1 mM de EDTA (pH 7,8). O

Tampão de reação contém 0,3 mL de ferricitocromo c 0,1 mM, 0,3 mL de xantina 0,5 mM e 2,4 mL de tampão. A reação é iniciada pela adição de 10 μ M de xantina oxidase (Sigma).

Uma unidade de *SOD* é definida como a quantidade de *SOD* necessária para produzir 50 % de inibição da taxa de redução do citocromo c, onde o Δ Abs/min cai para a metade, ou seja, de 0,03 para 0,015. Assim, a quantidade de extrato protéico adicionado à reação na cubeta deve promover um decaimento de absorbância para a metade.

Em nossos experimentos as unidades de *SOD* foram expressas em U/mg de proteína.

2.10.1. Extração de proteínas

O método de extração de proteínas utilizado está descrito em Shin *et al.*, (1987), apresentando algumas modificações. As células foram coletadas por centrifugação, lavadas com água Milli Q e estocadas à - 20 °C durante a noite. Em seguida, foram ressuspensas em 50-100 μ L de água Milli Q e cerca de 0,3 g de pérolas de vidro (0,45 mm de diâmetro) foram adicionadas. A mistura foi submetida a forte agitação em *vortex* (agitador de tubos) durante 30 segundos por, pelo menos, 20 vezes, tendo-se o cuidado de manter as amostras em gelo o máximo de tempo possível. Após

isso, foi feito uma centrifugação (10.000 rpm/4 °C) e o sobrenadante (extrato celular) foi coletado.

2.10.2. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi feita de acordo com Lowry *et al.* (1951) utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Para a curva padrão foram utilizadas concentrações de BSA que variam na faixa de 0 a 60 µg, num volume final de 1 mL da solução de reação. Para a dosagem de proteínas do extrato celular, cerca de 5-10 µL do extrato foram adicionados à solução de reação. A leitura foi feita em espectrofotômetro à 700 nm.

2.11. Análise de conteúdo intracelular de metal por espectroscopia de plasma acoplado

Células de levedura foram crescidas em meio líquido por 18 horas e coletadas por centrifugação. Em seguida as células foram lavadas 4 vezes com 1 ml de 10 mM de EDTA para remover metais do meio externo e depois, lavadas 4 vezes com água livre de metais. O precipitado de células foi digerido a 100 °C em 1 mL de ácido nítrico 3 % durante a noite. Após digestão, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi coletado e diluído para 5 mL com água livre de metais (Li & Kaplan, 1998). A análise

do conteúdo intracelular total de metais foi feito utilizando-se espectroscopia de plasma acoplado (ICP – inductively coupled plasma). Uma curva padrão de cada metal foi aplicada ao aparelho anteriormente. Todas as amostras foram medidas 10 vezes e cada experimento foi repetido pelo menos 2 vezes. Os cálculos foram feitos a partir da curva padrão. Os dados foram normalizados pela OD₆₀₀ da cultura de células.

2.12. Análise de conteúdo intracelular de ferro através da dosagem de ⁵⁵Fe incorporado durante o crescimento

As células de levedura foram crescidas em meio rico sob baixa aeração durante a noite e, em seguida, incubadas em meio LIM contendo 5 μ M de ⁵⁵Fe (1 mCi/mL; Amersham). As culturas foram incubadas a 30 °C sob alta aeração. Nos tempos 0 e 18 horas, alíquotas foram retiradas e foi feito tanto a medida de densidade óptica das culturas, como uma coleta de células em filtros de vidro (22 mm θ , Millipore).

A coleta de células em filtros foi feita para contagem de radioatividade incorporada pelas células. Os filtros foram lavados 4 vezes com 1 mL de EDTA 10 mM e 4 vezes com 1 mL de água para remover o ferro radioativo externo. Os filtros foram submetidos a contagem de radioatividade por líquido de cintilação. Os dados de radioatividade dos

filtros foram comparados com os de radioatividade total do meio de cultura antes da incubação das células. Este experimento foi repetido 4 vezes.

2.13. Ensaio de captação de ferro

O ensaio de captação de ferro baseia-se em Dancis *et al.* (1990). As células foram cultivadas em meio SD durante a noite sob agitação à 30 °C. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação em minicentrífuga (14.000 rpm/5 min) e lavadas 4 vezes com o meio LIM. Logo após, as células foram ressuspensas em tampão contendo 10 mM de citrato de sódio (pH 6,5), 5 % de glicose e 5-20 μM de $^{55}\text{FeCl}_3$ (1 mCi/mL Amersham). A suspensão de células foi incubada à 30 °C, sob agitação de 200 rpm e em tempos diferentes (0 a 30 minutos), as células foram coletadas através de filtros de vidro (22 mm θ , Millipore). Os filtros foram lavados três vezes com 5 mL de EDTA 10mM e mais três vezes com 5 mL de água destilada. Em seguida, os filtros foram submetidos a contagem de radioatividade (emissão β) em líquido de cintilação. Os cálculos de captação de ferro pelas células foram feitos comparando-se a radioatividade dos filtros com a radioatividade total do meio antes da ressuspensão das células. Os dados de captação de ferro foram normalizados considerando-se a densidade óptica da cultura à 600 nm como sendo igual a 1 (10^7 cél/mL).

2.14. Consumo de oxigênio em culturas de levedura

O consumo de oxigênio foi observado em culturas de células de leveduras crescidas por 18 horas sob rotação forte (200 rpm) em meio YPG). 3 mL de culturas contendo cerca de $1 \cdot 10^7$ cél/mL foram incubados à 30 °C sob constante rotação. A medida de consumo de oxigênio feita pela introdução do eletrodo Clark no tubo contendo 3 mL de cultura durante cerca de 10 minutos. Os dados de consumo de oxigênio foram normalizados por 10^7 cél/mL.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. *Construção de mutantes deficientes em superóxido dismutase e Fet3 oxidase em S. cerevisiae*

As linhagens mutantes *sod1Δ* apresentam uma série de defeitos relacionados à toxicidade do oxigênio molecular, dentre eles sensibilidade a oxigênio atmosférico, crescimento lento em presença de oxigênio, deficiência no crescimento sob metabolismo respiratório, incapacidade de sintetizar lisina e metionina quando crescem em presença de ar, perda da viabilidade na fase estacionária e níveis aumentados de mutagênese espontânea (Gralla, 1997).

A razão porque os mutantes *sod1Δ* apresentam estes defeitos não é clara. No entanto, evidências indicam que grande parte desses defeitos pode estar relacionada à produção aumentada do radical $\cdot\text{OH}$, dada a presença de altos níveis de O_2^- intracelular (vide Equação I, II, IV e V).

Estudos feitos em bactérias mutantes por interrupção gênica em *Fe-SOD* e *Mn-SOD* mostram que as altas de taxas de mutações apresentadas por estas células ocorre devido ao aumento da concentração de ferro livre intracelular (Keyer & Imlay, 1998), uma vez que é sabido que o radical superóxido remove ferro de grupos prostéticos contendo 4 íons de ferro ligados a 4 enxofres (Kuo *et al.*, 1987; Gardner & Fridovich, 1991; Flint *et*

al., 1993). O excesso de ferro livre poderia estar reagindo com H_2O_2 gerando radicais $\cdot OH$ e isto levaria ao aumento das lesões no DNA e mutagênese.

Neste trabalho, nós modulamos os níveis intracelulares de ferro em células selvagens e mutantes *sod1Δ* através da construção de mutantes deficientes em Fet3p, que é uma proteína de membrana citoplasmática responsável pelo transporte de ferro de alta afinidade (De Silva *et al.*, 1995).

Para isto, nós transformamos células selvagens e mutantes *sod1Δ* com um plasmídeo recombinante apresentado uma interrupção no gene *FET3*. Após a transformação, nós selecionamos uma série de colônias, que supostamente eram mutantes *fet3Δ*, em seguida vários testes foram feitos para verificar se estas apresentavam fenótipo semelhante aos apresentados pelas linhagens mutantes *fet3Δ* descritos na literatura.

Os mutantes *fet3Δ* são incapazes de crescer em meio de cultura limitado em ferro, uma vez que o gene *FET3* é extremamente necessário para o transporte de ferro em condições de limitação desse metal (Dancis *et al.*, 1992; Georgatson & Alexandraki, 1994). Nos mutantes *fet3Δ* o transporte de ferro é feito por uma proteína de membrana que transporta ferro, cádmium e níquel, denominada Fet4p (vide Figura 2). Como Fet4p

representa o sistema de transporte de ferro de baixa afinidade, os mutantes *fet3Δ* não crescem em meio carenciado em ferro (Askwith *et al.*, 1994).

Os mutantes *fet3Δ* também crescem muito lentamente em meio de cultura contendo glicerol ou etanol, ou seja, são deficientes em crescimento respiratório (Askwith *et al.*, 1994).

Alguns testes foram feitos para observar se as colônias selecionadas após a transformação, os supostos mutantes *fet3Δ*, apresentam o mesmo fenótipo dos mutantes *fet3Δ* descritos na literatura. Para isto foi feito um repique das colônias em meio rico (YPD) e réplicas em meio deprivado em ferro (LIM - sólido) e em meio rico contendo glicerol (YPG). A partir daí, nós selecionamos colônias formadas nas placas de YPD que não haviam crescido nas placas de culturas contendo os meios LIM e YPG (dados não apresentados).

3.1.1. Análise da interrupção do gene *FET3* por Southern blot

Análise por *Southern blot* foi feita para verificar se as colônias selecionadas após a transformação e mostrando um fenótipo *fet3*-apresentavam em seu DNA genômico a inserção do gene *HIS3* em *FET3*.

Na Figura 3 podemos observar duas bandas de tamanhos diferentes. A banda de tamanho menor representa o gene *FET3* intacto (1,9 kb) e a banda de tamanho maior representa o gene *FET3* interrompido com a sequência *HIS3* (2,56 kb).

Todas as linhagens que foram selecionadas como apresentando fenótipo *fet3* Δ apresentaram uma única banda de tamanho maior na figura abaixo, o que confirma que a interrupção no gene *FET3* ocorreu de fato.

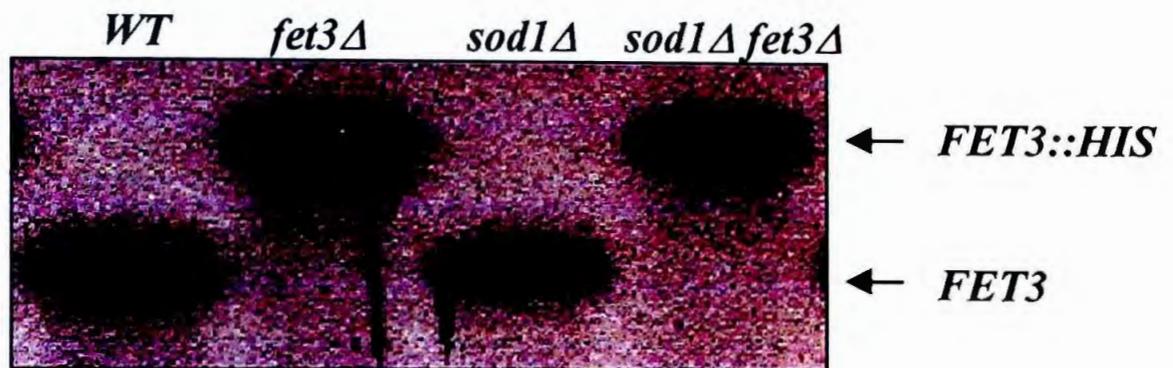


Figura 3 - Análise da interrupção gênica do gene *FET3* por *Southern blot*.

Após transformação e seleção de células de levedura que apresentaram o fenótipo *fet3Δ* foi feita extração de DNA genômico e *southern blot* (Mat. e Mét., ítem 2.5 e 2.6). As bandas de tamanho maior indicam o gene *FET3* interrompido com *HIS3* (2,56 kb). As bandas de tamanho menor indicam o gene *FET3* intacto (1,9 kb). *WT*, células selvagens (EG103); *fet3Δ*, células deficientes em Fet3p (JF242); *sod1Δ*, células deficientes em *Cu,Zn-SOD* (EG118); *sod1Δ fet3Δ*, células mutantes duplos em *FET3* e *Cu,Zn-SOD* (JF244).

3.1.2. Os mutantes *sod1Δ/fet3Δ* não apresentam supressão dos fenótipos ligados à mutação *sod1Δ*

As células mutantes *sod1Δ* perdem a capacidade de sintetizar lisina e metionina quando crescem em presença de ar e apresentam sensibilidade a oxigênio atmosférico (Gralla & Valentine, 1991; Liu *et al.*, 1992). A reversão do defeito da síntese de lisina é utilizada como meio de observação para detectar a presença de supressores genéticos da mutação *sod1Δ* (Lapinskas *et al.*, 1995, Longo *et al.*, 1996), uma vez que, se trata de um experimento simples e rápido. Assim, resolvemos analisar se os duplos mutantes *sod1Δ/fet3Δ* eram capazes de crescer em meio mínimo sem o aminoácido lisina (SD-Lis).

Podemos observar na Figura 4A que mutação em *FET3* não determina a capacidade dos duplos mutantes *sod1Δ/fet3Δ* crescerem em ausência de lisina.

De acordo, a Figura 4B mostra que a os mutantes duplos *sod1Δ/fet3Δ* são até mais sensíveis ao oxigênio atmosférico que os mutantes *sod1Δ* quando crescem em meio rico (YPD) sob condições normais de oxigênio (20% O₂). Além do mais, os mutantes *sod1Δ/fet3Δ* permanecem sensíveis à

concentração de 5 % de oxigênio, enquanto que os mutantes *sod1Δ* crescem relativamente bem em comparação as células selvagens.

Assim, ao contrário do que imaginávamos, a diminuição dos níveis intracelulares de ferro determinado pela mutação *fet3Δ* não implica na reversão do fenótipo *sod1Δ*.

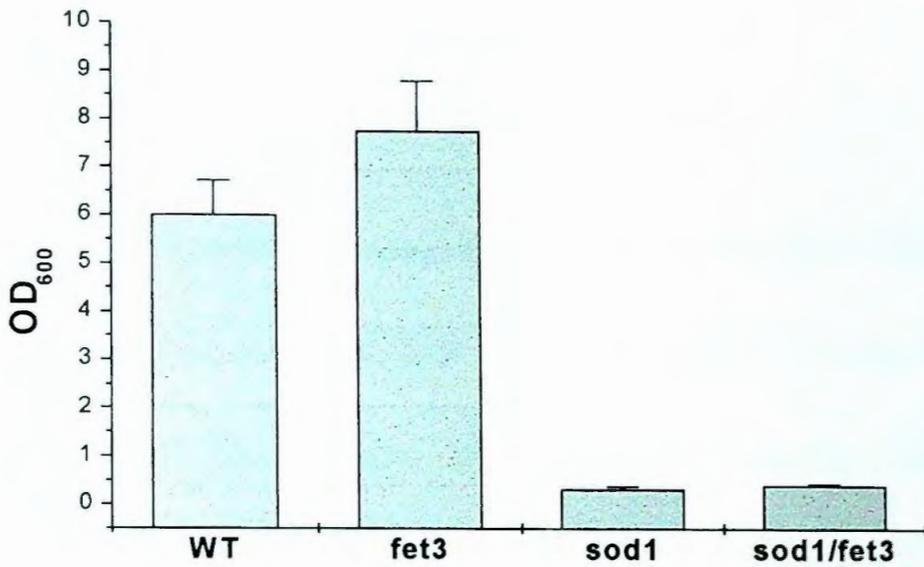
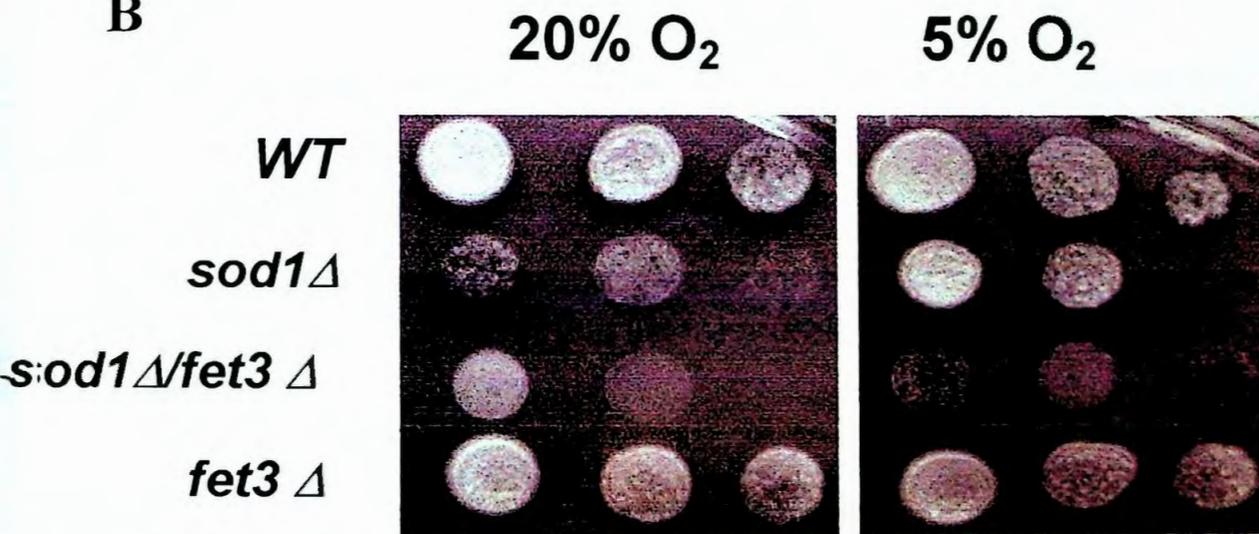
A**B**

Figura 4 - Os mutantes duplos *sod1*Δ/*fet3*Δ não apresentam supressão dos fenótipos ligados à mutação *sod1*Δ. Células pré-cultivadas em meio YPD foram crescidas em meio mínimo sem o aminoácido lisina (SD-Lis) à 30 °C, 200 rpm (**A**) ou inoculadas em YPDA para as diluições de $5 \cdot 10^5$, $5 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$ células, respectivamente (**B**) e incubadas em estufa à 30 °C, em 20 % ou 5 % de O₂ (Mat. e Mét., ítem 2.4).

3.1.3. Suplementação de íons de ferro no meio YPG recupera o crescimento respiratório dos mutantes *sod1Δ* de *Saccharomyces cerevisiae*.

Alguns dos defeitos apresentados pelos mutantes *sod1Δ*, como por exemplo a inabilidade de crescer em ausência de lisina e metionina, são suprimidos parcialmente pela ausência de transporte de elétrons nos mutantes duplos *sod1Δ/coq3Δ* e *sod1Δ/atp2Δ* (Longo *et al.*, 1996), o que significa que a eliminação da principal fonte de produção de superóxido, a cadeia respiratória, alivia o fenótipo da mutação *sod1Δ*.

Dados recentes da literatura têm mostrado que metais de transição apresentam um papel importante em situações de estresse oxidativo. Genes supressores da mutação *sod1Δ* estão relacionados com o acúmulo dos íons Cu e Mn no citoplasma dos mutantes *sod1Δ*, o que reforça a idéia de que cobre e manganês podem agir como sequestradores do radical superóxido *in vivo* (Lapinskas *et al.*, 1995; Lin & Culotta, 1995; Liu & Culotta, 1994).

De acordo com os resultados mostrados nas Figuras 4A e 4B, os mutantes *sod1Δ/fet3Δ* apresentam uma acentuação dos fenótipos *sod1Δ*, possivelmente causado pela eliminação da captação de ferro via Fet3p.

Nós resolvemos observar se suplementação de ferro no meio YPG teria algum efeito no crescimento dos mutantes *sod1Δ* sob metabolismo respiratório.

Na Figura 5, nós podemos observar que a adição de 0,3 mM e 1 mM de ferro no meio YPG recupera o crescimento dos mutantes *sod1Δ* sob metabolismo respiratório. O tratamento com ferro também reverte o defeito no crescimento respiratório dos mutantes *fet3Δ*, o que já era esperado, mas não teve efeito nos mutantes *sod1Δ/fet3Δ*.

Concordando com esse dado, nós observamos que o consumo de oxigênio aumenta nos mutantes *sod1Δ*, quando estes crescem em YPG suplementado de 0,3 mM de ferro (Tabela III), sugerindo um aumento na atividade da cadeia de transporte de elétrons.

Estes resultados sugerem que os mutantes *sod1Δ* parecem requerer a presença de ferro. Evidências de que ferro suprime defeitos nos mutantes *sod1Δ* foram bem recentemente obtidas em bactérias (Benov & Fridovich, 1998). Dados do laboratório da Dr. Joan Valentine, mostram que a adição de ferro no meio de cultura restaura a capacidade dessas células sintetizarem lisina.

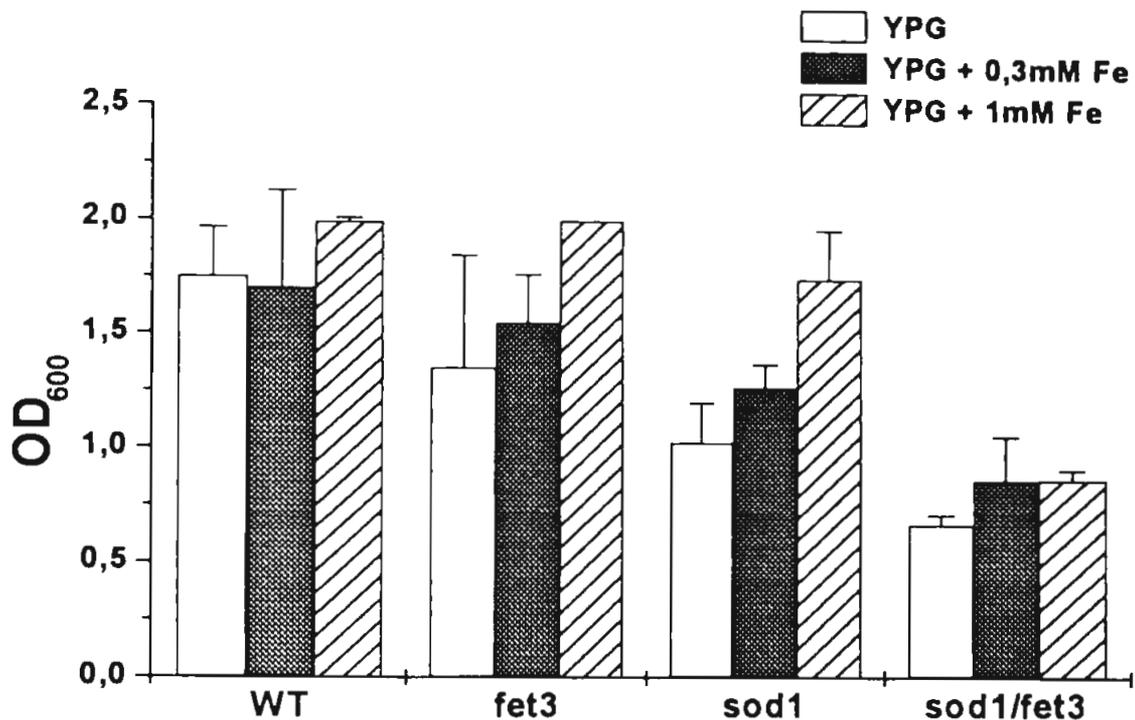


Figura 5 – Tratamento de células mutantes *sod1Δ* e *fet3Δ* com íons de ferro recupera o crescimento sob metabolismo respiratório dessas linhagens. As células foram cultivadas em meio rico (YPD) sob baixa aeração durante a noite, em seguida foram transferidas para meio rico contendo glicerol como fonte de carbono (YPG) em ausência e presença de 0,3 mM e 1 mM de FeCl₃. As culturas foram incubadas a 30 °C sob alta aeração (200 rpm) por 18 horas. Logo depois foi medida a densidade óptica à 600 nm em espectrofotômetro das diferentes linhagens. As barras representam o desvio padrão de 3 experimentos independentes.

Tabela III – Suplementação de ferro em YPG aumenta o consumo de oxigênio nos mutantes *sod1Δ* e *fet3Δ*.

Linhagens	YPG	YPG + 0,3 mM Fe
<i>WT</i>	41,1 (±11,45)	39,3 (±8,06)
<i>sod1Δ</i>	19,435 (±3,91)	24,61 (±7,93)
<i>fet3Δ</i>	21,15 (±11,1)	32,43 (±14,05)
<i>sod1Δ/fet3Δ</i>	11,65 (±5,86)	11,2 (±2,54)

As células foram crescidas em YPD sob baixa aeração, em seguida foram transferidas para meio rico contendo glicerol (YPG) como fonte de carbono que induz crescimento respiratório tanto em ausência como em presença de 0,3 mM de cloreto de ferro (FeCl₃). Após 18 horas de crescimento sob alta aeração, o consumo de oxigênio foi medido com eletrodo Clark. Os numeros em parênteses representam o desvio padrão de dois experimentos independentes.

3.1.4. – Os mutantes *sod1Δ* apresentam níveis intracelulares de ferro idênticos aos das células selvagens quando crescem por metabolismo respiratório.

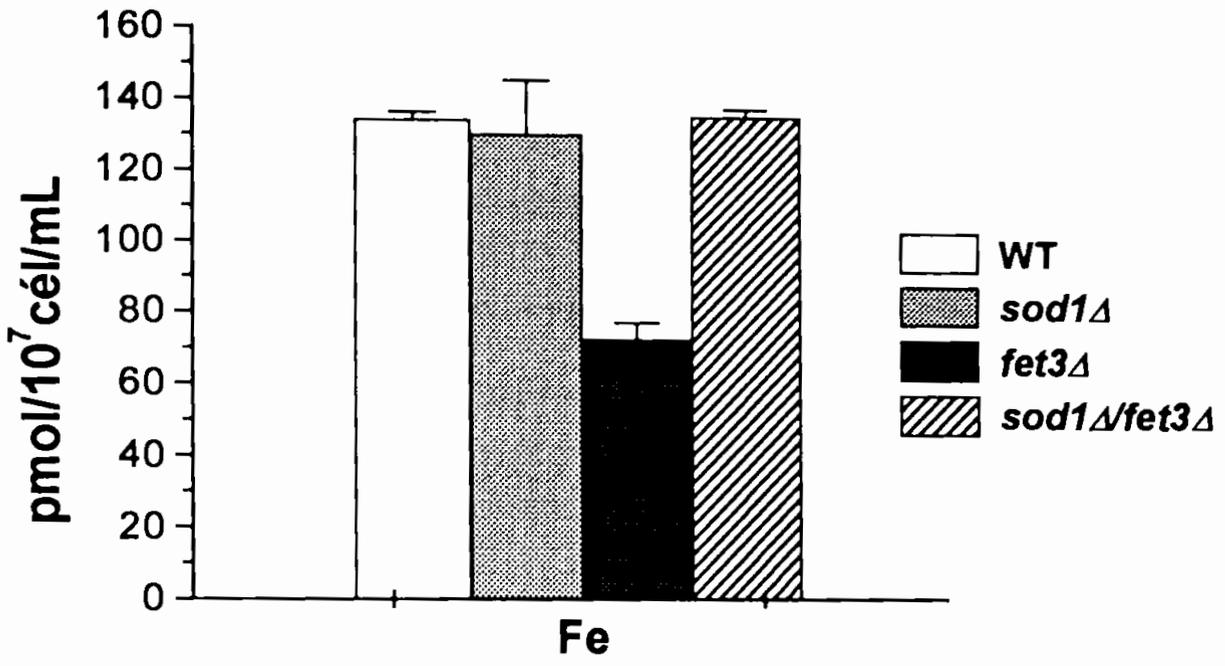
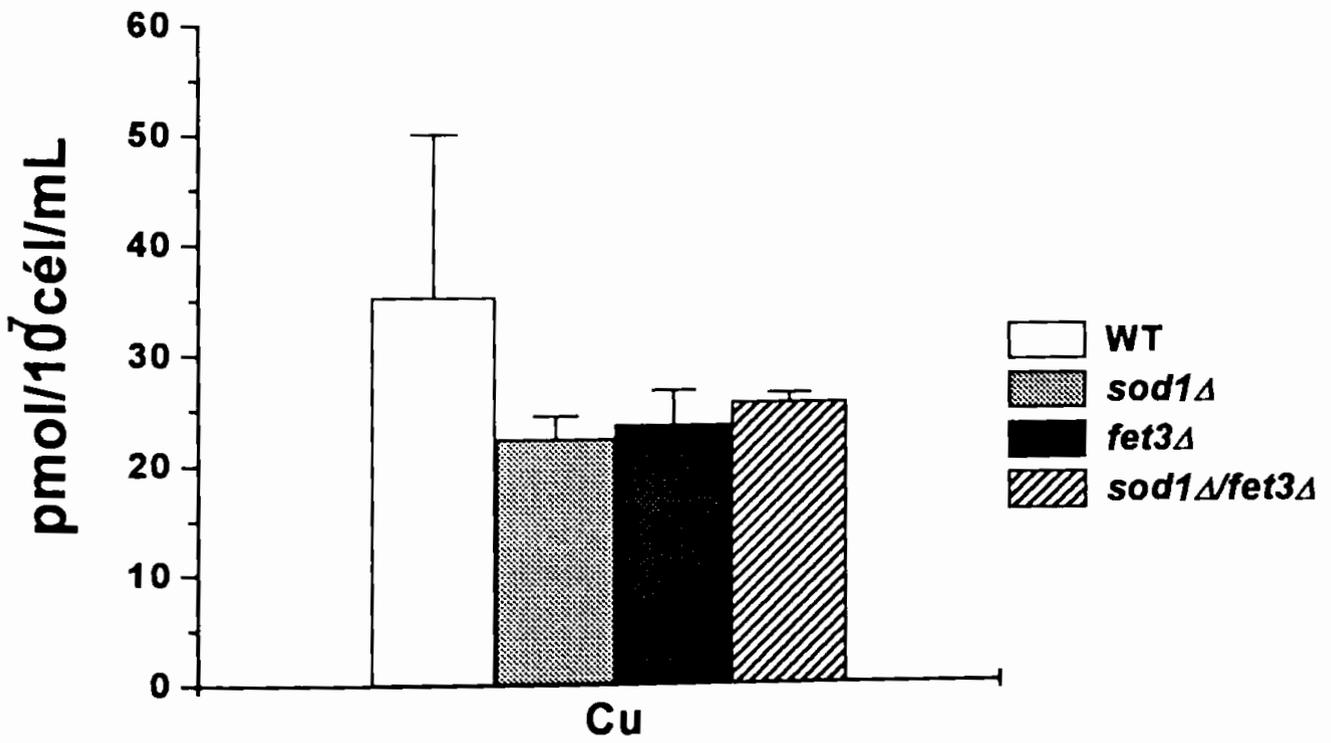
Embora os dados apresentados na Figura 5 e Tabela III pareçam indicar que os níveis intracelulares de ferro poderiam estar diminuídos nos mutantes *sod1Δ*, uma vez que a adição deste no meio de cultura recupera o crescimento respiratório dos mutantes, nós observamos na Figura 6A que os níveis intracelulares de ferro nas células mutantes *sod1Δ*, bem como dos duplos mutantes *sod1Δ/fet3Δ* são iguais aos das células selvagens. No entanto, isso não invalida a idéia de que ferro pode ser requerido e necessário para sobrevivência desses mutantes durante o crescimento sob metabolismo respiratório.

Os mutantes *fet3Δ* apresentam níveis inferiores de íons de ferro quando comparados aos das células selvagens, o que já é esperado, uma vez que esses mutantes são deletados num gene que codifica para uma proteína responsável pelo transporte de ferro de alta afinidade na membrana citoplasmática.

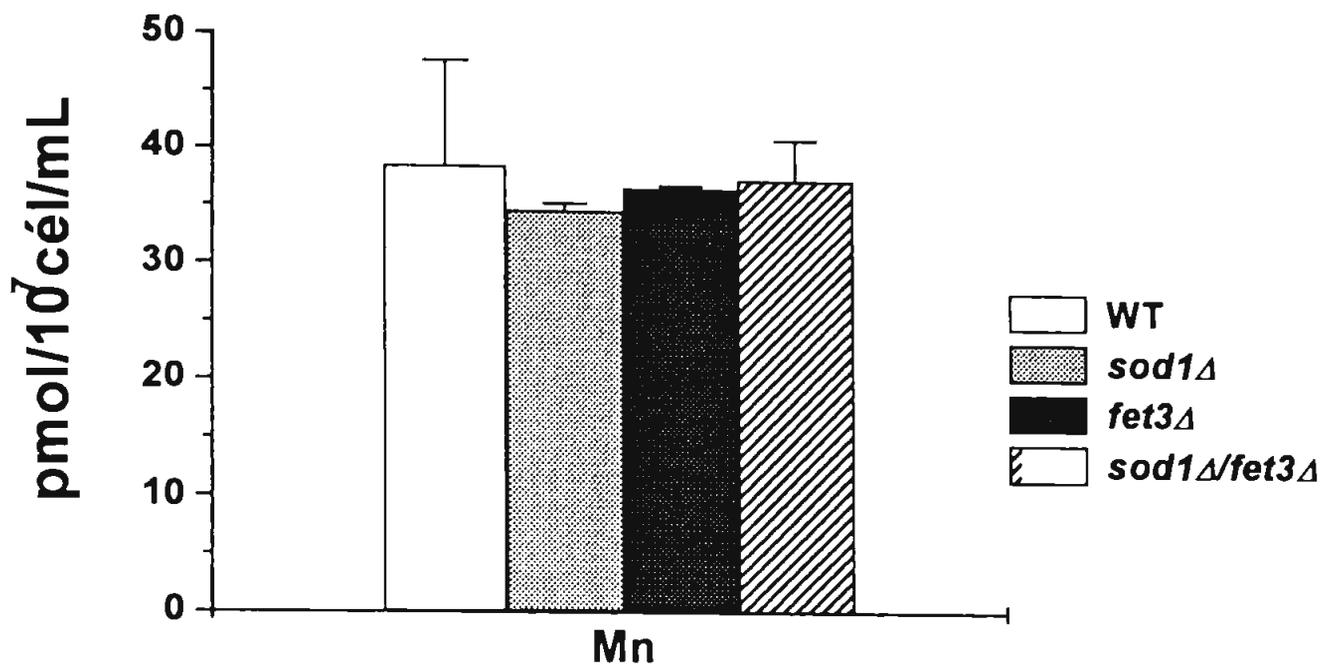
Como o metabolismo de ferro está acoplado ao metabolismo de cobre (Introdução, ítem 1.4), nós resolvemos observar os níveis intracelulares de cobre nas diferentes linhagens. A Figura 6B mostra que os

níveis de cobre nas células mutantes *sod1Δ*, *fet3Δ* e *sod1Δfet3Δ* são inferiores aos das células selvagens. A razão para este fato não está clara. Estudos à respeito desse mecanismo estão sendo iniciados no laboratório da Dra. Joan Valentine, na UCLA.

Nós verificamos também os níveis intracelulares de íons de manganês e zinco, uma vez que, existem hipóteses de que esses metais tenham um papel antioxidante (Bray & Bettger, 1990; Lapinskas *et al.*, 1995). Os dados apresentados na Figura 6C mostram que o conteúdo intracelular total de manganês é igual em todas as linhagens. Todavia, o conteúdo total de zinco parece estar levemente diminuído nos mutantes *sod1Δ* e *fet3Δ* nestas condições.

A**B**

C



D

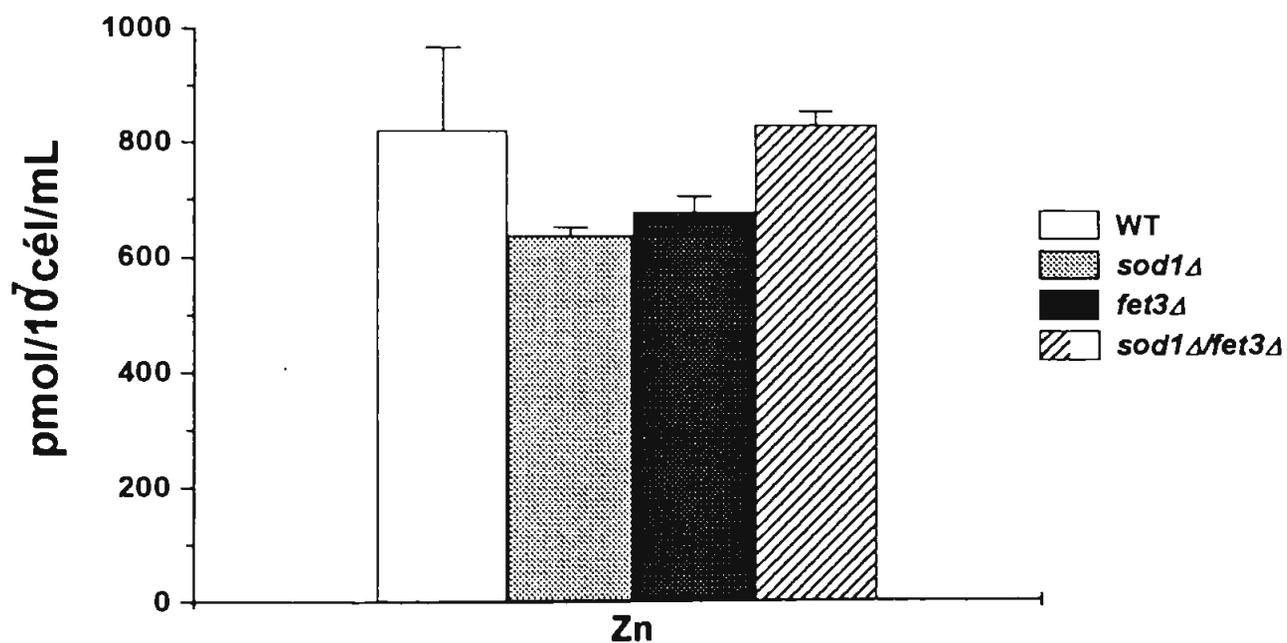


Figure 6 – Conteúdo intracelular total de Fe, Cu, Mn e Zn em células sob metabolismo respiratório. Culturas provenientes da Figura 5 foram coletadas e lisadas (Mat. e Mét., item 2.11). para análise do conteúdo total de Fe (A), Cu (B), Mn (C) e Zn (D) por espectroscopia de plasma acoplado. As barras representam o desvio de 2 experimentos independentes.

3.1.5. Ferro induz crescimento nos mutantes *sod1Δ*

Os resultados apresentados na Figura 5 mostram que a suplementação de ferro no meio YPG recupera o crescimento das células mutantes *sod1Δ* sob metabolismo respiratório. Como estes mutantes *sod1Δ* apresentam um crescimento lento em meio mínimo (SD), nós resolvemos observar se íons de ferro teriam algum efeito sobre este fenótipo.

A Figura 7 mostra que a adição de concentrações diferentes de cloreto de ferro (FeCl_3) ao meio mínimo LIM implica na diminuição do crescimento celular das células quando comparado ao crescimento em meio SD. No entanto, este fenômeno é mais acentuado nas células selvagens do que nos mutante *sod1Δ*.

De fato, dados de literatura mostram que o tratamento de células de levedura, em meio definido em ferro, com concentrações altas de ferro leva a parada do ciclo celular, na fase G1, possivelmente devido a diminuição da tradução das ciclinas Cln1 e Cln2, que são específicas da fase G1 (Philpott *et al.*, 1998).

É intrigante o fato de que nos mutantes *sod1Δ* o crescimento em presença de concentrações elevadas de ferro seja superior aos de células selvagens. Uma especulação plausível seria de que os mutantes *sod1Δ* nestas condições poderiam apresentar perda de controle do ciclo celular.

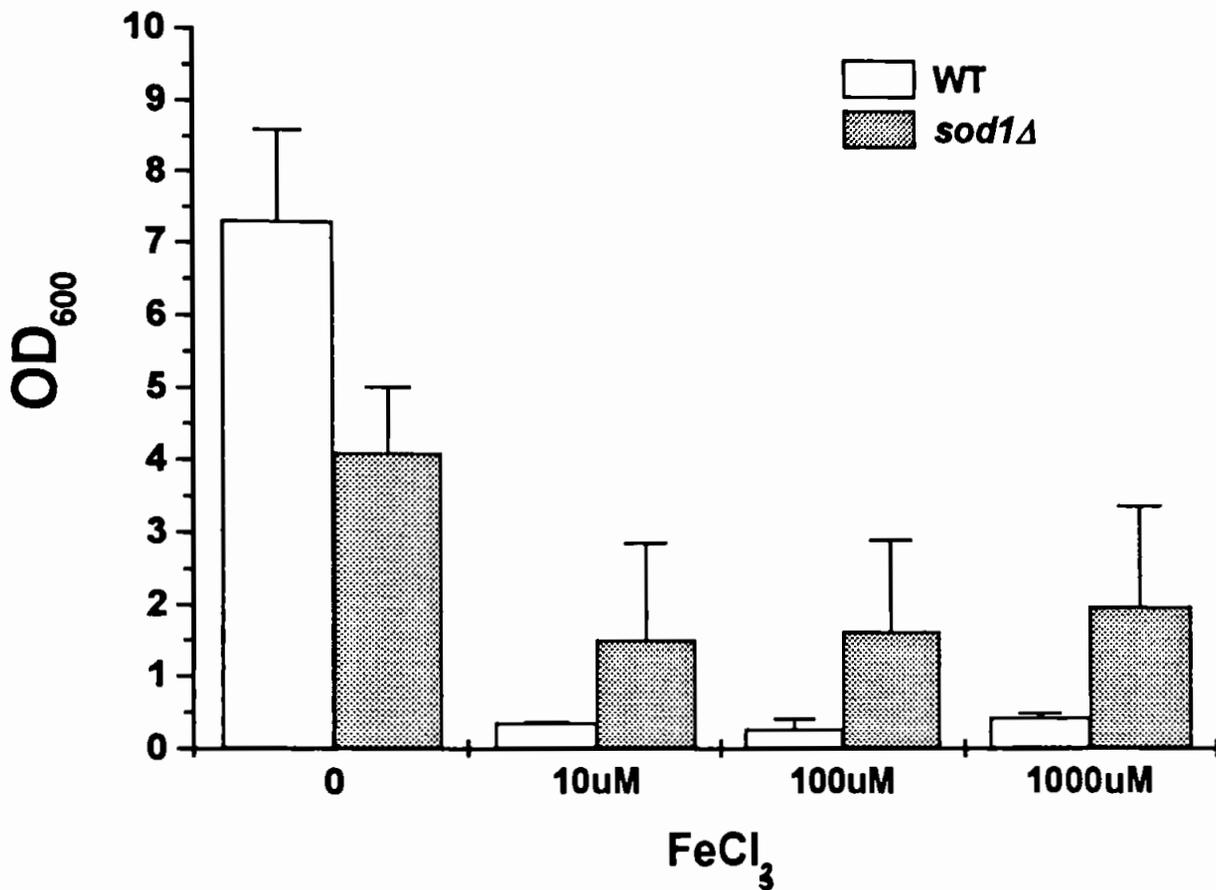


Figura 7 – Crescimento de células selvagens e mutantes *sod1Δ* sob diferentes concentrações de ferro. Células pré-cultivadas em YPD sob baixa aeração foram lavadas 4 vezes com meio LIM, em seguida $5 \cdot 10^5$ cél/mL foram ressuspensas em meio mínimo SD (0) e em meio definido em ferro (LIM) contendo 10 μM, 100 μM e 1000 μM de FeCl₃ e cultivadas à 30 °C e 200 rpm durante 18 horas.

3.1.6. – Os mutantes *sod1Δ* apresentam aumento dos níveis intracelulares de ferro e zinco quando crescem em meio SD.

Trabalhos recentes da literatura têm mostrado que alguns metais de transição parecem ter um papel importante em estresse oxidativo, como é o caso de cobre e manganês (Liu & Culotta, 1994; Lapinskas *et al.*, 1995; Lin & Culotta, 1995). Como nós estudamos o envolvimento da homeostase de ferro em condições de estresse oxidativo dada pela mutação *sod1Δ*, resolvemos verificar os níveis intracelulares de ferro, bem como de cobre, manganês e zinco, nos mutantes *sod1Δ* e nos duplos mutantes *sod1Δ/fet3Δ* sob crescimento em meio SD.

Os dados apresentados na Figura 8A mostram que o conteúdo intracelular de ferro nos mutantes *sod1Δ* e *sod1Δ/fet3Δ* é duas vezes superior ao das células selvagens. Os mutantes *fet3Δ* apresentam níveis de ferro inferiores aos das células selvagens, o que já havíamos observado anteriormente na Figura 6A. Assim, os níveis aumentados de ferro no mutante duplo *sod1Δ/fet3Δ* parecem ser determinado pela mutação *sod1Δ*.

Estes dados corroboram a ideia de que os mutantes *sod1Δ* parecem requerer ferro. Como consequência disso, é possível que estas células mutantes apresentem uma alteração no metabolismo de ferro.

Nas condições de crescimento em meio SD a captação de ferro parece ser feita preferencialmente pela Fet3p/Ftr1p, uma vez que, a concentração de ferro calculada é aproximadamente 2 μ M. Em meio rico (por exemplo YPD) a captação de ferro é feita pelo sistema de baixa afinidade, Fet4p (Hasset *et al.*, 1998). Isto sugere que Fet3p/Ftr1p podem estar sendo responsável pelo aumento dos níveis intracelulares de ferro nos mutantes *sod1* Δ .

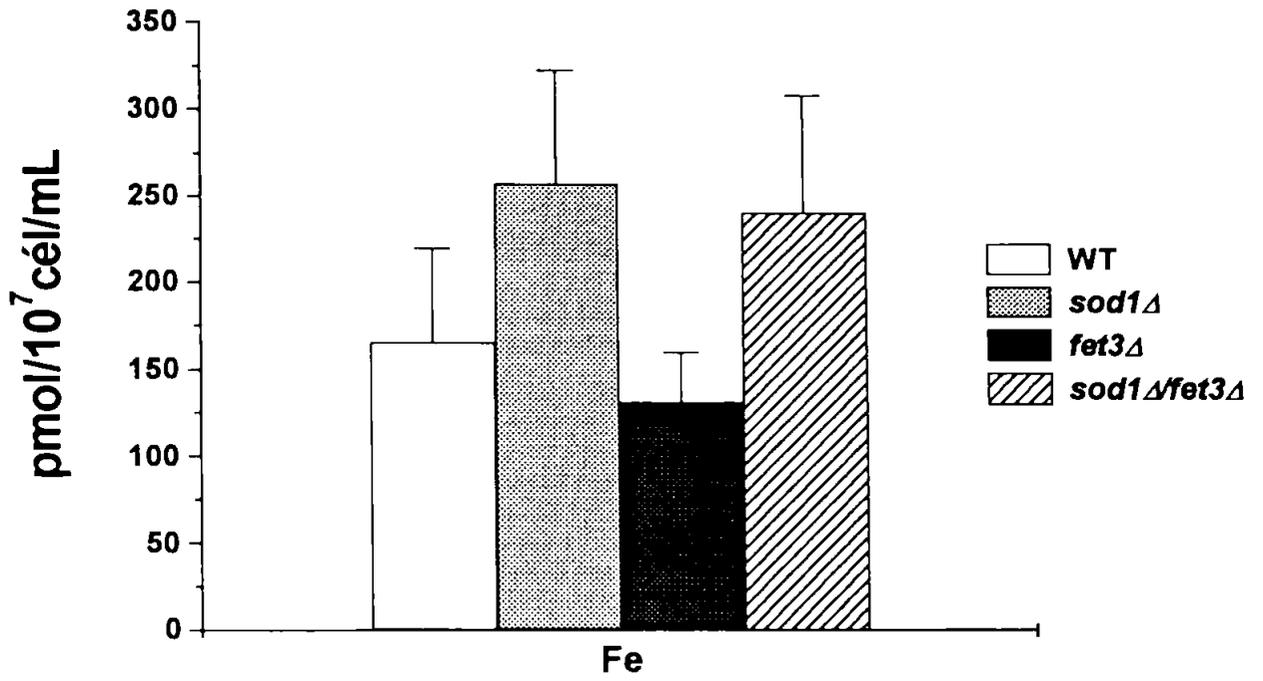
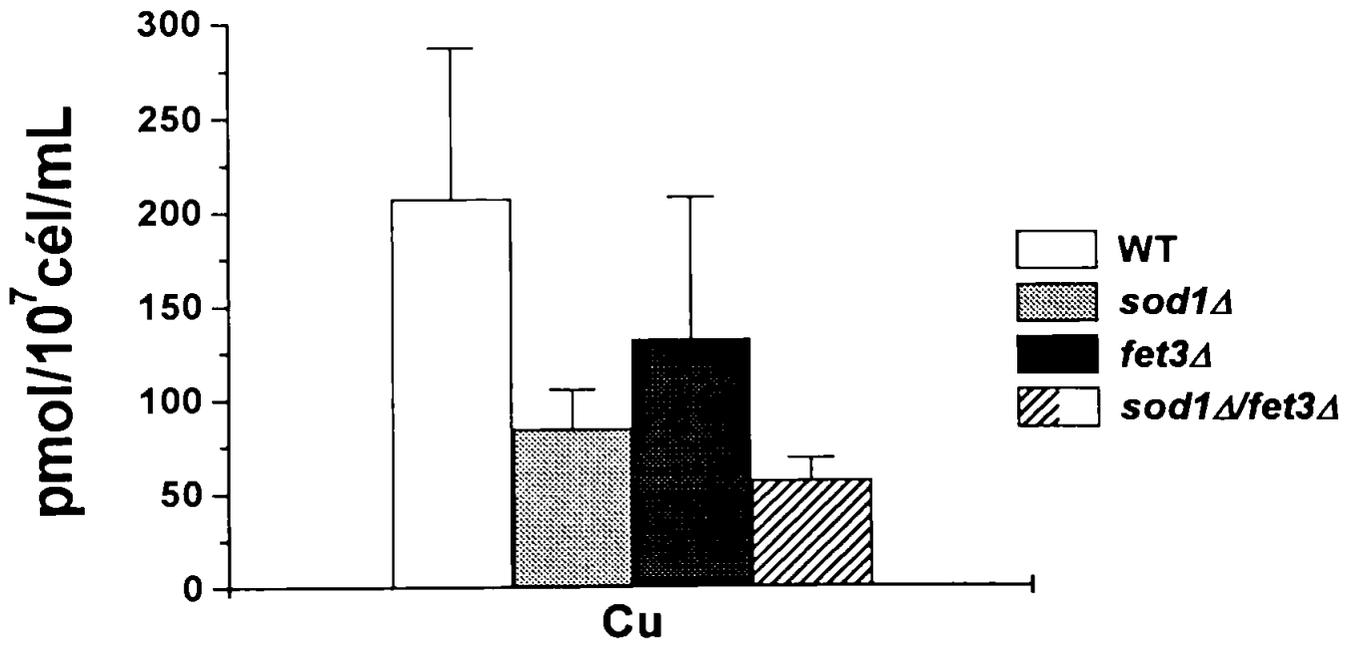
A Figura 8B mostra que os níveis de cobre nos mutantes *sod1* Δ , *fet3* Δ e *sod1* Δ /*fet3* Δ são inferiores aos das células selvagens. Estes dados estão de acordo com os apresentados na Figura 6B.

Na Figura 8C podemos observar que o conteúdo total de manganês é relativamente alto no mutante *fet3* Δ , e está diminuído no mutante duplo *sod1* Δ /*fet3* Δ . A razão para isto também não é clara. Nos mutantes *sod1* Δ , os níveis intracelulares de manganês são iguais aos das células selvagem, o que representa um controle interno de que estas células não desenvolveram mutações em *PMR1*. O acúmulo de manganês suprimiria a mutação *sod1* Δ (Lapinskas *et al.*, 1995).

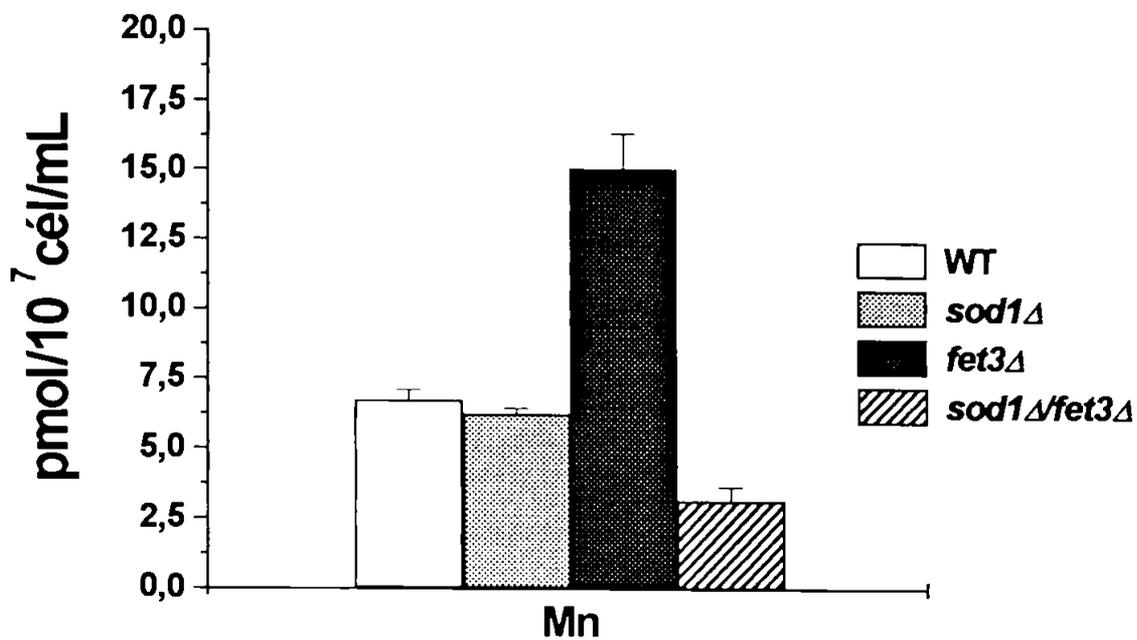
A Figura 8D mostra que os níveis intracelulares de zinco também estão aumentados tanto nos mutantes *sod1* Δ como nos duplos mutantes *sod1* Δ /*fet3* Δ . A razão para este fato é desconhecida, embora haja indícios de que zinco tenha um papel antioxidante por proteger grupos sulfidrila de

proteínas contra ação de ROS. Por outro lado, há evidências de que zinco compete com ferro na ligação a biomoléculas, onde o ferro teria um papel em oxidação-redução, o que normalmente leva a geração de radicais de oxigênio. Como zinco não participa desse processo de oxidação-redução a sua competição com ferro por biomoléculas leva a diminuição da geração de ROS (Bray & Bettger, 1990).

Confirmando os dados apresentados na Figura 8A, a Figura 9 mostra que o acúmulo de ^{55}Fe durante o crescimento na linhagem mutante *sod1* Δ é duas vezes maior ao observado na linhagem selvagem (*WT*).

A**B**

C



D

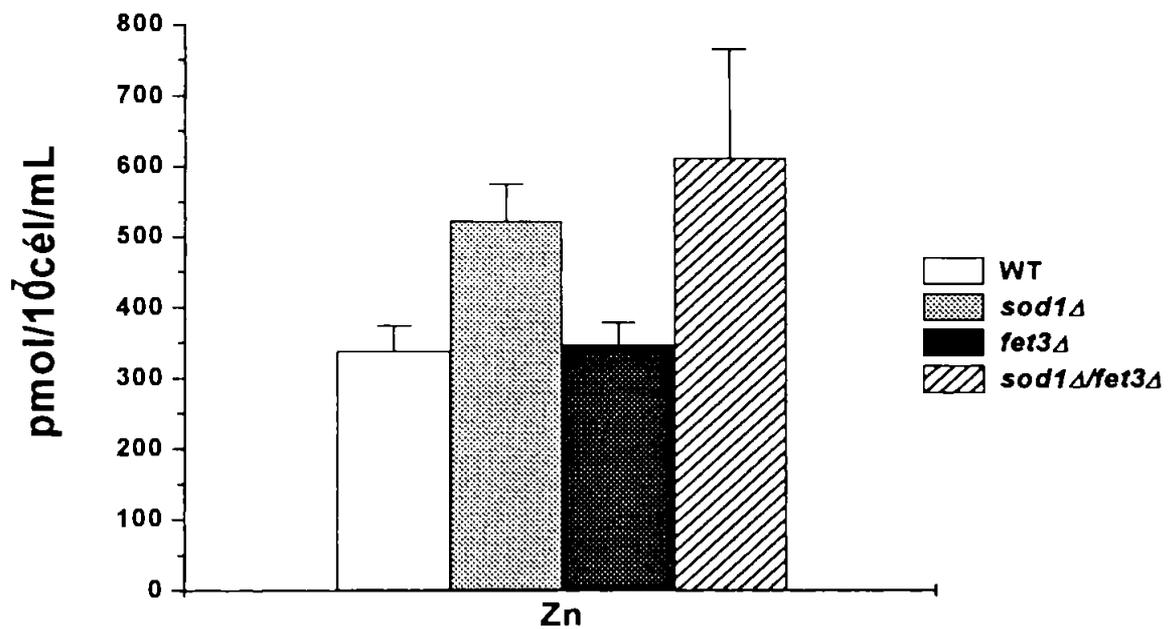


Figure 8 – Conteúdo intracelular total de Fe, Cu, Mn e Zn em culturas de células em SD. Células foram crescidas em SD sob alta aeração, coletadas, lisadas e submetido a análise do conteúdo total de Fe, Cu, Mn e Zn por espectroscopia de plasma acoplado (Mat e Mét., ítem 2.11). As barras representam o desvio padrão de 4 experimentos independentes.

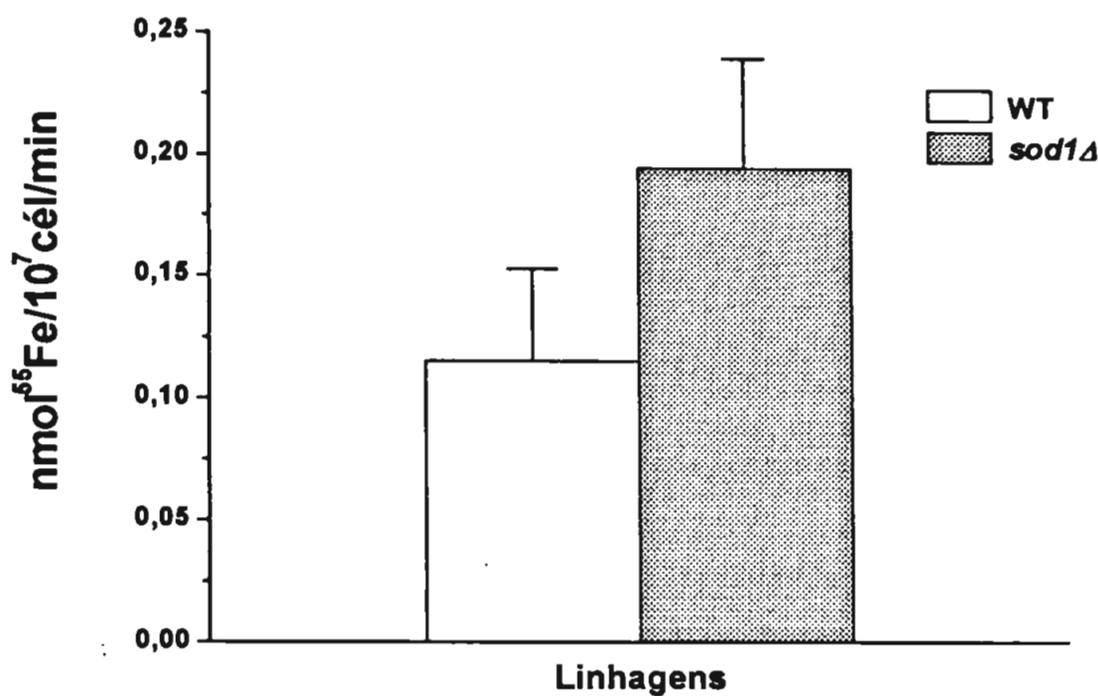


Figure 9 – O acúmulo de ⁵⁵Ferro intracelular nos mutantes *sod1Δ* é superior ao das células selvagens durante o crescimento em SD. Células pré-cultivadas em SD sob baixa aeração foram transferidas para o meio LIM fresco contendo 5 μM de ⁵⁵Fe e crescidas à 30 °C com agitação de 200 rpm por 18 horas. Após cultivo, alíquotas das culturas foram retiradas para medida de densidade óptica e foi feita uma coleta das células através de filtros de vidro para medida da radioatividade incorporada nas células (Mat. e Mét., item 2.13). As barras representam o desvio padrão de 4 experimentos independentes.

3.1.7. – Os mutantes *sod1Δ* apresentam aumento dos níveis de transcrição do gene *FET3* e da atividade de *Fet3p*.

Os resultados apresentados acima mostram que os níveis intracelulares de íons de ferro estão aumentados nos mutantes *sod1Δ*. Isto sugere que um dos transportadores de ferro de membrana plasmática poderia estar sendo superexpressos nesse mutante.

Na Figura 10A, nós podemos observar que os níveis de RNA mensageiro (RNAm) do gene *FET3* estão três vezes aumentados nas células mutantes *sod1Δ* quando comparados aos das células selvagens (*WT*). Os níveis de RNAm do gene *FET4* tanto nas células selvagens quanto nos mutantes *sod1Δ* permanecem iguais (dados não apresentados).

De acordo com esses resultados, a Figura 10B mostra que os níveis de atividade de β -galactosidade em células mutantes e selvagens expressando o gene *lacZ* sob controle do promotor do gene *FET3* são duas vezes maiores nos mutantes *sod1Δ*. Ainda, corroborando os dados acima, a Figura 10C mostra que a captação de Fe III pelas células mutantes *sod1Δ* ocorre numa velocidade 2 vezes maior do que nas células selvagens.

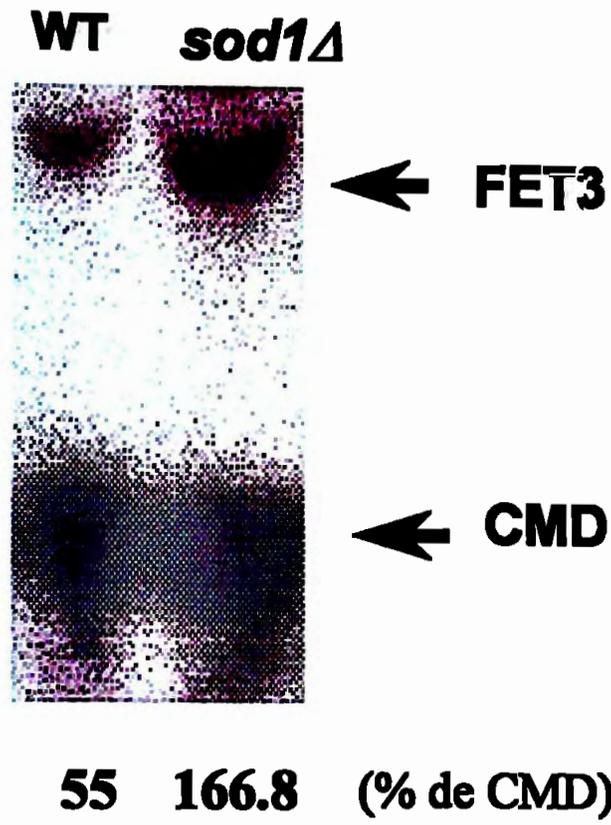
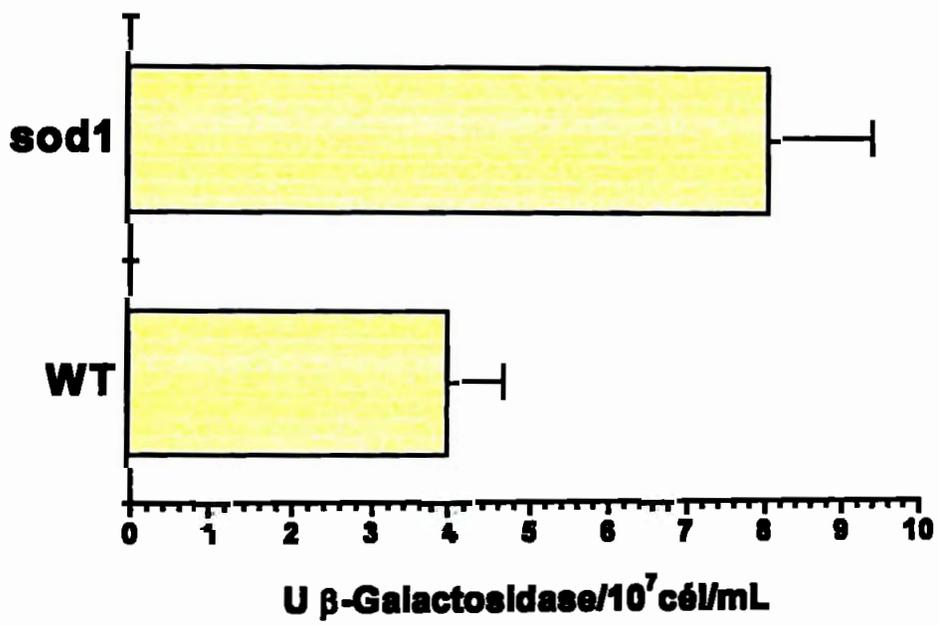
A Figura 11 mostra que os níveis de transcrição do gene *FET3* estão aumentados nos mutantes *sod1Δ* durante o crescimento observado. Os

níveis de transcrição de *FET3* são maiores para ambas células às 20 horas de cultivo.

Essa é a primeira evidência de que o metabolismo de ferro está alterado em condições de estresse oxidativo em eucariotos inferiores. Grande parte dos trabalhos de literatura vêm descrevendo o efeito tóxico dado pela presença de íons de ferro em condições de estresse oxidativo (Fridovich, 1995, 1997). No entanto, um trabalho recente do grupo do Dr. Fridovich mostra que tratamento de bactérias mutantes *sodA* com íons de ferro recupera o crescimento dessas células, além de protegê-las contra drogas geradoras do radical O_2^- . Neste trabalho, os autores demonstram que o tratamento desses mutantes com ferro leva a reativação de enzimas que contém *cluster Fe-S*, que haviam sido anteriormente inativadas pelo radical superóxido (Benov & Fridovich, 1998). Essa foi a primeira evidência de que ferro poderia ser requerido em situações de estresse oxidativo causado pelo aumento dos níveis de superóxido.

Em levedura, estudos mostram inativação de aconitase citoplasmática por tratamento com *paraquat* (gerador de radical O_2^-) (Murakami & Yoshino). Dados do laboratório da Dra. Joan Valentine mostram que os mutantes *sod1Δ* apresentam níveis relativamente baixos de atividade de aconitase citoplasmática comparados aos das células selvagens. Todavia, esses níveis de atividade de aconitase são aumentados com a adição de 1mM de $FeCl_3$ ao extrato celular dos mutantes *sod1Δ*.

Nossos resultados mostram que linhagens de *S. cerevisiae* mutantes em *Cu/Zn-SOD*, de alguma forma, desenvolvem um mecanismo de ativação da transcrição do gene *FET3*, que conseqüentemente leva ao aumento da captação de ferro. Nós, sugerimos que os mutantes *sod1Δ* possivelmente requerem e importam níveis altos de ferro para reparar danos causados nos *clusters Fe-S* pelo radical superóxido.

A**B**

C

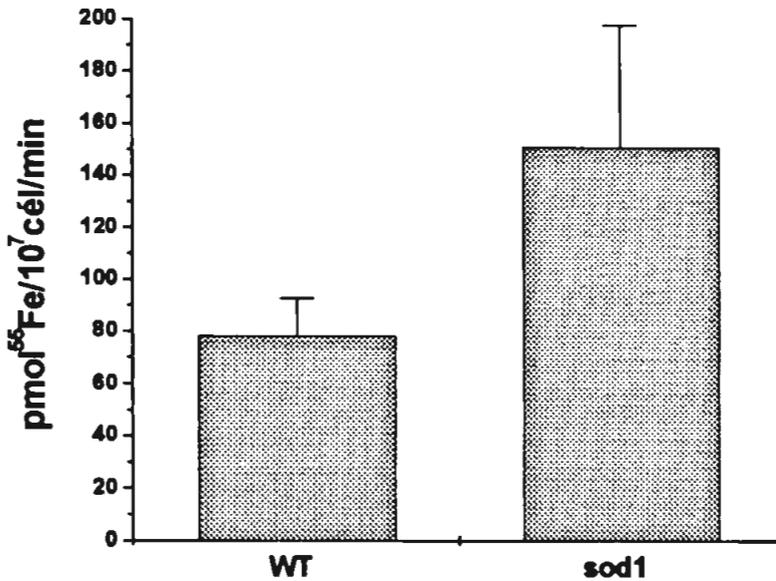


Figura 10 – Os níveis de transcrição do gene *FET3* e a captação de ferro estão aumentados nos mutantes *sod1Δ*. As células mutantes (*sod1Δ*) e selvagens (*WT*) foram crescidas em meio mínimo, à 30 °C, 200 rpm, durante 18 horas. Em seguida: (A) o RNA total foi extraído e hibridizado com sondas para os genes *FET3* e *CMD* marcadas radioativamente, para o ensaio de proteção por S1 nuclease (Mat. e Mét., item 2.9). A imagem e a quantificação foram obtidas através de Phosphor-Imager. Em (B), as células foram lisadas para medida da atividade de β-galactosidase (Mat. e Mét., item 2.7). O desvio padrão representa os dados em duplicata de um experimento representativo. Em (C), as células foram lavadas com 10 mM de EDTA e água, em seguida foram ressuspensas no tampão do ensaio de captação de ferro, contendo 5 μM de ⁵⁵Fe. Em diferentes tempos, amostras foram coletadas e submetidas à contagem de radioatividade (Mat. e Mét., item 2.13). O desvio padrão representa dois experimentos independentes.

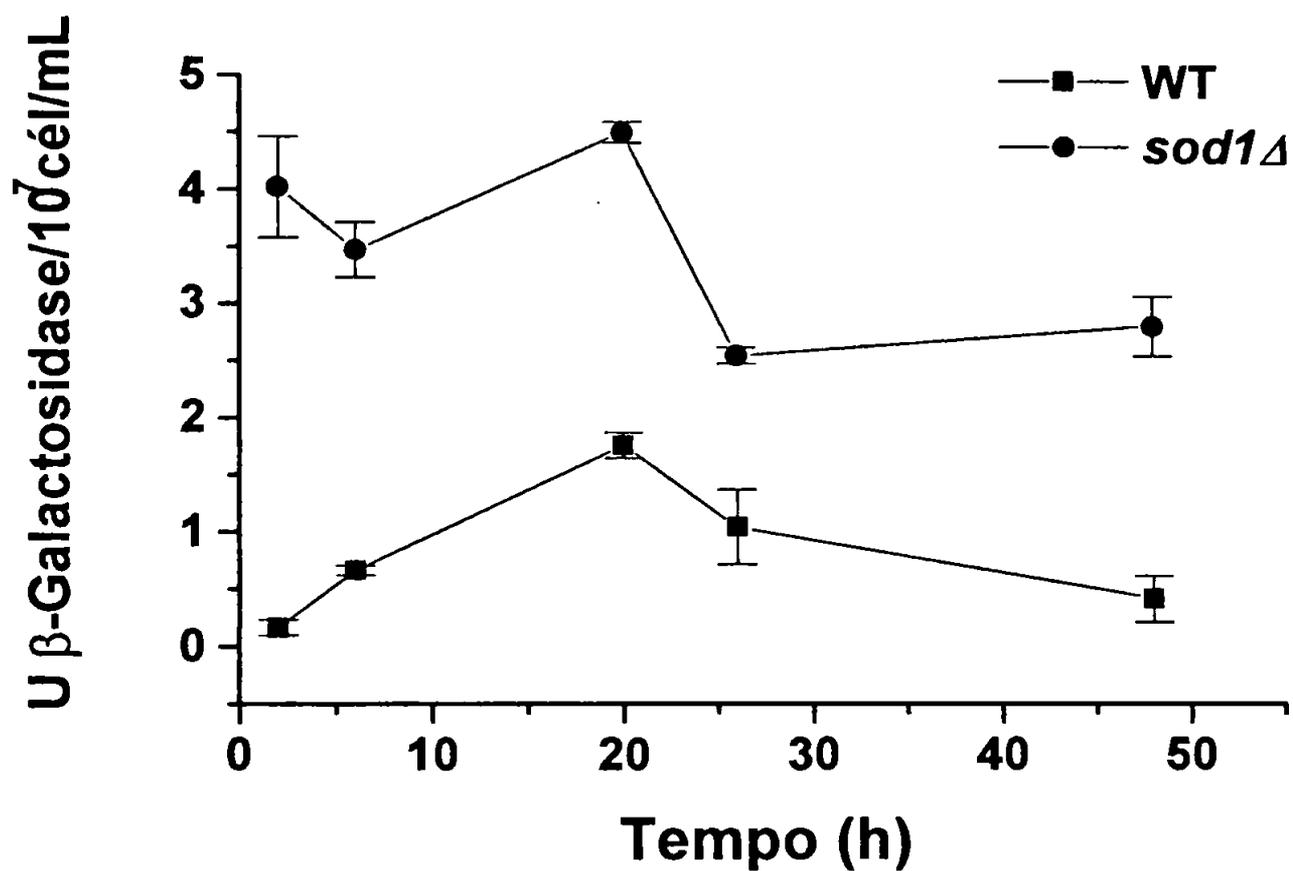


Figura 11 – Os níveis de transcrição do gene *FET3* nos mutantes *sod1Δ* durante o crescimento. As células mutantes (*sod1Δ*) e selvagens (*WT*) foram crescidas em meio mínimo (SD-Ura), à 30 °C, 200 rpm, durante 48 horas. Em seguida, as células foram lisadas para medida da atividade de β-galactosidase (Mat. e Mét., ítem 2.7). O desvio padrão representa os dados em duplicata de um experimento representativo.

3.1.8. – Os mutantes *sod1Δ/fet3Δ* apresentam aumento dos níveis de transcrição do gene *FET4*.

De acordo com os dados apresentados na Figura 8A os mutantes *sod1Δ/fet3Δ* apresentam um conteúdo intracelular de ferro duas vezes mais alto, quando comparado ao mutante *fet3Δ*.

Dados recentes da literatura mostram que os mutantes *fet3Δ* apresentam aumento da atividade do gene *FET4*, principalmente quando há suplementação de metais como cobalto, cobre, zinco e manganês ao meio de cultura (Li & Kaplan, 1998). *FET4* codifica para uma proteína que é responsável pelo transporte de ferro de baixa afinidade, e também transporta Co, Cu, Zn, Mn e Cd (Dix et al., 1997; Li & Kaplan, 1998).

Assim, nós resolvemos observar se a expressão do gene *FET4* estaria alterada nos mutantes *sod1Δ/fet3Δ*.

De fato, os resultados apresentados na Figura 12 mostram que os níveis de RNAm do gene *FET4* estão duas vezes aumentados nos mutantes duplos *sod1Δ/fet3Δ*. Em nossas condições de trabalho, os níveis de RNAm do gene *FET4* permaneceram inalterados nos mutantes *fet3Δ* (dados não apresentados).

Estes dados estão de acordo com a idéia de que os mutantes *sod1Δ* requerem ferro. Os níveis aumentados de ferro apresentados pelos mutantes

duplos *sod1* Δ *fet3* Δ podem resultar da superexpressão do gene *FET4* nessas células.

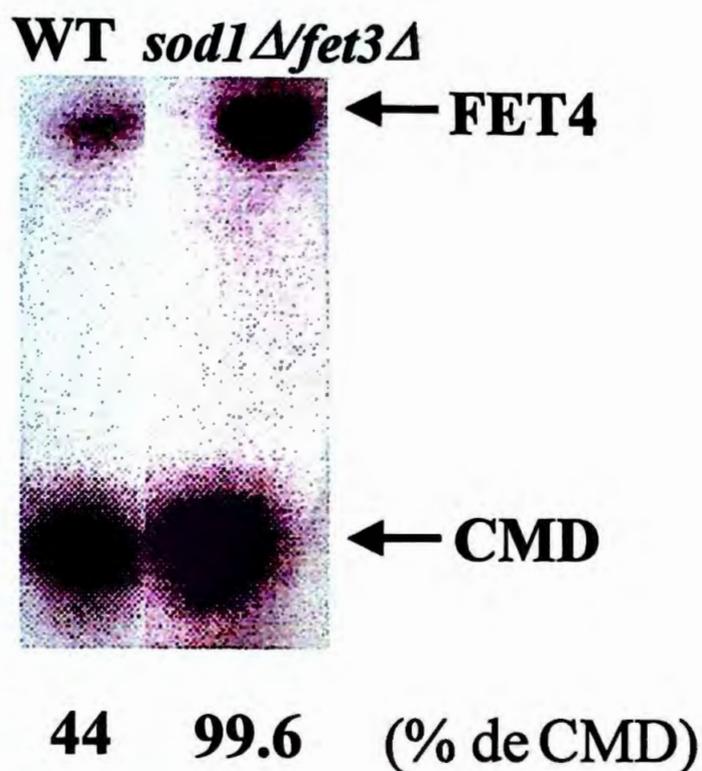


Figura 12 – Os níveis de RNAm do gene *FET4* estão aumentados nos **mutantes *sod1Δ/fet3Δ***. As células mutantes (*sod1Δ/fet3Δ*) e selvagens (*WT*) foram crescidas em meio mínimo, à 30 °C, 200 rpm, durante 18 horas. Em seguida, o RNA total foi extraído e hibridizado com sondas para os genes *FET4* e *CMD* marcadas radioativamente, para o ensaio de proteção por S1 nuclease (Mat. e Mét., ítem 2.9). A imagem e a quantificação foram obtidas através de Phosphor-Imager.

3.1.9. – *Os mutantes sod1Δ/coq3Δ apresentam níveis aumentados de transporte de ferro durante todo o crescimento*

Os dados apresentados anteriormente nas Figuras 8A mostram que os mutantes *sod1Δ* e *sod1Δ/fet3Δ* apresentam níveis elevados de ferro. Isto nos levou a buscar informações sobre aumento no transporte de ferro pelo sistema Fet3p/Ftr1p, confirmado nas Figuras 10A/B/C e 11. Embora o motivo pelo qual essas células desenvolvem esse mecanismo não esteja completamente claro, as evidências sugerem que os mutantes *sod1Δ* possivelmente requerem ferro para reativar enzimas, inativadas pelo excesso de superóxido, uma vez que essas células não contêm a proteína responsável pela dismutação dessa ROS.

Dados de literatura mostram que a eliminação da principal fonte geradora de superóxido, a cadeia respiratória, alivia alguns dos defeitos apresentados pelos mutantes *sod1Δ* (Longo *et al.*, 1996). Assim, nós observamos os níveis intracelulares de ferro e zinco em linhagens deficientes em *Cu,Zn-SOD* e Coq3p (coenzima Q).

Os resultados apresentados na Figura 13 mostram que o conteúdo intracelular de ferro e zinco nos mutantes *sod1Δ/coq3Δ* também estão aumentados. Este dado é surpreendente e contraditório. Nós não temos uma explicação plausível para esta observação. É interessante a especulação de

que reações envolvendo oxido-redução intracelular, não somente na mitocôndria, apresentem uma contribuição importante na geração de radicais superóxido.

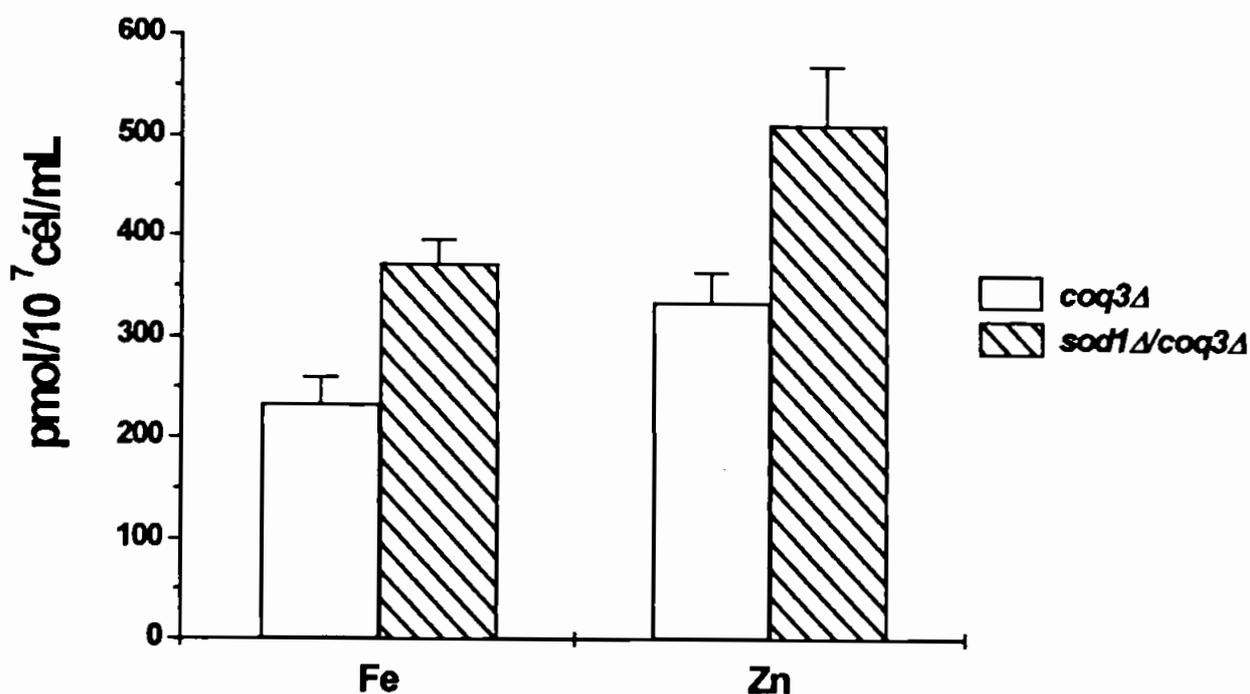


Figure 13 – O conteúdo intracelular total de Fe e Zn permanece alto em células mutantes *sod1Δ/coq3Δ* cultivadas em SD. Células pré-cultivadas em SD sob baixa aeração foram transferidas para o meio SD fresco e crescidas à 30 °C com agitação de 200 rpm por 18 horas. Após cultivo, as células foram lavadas 4 vezes com 1 mL de EDTA 10mM e 4 vezes com 1mL de água. O precipitado foi coletado, digerido e submetido a análise do conteúdo total de ferro, cobre, manganês e zinco por espectroscopia de plasma acoplado (Mat e Mét., item 2.11). As barras representam o desvio padrão de 2 experimentos independentes.

3.1.10. – Células superexpressando *Cu,Zn-SOD* e *Mn-SOD* apresentam conteúdo de Fe, Cu, Mn e Zn semelhantes aos das células selvagens.

Os resultados apresentados anteriormente nas Figuras 8 e 10 mostram que os mutantes em *Cu,Zn-SOD* apresentam alteração na homeostase de ferro. Nesta etapa do trabalho, nós resolvemos observar como estariam os níveis dos metais analisados na Figura 8 em células que superexpressam tanto a *Cu,Zn-SOD* quanto a *Mn-SOD*.

Essas células foram obtidas através da transformação de células selvagens (EG103) com plasmídeos contendo o gene da *SOD1* e *SOD1/SOD2* de levedura. Os níveis totais de *SOD* estão mostrados na Tabela IV. As células superexpressando *SOD1* e *SOD1/SOD2* apresentam atividade de *SOD* duas vezes superior a de células selvagens.

Tabela IV – Níveis de atividade de superóxido dismutase nas linhagens *WTSOD1* e *WTSOD1/2*

	U/mg de proteína de <i>SOD</i>
<i>WT</i>	19,9 ($\pm 4,8$)
<i>WTSOD1</i>	40,19 ($\pm 2,9$)
<i>WTSOD1/2</i>	44,52 ($\pm 3,51$)

Colônias de células em YPD foram inoculadas em SD e cultivadas à 30 °C, 200 rpm, durante 20 horas; em seguida, as células foram coletadas por centrifugação e o extrato celular foi obtido para dosagem de superóxido dismutase total (Mat. e Mét. item 2.10). Os dados foram normalizados pela quantidade de proteína total do extrato celular. O desvio padrão em parênteses representa a media de 3 experimento independentes.

Os dados mostrados na Figura 14 mostram o conteúdo total intracelular de ferro, cobre, manganês e zinco das células superexpressando *SOD*. Nós podemos observar que os níveis desses metais permanecem iguais aos das células selvagem. Isto sugere que o excesso de superóxido dismutase, não implica na diminuição dos níveis intracelulares de metais. O efeito observado pela falta de *Cu,Zn-SOD* nos mutantes não é inverso em células apresentando excesso de *Cu,Zn-SOD*.

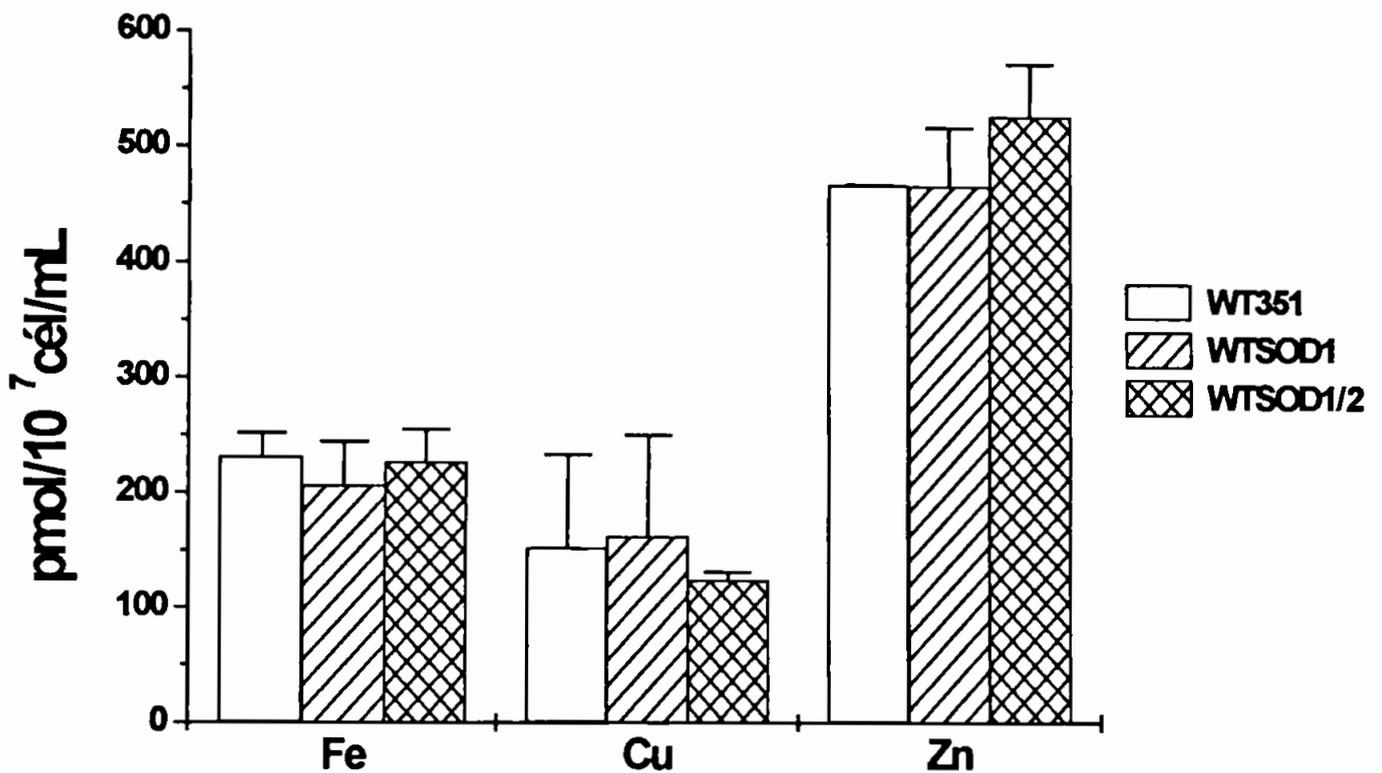


Figure 14 – O conteúdo intracelular total de Fe, Cu e Zn em células superexpressando SOD Células pré-cultivadas em SD sob alta aeração foram transferidas para o meio SD fresco e crescidas à 30 °C com agitação de 200 rpm por 20 horas. Após cultivo, as células foram lavadas 4 vezes com 1mL de EDTA 10mM e 4 vezes com 1mL de água. O precipitado foi coletado, digerido e submetido a análise do conteúdo total de ferro, cobre, manganês e zinco por espectroscopia de plasma acoplado (Mat e Mét., ítem 2.11). As barras representam o desvio padrão de 2 experimentos independentes.

4. DISCUSSÃO GERAL

A reação de Fenton (Equação IV) foi um achado de extrema importância, pois evidencia o envolvimento de metais de transição na catálise e formação de radicais livres de oxigênio (ROS). Os íons de ferro e cobre estão intimamente relacionados à formação de ROS. Embora, o ferro seja mais abundante na natureza, evidências mostram que o cobre é mais reativo que ferro na reação de Fenton (Halliwell & Gutteridge, 1984).

Os metais de transição, por outro lado, podem reagir com radicais de oxigênio, como por exemplo o superóxido, e catalisar a sua dismutação. As Equação II e III mostram que, íons de ferro podem ser reduzidos ou oxidados por superóxido. Tendo como base a oxidação do ferro por superóxido, dados de literatura mostram que o radical superóxido reage com ferro de grupos prostéticos de enzimas, apresentando 4 íons de ferro ligados à 4 enxofres (*clusters Fe-S*), numa velocidade extremamente alta (10^8 a 10^9 $M^{-1}s^{-1}$) (Liochev & Fridovich, 1994). Neste caso, superóxido oxida um dos ferros dos *clusters Fe-S* levando à formação H_2O_2 . O mecanismo pelo qual os *clusters Fe-S* são desestruturado é desconhecido, mas acredita-se que os íons de Fe (III) sejam ligados mais fortemente aos enxofres e o primeiro íon de ferro a se desligar dos *clusters Fe-S* é o Fe (II). A destruição dos *clusters Fe-S* leva à inativação reversível de enzimas que

contém esse grupo prostético. Assim, o principal dano causado por superóxido é inativação de uma série de enzimas que contém *clusters Fe-S*. Algumas dessas enzimas fazem parte do ciclo de Krebs e cadeia de transporte de elétrons, como é o caso da aconitase, desidratases, fumarase e complexo bc1, respectivamente (Fridovich, 1997).

O metabolismo de ferro é extremamente controlado nas células e organismos, uma vez que o aumento dos níveis de ferro “livre” leva a formação de radicais hidroxila (Equação IV), que sabidamente causa uma série de danos celulares (Meneghini, 1997). Por outro lado, o primeiro passo na proteção contra ROS é feito pela *SOD*, que mantém os níveis de superóxido baixos e, conseqüentemente protege os grupos *Fe-S clusters*, além de evitar a formação de radicais $\cdot\text{OH}$ via a reação de superóxido com esses *clusters* (Liochev & Fridovich, 1994).

Neste trabalho, nós mostramos que linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes em Cu/Zn-superóxido dismutase, e portanto, apresentando níveis aumentados do radical superóxido, de alguma forma adquirem a capacidade de captar níveis altos de ferro, via sistema de transporte de ferro de alta afinidade, composto pela função acoplada das proteínas Fet3p (Figuras 8A e 10A/B/C) e Ftr1p. Nós observamos que as linhagens mutantes *sod1Δ* requerem ferro para o crescimento respiratório (Figura 5) e que os duplos mutantes *sod1Δ/fet3Δ* são até mais sensíveis a oxigênio molecular que os mutantes *sod1Δ* (Figura 4B). Esses dados nos

levou a ideia de que essas células requerem ferro e que a oxidase Fet3p estaria envolvida. Essa é a primeira evidência de que uma situação de estresse induzida pela falta da *SOD* leva a uma alteração na homeostase de ferro. O mecanismo pelo qual os mutantes *sod1Δ* utilizam para captar níveis altos de ferro via Fet3p é completamente desconhecido. Nós podemos especular que o fator de transcrição Aft1p, responsável pela ativação do gene *FET3*, poderia estar sendo afetado pelo aumento dos níveis de superóxido nos mutantes *sod1Δ*. Evidências mostram que Aft1p é ativado por concentrações altas de oxigênio e por quelantes de metais, e isto sugere a presença de metais na proteína (Hasset *et al.*, 1998).

Nós estamos propondo que mutantes *sod1Δ* adquirem a capacidade de captar níveis mais altos de ferro para reativar as enzimas que contêm *clusters Fe-S*, inativadas pelo excesso de radical superóxido (vide Figura 14). A inativação de enzimas do ciclo de Krebs e cadeia respiratória levaria a diminuição da produção de ATP e conseqüentemente do metabolismo e divisão celular. Além do mais, reações entre ferro “livre” e radicais superóxido algumas vezes leva a dismutação deste radical para oxigênio (Equação II), o que é um mecanismo antioxidante. Coincidência ou não, o ferro transportado via Fet3p/Ftr1p é o Fe III, o substrato da reação mencionada acima. Assim, a idéia de que o aumento da concentração de

ferro em células mutantes *sod1Δ* parece trazer algumas vantagens para sobrevivência dessas células é pertinente.

Modelo

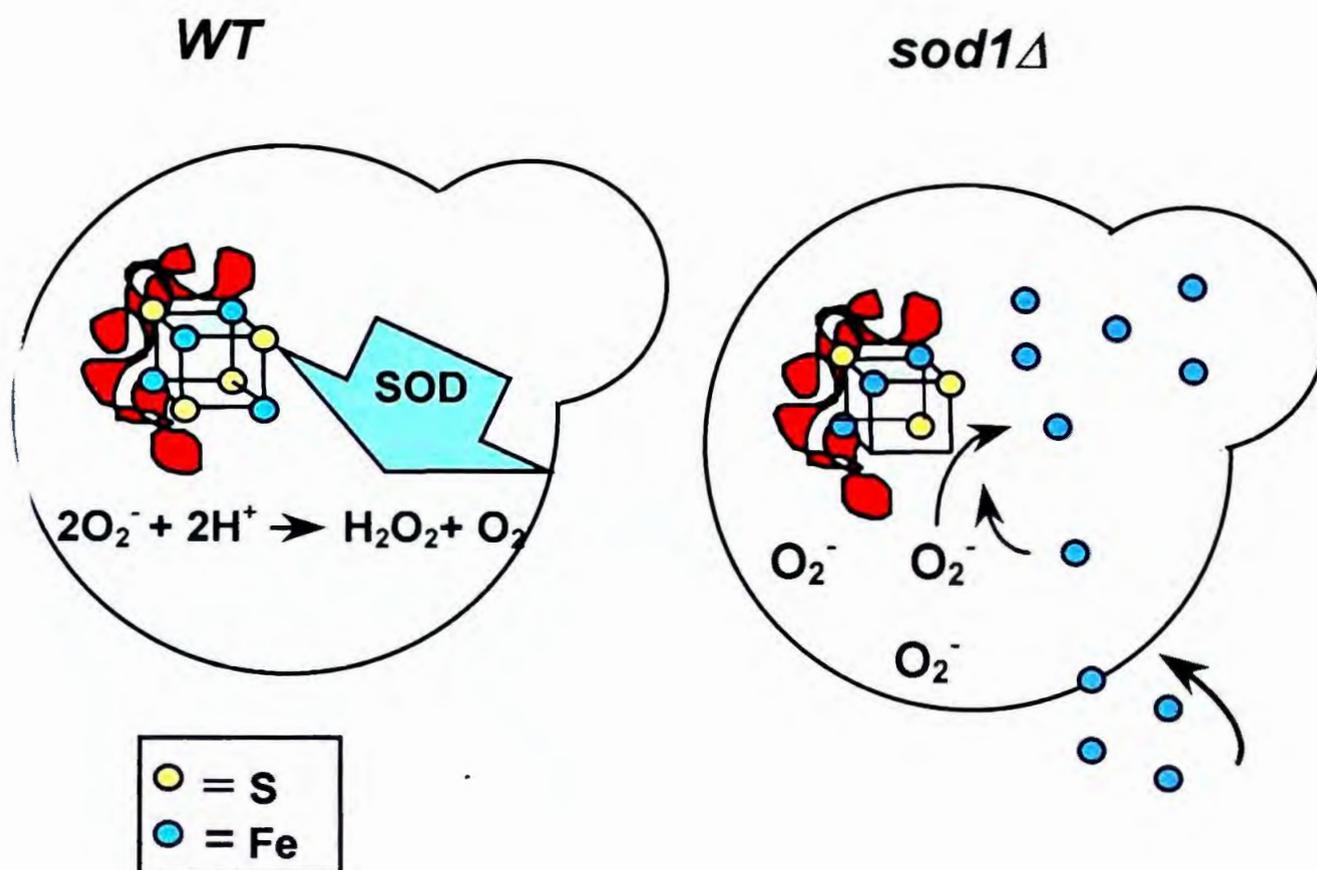


Figura 15 – Células deficientes em *Cu,Zn-SOD* exibem alteração no **metabolismo de ferro**. Nossos dados mostram que os mutantes *sod1Δ* apresentam aumento do transporte de ferro. Nós propomos que esses mutantes adquirem a capacidade de transportar altos níveis de ferro para reconstituir *cluster Fe-S* e reativar enzimas. Nas células selvagens (*WT*) a *SOD* protege os *clusters Fe-S* por diminuir os níveis de O_2^- . Nos mutantes *sod1Δ* os íons de ferro estariam sendo continuamente mobilizados pela presença de altos níveis de superóxido.

5. SUMMARY

Superoxide dismutase (*SOD*) has a protective role against oxygen toxicity to remove superoxide radicals (O_2^-) through its dismutation to hydrogen peroxide and oxygen. Yeast contains two intracellular *SODs*, one containing manganese and the other copper and zinc in their active sites. *Saccharomyces cerevisiae* lacking *Cu,Zn-SOD* shows a serie of metabolic defects associated with increased levels of O_2^- . A superoxide specific damage is the release of iron from iron-sulfur clusters-containing enzymes, which lead to an inactivation of these enzymes. Since, Fe (II) and H_2O_2 are released from oxidized clusters, this process can favor hydroxyl radical ($^{\bullet}OH$) production in the Fenton reaction. $^{\bullet}OH$ radical is a very reactive radical that causes damage to proteins, lipids and DNA. In this work, we observed an alteration in the iron metabolism in yeast cells lacking *Cu,Zn-SOD*. Our results show a) Increased total intracellular iron content in *sod1Δ* strains; b) High levels of *FET3* gene transcripts in the mutants (*FET3* encodes a high affinity iron uptake cell membrane protein); c) Increased iron transport in the cell membrane in *sod1Δ* strains. This is the first evidence of an alteration in iron metabolism under *SOD* deficiency. We propose that *sod1Δ* mutants show increased iron uptake as a cells' effort to reactivate iron sulfur-containing enzymes.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Subsidiária de São Paulo

6. BIBLIOGRAFIA

Askwith, C.; D. Eide; A. Van Ho; P. S. Bernard; L. Li; S. Davis-Kaplan; D. M. Sipe & J. Kaplan. (1994). The *FET3* gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell*. 76, 403-410.

Benov, L. & I. Fridovich. (1998). Growth in iron-enriched medium partially compensates *Escherichia coli* for the lack of manganese and iron superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 273, 10313-10316.

Berlett, B. S. & E. R. Stadtman. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313-20316.

Bertoncini, C. R. A. & R. Meneghini. (1995). DNA strand breaks produced by oxidative stress in mammalian cells exhibit 3'-phosphoglycolate termini. *Nuc. Ac. Res.* 23, 2995-3002.

Blin, N. & D. W. Stafford. (1976). Isolation of high molecular-weight DNA. *Nucleic Acids Res.* 3, 2303.

Bray, T. M. & W. J. Bettger. (1990). The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Rad. Biol & Med.* 8, 281-291.

Chang, E. C. & D. J. Kosman. (1989). Intracellular Mn (II)-associated with superoxide scavenging activity protects Cu,Zn superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* against dioxygen stress. *J. Biol. Chem.* 264, 12172-12178.

Chang, E. C. & D. J. Kosman. (1990). O₂-dependent methionine auxotrophy in Cu,Zn-superoxide dismutase deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 172, 1840-1845.

Crapo, J. D.; J. M. McCord & I. Fridovich. (1978). Preparation and assay of superoxide dismutase. *Methods Enzymol.* 53, 382-393.

Dancis, A.; R. D. Klausner; A. G. Hinnebusch & J. G. Barriocanal. (1990). Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10, 2294-2301.

- Dancis, A.; D. G. Roman; G. J. Anderson; A. G. Hinnebusch & R. D. Klausner. (1992). Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 3869-3873.
- De Silva, D.; C. C. Askwith, D. Eide & J. Kaplan. (1995). The *FET3* gene product, required for high affinity iron transport, is a cell surface ferroxidase. *J. Biol. Chem.* 270, 1098-1101.
- De Silva, D.; C. C. Askwith & J. Kaplan. (1996). Molecular Mechanisms of iron uptake in eukaryotes. *Physiol. Rev.* 76, 31-47.
- De Silva, D.; S. D-Kaplan; J. Fergestad & J. Kaplan. (1997). Purification and characterization of Fet3 protein, a yeast homologue to ceruloplasmin. *J. Biol. Chem.* 272, 14208-14213.
- Dix, D.; J. Bridgham, M. Broderius & D. Eide. (1997). Characterization of the *FET4* protein of yeast. *J. Biol. Chem.* 272, 11770-11777.
- Elble. (1992). A simple efficient procedure for transformation of yeast. *BioTechniques.* 13, 18.

- Fenton, H. J. H. (1894). Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J. Chem. Soc.* 65, 899-910.
- Flint, D. H.; Tuminello, J. F. & M. H. Emptage. (1993). The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J. Biol. Chem.* 268, 22369-22376.
- Fridovich, I. (1978). The Biology of Oxygen Radicals. *Science.* 201, 875-880.
- Fridovich, I (1984). Overview: Biological sources of O_2^- . *Methods in Enzymology.* Vol 105. pp 59-61.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.* 64, 97-112.
- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* 272, 18515-18517.

Fu, D.; T. J. Beeler & T. M. Dunn. (1995). Sequence, mapping and disruption of CCC2, a gene that cross-complements the Ca(2+)-sensitive phenotype of *csg1* mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu (2+)-ATPase subfamily. *Yeast*. 11, 283-292.

Gardner, P. R. & I. Fridovich. (1991). Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *J. Biol. Chem.* 266, 1478-1483.

Gardner, P. R.; I. Raineri; L. B. Epstein & C. W. White. (1995). Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 270, 13399-13405.

Georgatson, E. & D. Alexandraki. (1994). Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3065-3073.

Graden, J. A. & D. R. Winge. (1997). Copper-mediated repression of the activation domain in the yeast Mac1p transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 5550-5555.

- Gralla, E. B. & J. S. Valentine. (1991). Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu,Zn-superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *J. Bacteriol.* 173, 5918-5920.
- Gralla, E. B. (1997). Superoxide Dismutase: Studies in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In Oxidative stress and the molecular Biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbor Lab. Press. Cold Spring Harbor. pp. 495.
- Haber, F & J. Weiss. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. London Ser. A* 47, 332.
- Hageman, J. J.; A. Bast & N. P. E. Vermeulen. (1992). Monitoring of oxidative free radical damage in vivo: analytical aspects. *Chem. Biol. Interactions.* 82, 243-293.
- Halliwell, B. & J. Gutteridge. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1-14.
- Hasset, R. F.; A. M. Romeo & D. J. Kosman. (1998). Regulation of high affinity iron uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 7628-7636.

- Henle, E. S. & S. Linn. (1997). Formation, prevention, and repair of DNA damage by Iron/hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 272, 19095-19098.
- Iyer, V. & K. Struhl. (1996). Absolute mRNA levels and transcriptional initiation rates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 5208-5212.
- Kaplan, J. & T. V. O'Halloran. (1996). Iron metabolism in eucaryotes: Mars and Venus at it again. *Science.* 271, 1510-1511.
- Keyer, K. & J. A. Imlay.(1996). Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 13635-13640.
- Kim, H.; D. Xia; C-A Yu; J/Z Xia; A. M. Kachurin; L. Zhang; L. Yu & J. Deisenhofer. (1998). inhibitor binding changes domain mobility in the iron-sulfur protein of the mitochondrial bc1 complex from bovine heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 8026-8033.
- Kuo, C. F.; Mashino, T. & I. Fridovich. (1987). α,β -Dihydroxyisovalerate dehydratase. *J. Biol. Chem.* 262, 4724-4727.

- Lapinskas, P. J.; K. W. Cunningham, X. F. Liu, G. R. Fink & V. C. Culotta. (1995). Mutations in PMR1 suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1382-1388.
- Liao, Z.; W. Liu; J. Liu; Y. Jiang; J. Shi & C. Liu. (1994). A study on superoxide dismutase activity on some model compounds. *J. Inorg. Biochem.* 55, 165-174.
- Li, L. & J. Kaplan. (1998). Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity due to the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. *J. Biol. Chem.* 273, 22181-22187.
- Lin, S-J & V. C. Culotta. (1995). The ATX1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 3784-3788.

- Lin, S-J; R. A. Pufahl; A. Dancis; T. V. O'Halloran & V. C. Culotta. (1997). A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 gene in copper trafficking and iron transport. *J. Biol. Chem.* 272, 9215-9220.
- Liochev, S. I. & I. Fridovich. (1994). The role of O_2^- in production of HO^\cdot : *in vitro* and *in vivo*. *Free Rad. Biol. Med.* 16, 29-33.
- Liu, X. F.; I. Elashvili; E. Gralla; J. Valentine; P. Lapinskas & V. C. Culotta. (1992). Yeast lacking superoxide dismutase: isolation of genetic suppressors. *J. Biol. Chem.* 267, 18298-18303.
- Liu, X. F. & V. C. Culotta. (1994). The requirement for yeast superoxide dismutase is bypassed through mutations in BSD2, a novel metal homeostasis gene. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7037-7045.
- Liu, X. F.; F. Supek; N. Nelson & V. C. Culotta. (1997). Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 Gene. *J. Biol. Chem.* 272, 11763-11769.

- Longo, V. D.; Gralla, E. B. & J. S. Valentine. (1996). Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271, 12275-12280.
- Lowry, O. H.; N. J. Rosebrough; A. L. Farr & R. J. Randall. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lyons, T. J.; H. Liu; J. J. Goto; A. Nersissian; J. A. Roe; J. A. Graden; C. Cafe; L. M. Ellerby; D. E. Bredesen; E. B. Gralla & J. S. Valentine. (1996). Mutations in copper—zinc superoxide dismutase that cause amyotrophic lateral sclerosis alter the zinc binding site and the redox behavior of the protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 12240-12244.
- Lyons, T. J.; E. B. Gralla & J. S. Valentine. (1999). Biological chemistry of copper-zinc superoxide dismutase and its link to amyotrophic lateral sclerosis. *Met. Ions Biol. Syst.* 36, 125-177.
- Mello-Filho, A. C.; M. E. Hoffmann & R. Meneghini. (1984). Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem. J.* 218, 273-275.

- Meneghini, R. (1997). Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Rad. Biol. Med.* 23, 783-792.
- Murakami, K. & M. Yoshino. (1997). Inactivation of aconitase in yeast exposed to oxidative stress. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 41, 481-486.
- Nascimento, A. L. T. O. & R. Meneghini. (1995). Cells transfected with transferrin receptor cDNA lacking the iron regulatory domain become more sensitive to the DNA-damaging action of oxidative stress. *Carcinogenesis.* 16, 1335-1338.
- Philpott, C. C.; J. Rashford; Y. Yamaguchi-Iwai; T. A. Rouault; A. Dancis & R. D. Klausner. (1998). Cell-cycle arrest and inhibition of G1 cyclin translation by iron in *AFT1^{UP}* yeast. *EMBO J.* 17, 5036-5036.
- Rose, M. & D. Botstein. (1983). Construction and use of gene fusions to lacZ (beta-galactosidase) that are expressed in yeast. *Methods Enzymol.* 101, 167-180.
- Rouault, T. A. & R. D. Klausner. (1996). Post-transcriptional regulation of genes of iron metabolism in mammalian cells. *JBIC.* 1, 494-499.

- Sherman, F. (1991). Getting started with yeast. *Methods enzymol.* 194, 3-21.
- Shin, D. Y.; K. Matsumoto; H. Iida; I. Uno & T. Ishikawa. (1987). Heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae* mutants altered in cyclic AMP-dependent protein phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 7, 244-250.
- Spizzo, T.; C. Byersdorfer; S. Duesterhoeft & D. Eide. (1997). The yeast *FET5* gene encodes a *FET3*-related multicopper oxidase implicated in iron transport. *Mol. Gen. Genet.* 256, 547-556.
- Strain, J.; C. R. Lorenz; J. Bode; S. Garland; G. A. Smolen; D. T. Ta; L. E. Vickery & V. C. Culotta. (1998). Suppressors of superoxide dismutase (*SOD1*) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly. *J. Biol. Chem.* 273, 31138-31144.
- Tamai, K. T.; E. B. Gralla; L. M. Ellerby; J. S. Valentine & D. J. Thiele. (1993). Yeast and mammalian metallothioneins functionally substitute for yeast copper-zinc superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 8013-8017.

Teixeira, H. D. & R. Meneghini. (1996). Chinese hamster fibroblasts overexpressing CuZn-superoxide dismutase undergo a global reduction in antioxidants and an increasing sensitivity of DNA to oxidative damage. *Biochem. J.* 315, 821-825.

Valentine, J. S.; L. D. Wertz; T. J. Lyons; L-L. Liu; J. J. Goto & E. B. Gralla. (1998). The dark side of dioxygen biochemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 253-262.

van Loon, a.; B. Pesold-Hart & G. Schatz. (1986). A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 3820-3824.

Yamaguchi-Iwai, Y.; R. Stearman, A. Dancis & R. D. Klausner. (1996). Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast. *EMBO J.* 15, 3377-3384.

Yim, M. B.; J-H Kang; H-S Yim; H-S Kwak; P. B. Chock & E. R. Stadtman. (1996). A gain-of-function of an amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn-superoxide dismutase mutant: An enhancement of free radical formation due to a decrease in K_m for hydrogen peroxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 5710-5714.

Yuan, D. S.; R. Stearman; A. Dancis; T. Dunn; T. Beeler & R. D. Klausner. (1995). The menkes/wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92. 2632-2636.

Wiedau-Pazos, M.; J. J. Goto; S. Rabizadeh; E. B. Gralla; J. A. Roe; M. K. Lee; J. S. Valentine & D. E. Brendensen. (1996). Altered reactivity of superoxide dismutase in Familial Amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 271, 515-518.

Wolff, S. P.; A. Garner & R. T. Dean. (1986). Free radicals, lipids and protein degradation. *TIBS.* 11, 27-31.