

## Acoplamento das unidades catalítica e regulatória do proteassomo e a funcionalidade mitocondrial em leveduras após mutações sítio-específicas na unidade catalítica do proteassomo

*Coupling between the proteasomal catalytic unit and the 19S regulatory unit affects mitochondrial functionality after site-specific mutations of the 20S particle*

Natália Mori Avellaneda Penatti<sup>1</sup>, Marilene Demasi<sup>2</sup>

Penatti NMA, Demasi M. Acoplamento das unidades catalítica e regulatória do proteassomo e a funcionalidade mitocondrial em leveduras após mutações sítio-específicas na unidade catalítica do proteassomo / *Coupling between the proteasomal catalytic unit and the 19S regulatory unit affects mitochondrial functionality after site-specific mutations of the 20S particle*. Rev Med (São Paulo). 2023 jan.-fev.;102(1 ed. esp.):e-204164.

**RESUMO:** Em leveduras da espécie *S. cerevisiae*, foi descrito uma modificação redox pós-traducional denominada S-glutationilação em resíduos Cys da subunidade  $\alpha 5$  da unidade catalítica 20S do proteassomo, especificamente o resíduo  $\alpha 5$ -C76, posteriormente mutada para  $\alpha 5$ -C76S. A linhagem carregando essa mutação apresentou como alteração fenotípica um menor tempo de vida cronológico (CLS: chronological life span) e uma maior frequência da conformação fechada da câmara catalítica da unidade 20S. Uma dupla mutação randômica na subunidade  $\alpha 5$  ( $\alpha 5$ -S35P/C221S) criou uma linhagem duplo-mutante (DM), a qual induziu a abertura da câmara catalítica do 20S e também aumentou o CLS da célula. O presente estudo teve como objetivo estudar o grau de acoplamento entre as unidades catalítica e regulatória do proteassomo nas linhagens de levedura (C76S, WT e DM), bem como avaliar a funcionalidade mitocondrial em todas elas. A análise do acoplamento foi feita com eletroforese em gel nativo. Para determinar a funcionalidade mitocondrial, foi medida a atividade da enzima citrato sintase a partir da reação entre DTNB e CoA-SH. Foi observado que na linhagem C76S com CLS reduzido havia um menor grau de acoplamento entre as unidades catalítica 20S e regulatória 19S, além de uma atividade mitocondrial diminuída. Portanto, um menor grau de acoplamento entre as unidades do proteassomo muito provavelmente provocou uma disfunção mitocondrial devido a um imporre de proteínas

mitocondriais defeituoso, resultando em uma CLS reduzida, fato que pode melhor elucidar a nossa compreensão acerca do processo de envelhecimento e da morte celular prematura vista em doenças degenerativas causadas por acumulação proteica.

**Palavras-chave:** Biologia redox; Mitocôndria; Proteassomo; Proteólise.

**ABSTRACT:** A post-translational redox modification called S-glutathionylation in *S. cerevisiae* was described at Cys residues of the  $\alpha 5$  subunit of the 20S catalytic unit of the proteasome, specifically  $\alpha 5$ -C76, posteriorly mutated to  $\alpha 5$ -C76S. The  $\alpha 5$ -C76S strain presented, as a phenotypic alteration, a higher frequency of the closed conformation of the catalytic chamber of the 20S unit and a shorter chronological life span (CLS: chronological life span). A double random mutation (DM: double mutated) in the  $\alpha 5$  subunit ( $\alpha 5$ -S35P/C221S) induced the opening of the catalytic chamber and also increased CLS. This project aimed to assess the coupling between the catalytic and the regulatory units of the proteasome in some yeast strains (C76S, WT and DM) and to further evaluate their mitochondrial functionality. The study of the coupling of 20S-19S units was carried out in native gel electrophoresis. To determine mitochondrial functionality, the activity of citrate synthase was measured by the reaction between

Instituição onde trabalho foi realizado: Instituto Butantan

Os resultados apresentados nesse artigo fazem parte do trabalho de iniciação de científica da aluna Natália Mori Avellaneda Penatti, estudante de medicina da FCMSCSP e que realiza sua pesquisa no Instituto Butantan sob a orientação da Profa. Dra. Marilene Demasi. Estes resultados foram apresentados no COMU Awards 2022, no prêmio Oswaldo Cruz Basic, tendo sido premiado em 2º lugar.

1. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – FCMSCSP. <https://orcid.org/0000-0002-1703-7374>. E-mail: [natalia.penatti@aluno.fcmsantacasaspedu.br](mailto:natalia.penatti@aluno.fcmsantacasaspedu.br).
2. Instituto Butantan. <https://orcid.org/0000-0002-3749-1160>. E-mail: [marilene.demasi@butantan.gov.br](mailto:marilene.demasi@butantan.gov.br)

DTNB with CoA-SH. It was observed that in the C76S strain there was a lower degree of coupling between the 20S catalytic and 19S regulatory units, in addition to a decreased citrate synthase activity. Therefore, less coupling between the proteasomal units triggers mitochondrial dysfunction most likely due to deficient mitochondrial protein import, ultimately leading to decreased

## INTRODUÇÃO

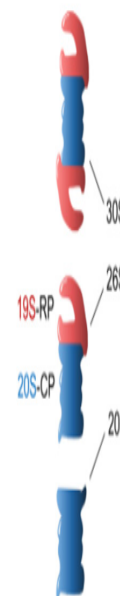
A proteólise é um processo de suma importância para a homeostase celular, visto que, por meio da catálise proteica, pode haver remoção das proteínas aberrantemente sintetizadas e daquelas danificadas durante as reações metabólicas, manutenção do pool de aminoácidos, geração de peptídeos ativos e degradação das proteínas que variam sua concentração ao longo do tempo. Em meados da década de 1980, Aaron Ciechanover, Avram Hershko e Irwin Rose descreveram que o maior responsável pela proteólise celular é o sistema ubiquitina- proteassomo (UPS), descoberta essa que lhes renderam o Prêmio Nobel de Química em 2004.

Em essência, o UPS é uma via de degradação proteica composta por enzimas capazes de marcar proteínas, sinalizando-as para degradação. Esta marcação é feita pela ubiquitina, uma proteína de 8,5 kDa que é atrelada à proteína que será degradada mediante uma série de enzimas. Uma vez que a proteína estiver poli-ubiquitinada, ela será reconhecida pelo proteassomo. O proteassomo é um complexo protéico composto por duas unidades. A unidade catalítica, denominada 20S (20SPT), composta por 4 anéis heptaméricos empilhados, formando uma estrutura semelhante a um barril. Há dois anéis beta (constituídos pelas subunidades beta) flanqueados em ambos os lados pelos dois anéis alfa (constituídos pelas subunidades alfa). Enquanto os anéis alfa controlam o acesso de substratos para dentro do proteassomo, os anéis beta formam a câmara catalítica, com três subunidades cataliticamente distintas. A outra unidade do proteassomo é a regulatória, conhecida como 19S (19SPT), capaz de interagir com as subunidades alfa do 20S e modular a atividade do proteassomo.

O proteassomo pode ser encontrado com as unidades catalítica e regulatória acopladas, formando ora o proteassomo 26S (quando há apenas uma unidade 19S associado ao 20S), ora o proteassomo 30S (quando há duas unidades 19S associados ao 20S). No entanto, o proteassomo pode ser constituído somente pela unidade catalítica (20S). Assim, o 20S destituído do 19S é responsável pela degradação de proteínas principalmente não-ubiquitinadas, que em sua maioria apresentam sequências naturalmente desestruturadas, ou são proteínas parcialmente desnaturadas por estresse oxidativo<sup>1</sup>. A Figura 1 ilustra os complexos do proteassomo.

CLS, which can better our understanding in regards to the process of aging and premature cell death seen in degenerative disorders caused by protein accumulation.

**Key-words:** Redox biology; Mitochondria; Proteasome; Proteolysis.



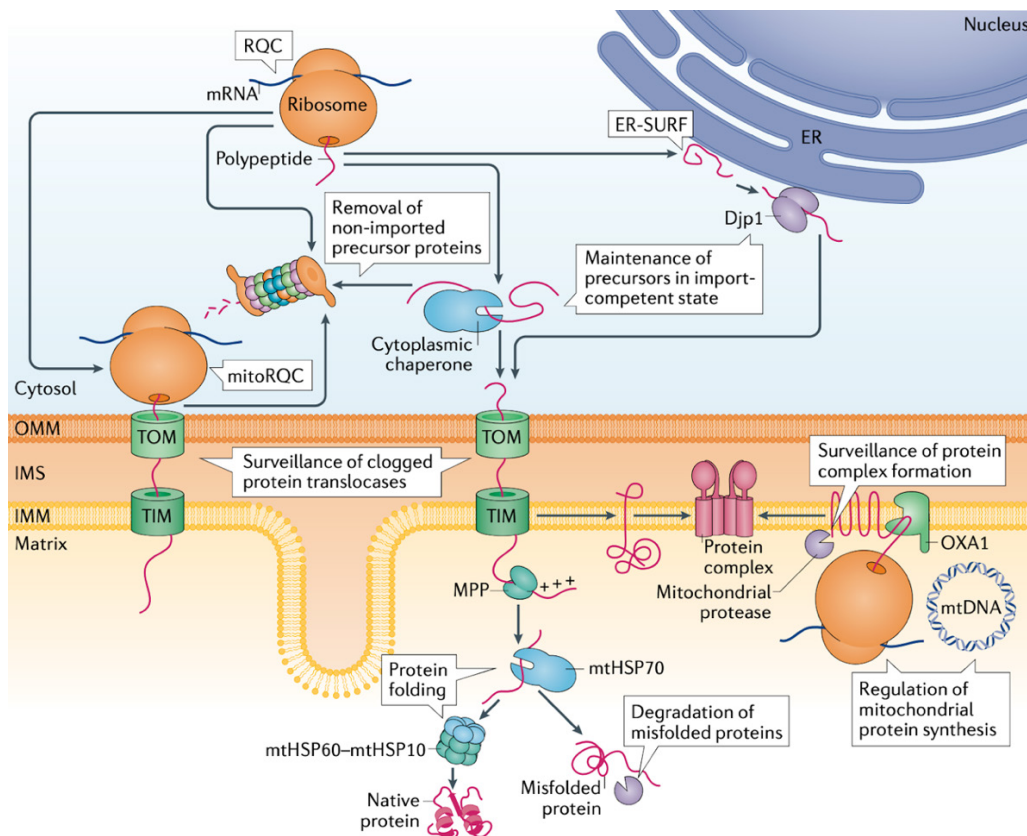
**Figura 1.** Complexos proteassômicos e unidades constituintes<sup>2</sup>

O grupo de pesquisa da Profa. Marilene Demasi investiga a modificação redox pós-traducional de resíduos de Cys encontrados na subunidade  $\alpha 5$  do proteassomo 20S da levedura *Saccharomyces cerevisiae*<sup>3,4</sup>. Foi constatado que a S-glutacionilação do resíduo Cys76 é crítico para a abertura da câmara catalítica, visto que mutação nesse sítio para resíduos de Ser,  $\alpha 5$ -Cys76S, resultou em maior porcentagem de 20S em sua conformação fechada e menor tempo de vida cronológico (CLS: Chronological Life Span), em comparação com a selvagem. O mesmo foi observado em linhagens com mutação em  $\alpha 5$ -Cys221S. As células que possuíam mutações concomitantes em ambos os resíduos,  $\alpha 5$ -Cys76S e  $\alpha 5$ -Cys221S, mostraram-se inviáveis<sup>5</sup>. Em contrapartida, uma dupla mutação randômica da subunidade  $\alpha 5$  (S35P/C221S) ocasionou em maior frequência da câmara catalítica em sua conformação aberta e em um maior CLS. A partir dos estudos supracitados, concluiu-se que o CLS está intimamente relacionado à frequência da conformação aberta do proteassomo 20S. Entretanto, não havia sido feita a análise acerca do grau de acoplamento entre as unidades 20S e 19S. Visto que a manutenção do CLS fundamenta-se na degradação de proteínas sinalizadoras via poliubiquitinação, especula-se que déficits no acoplamento entre unidades catalítica e regulatória poderão resultar em menores taxas de proteólise

pelo UPS, o que acarretaria em uma proteotoxicidade por acúmulo de proteínas ubiquitinadas que, consequentemente, determinaria um CLS diminuído<sup>6</sup>.

Atualmente, sabe-se que a associação entre as unidades 20S e 19S depende, dentre muitos fatores (por exemplo, chaperonas citoplasmáticas - Hsp70, Hsp90 e Ecm29)<sup>7</sup> e da funcionalidade mitocondrial. Sendo responsável pela maior produção de ATP por meio da fosforilação oxidativa, a mitocôndria é de fundamental importância para a ativação do UPS, uma vez que tanto o processo de ubiquitinação quanto o de desdobraimento dos substratos proteicos antes de penetrarem a unidade catalítica dependem de ATP. Para que exerça adequadamente a sua função, a mitocôndria necessita das proteínas mitocondriais, a maioria das quais são codificadas pelo DNA nuclear, sintetizadas no citosol e importadas para dentro da organela através das

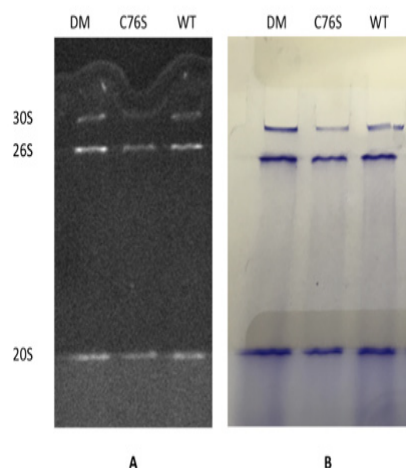
translocases presentes na membrana mitocondrial externa (TOM: Translocase of Outer Membrane)<sup>8</sup>. Durante o processo de importação, algumas proteínas mitocondriais podem sofrer dobramento prematuro ou então se agregar com outras proteínas, podendo provocar o entupimento do complexo TOM. Em ambos os casos, o UPS é essencial no controle de qualidade das proteínas mitocondriais na medida que degrada as proteínas que obstruíam TOM, liberando-o para a importação de proteínas sem defeitos estruturais<sup>7</sup>. Em adição a isso, existe um sistema de retro-translocação de proteínas intramitocondriais, danificadas pelo metabolismo oxidativo intrínseco da organela, para o citosol onde possam ser ubiquitinadas e degradadas pelo UPS<sup>1</sup>. Ou seja, ao mesmo tempo que a mitocôndria garante a disponibilidade de ATP para o bom funcionamento do UPS, este, por sua vez, auxilia no importe proteico, processo de suma relevância para a funcionalidade mitocondrial. A Figura 2 ilustra os mecanismos descritos acima.



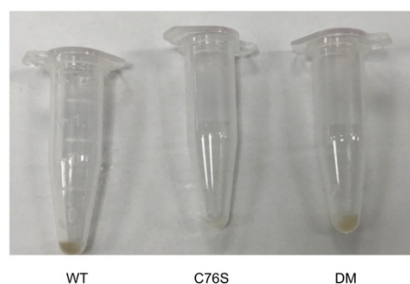
**Figura 2.** Representação esquemática do processo de controle de qualidade e importe de proteínas mitocondriais e o papel do proteossomo<sup>9</sup>

Ademais, ao comparar os pellets mitocondriais das três linhagens, notou-se que os da C76S, além de menores, não apresentavam a mesma cor acastanhada das outras; pelo contrário, possuía uma coloração pálida esbranquiçada, o que sugere alguma alteração na citocromo C. Outro dado que corrobora para a hipótese de que a C76S possui uma

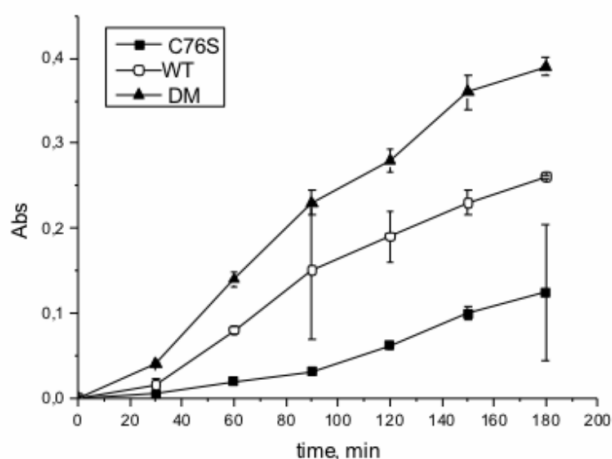
menor funcionalidade mitocondrial é a menor atividade da enzima citrato sintase, como demonstra o gráfico da Figura 5. Esse ensaio já foi reproduzido pelo menos 3 vezes em triplicata. Uma foto dos precipitados mitocondriais está mostrada na Figura 4.



**Figura 3.** (A) Gel nativo feito a partir do extrato celular das linhagens indicadas de leveduras. Após a corrida (6 h; 150 V, 4 °C), a atividade do proteassomo foi avaliada pela adição sobre o gel do fluoro-substrato Suc-LLVY-AMC. A fluorescência foi registrada em fotodocumentador. (B) O mesmo gel foi corado com Coomassie blue.



**Figura 4.** Foto representativa dos pellets mitocondriais obtidos como descrito em Metodologia.



**Figura 5.** Gráfico representativo da atividade da citrato sintase das três linhagens. Detalhes do experimento estão descritos em Metodologia.

## CONCLUSÃO E DISCUSSÃO

O menor grau de acoplamento entre as unidades 20S e 19S do proteassomo, junto com uma atividade proteassomal reduzida observada na linhagem C76S, provavelmente gerou uma disfunção mitocondrial, evidenciada pela baixa atividade da citrato sintase e pela palidez dos pellets mitocondriais, que acabou levando a uma diminuição do CLS.

Nossa hipótese é de que, com o acoplamento reduzido entre as unidades do proteassomo, bem como uma atividade proteassomal atenuada, o proteassomo é incapaz de desempenhar adequadamente seu papel no controle de qualidade da importação de proteínas mitocondriais, o que muito provavelmente resultou em uma proteotoxicidade causada pelo acúmulo de proteínas mitocondriais no citosol. Consequentemente, a mitocôndria é deixada de exercer suas funções adequadamente, gerando uma depleção de ATP e, portanto, uma inaptidão para manter processos celulares vitais, levando a um CLS diminuído. Podemos especular que o conhecimento por trás desse mecanismo bioquímico é fundamental para desvendar alguns processos celulares degenerativos que levam à morte celular antecipada em doenças provocadas por agregados proteicos (por exemplo, algumas formas de demência e miocardiopatia amiloide por transtirretina), assim como o próprio processo de envelhecimento, o que é crucial para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas.

**Participação dos autores:** A aluna *Natália Mori Avellaneda Penatti* realizou os experimentos em gel nativo e as reações da citrato sintase. A obtenção das linhagens de levedura foi realizada em trabalhos anteriores da *Profa. Dra. Marilene*, e o crescimento delas, bem como suas curvas de crescimento, foram feitas pela orientadora do projeto.

## REFERÊNCIAS

- Ross JM, Olson L, Coppotelli G. Mitochondrial and Ubiquitin Proteasome System Dysfunction in Ageing and Disease: Two Sides of the Same Coin? *Int J Mol Sci.* 2015;16:19458. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms160819458>
- Demasi M, da Cunha FM. The physiological role of the free 20S proteasome in protein degradation: a critical review. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.09.009>
- Demasi M, Shringarpure R, Davies KJ. Glutathiolation of the proteasome proteolytic inhibitors. *Arch Biochem Biophys.* 2001;389:254. doi: <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2332>
- Demasi M, Silva GM, Netto LE. 20S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is S-glutathionylated. *J Biol Chem.* 2003;278:679. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M209282200>
- Leme JMM, Ohara E, Santiago VF, Barros MH, Netto

- LES, Pimenta DC, Mariano DOC, Oliveira CLP, Bicev RN, Barreto-Chaves MLM, Lino CA, Demasi M. Mutations of Cys and Ser residues in the  $\alpha 5$ -subunit of the 20S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* affects gating and chronological lifespan. *Arch Biochem Biophys*. 2019;666:63. doi: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.03.012>
6. Chondrogianni N, Voutetakis K, Kapetanou M, Delitsikou V, Papaevgeniou N, Sakellari M, Lefaki M, Filippopoulou K, Gonos ES. Proteasome activation: An innovative promising approach for delaying aging and retarding age-related diseases. *Ageing Res Rev*. 2014;(Pt A):37. doi: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.12.003>
7. Gu ZC, Enenkel C. Proteasome assembly. *Cel Mol Life Sci*. 2014;71:4729. doi: <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1699-8>
8. Meul T, Berschneider K, Schmitt S, Mayr CH, Mattner LF, Schiller HB, Yazgili AS, Wang X, Lukas C, Schlessner C, Prehn C, Adamski J, Graf E, Schwarzmayer T, Perocchi F, Kukat A, Trifunovic A, Kremer L, Prokisch H, Popper B, von Toerne C, Hauck SM, Zischka H, Meiners S. Mitochondrial Regulation of the 26S Proteasome 17. *Cell Rep*. 2020;32:108059. doi: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108059>
9. Song J, Herrmann JM, Becker T. Quality control of the mitochondrial proteome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22:54. doi: <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00300-2>
10. Raynes R, Pomatto LC, Davies KJ. Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways. *Mol Aspects Med*. 2016;50:41. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.05.001>
11. Gregg C, Kryyakov P, Titorenko V. Purification of mitochondria from yeast cells. *J Vis Exp*. 2009;(30):1417. doi: <https://doi.org/10.3791/1417>
12. Spinazzi M, Casarin A, Pertegato V, Salviati L, Angelini C. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat Protoc*. 2012;7:1235. doi: <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.058>

Recebido: 05.11.2022

Aceito: 17.11.2022