A levedura como modelo para estudar as bases moleculares da doença de Parkinson

Sandra Tenreiro*, Tiago Fleming Outeiro**

Resumo

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa sem cura, está associada ao envelhecimento e caracteriza-se pela acumulação de inclusões proteicas intraneuronais conhecidas como corpos de Lewy (CL) no cérebro. Os CL são inclusões maioritariamente compostas pela proteína alfa-sinucleína (aSyn), pensando-se estarem associados à neurodegeneração característica na DP. A aSyn está sujeita a várias modificações pós-tradução (MPT) sendo a mais estudada a fosforilação da serina S129, uma vez que esta modificação ocorre em mais de 90% da proteína agregada nos CL. Atualmente há indícios que esta e eventualmente outras MPT poderão ter um papel patológico na doença, mas não está totalmente esclarecido como poderão influenciar a agregação e a toxicidade da aSyn. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo eucariota simples e muito bem caracterizado a nível celular e genético. Para além disso, a levedura apresenta vários mecanismos celulares que são conservados até às células eucarióticas superiores. Estas características fazem da levedura um modelo celular poderoso no

estudo os mecanismos básicos de várias doenças, entre as quais as que envolvem a agregação de proteínas como a DP. Na nossa investigação temos usado o modelo da levedura da DP em paralelo com outros modelos celulares e animais para responder a várias questões, entre as quais esclarecer o trinómio fosforilação S129-agregação-toxicidade. Estes estudos têm contribuído para obter novos dados que reforçam a ideia que as MPT podem ser modeladores importantes da agregação, toxicidade e degradação da aSyn nas sinucleinopatias, abrindo perspetivas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para estas doenças.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Alfa-sinucleína. *Saccharomyces cerevisiae*. Agregação de proteínas. Envelhecimento.

* Instituto de Medicina Molecular, 2Instituto de Fisiologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

** Department of NeuroDegeneration and Restorative Research, Center for Nanoscale Microscopy and Molecular Physiology of the Brain, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany.

Correspondência: Dr^a. Sandra Tenreiro, Instituto de Medicina Molecular, Av Prof Egas Moniz, 1649-028 Lisboa, Portugal; Tel: +351 217999441; E-mail: stenreiro@gmail.com

↳ <http://dx.doi.org/10.5335/rbceh.v12i3.6006>

Recebido em: 03/11/2015. Aceito em: 03/11/2015.

Introdução

Várias doenças neurodegenerativas partilham entre si mecanismos moleculares que envolvem a agregação de proteínas específicas. É o caso da doença de Alzheimer (DA), a doença de Parkinson (DP), demência fronto-temporal, demência com corpos de Lewy (CL), entre outras (SOTO, 2003; DOBSON, 2003). Ao nível celular, estas doenças envolvem a morte seletiva de populações de neurónios específicas de cada uma delas e que depende do seu estado de desenvolvimento, enquanto que ao nível molecular têm em comum a formação de agregados intra ou extracelulares de proteínas específicas (SOTO, 2003).

As proteínas precisam adotar uma conformação que lhes permita desempenhar a sua função na célula. No entanto, algumas proteínas são mais propensas a perder essa conformação funcional, devido a fatores ambientais ou genéticos, e a adotar conformações alteradas (*misfolded*) que são termodinamicamente instáveis e que potenciam a agregação, com a formação de dímeros, oligómeros, protofibrilas, e fibrilas amiloide (DOBSON, 2003) (Figura 1). Este processo tem duas consequências: a perda da função biológica da proteína envolvida e a aquisição de uma função tóxica. Esta toxicidade pode ser devida à interação dos oligómeros solúveis com as várias estruturas celulares ou porque os grandes agregados formados pelas fibrilas amiloide sequestram proteínas essenciais da célula, interferindo com a funcionalidade celular. No caso particular da DP pensa-se que são os oligóme-

ros solúveis as espécies mais tóxicas da aSyn (OUTEIRO et al., 2007; CHEN et al., 2009).

Figura 1 – Relação entre a fosforilação da aSyn em diferentes resíduos, a sua propensão para agregar e a sua toxicidade

A proteína aSyn desempenha um papel central na DP está representada no topo da figura. Nesta estão representadas as mutações associadas às formas genéticas da DP (a vermelho); o terminal amínico da região anfipática da proteína (a azul); a região hidrofóbica central que contém a componente não amiloide (a roxo); as sequências de repetições imperfeitas KTKEGV (a amarelo). A proteína aSyn pode ser fosforilada em vários resíduos *in vivo* (a azul) e *in vitro* (a verde). Não se encontra totalmente esclarecido como é que essas MPT podem modular a agregação e a toxicidade da proteína.

Fonte: adaptado de Tenreiro et al. (2013, 2014a).

A doença de Parkinson (DP)

A DP é a doença neurodegenerativa motora mais comum afetando 2% da população acima dos 65 anos e para a qual o envelhecimento é o principal fator de risco. Atualmente não há tratamento disponível para esta doença e os medicamentos normalmente prescritos aos pacientes permitem apenas minimizar alguns dos sintomas da doença não impedindo a progressão da neurodegeneração. Assim, com o aumento da esperança de vida e o consequente esperado aumen-

to da incidência desta doença, está a ser feito um grande esforço no sentido de se desenvolverem terapias eficientes bem como formas de realizar um diagnóstico mais precoce.

Os sintomas motores da DP caracterizam-se por instabilidade postural, bradiquinésia, tremor em repouso, rigidez muscular. Muitos pacientes apresentam ainda uma variedade de sintomas não motores que normalmente antecedem o desenvolvimento dos sintomas motores como depressão, disautonomia, perturbações gastrointestinais e alterações do sono (GALLAGHER; LEES; SCHRAG, 2010; PARK; STACY, 2009; SIMUNI; SETHI, 2008). Ao nível patológico a DP caracteriza-se pela perda seletiva de neurónios dopaminérgicos localizados na substância *nigra pars compacta* e a consequente redução da dopamina no corpo estriado. Os neurónios sobreviventes apresentam inclusões proteicas, os CL (SIMUNI; SETHI, 2008). Esta doença ocorre maioritariamente de forma esporádica, sendo fatores de risco conhecidos a exposição contínua a toxinas, tais como pesticidas, herbicidas, fumo do cigarro, químicos industriais ou metais (ELBAZ; MOISAN, 2008). No entanto, cerca de 8-10% dos casos de DP tem sido também atribuída a fatores genéticos – formas raras familiares – devido a mutações genéticas em determinados genes que codificam para proteínas associadas à doença (KLEIN; WESTENBERGER, 2012).

A proteína central da DP: a alfa-sinucleína (aSyn)

A proteína a alfa-sinucleína (aSyn) desempenha um papel central na DP e em outras doenças designadas por sinucleinopatias. Esta pequena proteína de 140 aminoácidos tem localização predominante nos terminais pré-sinápticos. A aSyn não tem uma estrutura secundária definida embora quando interaja com lípidos o seu N-terminal tenda a formar uma alfa-hélice. A função da aSyn não está totalmente clarificada, mas resultados obtidos em camundongos transgénicos onde a sua expressão foi abolida ou super-expressa indica que está envolvida em plasticidade e transmissão sináptica (LASHUEL et al., 2013).

A aSyn foi primeiro identificada como sendo a principal proteína agregada nos CL, característicos da DP e de outras sinucleinopatias (BAYER et al., 1999). O gene que codifica a aSyn, o *SNCA*, foi o primeiro identificado como estando associado a formas genéticas da doença devido a mutações pontuais, A30P, E46K, H50Q, G51D e A53T/E (KRUGER et al., 1998; APPEL-CRESSWELL et al., 2013; LESAGE et al., 2013; POLYMERPOULOS et al., 1997; ZARRANZ et al., 2004), ou a duplicações e triplicações do locus do gene (SINGLETON et al., 2003; CHARTIER-HARLIN et al., 2004). Além disso, certos polimorfismos no gene *SNCA* representam fatores de risco para o desenvolvimento das formas esporádicas da doença (EDWARDS et al., 2010; SATAKE et al., 2009; SIMON-SANCHEZ et al., 2009). Todas estas alterações têm como última consequência

a aquisição de uma função tóxica para a proteína aSyn que na maioria dos casos está associada ao aumento da sua expressão proteica (SINGLETON et al., 2003; ROSS et al., 2008).

Sabe-se que a agregação da aSyn desencadeia uma série de mecanismos de toxicidade que envolvem aumento do stress oxidativo, disfunção mitocondrial, da autofagia e do proteossoma, alterações do tráfico vesicular e da endocitose (WALES et al., 2013).

A levedura como modelo no estudo da DP

Uma das grandes limitações na área da investigação da DP tem sido a inexistência de um modelo animal que mimetize todas as características da doença, desde agregação até aos sintomas motores. Assim, a estratégia de muitos grupos de investigação tem sido recorrer a diferentes modelos celulares e/ou animais da doença em paralelo ou de forma sequencial, para responder a perguntas científicas concretas. Apesar de cada modelo ter vantagens e desvantagens, a utilização de um dado modelo em detrimento de outro pode ser uma mais valia, desde que adequado à questão científica que se pretende esclarecer.

Neste contexto, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido um modelo muito versátil para esclarecer mecanismos básicos conservados associados à DP (TENREIRO; OUTEIRO, 2010; TENREIRO et al., 2013; OUTEIRO; LINDQUIST, 2003). A levedura é também um modelo aceite para estudar mecanismos moleculares conservados

do envelhecimento (KAEBERLEIN; BURTNER; KENNEDY, 2007), além de outras doenças humanas (BOTSTEIN; FINK, 2011).

Vulgarmente conhecida como a levedura de padeiro ou da cerveja, a levedura é muito fácil de cultivar em laboratório envolvendo baixos custos. É também fácil de manipular geneticamente por ter uma elevada eficiência de transformação e uma eficiente via de recombinação homóloga que permitem eliminar ou mutar o seu genoma ou mesmo inserir ADN exógeno com elevada eficiência (SUGIYAMA et al., 2009). Foi devido a estas características que a levedura *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucariótico a ter o seu genoma completamente sequenciado em 1996 (GOFFEAU et al., 1996). Atualmente, cerca de 80% dos seus cerca de 6000 genes encontram-se funcionalmente caracterizados, o que faz da levedura a célula eucariótica mais bem estudada ao nível genético e fisiológico (SUTER; AUERBACH; STAGLJAR, 2006; CHRISTIE; HONG; CHERRY, 2009).

Uma grande vantagem da levedura relativamente a outros organismos modelo tem sido a sua utilização em *screenings* genéticos tirando partido das muitas ferramentas biológicas que entretanto foram construídas pelos investigadores que usam este organismo modelo. Existem disponíveis várias coleções de estirpes extremamente úteis para esse fim. Nomeadamente, uma coleção de estirpes onde todos os genes de levedura não essenciais foram eliminados individualmente (YGDS), ou de mutantes heterozigóticos onde uma das

cópias de cada um dos genes essenciais foi eliminada individualmente (WINZELER et al., 1999); estirpes onde cada um dos genes de levedura foi colocado em fusão com a proteína verde fluorescente (GFP) (HUH et al., 2003) e uma coleção de estirpes modificadas para superexpressão de PROTEÍNAS (JONES et al., 2008).

O primeiro modelo da DP em levedura foi desenvolvido por Outeiro e Lindquist (2003). Neste modelo o gene humano *SNCA* que codifica a proteína aSyn foi expresso em levedura sob a regulação de um promotor induzível, o promotor *GAL*, e com uma fusão C-terminal com o gene que codifica a GFP. A expressão de uma cópia do gene humano não se mostrou tóxica para as células de levedura enquanto que a expressão de duas cópias do gene induziu toxicidade (Figura 2). Estes resultados mostraram que a superexpressão da proteína aSyn em levedura é suficiente para induzir toxicidade, à semelhança do reportado em algumas formas genéticas da doença (CHARTIER-HARLIN et al., 2004; SINGLETON et al., 2003). Paralelamente, a proteína aSyn-GFP localiza-se na membrana plasmática nas células contendo apenas uma cópia do gene humano. No entanto, nas células a expressar duas cópias do gene humano há formação de inclusões intracelulares de aSyn-GFP (Figura 2). Estudos posteriores revelaram que as inclusões de aSyn formadas em levedura são aglomerados de vesículas (SOPER et al., 2008), como resultado disfunção causada por esta proteína no tráfico vesicular (OUTEIRO; LINDQUIST, 2003; GITLER et al., 2008; SANCENON et al., 2012). De destacar

que vesículas e estruturas membranares também parecem ser acumuladas na periferia dos CL presentes em cérebros de doentes de DP (SOPER et al., 2008). Além disso, há indícios que a proteína aSyn pode formar em levedura, fibrilas amiloide semelhantes às dos CL uma vez que algumas inclusões de aSyn mostraram marcação com compostos que marcam especificamente este tipo de conformação: a tioflavina S e a tioflavina T (ZABROCKI et al., 2005; OIEN et al., 2009). Recentemente o nosso grupo demonstrou que a aSyn forma oligómeros de elevado peso molecular em levedura, recorrendo a cromatografia de exclusão molecular (TENREIRO et al., 2014b).

Figura 2 – O modelo da DP em levedura

A expressão da proteína aSyn em *S. cerevisiae* é obtida pela inserção no genoma da levedura do gene humano *SNCA* que codifica a aSyn em fusão com a GFP sob a regulação do promotor regulável *GAL1* (à esquerda) (OUTEIRO; LINDQUIST, 2003). Recorrendo a microscopia de fluorescência, observa-se que a expressão de uma única cópia do gene *SNCA* resulta na localização da aSyn-GFP na membrana plasmática. No entanto, quando duas cópias do gene *SNCA* são expressas na levedura, observa-se a formação de inclusões citoplasmáticas (ao centro). A toxicidade induzida pela expressão da aSyn avaliada pela técnica de spots (à direita) revela que enquanto a expressão de uma única cópia do gene não é tóxica para a levedura, a expressão de duas cópias afeta o crescimento celular, o que é indicativo da sua toxicidade.

Fonte: Outeiro e Lindquist (2003).

A toxicidade induzida pela expressão da aSyn em levedura deve-se à sua interferência em várias vias celulares como endocitose, tráfico vesicular, em

particular do Reticulo Endoplasmático para o Golgi, aumento do stress oxidativo e da formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), disfunção mitocondrial, do proteassoma e da autofagia (OUTEIRO; LINDQUIST, 2003; SOPER et al., 2008; GITLER et al., 2008; ZABROCKI et al., 2005; SANCENON et al., 2012).

A fosforilação da alfa-sinucleína na DP

As modificações pós-tradução (MPT) de proteínas são mais de 300 alterações que podem ocorrer em aminoácidos da sequência polipeptídica e que alteram o tamanho, a carga, estrutura e a conformação das proteínas. São exemplos destas modificações a fosforilação, glicosilação, glicação, acetilação, acilação, ubiquitinação entre outras. As MPT podem regular várias características das proteínas, nomeadamente a sua localização sub-celular, hidrofobicidade, estabilidade, a interação com outras proteínas e alterar a sua atividade enzimática e função na célula. Há cada vez mais exemplos descritos onde alterações do padrão das MPT de proteínas têm consequências patológicas estando associados a doenças humanas (TENREIRO et al., 2014a).

No caso particular da aSyn, esta proteína é sujeita a várias MPT como fosforilação, ubiquitinação, clivagens em locais específicos do C-terminal, acetilação do N-terminal, nitratação, oxidação e sumuilação (BEYER, 2006; OUESLATI; FOURNIER; LASHUEL, 2010). Destas, a mais estudada é a fosforilação por se pensar ter um papel patológico uma vez que se observou que cerca de 90%

da proteína aSyn agregada nos CL se encontra fosforilada no resíduo serina 129 (S129) (ANDERSON et al., 2006; FUJIWARA et al., 2002). No entanto, não é claro se esta fosforilação ocorre antes ou depois da agregação e se promove ou previne a agregação. Também não é claro se esta modificação é protetora ou aumenta a toxicidade da aSyn (Figura 1). Tal deve-se ao facto de estudos realizados em diferentes modelos celulares e animais terem conduzido a conclusões contraditórias quanto ao trinómio: fosforilação na S129 (pS129) – toxicidade – agregação (TENREIRO et al., 2014a). Em particular, estudos realizados em *Drosophila* e em camundongos demonstraram que a pS129 aumenta o carácter tóxico da aSyn (CHEN; FEANY, 2005; FREICHEL et al., 2007), enquanto que outros estudos realizados em ratos e no nematode *Caenorhabditis elegans* apontavam precisamente no sentido oposto, com esta fosforilação a ter um carácter protetor (GORBATYUK et al., 2008; KUWAHARA et al., 2012). Além disso, diferentes estudos mostraram resultados contraditórios sobre a relação da pS129 e a agregação da aSyn (SMITH et al., 2005; WAXMAN; GIASSON, 2008). Outros locais de fosforilação foram entretanto descritos, embora não seja ainda claro se têm ou não um papel na DP (Figura 1). No entanto, há já várias evidências que indicam que estas modificações podem afetar a agregação e a toxicidade da aSyn. Nomeadamente, a fosforilação da tirosina 125 (Y125) reverte o efeito tóxico da pS129 num modelo de *Drosophila* (CHEN et al., 2009). A fosforilação na Y125 encontra-se reduzida em pacientes

de demência com CL e os seus níveis diminuem com o envelhecimento, o que parece indicar um papel protetor para esta fosforilação (CHEN et al., 2009). A fosforilação de outro resíduo, a tirosina 39 (Y39) foi recentemente descrita em cérebros humanos mas não foram detetadas diferenças nos seus níveis entre doentes de DP e controlos saudáveis (MAHUL-MELLIER et al., 2014). De destacar que a fosforilação nos resíduos Y39 e Y125 mostrou regular a forma como a proteína aSyn é degradada pelas células (MAHUL-MELLIER et al., 2014). Também a fosforilação do resíduo S87 encontra-se aumentada em pacientes com sinucleinopatias (PALEOLOGOU et al., 2010), mas resultados obtidos em diferentes modelos foram incoerentes quanto à sua implicação na agregação e toxicidade da ASYN (WAXMAN; GIASON, 2008; PALEOLOGOU et al., 2010; OUESLATI et al., 2012).

A fosforilação S129 da aSyn regula a degradação das inclusões de aSyn no modelo da levedura de DP

No nosso grupo de investigação recorreremos ao modelo da levedura para estudar os efeitos da fosforilação S129 na agregação e toxicidade da aSyn. Para tal utilizámos dois mutantes da aSyn: o mutante S129A em que o resíduo da S129 foi substituído do pelo aminoácido neutro alanina (A), e que é resistente à fosforilação; e o mutante S129E onde a S129 foi substituída pelo aminoácido carregado negativamente, o ácido glutâmico (E) e que portanto mimetiza a adição do grupo fosfato carregado nega-

tivamente à serina. Ambos os mutantes foram gerados recorrendo a engenharia genética, recorrendo a mutagénesis dirigida realizada sobre a sequência de nucleótidos do gene *SNCA*. A aSyn selvagem e os dois mutantes S129A e S129E foram expressos em levedura sob a regulação do promotor induzível *GAL* e em fusão C-terminal com a proteína verde fluorescente (TENREIRO et al., 2014b). Observou-se que o bloqueio da fosforilação S129 aumenta a toxicidade e a formação de inclusões da aSyn. O bloqueio da fosforilação S129 resulta ainda na formação de espécies oligoméricas de maior peso molecular, em comparação com as espécies formadas pela proteína selvagem (TENREIRO et al., 2014b). Por outro lado, observou-se que a aSyn selvagem é fosforilada no resíduo S129 por cinases endógenas da levedura, recorrendo à técnica de *western-blot* e a um anti-corpo que reconhece especificamente esta fosforilação (TENREIRO et al., 2014b). Com efeito, a proteína selvagem aSyn e a proteína mutante S129E (que mimetiza a fosforilação nesta posição) apresentam níveis equivalentes de toxicidade e de formação de inclusões.

Para avaliar como a fosforilação S129 afeta a forma como as células de levedura degradam a aSyn, a expressão da proteína selvagem e da mutante S129A foi bloqueada, por repressão do promotor *GAL* com glucose. Observámos que quando a fosforilação S129 é bloqueada a degradação da proteína aSyn é diminuída, em comparação com a degradação da proteína selvagem. As vias de degradação da aSyn em levedura envolvem o proteassoma e a autofagia. A inibição farmacológica e/ou genética destas vias revelou que a diferença

observada na degradação da aSyn selvagem e S129A envolve principalmente a via da autofagia (TENREIRO et al., 2014b). Observou-se ainda que quando a fosforilação da aSyn é bloqueada há uma deficiente indução desta via pelas células da levedura (TENREIRO et al., 2014b).

Estes resultados demonstraram pela primeira vez a relação entre a fosforilação da S129 e a degradação seletiva da aSyn, o que realça a importância desta MPT como um possível alvo terapêutico para a DP.

Conclusões finais

A incidência de doenças associadas ao envelhecimento sem tratamento disponível tem aumentado devido ao envelhecimento da população. Assim, é urgente desenvolver terapias eficientes que possam contribuir para um envelhecimento saudável. Para tal é fundamental perceber os mecanismos moleculares básicos subjacentes à neurodegeneração de forma a identificar novos alvos terapêuticos. Neste contexto, a levedura tem demonstrado ser um poderoso modelo de célula eucariótica onde muitos dos processos que ocorrem nas células neuronais são conservadas e que já deu consideráveis contributos para o conhecimento científico da DP.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação para a ciência e a Tecnologia (projeto PTDC/BIA-BCM/117975/2010 e pela bolsa de pós-doutoramento – SFRH/BPD/101646/2014 ST). TFO foi financiado pelo *DFG Cluster of Excellence Center*

for Nanoscale Microscopy and Molecular Physiology of the Brain (CNMPB).

Yeast as a model to study the molecular basis of Parkinson's disease

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative pathology associated with aging with no available treatment. PD is characterized by the accumulation of intraneuronal protein inclusions, the Lewy bodies (LBs). The LBs are mainly constituted by the protein alfa-synuclein (aSyn) and are thought to be associated to the neurodegeneration that occurs in PD. aSyn is target of several post-translational modifications (PTMs) but the most studied one is the phosphorylation of S129 as it occurs in more than 90% of the aggregated protein in LBs. However, the pathological role of this and other PTMs in PD is not completely understood. Yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a simple and well known eukaryote organism with several cellular mechanisms that are conserved until higher eukaryotic cells. Accordingly, yeast has been used as a powerful cellular model to study basic molecular mechanisms of disease such as PD. In our research we have been using yeast models in parallel with other cellular and animal models to dissect different questions related with PD pathobiology, including the relation S129phosphorylation – aggregation-toxicity. These studies have been contributing to reinforce the notion that PTMs can be important modulators of aggregation, toxicity and degradation of aSyn in synucleinopathies, opening new perspectives to the development of new therapeutic strategies for these diseases.

Keywords: Parkinson's disease. Alpha-synuclein. *Saccharomyces cerevisiae*. Protein aggregation. Aging.

Referências

- ANDERSON, J. P. et al. Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 40, p. 29739-29752, Oct. 2006.
- APPEL-CRESSWELL, S. et al. Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society, Canada*, v. 28, n. 6, p. 811-813, 2013.
- BAYER, T. A. et al. Alpha-synuclein accumulates in Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies but not in Alzheimer's disease beta-amyloid plaque cores. *Neuroscience Letters*, v. 266, n. 3, p. 213-216, May 1999.
- BEYER, K. Alpha-synuclein structure, post-translational modification and alternative splicing as aggregation enhancers. *Acta Neuropathologica*, v. 112, n. 3 p. 237-251, Sept. 2006.
- BOTSTEIN, D.; FINK, G. R. Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics*, v. 189, n. 3, p. 695-704, Nov. 2011.
- CHARTIER-HARLIN, M. C. et al. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*, v. 364, n. 9.440, p. 1167-1169, Sept./Oct. 2004.
- CHEN, L. et al. Tyrosine and serine phosphorylation of alpha-synuclein have opposing effects on neurotoxicity and soluble oligomer formation. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 119, n. 11, p. 3257-3265, Nov. 2009.
- CHEN, L.; FEANY, M. B. Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Nature Neuroscience*, v. 8, n. 5, p. 657-663, May/Apr. 2005.
- CHRISTIE, K. R.; HONG, E. L.; CHERRY, J. M. Functional annotations for the *Saccharomyces cerevisiae* genome: the knowns and the known unknowns. *Trends in Microbiology*, v. 17, n. 7, p. 286-294, jul. 2009.
- DOBSON, C. M. Protein folding and misfolding. *Nature*, San Francisco, Califórnia, v. 426, p. 884-890, Dec. 2003.
- EDWARDS, T. L. et al. Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease. *Annals of Human Genetics*, v. 74, n. 2, p. 97-109, Mar. 2010.
- ELBAZ, A; MOISAN, F. Update in the epidemiology of Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology*, v. 21, n. 4, p. 454-460, Aug. 2008.
- FREICHEL, C. T. et al. Age-dependent cognitive decline and amygdala pathology in alpha-synuclein transgenic mice. *Neurobiology of Aging*, v. 28, n. 9, p. 1421-1435, Sept. 2007.
- FUJIWARA, H. et al. Alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nature Cell Biology*, v. 4, n. 2, p. 160-164, Feb. 2002.
- GALLAGHER, D. A.; LEES, A. J.; SCHRAG, A. What are the most important nonmotor symptoms in patients with Parkinson's disease and are we missing them? *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, v. 25, n. 15, p. 2493-2500, Nov. 2010.
- GITLER, A. D. et al. The Parkinson's disease protein alpha-synuclein disrupts cellular Rab homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 105, n. 1, p. 145-150, Jan. 2008.
- GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. *Science*, v. 274, n. 546, p. 563-547, Oct. 1996.
- GORBATYUK, O. S. et al. The phosphorylation state of Ser-129 in human alpha-synuclein determines neurodegeneration in a rat model of Parkinson disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 105, n. 2, p. 763-768, 2008.

- HUH, W. K. et al. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, San Francisco, Califórnia, v. 425, p. 686-691, Oct. 2003.
- JONES, G. M. et al. A systematic library for comprehensive overexpression screens in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Methods*, v. 5, p. 239-241, Feb. 2008.
- KAEBERLEIN, M.; BURTNER, C. R.; KENNEDY, B. K. Recent developments in yeast aging. *PLoS Genetics*, v. 3, n. e84, May 2007.
- KLEIN, C.; WESTENBERGER, A. Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 2, n. 1, Jan. 2012.
- KRUGER, R. et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nature Genetics*, v. 18, n. 2, p. 106-108, Feb. 1998.
- KUWAHARA, T. et al. Phosphorylation of alpha-synuclein protein at Ser-129 reduces neuronal dysfunction by lowering its membrane binding property in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 287, p. 7098-7109, 2012.
- LASHUEL, H. A. et al. The many faces of alpha-synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 14, p. 38-48, Jan. 2013.
- LESAGE, S. et al. G51D alpha-synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Annals of Neurology*, v. 73, n. 4, p. 459-471, Apr. 2013.
- MAHUL-MELLIER, A. L. et al. c-Abl phosphorylates alpha-syn and regulates its degradation, implication for alpha-syn clearance and contribution to the pathogenesis of Parkinson's Disease. *Human Molecular Genetics*, v. 23, n. 11, p. 2858-2879, jun. 2014.
- OIEN, D. B. et al. Clearance and phosphorylation of alpha-synuclein are inhibited in methionine sulfoxide reductase a null yeast cells. *Journal of Molecular Neuroscience*: MN, v. 39, n. 39, p. 323-332, Aug. 2009.
- OUESLATI, A.; FOURNIER, M.; LASHUEL, H. A. Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of alpha-synuclein: implications for Parkinson's disease pathogenesis and therapies. *Progress in Brain Research*, v. 183, p. 115-145, 2010.
- OUESLATI, A. et al. Mimicking phosphorylation at serine 87 inhibits the aggregation of human alpha-synuclein and protects against its toxicity in a rat model of Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience*, v. 32, n. 5, p. 1536-1544, Feb. 2012.
- OUTEIRO, T. F. et al. Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science*, v. 317, n. 5.837, p. 516-519, July 2007.
- OUTEIRO, T. F.; LINDQUIST, S. Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science*, v. 302, n. 5.651, p. 1772-1775, Dec. 2003.
- PALEOLOGOU, K. E. et al. Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits alpha-synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions. *The Journal of Neuroscience*, v. 30, n. 9, p. 3184-3198, Mar. 2010.
- PARK, A.; STACY, M. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, v. 256, p. 293-298, Aug. 2009.
- POLYMERPOULOS, M. H. E. et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, p. 276, 2045-2047, Aug. 1997.
- ROSS, O. A. et al. Genomic investigation of alpha-synuclein multiplication and parkinsonism. *Annals of Neurology*, v. 63, n. 6, p. 743-750, June 2008.
- SANCENON, V. L. et al. Suppression of alpha-synuclein toxicity and vesicle trafficking defects by phosphorylation at S129 in yeast depends on genetic context. *Human Molecular Genetics*, v. 21, p. 2432-2449, Feb. 2012.
- SATAKE, W. et al. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's

- disease. *Nature Genetics*, v. 41, p. 1303-1307, Nov. 2009.
- SIMON, S. J. et al. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nature Genetics*, v. 41, n. 12, p. 1308-1312, Dec. 2009.
- SIMUNI, T.; SETHI, K. Nonmotor manifestations of Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, v. 64, p. S65-80, Dec. 2008.
- SINGLETON, A. B. et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*, v. 302, n. 5.646, p. 841, Oct. 2003.
- SMITH, W. W. et al. Alpha-synuclein phosphorylation enhances eosinophilic cytoplasmic inclusion formation in SH-SY5Y cells. *The Journal of Neuroscience*, v. 25, n. 23, p. 5544-5552, June 2005.
- SOPER, J. H. et al. Alpha-synuclein-induced aggregation of cytoplasmic vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, v. 19, n. 3, p. 1093-1103, Mar. 2008.
- SOTO, C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 4, n. p. 49-60, Jan. 2003.
- SUGIYAMA, M. et al. Advances in molecular methods to alter chromosomes and genome in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 84, n. 6, p. 1045-1052, Oct. 2009.
- SUTER, B.; AUERBACH, D.; STAGLJAR, I. Yeast-based functional genomics and proteomics technologies: the first 15 years and beyond. *BioTechniques*, v. 40, n. 5, p. 625-644, May 2006.
- TENREIRO, S.; ECKERMANN, K.; OUTEIRO, T. F. Protein phosphorylation in neurodegeneration: friend or foe? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 7, p. 42, May 2014.
- TENREIRO, S. et al. Harnessing the power of yeast to unravel the molecular basis of neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, v. 127, n. 4, p. 438-452, Nov. 2013.
- TENREIRO, S.; OUTEIRO, T. F. Simple is good: yeast models of neurodegeneration. *FEMS Yeast Research*, v. 10, n. 8, p. 970-979, Dec. 2010.
- TENREIRO, S. et al. Phosphorylation modulates clearance of alpha-synuclein inclusions in a yeast model of Parkinson's disease. *PLoS Genetics*, v. 10, p. e1004302, May 2014.
- WALES, P. et al. Limelight on alpha-synuclein: pathological and mechanistic implications in neurodegeneration. *Journal of Parkinson's Disease*, v. 3, n. 4, p. 415-459, 2013.
- WAXMAN, E. A.; GIASSEN, B. I. Specificity and regulation of casein kinase-mediated phosphorylation of alpha-synuclein. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 67, n. 5, p. 402-416, May 2008.
- WINZELER, E. A. et al. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, v. 285, n. 5.429, p. 901-906, Aug. 1999.
- ZABROCKI, P. et al. Characterization of alpha-synuclein aggregation and synergistic toxicity with protein tau in yeast. *The FEBS Journal*, v. 272, n. 6, p. 1386-1400, Mar. 2005.
- ZARRANZ, J. J. et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Annals of Neurology*, v. 55, n. 2, p. 164-173, Feb. 2004.