

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Evaluation of Cytotoxic and Genotoxic Effects of
Microcystin-LR in *Saccharomyces cerevisiae***

Sara Estrela Soares Barreiros

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Versão Definitiva

Dissertação orientada por:
Doutora Elisabete Valério
Professora Doutora Deodália Dias

2017

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Evaluation of Cytotoxic and Genotoxic Effects of Microcystin-LR in *Saccharomyces cerevisiae*

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Sara Estrela Soares Barreiros

Thesis dissertation oriented per:

Doutora Elisabete Valério

Departamento de Saúde Ambiental – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

Professora Doutora Deodália Dias

Departamento de Biologia Animal – Faculdade de Ciências – Universidade de Lisboa

Previous notes

This project had the support of the co-supervisor Doutora Maria João Silva (Departamento de Genética, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge).

The thesis dissertation references and bibliography were written in accordance with *Toxicon* Journal criteria.

This work led to the following communication:

Panel communication in international conference:

Barreiros, S., Silva, M.J., Valério, E. 2016. Evaluating cytotoxic and genotoxic effects of microcystin using *Saccharomyces cerevisiae* as eukaryotic cell model. 3rd International Conference on Occupational and Environmental Toxicology (ICOETox 2016), Porto, Portugal, June 21-23 2016 (ICOETox; Abstract book, Page 75).

Acknowledgments

I would first like to thank my thesis advisor Doutora Elisabete Valério of the Environmental Health Department at Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. She consistently allowed this paper to be my own work, but steered me in the right the direction whenever she thought I needed it.

I would also like to thank Sérgio Paulino, Doutora Elsa Dias and Mestre Carina Menezes. Their office doors were always open whenever I ran into a trouble spot or had a question about my research or writing.

Secondly I would like to thank the experts who were involved in the validation of some of the project techniques: Doutora Maria João Silva and Doutora Henriqueta Louro of the Human Genetics Department at Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Even though we could not reach our ambitious goal, without their passionate participation and input, the validation survey would most certainly be a completely failure.

I would like to acknowledge Prof^a Deodália Dias from Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa for the constant support and sympathy. I am gratefully indebted for her very valuable input on this thesis.

I would like to give my deepest appreciation to my partners in crime, my stress relievers and my lunch companions André, Inês, Andreia, Joana, Catarina and Sara. I will cherish your friendship and never forget all the things you thought me.

Finally, I must express my very profound gratitude to João Carvalho and my family, specially my parents, for providing me with unfailing support, love and continuous encouragement throughout my years of study and through the process of researching and writing this thesis. This accomplishment would not have been possible without you. Thank you and I love you with all my heart.

Sumário

Neste trabalho pretendia-se caracterizar os efeitos genotóxicos e citotóxicos de uma toxina (Microcistina-LR) que é produzida por cianobactérias, utilizando como organismo eucariota modelo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

As cianobactérias são bactérias fotossintéticas existentes frequentemente em ambientes aquáticos, inclusive em água doce. Podem sobreviver em locais com níveis de pH e amplitudes térmicas distintas. Atualmente, são usadas para diversos propósitos, incluindo produção de comida animal, fertilizantes, entre outras. Quando as condições ambientais são propícias (p.e. concentração de nutrientes, temperatura, pH...), as cianobactérias podem crescer massivamente, um fenómeno conhecido por *blooms*, que pode estar associado à produção de toxinas por parte das cianobactérias, prejudiciais a diversas espécies, incluindo o ser humano, tornando-se uma questão de preocupação ambiental e de saúde pública.

As microcistinas (MC) são hepatotoxinas, o que significa que o órgão alvo principal de atuação é o fígado, produzidas por cianobactérias. A sua fórmula química é $C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$, tendo no entanto dois resíduos variáveis, que são responsáveis pelas cerca de 80 variedades da toxina. A MC utilizada neste trabalho tem um resíduo de Leucina e Arginina, sendo assim designada por MC-LR. De entre as MCs, a microcistina-LR (MC-LR), produzida por várias espécies, em particular pela espécie *Microcystis aeruginosa*, é a mais abundante, a mais tóxica e também a que se encontra mais bem estudada. Estas foram algumas das razões pelas quais esta toxina foi escolhida. As MCs são péptidos cíclicos que têm uma elevada afinidade para as fosfatases proteicas de Serina/Treonina (PPs), nomeadamente a PP1 e PP2A, agindo assim como inibidores das mesmas especialmente da última. É a partir destas interações que ocorrem uma série de eventos responsáveis pelos efeitos citotóxicos e genotóxicos das MC em células animais. Para além de afetar o fígado, sabe-se que as MC induzem o aumento de espécies reativas de oxigénio (ROS), no entanto ainda não se conseguiu uma caracterização completa dos efeitos destas toxinas.

A exposição Humana é um risco atual sendo que as pessoas podem ter contacto com a toxina, especialmente quando praticam desportos aquáticos, como nadar ou praticar surf em águas balneares contaminada, ou ingerir águas contaminadas que não foram devidamente tratadas para consumo humano. Se houver contacto com elevadas doses da toxina, podem ocorrer sintomas como náuseas, vômitos e danos no fígado, no entanto se o contacto com MCs for crónico e em doses baixas não ocorrem sintomas físicos, mas há danos cumulativos no fígado ao longo do tempo. Devido a estas características a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu um valor máximo para a toxina em águas para consumo, sendo este de 1 µg/L, que se encontra também na Legislação Nacional aplicável.

Desde que a OMS estabeleceu um valor máximo para microcistinas em águas para consumo, o contacto Humano com concentrações elevadas desta toxina tem sido raro. No entanto, a exposição prolongada a doses baixas pode vir a ser problemática, pois é assintomática.

Este projeto pretendeu esclarecer alguns dos mecanismos moleculares de toxicidade da MC-LR em células animais usando *Saccharomyces cerevisiae* como organismo eucariota modelo. Tentou-se caracterizar os efeitos genotóxicos e citotóxicos da exposição a doses relevantes do ponto de vista ambiental de MC-LR em *S. cerevisiae*.

Para avaliar os efeitos citotóxicos da MC-LR, foi utilizado um ensaio de viabilidade celular que determina a capacidade funcional das mitocôndrias, o ensaio de MTT, após exposição das leveduras a diferentes concentrações de MC-LR durante 4 horas. Como controlo positivo utilizou-se o SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) e H₂O₂ (Peróxido de Hidrogénio) onde se observou uma relação significativa na dose-resposta, sendo que quanto maior a percentagem de SDS e H₂O₂ usada, maior foi o decréscimo de viabilidade celular. Quando se utilizaram diferentes concentrações de MC-LR observou-se um aumento da absorvância quanto maior fosse a concentração usada, um efeito inverso ao esperado.

Por outro lado, tentou-se ainda adaptar o ensaio de eletroforese de célula única em gel (ensaio do cometa), convencionalmente realizado em células de mamífero, às células de *Saccharomyces cerevisiae*, a fim de quantificar quebras induzidas no DNA. Começou-se por adotar o protocolo de Oliveira et al. (2012) e expor as células a diferentes concentrações do controlo positivo, H₂O₂. Durante a otimização do processo, alterou-se principalmente a composição dos vários componentes do ensaio, o tampão de eletroforese, a solução de lise, a concentração do gel, a duração da eletroforese e a voltagem da mesma. Em alguns ensaios conseguiu-se expor o DNA das células, confirmando que a liticase funcionava pois houve digestão da parede celular, mas não houve migração do mesmo, o que significa que o protocolo ainda não está totalmente otimizado.

Os efeitos genotóxicos foram avaliados através da análise da alteração dos níveis de expressão dos genes *Rad27*, *Apn1*, *Apn2*, *Ntg1* e *Ntg2* do sistema de reparação de DNA de *S.cerevisiae*, BER e do gene *Cdc55*, que codifica a proteína fosfatase PP2A, através da técnica de Real-Time PCR. Utilizaram-se os genes *Alg9* e *Taf10* como referência, para normalizar os níveis de expressão. *S. cerevisiae* foi exposta a quatro concentrações de MC-LR; 1 nM, 10 nM, 100 nM e 1 µM, e os resultados obtidos foram comparados com a situação controlo (sem toxina). O gene *Apn1* mostrou uma tendência para ser subexpresso quando as células foram expostas a concentrações mais baixas de MC-LR e sobreexpresso para concentrações mais elevadas. O gene *Apn2* mostrou uma tendência para ser subexpresso em qualquer uma das concentrações de MC-LR testadas. O gene *Rad27* mostrou uma relação de dose-resposta onde existe uma tendência para quanto maior for a concentração de MC-LR maior é a expressão do gene. O gene *Ntg1* tem tendência a ser subexpresso em todas as concentrações de MC-LR. O gene *Ntg2* mostra uma relação dose-resposta clara, onde quanto maior for a concentração de microcistina menor é a expressão génica. O gene *Cdc55* sofre uma repressão génica quando exposto a qualquer concentração de microcistina. Apesar dos resultados obtidos serem para já tendências, demonstram ser interessantes e estão relativamente de acordo com o espetável.

Como conclusões finais a retirar deste trabalho, pelos resultados obtidos com o MTT, aparentemente a microcistina não parece ser citotóxica para *S.cerevisiae*, contudo apesar de se ter verificado que o MTT é um método que funciona muito bem em *S. cerevisiae*, poderá não ter sido o método mais adequado para analisar a toxicidade de MC-LR, pelo que é necessária uma confirmação dos resultados obtidos através de outras técnicas que avaliam a viabilidade celular. Em relação ao ensaio Cometa, os resultados não foram conclusivos, possivelmente devido à dificuldade em otimizar o método para leveduras, nomeadamente na migração do DNA no campo elétrico. No entanto, o método é bastante intuitivo e seria bastante interessante que futuramente viesse a ser otimizado para leveduras. Verificou-se que *S. cerevisiae* aparenta ser suscetível a MC-LR, confirmado pelos efeitos genotóxicos. Em relação ao método de RT-qPCR conseguiu-se obter tendências na expressão génica, quando comparadas com a situação controlo. Este método permitiu ver que a microcistina parece afetar ambas as vias do sistema de reparação de DNA BER, mas de forma diferente. No entanto é necessário realizar mais ensaios com

maior número de réplicas biológicas para que se possa proceder ao tratamento estatístico e obter resultados mais consistentes.

Apesar da dificuldade em reproduzir alguns métodos em leveduras, tudo indica que a microcistina-LR pode desempenhar um papel crítico na toxicidade de células eucariotas. Este trabalho permitiu contribuir um pouco mais um campo de estudo ainda pouco conhecido, utilizando *S.cerevisiae* como organismo modelo eucariota.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, microcistina, genotoxicidade, citotoxicidade

Abstract

Microcystins (MC) are hepatotoxins produced by cyanobacteria. Among the MCs, the microcystin-LR (MC-LR), produced by several cyanobacterial species, especially by the species *Microcystis aeruginosa*, is the most abundant and also the most well studied cyanotoxin. MCs are cyclic peptides which have high affinity for protein phosphatases Serine/Threonine (PPs), namely PP1 and PP2A, thus acting as their inhibitors, especially of the last one. It is from these interactions that a series of events occur which are responsible for the MCs cytotoxic and genotoxic effects on animal cells. It is also known that MCs induce oxidative stress in cells due to the production of reactive oxygen species (ROS), however a complete characterization of the effects of these toxins has not yet been obtained.

This project intends to clarify some of the molecular mechanisms of MC-LR toxicity in animal cells using *Saccharomyces cerevisiae* as an eukaryotic organism model.

To evaluate the cytotoxic effects of MC-LR, a cell viability assay was used to determine the functional capacity of the mitochondria, the MTT assay, after exposing the yeasts to different concentrations of MC-LR for 4 hours. Genotoxic effects were evaluated by gene expression studies for genes *Rad27*, *Apn1*, *Apn2*, *Ntg1* and *Ntg2* (from the BER DNA repair system) and *Cdc55* gene which encodes the PP2A phosphatase protein, using the Real-Time qPCR technique. The reference genes used for expression normalization were *Alg9* and *Taf10*. Furthermore, it was attempted to adapt the single cell gel electrophoresis assay (comet assay), conventionally performed on mammalian cells, to *Saccharomyces cerevisiae* cells, in order to quantify induced DNA breaks.

MTT was optimized and successfully used in *S. cerevisiae*. Apparently, MC-LR is not cytotoxic for *Saccharomyces cerevisiae*, although these results should be confirmed with other methods that accessed cell viability. Regarding the Comet assay, the results were not conclusive, possibly due to the difficulty in optimizing the method when applied to yeast cells, particularly in the DNA migration on the electric field. However, the first two steps of the YCA protocol were optimized. Concerning the RT-qPCR method it was possible to obtain tendencies in the gene expression levels, when compared with the control situation, thus revealing that MC-LR affects differently both BER pathways.

Despite the difficulty of reproducing some methods in yeast cells, it appears that microcystin-LR plays a critical role in the toxicity of eukaryotic cells. This work allowed us to contribute with a little more information to a still relative unknown study field.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, microcystin, genotoxicity, cytotoxicity