Renata Bannitz Fernandes

Caracterização bioquímica e estrutural de peroxirredoxinas de *Aspergillus fumigatus*, fungo patógeno oportunista humano

Biochemical and structural characterization of peroxiredoxins from *Aspergillus fumigatus*, human opportunistic pathogen

São Paulo

2018

Renata Bannitz Fernandes

Caracterização bioquímica e estrutural de peroxirredoxinas de *Aspergillus fumigatus*, fungo patógeno oportunista humano

Biochemical and structural characterization of peroxiredoxins from *Aspergillus fumigatus*, human opportunistic pathogen

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Biologia/ Genética. Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto

São Paulo

2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP, com os dados fornecidos pelo autor no formulário: http://www.ib.usp.br/biblioteca/ficha-catalografica/ficha.php

> Bannitz-Fernandes, Renata Caracterização bioquímica e estrutural de peroxirredoxinas de Aspergillus fumigatus, fungo patógeno oportunista humano / Renata Bannitz-Fernandes; orientador Luis Eduardo Soares Netto. -- São Paulo, 2018. 118 f. + anexo Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. 1. Peroxirredoxina. 2. Aspergillus fumigatus. 3. 1 Cys Prx. 4. Prx6. I. Netto, Luis Eduardo Soares, orient. II. Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura da catalogação da publicação: Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

Comissão Julgadora

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto Orientador

Dedicatória

À minha família, em especial aos meus sobrinhos Nicolas, Suria, Pietro e Luna, que nasceram junto com os experimentos mais importantes.

Epígrafe

"One child, one teacher, one pen and one book can change the world."

Malala Yousafzai

Agradecimentos

À Universidade de São Paulo, especialmente aos Instituto de Biociências e Instituto de Química por toda a estrutura oferecida.

Às agências de fomento FAPESP, Capes e CNPq pelo apoio financeiro durante todo o projeto.

À todo CEPID Redoxoma, especialmente à Prof. Dra. Ohara Augusto por coordenar todo o projeto e ser uma grande inspiração.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto por ter aberto as portas do seu laboratório e por todo o conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira e seu laboratório, que sempre me recebe tão bem e me ajuda com tantas questões (desde 2009).

Ao Prof. Dr. Iran Malavazi e seu laboratório na UFSCar, em especial à Ms. Krissia Godoy e Dra. Marina Rocha, por todo aprendizado e por me apresentarem ao *Aspergillus fumigatus*.

Ao Prof. Dr. Aron B. Fisher e todo o seu laboratório da Upenn (Dr. Chandra Dodia, Dr. Jose Vazquez-Medina, Pryal Patel, Dra. Elena Sorokina, Dra. Shampa Chatterjee, Dr Sheldon Feinstein e Dra. Tao) por terem me recebido tão bem durante meu primeiro estágio no exterior.

A todo Laboratorio de Fisicoquímica Biológida da UdelaR: aos amigos Mara Carreño, Martina Steglich, Luciana Fleitas, Jimena Hochmann, Dayana Benchoam, Florencia Orrico, Lucía Turell, Vera Skafar, Ana Clara Lopez, Sebastián Villar, Joaquín Dalla, Ernesto Cuevasanta, Bruno Musetti, Mariana Bonilla e aos professores Dra. Beatriz Alvarez, Dra. Ana Denicola, Dra. Leonor Thomson, Dr. Matías Möller e, especialmente, Dr. Gerardo Ferrer-Sueta. Gracias por me mostrarem um jeito mais divertido e proveitoso de trabalhar.

Aos amigos tão diversos que o Uruguai me deu, especialmente à Laura. Obrigada por ter sido minha família aí.

A todos os amigos do laboratório por todo companherismo, troca de conhecimento e diversão: Sushi, Flávio, Renato, Helena, Fernando, Thiago, Simone, Julia, Amanda, Rogério, Carol, João, Carlos, César, Juliana, Dérik, Diogo, Anita, Andressa, Cris (*in memoriam*), Jana, Erina, Verônica, Vanessa, Angélica.

Aos outros colegas do IB: Vânia, Tati, Paulo, Mara.

Às amigas Houston e Jé pelos cafezinhos e jantares pra quebrar a rotina.

Às amigas Camila e Carol, que mesmo longe estamos perto.

Às amigas sempre presentes desde os tempos de bixetes: Dime, Hima, Barna, Cumpadi e Tama.

À minha nova família Angélica, Geovani e Thamara por abrirem os braços para mim e os gatinhos num momento tão importante. Angie, obrigada por tudo! Não sei como teria feito sem você.

À minha família toda que sempre me apoiou nos momentos mais difíceis do doutorado e por me entenderem nos momentos que não pude estar presente.

Mãe, Rada, Dé, Sil, Suria, Luna, Manu, Giu, Nicolas, Pietro, Thi, vó Rachel, vó Sebastina, Leda, Gi, Cé, Leila, Ti, Frida, Tatá, Linus.

Pai, Sil, Lu, vô Dorival, vó Magnólia.

Resumo

Peroxirredoxinas (Prxs) são peroxidases muito eficientes que dependem de uma tríade catalítica composta por uma Thr (ou Ser em alguns casos), uma Cys e uma Arg para decompor peróxidos. Elas podem ser classificadas em 1-Cys Prx e 2-Cys Prx, de acordo com o número de Cys envolvidas na catálise, ou de acordo com características estruturais que dividem as Prxs em 6 subfamílias. A grande maioria das enzimas da subfamília Prx6 é composta por 1-Cys Prx. As Prx6 são ainda pouco caracterizadas e a identidade biológica de seu (s) redutor (es) ainda é controversa. Alguns dos redutores candidatos são a Trx e o ascorbato. As Prx6 de mamíferos também possuem atividade de fosfolipase do tipo A₂ (PLA₂), que depende de uma tríade catalítica composta por uma His, uma Ser e um Asp. Nessa tese, investigamos aspectos bioquímicos e estruturais de duas enzimas da subfamília Prx6 de Aspergillus fumigatus: a AfPrx1 citossólica e a AfPrxC mitocondrial. A. fumigatus é o mais importante fungo patogênico transmitido pelo ar. Inicialmente, caracterizamos as cinéticas de oxidação de AfPrx1 e AfPrxC por H2O2, t-BOOH, CuOOH, LAOOH e ONOO⁻, monitorando alterações redox-dependentes das fluorescência intrínseca dessas proteínas. Adicionalmente, avaliamos as reduções de AfPrx1 e AfPrxC por Trx, Grx, ascorbato, ergotioneína, GSH e H₂S. Apenas H₂S reduziu eficientemente AfPrx1 e AfPrxC ($k_{AfPrx1} \approx 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $k_{AfPrxC} \approx 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Além da atividade peroxidásica, utilizamos lipossomos radioativos para caracterizar pela primeira vez atividade fosfolipásica (PLA₂) para uma Prx de não-mamífero que AfPrx1 e AfPrxC possuem. Esta atividade ($\approx 200 \text{ nmol/ h/ mg}$ de proteína) pode ser inibida por MJ33 (aproximadamente 75 %) e aumentada pela fosforilação através de MAPK. Adicionalmente, estas proteínas estão envolvidas na sobrevivência do fungo durante interação com macrófagos. Utilizando microeletrodo, pudemos verificar que AfPrx1 é importante para detoxificar o fungo de H₂O₂ exógeno. A caracterização bioquímica destas atividades catalíticas das Prxs pode abrir novas perspectivas para tratamentos, já que pelo menos AfPrx1 está envolvida na virulência de A. fumigatus em ensaios com camundongos.

Abstract

Peroxiredoxins (Prxs) are highly efficient peroxidases that depend on a catalytic triad composed of Thr/Ser, Cys and Arg residues. These enzymes can be classified as 2-Cys Prx and 1-Cys Prx, according to the number of Cys residues involved in catalysis or according to structural characteristics that divide the Prxs in 6 subfamilies. The Prx6 subfamily is almost exclusively composed by 1-Cys Prx enzymes. This subfamily is still poorly characterized and the identities of their biological reductants are still controversial. Some of the reductant candidates are thioredoxin (Trx) and ascorbate. The mammalian members of this subfamily possess an additional phospholipase A₂ (PLA₂) activity that relies on another catalytic triad that is composed by His, Ser and Asp residues. In this thesis, we investigated biochemical and structural aspects of two enzymes belonging to the Prx6 subfamily from Aspergillus fumigatus: the cytosolic AfPrx1 and the mitochondrial AfPrxC. A. fumigatus is the most important pathogenic fungus transmitted through the air. Initially, we characterized the oxidation of AfPrx1 and AfPrxC by H₂O₂, t-BOOH, CuOOH, LAOOH and ONOO, monitoring redox dependent changes in the intrinsic fluorescence of these enzymes. Additionally, we characterized the reduction of AfPrx1 and AfPrxC by Trx, Grx, ascorbate, ergothioneine, GSH and H₂S. Interestingly, only H₂S reduced these proteins efficiently $(k_{AfPrx1} \approx 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ and}$ $k_{\text{AfPrxC}} \approx 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). In addition to the peroxidase activity, we determined for the first time the phospholipase activity (PLA₂) for a non-mammalian Prx, using liposomes radioactive-labeled. AfPrx1 and AfPrxC displayed PLA₂ activity (≈ 200 nmol/ h/ mg of protein) that was inhibited by MJ33 (about 75 %) and enhanced after phosphorylation by MAPK. Moreover, we also showed that these proteins were important for fungus survival during studies co-cultures with macrophages. Furthermore, AfPrx1 was important to detoxify A. fumigatus from exogenous added H₂O₂ as observed through an electrochemical approach. The biochemical and structural characterization of these Prxs described herein can open new therapeutic strategies, since at least AfPrx1 is involved in fungus virulence in a mouse model.

Introdução

Peroxirredoxinas e seu ciclo redox

As peroxirredoxinas (Prxs) são enzimas antioxidantes altamente conservadas, de grande representação entre os organismos e presentes em todos os reinos ^{1,2}. As Prxs estão envolvidas no processo de redução de hidroperóxidos no ambiente intracelular, portanto, possuem um importante papel na desintoxicação e no controle da concentração de hidroperóxidos ^{3–5}. As Prxs também reduzem o peroxinitrito; sendo que AhpC de *Salmonella typhimurium* foi a primeira Prx descrita com a capacidade de reduzir o peroxinitrito em nitrito, em velocidade rápida o suficiente para evitar danos nos componentes celulares ⁶. Além disso, as Prx estão implicadas em muitos processos diferentes como sinalização celular, proliferação, diferenciação, citotoxidade de *natural killer*, apoptose e permeabilidade da mitocôndria ^{4,7–9}.

As Prxs podem ser classificadas de acordo com o número de cisteínas envolvidas na catálise como 1-Cys Prx ou 2-Cys Prx, sendo que as 2-Cys Prx podem ser subdivididas em duas classes baseadas na formação intermolecular ou intramolecular do dissulfeto (2-Cys Prx típica e atípica, respectivamente) ¹⁰. Outra forma de classificação proposta envolve a conservação da sequência dos aminoácidos e/ ou características estruturais ^{11,12}. Recentemente foi criado uma base de dados (PREX - PeroxiRedoxin classification indEX) com 6325 sequências de Prxs subdivididas em seis subfamílias (AhpCPrx1, Prx6, Prx5, Tpx, BCP/PrxQ e AhpE). Os membros destas subfamílias foram identificados a partir de ferramenta de bioinformática que analisa sequências e diferenças entre: interface de oligomerização, sensibilidade redox, especificidade para doador de elétrons, sensibilidade de inativação com diferentes níveis de peróxido e especificidade de substrato (tipo de peróxido) ¹³.

Em todas as Prxs, a redução dos peróxidos começa pelo ataque nucleofílico do tiolato (RS⁻) da cisteína peroxidásica (Cys_P) a um dos oxigênios do peróxido. Assim, a ligação O-O do peróxido é clivada heteroliticamente, com consequente formação de ácido sulfênico no resíduo Cys_P (Cys_P-SOH) e liberação de H₂O, no caso do H₂O₂, ou de um derivado alcoólico no caso de peróxidos de lipídeos ¹⁴. O destino do ácido sulfênico (Cys_P-SOH) determina se a enzima é um 1-Cys Prx ou 2-Cys Prx. As 1-Cys Prx possuem somente uma cisteína catalítica (a Cys_P) e sua forma oxidada (Cys_P-SOH)

deve ser reduzida a fim de completar seu ciclo redox. Entretanto, para esta classe de proteínas (1-Cys Prx), esta etapa de redução não é bem estabelecida e seus agentes redutores na maioria das vezes são desconhecidos. Para algumas 1-Cys Prx, já foram descritos possíveis redutores, desde moléculas, como ascorbato; até sistemas redutores mais complexos como: sistema glutarredoxina (glutarredoxina (Grx), glutationa (GSH) e glutationa redutase (GR)); glutationa-S-transferase π (π GST) e glutationa (GSH); e sistema tiorredoxina (tiorredoxina (Trx), tiorredoxina redutase (TrxR) e NADPH) ^{15–20}. Adicionalmente, foi recentemente descrito que GSH pode atuar como tiól de resolução que, além de evitar a superoxidação de ScPrx1, favorece a redução por Trx3 sem o consumo de GSH ²¹ (Figura 1 C e Figura 2).

Em contraste, nas 2-Cys Prx o ácido sulfênico sofre reação de condensação com uma segunda cisteína, denominada de cisteína de resolução (Cys_R), liberando H₂O e formando uma ligação dissulfeto (Figura 1 A e B). Diversos trabalhos demonstram que para a formação do dissulfeto, há a necessidade de um rearranjo estrutural da Prx para que haja a aproximação das duas cisteínas ^{14,22}. A ciclagem das 2-Cys Prx oxidadas envolve redução efetuada pela Trx. Por sua vez, a Trx oxidada é reduzida pela TrxR, que utiliza elétrons oriundos do NADPH ^{1,5}.



Figura 1 – Mecanismo catalítico de três tipos de Prxs. A cisteína peroxidásica (C_P) primeiramente reage com o peróxido. Na 2-Cys Prx típica, C_P -OH reage com a cisteína de resolução (C_R) presente na segunda unidade do dímero (A), enquanto que na 2-Cys Prx atípica a C_R está localizada na mesma cadeia polipeptídica (B). O ácido sulfênico derivado da 1-Cys Prx é diretamente regenerado por um doador de elétrons para a forma tiol (C). Abreviações: ROOH: peróxido; Trx: tiorredoxina (adaptado ¹⁰).

As reações de Prxs com peróxidos apresentam constantes de segunda ordem que variam entre $10^6 - 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, o que representa uma extraordinária eficiência catalítica, já que a cisteína livre possui uma constante de segunda ordem de aproximadamente 10 $\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ²³. Ou seja, nas mesmas condições, as Prxs podem reagir 10.000.000 × mais rápido que uma Cys livre. Todas as Prxs caracterizadas até o momento possuem uma tríade catalítica (Cys_P, Thr/ Ser, Arg), sendo que os resíduos de Cys_P e a Thr/ Ser fazem parte do motivo universal das Prx (PxxxT/SxxC_P). Estes resíduos auxiliam na manutenção do ambiente favorável do sítio ativo ao, por exemplo, direcionar o peróxido e manter a Cys_P na forma de tiolato (Cys_P-S⁻)^{1,14,24,25}.

A unidade catalítica da grande maioria das Prxs é dimérica e podem se associar em tetrêmaros, hexâmeros e decâmeros ^{10,14,26}. Entre os fatores que interferem no estado oligomérico, pode-se citar pH, força iônica, concentração e estado redox ^{27–30}.

Entretanto, quando algumas 2-Cys Prx típicas são expostas a altas concentrações de peróxido, a C_P pode ser superoxidada, assumindo a forma de cisteína ácido sulfínico (C_P -SO₂H) ou cisteína ácido sulfônico (C_P -SO₃H), após o ataque da cisteína ácido sulfênico (C_P -SOH) por outras moléculas de peróxido. Estas enzimas superoxidadas podem se polimerizam e formar oligômeros de maior massa molecular, muitos dos quais apresentam uma segunda atividade além da peroxidásica: de chaperona molecular; e podem ter função de sinalizador celular^{4,31}. Nas 2-Cys Prx pode ocorrer a redução do ácido sulfínico, em um processo lento e dependente de ATP e catalisado pela enzima sulfirredoxina (Srx)^{32,33}.

Quando uma enzima possui mais de uma atividade bioquímica, mas não como um produto de fusões gênicas, muitas vezes é denominada de *moonlight protein* ³⁴. Neste contexto, adicionalmente às 2-Cys Prx típicas que exibem atividade peroxidásica e de chaperona molecular, algumas 1-Cys Prx possuem além da atividade peroxidásica a atividade de fosfolipase A_2 (PLA₂), sendo capazes de hidrolisar fosfolipídeos. Em mamíferos, estão fortemente relacionadas com a manutenção da homesotase do surfactante e decomposição de fosfatidilcolina internalizada de células pulmonares. Em fungos patógenos, enzimas PLA₂ liberadas durante a infecção de hospedeiros mamíferos podem desempenhar importantes papéis na aquisição de nutrientes pelo fungo, na invasão tecidual e na modulação da resposta imune do hospedeiro. As Prx6 de mamíferos que possuem atividade de PLA₂ utilizam a tríade catalítica S³², H²⁶ e D¹⁴⁰para hidrolisar o fosfolipídeo ^{35–38}.



Oxidized 1-Cys Prx

Figura 2 – Possíveis agentes redutores de 1-Cys Prx. A unidade catalítica da grande maioria das peroxirredoxinas 1-Cys é dimérica, cada monômero possui uma cisteína envolvida na catálise e estão representados em verde e azul. De maneira geral, as Prxs decompõem moléculas de peróxido, ficando oxidadas (Cys-SOH). Desta forma, precisam ser reduzidas para ficarem novamente ativas (Cys-SH). Esta etapa da redução não é clara para as 1-Cys Prx e alguns dos agentes redutores já descritos que possivelmente estão envolvidos nesta etapa são o ascorbato; a glutaredoxina (Grx) com glutationa (GSH), a glutationa-S-transferase (π GST) com GSH; enzimas lipoiladas e o sistema Trx (tiorredoxina, tiorredoxina redutase e NADPH). A peroxirredoxina ilustrada em *cartoon* é a Prx6 de *Homo sapiens* (PDB code: 1PRX). O átomo de enxofre está destacado em amarelo e o átomo de oxigênio em vermelho. Imagem gerada através do programa Pymol.

Envolvimento de Peroxirredoxinas na sobrevivência, virulência e patogenicidade de organismos patogênicos

Diversos estudos demonstram que, durante infecções, um dos mecanismos mais importantes para a defesa do hospedeiro é o *burst* oxidativo. O *burst* oxidativo é a geração de diversas moléculas oxidantes (H₂O₂, O₂^{-•}, HOCl) no fagossomo de células fagocitárias, como macrófagos e neutrófilos, a fim de eliminar o patógeno do organismo (Figura 3) ^{39–41}.

Como mencionado anteriormente, as Prxs são capazes de detoxificar peróxidos com alta eficiência e acredita-se que teriam um papel importante na resposta de patógenos (como bactérias, fungos e tripanossomatídeos) ao estresse oxidativo gerado pelo hospedeiro. Além de sua alta reatividade e abundância, muitos destes microorganismos não possuem catalases e/ou glutationa peroxidases selênio dependentes (GPx). Em princípio, a depleção dos níveis de antioxidantes de patógenos os tornaria mais susceptíveis ao estresse oxidativo gerado pelo hospedeiro. Sendo assim, é importante a caracterização destas proteínas e seus papéis na prevenção de danos oxidativos aos patógenos ^{42–45}.



Figura 3 – *Burst* oxidativo produzido em fagossomo de células fagocitárias do hospedeiro versus os principais mecanismos de defesa antioxidante proteico do patógeno. No hospedeiro: NADPH oxidase 2 (NOX2) é um complexo proteico que, quando ativado, possui seis subunidades (p40phox, p67phox, Rac, p47phox, p22phox e gp91phox) e produz radical ânion superóxido (O_2^{\bullet}) através da redução do oxigênio molecular (O_2). O radical produzido pode sofrer dismutação espontânea ou catalisada pela Superóxido Dismutase (SOD) e formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A proteína Mieloperoxidase (MPO) pode ainda produzir ácido hipocloroso (HOCl) a partir do H_2O_2 e íon cloreto (Cl⁻). Óxido nítrico sintase (iNOS) catalisa a produção de óxido nítrico (NO⁺) a partir de L-arginina. No patógeno: SOD catalisa a dismutação de $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 . Peroxirredoxina (Prx) catalisa a redução de hidroperóxidos no álcool correspondente ou água, no caso de H_2O_2 . Catalase (Cat) catalisa a redução de H_2O_2 em H_2O . Glutationa peroxidase (GPx) catalisa a redução de hidroperóxidos no álcool correspondente ou água, no caso de glutationa (GSH) (adaptado ⁴⁶).

Em *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas, foi demonstrado que as Prx desempenham papel fundamental no desenvolvimento da doença, uma vez que parasitas que superexpressam Prx (c-TXNPx e m-TXNPx) apresentam um significante aumento na capacidade de infectar células fagocíticas e não fagocíticas ⁴⁷.

Salmonella typhimurium (o agente causador de moléstias gastrointestinais, febre tifóide e septicemia) é um patógeno intracelular de macrófagos e, portanto, está sob intenso estresse oxidativo. Recentemente foi demonstrado que linhagens deficientes de Prx apresentam alteração da morfologia celular e proliferação reduzida no interior da célula. O estudo também revelou que quando uma Prx (TSAA) é superexpressa em células de *S. typhimurium* nocautedas para genes envolvidos na decomposição de peróxidos ($\Delta KatE$, $\Delta KatG$, $\Delta KatN$, $\Delta AhpC$ e $\Delta TSAA$), o patógeno recupera as características da linhagem selvagem. Estes dados indicam que as Prx de *S. typhimurium* contribuem para a virulência do patógeno ao capacitá-lo a sobreviver em ambientes hostis ⁴⁸. Adicionalmente, em *Mycobacterium tuberculosis*, o agente causador da tuberculose, foi demonstrado que em linhagens que apresentam deleção do gene que codifica a enzima catalase são virulentas e que a sobrevivência destas cepas no hospedeiro é atribuída às Prx ⁴⁹.

Recentemente, uma Prx de *Aspergillus fumigatus* foi caracterizada pela primeira vez. Nomeada de Asp f3, a proteína é 2-Cys, dimérica e possui atividade peroxidásica com H_2O_2 e peróxido orgânico *t*-BOOH. O fungo *knockout* para o gene *asp f3* foi sensível a estresse oxidativo e significativamente menos virulento em modelo de aspergilose invasiva pulmonar (AIP) em camundongo⁵⁰.

Outro trabalho, agora envolvendo uma Prx 1-Cys, demonstra o envolvimento desta proteína (LsfA) na proteção contra H_2O_2 e na patogenicidade de *Pseudomonas aeruginosa*. Em modelo de pneumonia aguda, camundongos infectados com a bacteria *knockout* para o gene *lsfA* liberam mais citocinas nos pulmões, recrutam mais neutrófilos e possuem melhores taxas de sobrevivência se comparados ao wt⁵¹.

Em acordo com as observações acima, as tiól peroxidases são largamente encontradas e bastante abundantes em patógenos que infectam animais e plantas ^{52,53}. Em alguns casos, estas proteínas apresentam aspectos estruturais únicos que as diferem largamente de enzimas correspondentes do hospedeiro e as colocam como alvos bastante promissores para o desenvolvimento de drogas específicas para o combate de determinados patógenos ^{45,47,54,55}. De fato, cabe destacar aqui que vários antibióticos e adjuvantes (compostos que fazem a bactéria mais suscetível aos antibióticos) operam via geração de estresse oxidativo ao hospedeiro ⁵⁶. Desta forma, a importância de enzimas antioxidantes, incluindo as Prx, para a manutenção do patógeno fica ainda mais evidente uma vez que sua depleção ou inibição pode resultar na hipersensibilidade do

patógeno frente à explosão oxidativa gerada naturalmente pelo hospedeiro ou através da administração de drogas ⁵⁷.

Aspergillus fumigatus: o mais importante fungo patogênico transmitido pelo ar

Espécies do gênero *Aspergillus* são ubíquas, saprofíticas e possuem um papel importante no ciclo do carbono e nitrogênio. Apesar de desempenharem este papel ecológico importante, algumas espécies são patógenos oportunistas, que produzem conídios pequenos e hidrofóbicos que se dispersam facilmente no ar e sobrevivem em uma grande variedade de ambientes ^{58,59}. *A. fumigatus* é um dos responsáveis mais frequentes por infecções fúngicas sistêmicas, sendo considerado o principal fungo patogênico transmitido pelo ar. As infecções são causadas pela inalação dos conídios, que atingem os pulmões do hospedeiro. Os conídios liberados na atmosfera possuem diâmetro pequeno o suficiente (2 a 3 μ m) para atingir os alvéolos pulmonares ^{60,61}. A população residente de macrófagos alveolares é a primeira linha de defesa imune a interagir com *A. fumigatus* no pulmão ⁶². Os conídios que não forem eliminados pelos alvéolos pulmonares germinam, originando micélios. Estes são atacados pelos neutrófilos recrutados através da liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos alveolares. Tanto os macrófagos alveolares quanto os neutrófilos recrutados utilizam mecanismos oxidativos (como H₂O₂) como não-oxidativos (como proteases) para eliminar o fungo (Figura 4) ^{63,64}.

Entretanto, indivíduos com deficiências no sistema imune, como neutropenia (diminuição no número de neutrófilos na corrente sanguínea), pacientes que recebem tratamento com corticosteroides, indivíduos com AIDS e pacientes com doença granulomatosa crônica hereditária, podem adquirir infecções com altas taxas de mortalidade. Os tipos de doenças causadas por este fungo em indivíduos imuno-competentes são reações alérgicas e colonização com invasão limitada, enquanto que em indivíduos imuno-comprometidos são infecções severas com altas taxas de mortalidade ^{61,65}.

Os sintomas das infecções fúngicas invasivas são inespecíficos, tornando o diagnóstico baseado em diferentes técnicas como exame de tecidos, radiologia, cultivos microbiológicos bem como testes sorológicos e moleculares. Essas infecções são a principal causa de mortalidade em pacientes que foram submetidos a transplante de medula óssea ou transplante de células-tronco ⁵⁸. A Aspergilose Invasiva Pulmonar (AIP) é o principal exemplo de infecção de alto risco em indivíduos imuno-comprometidos, podendo alcançar taxa de mortalidade de até 90%, pois geralmente é

fatal se não for tratada rapidamente. Diagnósticos específicos são muito limitados e intervenções terapêuticas são ineficazes, o que agrava ainda mais o prognóstico dos pacientes ⁶⁶. Embora as hospitalizações relacionadas à aspergilose representem uma pequena porcentagem das internações, os pacientes internados nesta condição têm hospitalização prolongada e altas chances de mortalidade, aumentando muito os custos envolvidos com esta doença ⁶⁷.



Figura 4 – Mecanismos de defesa dos indivíduos imunocompetentes. Após a inalação, macrófagos alveolares e o epitélio respiratório eliminam os conídios de *A. fumigatus*, a maioria dormente (A). Após exposição substancial (B), a grande carga fúngica supera essas defesas, permitindo que mais conídios em germinação sobrevivam. Em resposta às hifas germinantes, os neutrófilos são recrutados através de citocinas de macrófagos alveolares ou pneumocitos, ou ambos. Neutrófilos atacam hifas, inibindo seu crescimento (extraído ⁶³).

Objetivos

Objetivo Geral

Caracterização funcional e estrutural das enzimas antioxidantes AfPrx1 e AfPrxC do fungo patógeno humano *A. fumigatus*.

Metas

- Busca por peroxirredoxinas da subfamília 6 em A. fumigatus.
- Clonagem, expressão e purificação de AfPrx1 e AfPrxC;
- Determinação do estado oligomérico;
- Determinação da atividade peroxidásica (H₂O₂; *t*-BOOH; CuOOH; LAOOH; ONOO⁻);
- Verificar a importância de AfPrx1 e AfPrxC na detoxificação do fungo;
- Avaliação do possível redutor biológico destas enzimas (sistema Trx; sistema Grx; ascorbato; ergotioneína; GSH; H₂S);
- Avaliação da atividade de PLA₂.

Conclusões

- A. fumigatus possui ao menos duas Prx da subfamília Prx6: AfPrx1 e AfPrxC;
- AfPrx1 é citoplasmática e AfPrxC é mitocondrial;
- Com relação à estrutura primária e atividade peroxidásica: AfPrx1 e AfPrxC possuem a tríade catalítica para atividade peroxidásica (T, C e R), o motivo universal das Prx (PxxxTxxS) e o motivo das Prx6 (PVCTTE);
- Com relação à estrutura primária e atividade PLA₂: AfPrx1 e AfPrxC apresentam a tríade catalítica para atividade de PLA₂ (H, S, D), provável peptídeo endereçador lisossomal e T fosforilável conservada;
- AfPrx1 e AfPrxC foram clonadas, expressas e purificadas com alto grau de pureza. AfPrxC somente é expressa sem pré-sequência mitocondrial;
- AfPrx1 e AfPrxC são proteínas diméricas independente de concentração e estado redox;
- AfPrx1 e AfPrxC reduzem de maneira eficiente os seguintes peróxidos: H₂O₂; *t*-BOOH; CuOOH; LAOOH e ONOO⁻;
- AfPrxC é mais reativa com peróxidos orgânicos se comparada com AfPrx1, principalmente com LAOOH. Essa característica pode estar relacionada com a superfície hodrofóbica desta enzima na região do sítio ativo;
- Ao acompanhar a fluorescência intrínseca destas proteínas nos ensaios de oxidação, é possível notar pelo menos duas fases de reação. A primeira é muito rápida e representa a oxidação da Cys peroxidásica a ácido sulfênico (C-SOH). A segunda fase é independente da concentração do peróxido quando este encontra-se em baixas doses e é dependente quando em doses mais altas. Para os casos de dependência, assumimos que a reação se tratava da superoxidação proteica.
- Através de medidas eletroquímicas em micélio de A. fumigatus (linhagens wt, ΔAfPrx1 e ΔAfPrx1:: ΔAfPrx1⁺), pudemos atestar a grande importância de AfPrx1 na detoxificação de H₂O₂ exógeno. Apesar de incapaz de restaurar os níveis basais de H₂O₂, ΔAfPrx1 manteve-se viável após o tratamento com o peróxido;

- Todos os fungos *knockouts* simples as Prx6 de *A. fumigatus* sobrevivem significativamente menos após interação com macrófagos quando comparados com as linhagens wt e complementares;
- Dentre todos os sistemas redutores testados (sistema Trx, sistema Trx + GSH, sistema Grx, ascorbato, ergotioneína, GSH e H₂S), apenas o H₂S foi capaz de reduzir as proteínas de maneira eficiente (k_{AfPrx1} ≈ 10³ M⁻¹ s⁻¹ e k_{AfPrxC} ≈ 10⁴ M⁻¹ s⁻¹);
- A. *fumigatus* provavelmente sintetiza D-eritroascorbato (análogo de ascorbato).
 A concentração intracelular desta molécula é de aproximadamente 200 μM;
- AfPrx1 e AfPrxC possuem atividade de PLA₂ ácida (pH 4) e independente de Ca⁺² (aiPLA₂) de aproximadamente 200 nmol/ h/ mg de proteína;
- A atividade de PLA₂ é inibida pelo inibidor competitivo MJ33 em aproximadamente 75 %;
- AfPrxC é fosforilada por Erk2 e esta fosforilação aumenta a atividade de PLA₂, tanto em pH 4 quanto em pH 7,4;
- Apesar de não termos detectado a fosforilação em AfPrx1, após seu tratamento com Erk2 esta proteína também teve sua atividade de PLA₂ aumentada em pH 4 e pH 7,4.

Referências

- Rhee, S. G., Chae, H. Z. & Kim, K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 1543–52 (2005).
- 2. Eppig, J. J. & Pyle, A. D. Peroxiredoxin Evolution and the Signaling. **300**, 650–653 (2003).
- Netto, L. E. S., Chae, H. Z., Kang, S., Rhee, S. G. & Stadtman, E. R. Removal of Hydrogen Peroxide by Thiol-specific Antioxidant Enzyme (TSA) Is Involved with Its Antioxidant Properties. *J. Biol. Chem.* 271, 15315–15321 (1996).
- 4. Hall, A., Karplus, P. A. & Poole, L. B. Typical 2-Cys Peroxiredoxins: Structures, mechanisms and functions. *FEBS J* **276**, 2469–2477 (2009).
- Chae, H. Z., Chung, S. J. & Rhee, S. G. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. J. Biol. Chem. 269, 27670–8 (1994).
- Bryk, R., Griffin, P. & Nathan, C. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* 407, 211–5 (2000).
- Kang, S. W., Rhee, S. G., Chang, T.-S., Jeong, W. & Choi, M. H. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. *Trends Mol. Med.* 11, 571–8 (2005).
- 8. Brown, J. D. *et al.* A peroxiredoxin promotes H2O2 signaling and oxidative stress resistance by oxidizing a thioredoxin family protein. *Cell Rep.* **5**, 1425–35 (2013).
- Zhang, M. *et al.* Induction of Peroxiredoxin 1 by Hypoxia Regulates Heme Oxygenase-1 via NF-кВ in Oral Cancer. *PLoS One* 9, e105994 (2014).
- Barranco-Medina, S., Lázaro, J.-J. & Dietz, K.-J. The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function. *FEBS Lett.* 583, 1809–16 (2009).
- Nelson, K. J. *et al.* Analysis of the peroxiredoxin family: using active site structure and sequence information for global classification and residue analysis. *Proteins* **79**, 947– 964 (2011).
- Copley, S. D., Novak, W. R. P. & Babbitt, P. C. Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry* 43, 13981–95 (2004).
- Soito, L. *et al.* PREX: PeroxiRedoxin classification indEX, a database of subfamily assignments across the diverse peroxiredoxin family. *Nucleic Acids Res.* 39, D332–7 (2011).
- 14. Wood, Z. a, Schröder, E., Robin Harris, J. & Poole, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 32–40 (2003).

- Monteiro, G., Horta, B. B., Pimenta, D. C., Augusto, O. & Netto, L. E. S. Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 4886–91 (2007).
- Djuika, C. F. *et al.* Plasmodium falciparum antioxidant protein as a model enzyme for a special class of glutaredoxin/glutathione-dependent peroxiredoxins. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 4073–90 (2013).
- Pedrajas, J. R., Padilla, C. A., McDonagh, B. & Bárcena, J. A. Glutaredoxin participates in the reduction of peroxides by the mitochondrial 1-CYS peroxiredoxin in Saccharomyces cerevisiae. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 249–58 (2010).
- 18. Deponte, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathionedependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 3217–66 (2013).
- Ralat, L. a, Manevich, Y., Fisher, A. B. & Colman, R. F. Direct evidence for the formation of a complex between 1-cysteine peroxiredoxin and glutathione S-transferase pi with activity changes in both enzymes. *Biochemistry* 45, 360–72 (2006).
- Manevich, Y., Feinstein, S. I. & Fisher, a B. Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3780–5 (2004).
- Pedrajas, J. R. *et al.* Glutathione Is the Resolving Thiol for Thioredoxin Peroxidase Activity of 1-Cys Peroxiredoxin Without Being Consumed During the Catalytic Cycle. *Antioxid. Redox Signal.* 150819074011003 (2015). doi:10.1089/ars.2015.6366
- 22. Tairum, C. a, de Oliveira, M. a, Horta, B. B., Zara, F. J. & Netto, L. E. S. Disulfide Biochemistry in 2-Cys Peroxiredoxin: Requirement of Glu50 and Arg146 for the Reduction of Yeast Tsa1 by Thioredoxin. J. Mol. Biol. 424, 28–41 (2012).
- 23. Winterbourn, C. C. & Metodiewa, D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 322–328 (1999).
- 24. Flohe, L. A Comparison of Thiol Peroxidase Mechanisms. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 763–780 (2011).
- Hall, A., Parsonage, D., Poole, L. B. & Karplus, P. A. Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on transition-state stabilization. *J. Mol. Biol.* 402, 194–209 (2010).
- Park, S. G., Cha, M. K., Jeong, W. & Kim, I. H. Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* 275, 5723–32 (2000).
- 27. Kitano, K., Niimura, Y., Nishiyama, Y. & Miki, K. Stimulation of peroxidase activity by decamerization related to ionic strength: AhpC protein from Amphibacillus xylanus. *J.*

Biochem. 126, 313–319 (1999).

- 28. Morais, M. A. B. *et al.* How pH modulates the dimer-decamer interconversion of 2-cys peroxiredoxins from the Prx1 subfamily. *J. Biol. Chem.* **290**, 8582–8590 (2015).
- 29. Demasi, A. P. D., Pereira, G. a G. & Netto, L. E. S. Yeast oxidative stress response. Influences of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial functional state. *FEBS J.* **273**, 805–16 (2006).
- 30. Parsonage, D. *et al.* Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Biochemistry* **44**, 10583–10592 (2005).
- Jang, H. H. *et al.* Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* 117, 625–35 (2004).
- Lowther, W. T. & Haynes, A. C. Reduction of Cysteine Sulfinic Acid in Eukaryotic, Typical 2-Cys Peroxiredoxins by Sulfiredoxin. 99–109 (2011).
- Biteau, B., Labarre, J. & Toledano, Michael, B. ATP-dependent reduction of cysteine sulphinic acid by S. cerevisiae sulphiredoxin. *Nature* 425, 980–984 (2003).
- 34. Jeffery, C. J. Moonlighting proteins--an update. *Mol. Biosyst.* 5, 345–50 (2009).
- Fisher, A. B. Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ activities. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 831–44 (2011).
- Chen, J. W., Dodia, C., Feinstein, S. I., Jain, M. K. & Fisher, a B. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J. Biol. Chem.* 275, 28421–7 (2000).
- Oláhová, M. *et al.* A redox-sensitive peroxiredoxin that is important for longevity has tissue- and stress-specific roles in stress resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 19839–44 (2008).
- 38. Lien, Y.-C., Feinstein, S. I., Dodia, C. & Fisher, A. B. The roles of peroxidase and phospholipase A2 activities of peroxiredoxin 6 in protecting pulmonary microvascular endothelial cells against peroxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 440–51 (2012).
- Slauch, J. M. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Mol. Microbiol.* 80, 580–583 (2011).
- 40. Flannagan, R. S., Cosío, G. & Grinstein, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 355–66 (2009).
- 41. Wojtaszek, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.*322, 681–692 (1997).
- 42. Beavers, W. N. & Skaar, E. P. Neutrophil-generated oxidative stress and protein damage in Staphylococcus aureus. *Pathog. Dis.* **74**, 1–15 (2016).
- 43. Liebert, M. A., Nickel, C., Rahlfs, S., Deponte, M. & Cells, R. E. D. B. Thioredoxin

Networks in the Malarial Parasite Plasmodium falciparum. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1227–1239 (2006).

- 44. Gretes, M. C., Poole, L. B. & Karplus, P. A. Peroxiredoxins in parasites. *Antioxid. Redox Signal.* **17**, 608–33 (2012).
- 45. Jaeger, T. & Flohé, L. The thiol-based redox networks of pathogens: unexploited targets in the search for new drugs. *BioFactors* **27**, 109–20 (2006).
- 46. Flannagan, R. S., Cosío, G. & Grinstein, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 355–366 (2009).
- Piñeyro, M. D., Parodi-Talice, A., Arcari, T. & Robello, C. Peroxiredoxins from Trypanosoma cruzi: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene* 408, 45–50 (2008).
- Hébrard, M., Viala, J. P. M., Méresse, S., Barras, Frédéric, B. & Aussel, L. Redundant Hydrogen Peroxide Scavengers Contribute to Salmonella Virulence and Oxidative Stress Resistance. *J. Bacteriol.* 191, 4605–4614 (2009).
- Manca, C., Paul, S., Barry, C. E., Freedman, V. H. & Kaplan, G. Mycobacterium tuberculosis catalase and peroxidase activities and resistance to oxidative killing in human monocytes in vitro. *Infect. Immun.* 67, 74–79 (1999).
- Hillmann, F. *et al.* The Crystal Structure of Peroxiredoxin Asp f3 Provides Mechanistic Insight into Oxidative Stress Resistance and Virulence of Aspergillus fumigatus. *Sci. Rep.* 6, 33396 (2016).
- 51. Kaihami, G. H. *et al.* Involvement of a 1-Cys Peroxiredoxin in Bacterial Virulence. *PLoS Pathog.* **10**, (2014).
- Encheva, V., Wait, R., Gharbia, S. E., Begum, S. & Shah, H. N. Proteome analysis of serovars Typhimurium and Pullorum of Salmonella enterica subspecies I. *BMC Microbiol.* 5, 1–10 (2005).
- Iwasaki, M. *et al.* One-Dimensional Capillary Liquid Chromatographic Separation Coupled with Tandem Mass Spectrometry Unveils the Escherichia coli Proteome on a Microarray Scale. *Anal. Chem.* 82, 2616–2620 (2010).
- Horta, B. B., Oliveira, M. A. De, Discola, K. F., Cussiol, J. R. R. & Netto, L. E. S. Structural and biochemical characterization of peroxiredoxin Qb from Xylella fastidiosa. *J. Biol. Chem.* 16051–16065 (2010).
- 55. Oliveira, M. a *et al.* Structural insights into enzyme-substrate interaction and characterization of enzymatic intermediates of organic hydroperoxide resistance protein from Xylella fastidiosa. *J. Mol. Biol.* **359**, 433–45 (2006).
- Farha, M. a & Brown, E. D. Discovery of antibiotic adjuvants. *Nat. Biotechnol.* 31, 120–2 (2013).
- 57. Hassett, D. J. & Imlay, J. A. Bacterial Antibiotics and Oxidative Stress: A Radical

Proposal. ACS Chem. Biol. 2, 708–710 (2007).

- 58. Dagenais, T. R. T. & Keller, N. P. Pathogenesis of Aspergillus fumigatus in Invasive Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 447–65 (2009).
- Reichenberger, F., Habicht, J. M., Gratwohl, A. & Tamm, M. Diagnosis and treatment of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients. *Eur. Respir. J.* 19, 743–755 (2002).
- Lessing, F. *et al.* The Aspergillus fumigatus Transcriptional Regulator AfYap1 Represents the Major Regulator for Defense against Reactive Oxygen Intermediates but Is Dispensable for Pathogenicity in an Intranasal Mouse Infection Model *†. Eukaryot. Cell* 6, 2290–2302 (2007).
- Latgé, J.-P. Aspergillus fumigatus and Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 310–350 (1999).
- 62. Morton, C. O., Bouzani, M., Loeffler, J. & Rogers, T. R. Direct interaction studies between Aspergillus fumigatus and human immune cells; what have we learned about pathogenicity and host immunity? *Front. Microbiol.* **3**, 1–7 (2012).
- 63. Vinh, D. C. Insights into human antifungal immunity from primary immunodeficiencies. *Lancet Infect. Dis.* **11**, 780–792 (2011).
- 64. Heinekamp, T. *et al.* Interference of Aspergillus fumigatus with the immune response. *Semin. Immunopathol.* **37**, 141–152 (2015).
- 65. Denning, D. W. Invasive Aspergillosis. CID 781-803 (1998).
- 66. Albrecht, D., Guthke, R., Brakhage, A. a & Kniemeyer, O. Integrative analysis of the heat shock response in Aspergillus fumigatus. *BMC Genomics* **11**, 32 (2010).
- Dasbach, E. J. Burden of Aspergillosis-Related Hospitalizations in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 31, 1524–1528 (2000).
- Choi, J. *et al.* fPoxDB: fungal peroxidase database for comparative genomics. *BMC Microbiol.* 14, 117 (2014).
- Horton, P. *et al.* WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* 35, W585–W587 (2007).
- 70. Fukasawa, Y. *et al.* MitoFates: Improved Prediction of Mitochondrial Targeting Sequences and Their Cleavage Sites. *Mol. Cell. Proteomics* **14**, 1113–1126 (2015).
- Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, a. J. & Bateman, a. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 42, D503–D509 (2014).
- 72. Sorokina, E. M., Feinstein, S. I., Milovanova, T. N. & Fisher, A. B. Identification of the amino acid sequence that targets peroxiredoxin 6 to lysosome-like structures of lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **297**, L871–80 (2009).
- 73. Waterhouse, A. et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and

complexes. Nucleic Acids Res. 46, W296–W303 (2018).

- 74. Semenyuk, A. V. & Svergun, D. I. GNOM. A program package for small-angle scattering data processing. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 537–540 (1991).
- Svergun, D., Barberato, C. & Koch, M. H. CRYSOL A program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Crystallogr.* 28, 768–773 (1995).
- 76. Petoukhov, M. V. *et al.* New developments in the ATSAS program package for smallangle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* **45**, 342–350 (2012).
- Toledo, J. C. *et al.* Horseradish peroxidase compound I as a tool to investigate reactive protein-cysteine residues: from quantification to kinetics. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 1032–8 (2011).
- 78. Ogusucu, R., Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L. E. S. & Augusto, O. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 326–34 (2007).
- Miyamoto, S., Martinez, G. R., Martins, A. P. B., Medeiros, M. H. G. & Di Mascio, P. Direct evidence of singlet molecular oxygen [O2 (1Δg)] production in the reaction of linoleic acid hydroperoxide with peroxynitrite. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 4510–4517 (2003).
- Radil, R., Beckman, J. S., Bush, K. M. & Freeman, B. a. Peroxynitrite Oxidation of Sulfhydryls. J. Biol. Chem. 266, 4244–4250 (1991).
- Trujillo, M. *et al.* Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. *J. Biol. Chem.* 279, 34175–34182 (2004).
- Santos, C. S. *et al.* Monitoring H2O2 inside Aspergillus fumigatus with an integrated microelectrode: the role of peroxiredoxin protein Prx1. *Anal. Chem.* acs.analchem.7b04074 (2018). doi:10.1021/acs.analchem.7b04074
- 83. Käfer Etta. in Advances in Genetics 33–131 (1977).
- Rampersad, S. N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Switzerland)* 12, 12347–12360 (2012).
- 85. Repp, K. K., Menor, S. A. & Pettit, R. K. Microplate Alamar blue assay for susceptibility testing of Candida albicans biofilms. *Med. Mycol.* **45**, 603–607 (2007).
- Meletiadis, J. *et al.* Colorimetric assay for antifungal susceptibility testing of Aspergillus species. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3402–8 (2001).
- Nelson, K. J. *et al.* Analysis of the peroxiredoxin family: using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis. *Proteins* **79**, 947–64 (2011).

- Nevalainen, T. J. 1-Cysteine peroxiredoxin: A dual-function enzyme with peroxidase and acidic Ca2+-independent phospholipase A2 activities. *Biochimie* 92, 638–644 (2010).
- Chatterjee, S. *et al.* Peroxiredoxin 6 phosphorylation and subsequent phospholipase A2 activity are required for agonist-mediated activation of NADPH oxidase in mouse pulmonary microvascular endothelium and alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* 286, 11696–706 (2011).
- 90. Albrecht, D., Guthke, R., Brakhage, A. a & Kniemeyer, O. Integrative analysis of the heat shock response in Aspergillus fumigatus. *BMC Genomics* **11**, 32 (2010).
- 91. Barker, B. M. *et al.* Transcriptomic and proteomic analyses of the *Aspergillus fumigatus* hypoxia response using an oxygen-controlled fermenter. *BMC Genomics* **13**, 62 (2012).
- Cagas, S. E., Jain, M. R., Li, H. & Perlin, D. S. The Proteomic Signature of *Aspergillus fumigatus* During Early Development. *Mol. Cell. Proteomics* 10, M111.010108 (2011).
- Cagas, S. E., Jain, M. R., Li, H. & Perlin, D. S. Profiling the Aspergillus fumigatus proteome in response to caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 146–154 (2011).
- 94. da Silva Ferreira, M. E. *et al.* Transcriptome analysis of Aspergillus fumigatus exposed to voriconazole. *Curr. Genet.* **50**, 32–44 (2006).
- 95. Gautam, P. *et al.* Proteomic and transcriptomic analysis of Aspergillus fumigatus on exposure to amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 4220–4227 (2008).
- 96. Gautam, P. *et al.* Transcriptomic and Proteomic Profile of Aspergillus fumigatus on Exposure to Artemisinin. *Mycopathologia* **172**, 331–346 (2011).
- 97. Hagag, S. *et al.* Transcriptional and proteomic analysis of the aspergillus fumigatus δprtt protease-deficient mutant. *PLoS One* **7**, (2012).
- 98. Kniemeyer, O., Lessing, F. & Brakhage, A. a. Proteome analysis for pathogenicity and new diagnostic markers for Aspergillus fumigatus. *Med. Mycol.* **47**, S248–54 (2009).
- 99. Lessing, F. *et al.* The Aspergillus fumigatus transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryot. Cell* 6, 2290–302 (2007).
- 100. Ouyang, H., Luo, Y., Zhang, L., Li, Y. & Jin, C. Proteome analysis of Aspergillus fumigatus total membrane proteins identifies proteins associated with the glycoconjugates and cell wall biosynthesis using 2D LC-MS/MS. *Mol. Biotechnol.* 44, 177–189 (2010).
- 101. Owens, R. a., Hammel, S., Sheridan, K. J., Jones, G. W. & Doyle, S. A Proteomic Approach to Investigating Gene Cluster Expression and Secondary Metabolite Functionality in Aspergillus fumigatus. *PLoS One* 9, e106942 (2014).

- 102. Singh, S. *et al.* Proteomic Characterization of Aspergillus f umigatus Treated with an Antifungal Coumarin for Identi fi cation of Novel Target Molecules of Key Pathways. (2012).
- 103. Sugui, J. A. *et al.* Genes differentially expressed in conidia and hyphae of Aspergillus fumigatus upon exposure to human neutrophils. *PLoS One* **3**, (2008).
- 104. Suh, M. J. *et al.* Development stage-specific proteomic profiling uncovers small, lineage specific proteins most abundant in the Aspergillus Fumigatus conidial proteome. *Proteome Sci.* 10, 1–13 (2012).
- 105. Teutschbein, J. *et al.* Proteome profiling and functional classification of intracellular proteins from conidia of the human-pathogenic mold aspergillus fumigatus. *J. Proteome Res.* 9, 3427–3442 (2010).
- 106. Teutschbein, J. et al. Proteomic profiling of serological responses to aspergillus fumigatus antigens in patients with invasive aspergillosis. J. Proteome Res. 15, 1580– 1591 (2016).
- 107. Vödisch, M. *et al.* Analysis of the Aspergillus fumigatus proteome reveals metabolic changes and the activation of the pseurotin A biosynthesis gene cluster in response to hypoxia. *J. Proteome Res.* **10**, 2508–2524 (2011).
- 108. Perkins, A., Nelson, K. J., Parsonage, D., Poole, L. B. & Karplus, P. A. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem. Sci.* 40, 435–45 (2015).
- Li, T. T. & Chou, K. C. The quantitative relations between diffusion-controlled reaction rate and characteristic parameters in enzyme-substrate reaction systems. I. Neutral substrates. *Sci. Sin.* 19, 117–36
- Reyes, A. M. *et al.* Oxidizing substrate specificity of Mycobacterium tuberculosis alkyl hydroperoxide reductase E: Kinetics and mechanisms of oxidation and overoxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 464–473 (2011).
- Tairum, C. A. *et al.* Catalytic Thr or Ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms. *Sci. Rep.* 6, 33133 (2016).
- 112. Ogusucu, R., Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L. E. S. & Augusto, O. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 326–34 (2007).
- Trujillo, M. *et al.* Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: Taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 467, 95–106 (2007).
- 114. Nagy, P. *et al.* Model for the exceptional reactivity of peroxiredoxins 2 and 3 with hydrogen peroxide: a kinetic and computational study. *J. Biol. Chem.* 286, 18048–55 (2011).

- 115. Rocha, M. C. *et al.* Analyses of the three 1-Cys Peroxiredoxins from Aspergillus fumigatus reveal that cytosolic Prx1 is central to H2O2 metabolism and virulence. *Sci. Rep.* 8, 1–18 (2018).
- Feld, K. *et al.* Tyrosine substitution of a conserved active-site histidine residue activates Plasmodium falciparum peroxiredoxin 6. *Protein Sci.* 1–11 (2018). doi:10.1002/pro.3490
- 117. De Armas, M. I. *et al.* Rapid peroxynitrite reduction by human peroxiredoxin 3: Implications for the fate of oxidants in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 130, 369–378 (2019).
- Peskin, A. V. *et al.* Hyperoxidation of peroxiredoxins 2 and 3: Rate constants for the reactions of the sulfenic acid of the peroxidatic cysteine. *J. Biol. Chem.* 288, 14170–14177 (2013).
- Wood, Z. a, Poole, L. B. & Karplus, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300, 650–3 (2003).
- Karplus, P. A. & Poole, L. B. Peroxiredoxins as Molecular Triage Agents, Sacrificing Themselves to Enhance Cell Survival During a Peroxide Attack. *Mol. Cell* 45, 275–278 (2012).
- 121. Hugo, M. *et al.* Thiol and sulfenic acid oxidation of AhpE, the one-cysteine peroxiredoxin from Mycobacterium tuberculosis: Kinetics, acidity constants, and conformational dynamics. *Biochemistry* **48**, 9416–9426 (2009).
- 122. Hillmann, F. *et al.* The Crystal Structure of Peroxiredoxin Asp f3 Provides Mechanistic Insight into Oxidative Stress Resistance and Virulence of Aspergillus fumigatus. *Sci. Rep.* 6, 33396 (2016).
- 123. Mishra, S. & Imlay, J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Arch. Biochem. Biophys.* **525**, 145–160 (2012).
- Slesiona, S. *et al.* Persistence versus escape: Aspergillus terreus and Aspergillus fumigatus employ different strategies during interactions with macrophages. *PLoS One* 7, (2012).
- 125. Gersuk, G. M., Underhill, D. M., Zhu, L. & Marr, K. A. Dectin-1 and TLRs Permit Macrophages to Distinguish between Different Aspergillus fumigatus Cellular States. J. Immunol. 176, 3717–3724 (2006).
- 126. Chapman, S. K. & Reid, G. A. Flavoprotein protocols. 131, (Humana Press, 1999).
- 127. Oliveira, M. a *et al.* Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. *Biochemistry* 49, 3317–26 (2010).
- 128. Netto, S., Chem, J. B., Munhoz, D. C. & Eduardo, L. Metabolism and Bioenergetics : Cytosolic Thioredoxin Peroxidase I and II Are Important Defenses of Yeast against Organic Hydroperoxide Insult : CATALASES AND PEROXIREDOXINS

COOPERATE IN THE DECOMPOSITION OF H2O2 BY YEAST Daniela Cristina Munhoz and Luis E. (2004). doi:10.1074/jbc.

- Munhoz, D. C. & Netto, L. E. S. Cytosolic Thioredoxin Peroxidase I and II Are Important Defenses of Yeast against Organic Hydroperoxide Insult. J. Biol. Chem. 279, 35219–35227 (2004).
- Pedrajas, J. R. *et al.* Glutathione Is the Resolving Thiol for Thioredoxin Peroxidase Activity of 1-Cys Peroxiredoxin Without Being Consumed During the Catalytic Cycle. *Antioxid. Redox Signal.* 24, 115–128 (2016).
- Luthman, M. & Holmgren, A. Glutaredoxin from calf thymus. J. Biol. Chem. 257, 6686– 6690 (1982).
- Hernández, Y., Lobo, M. G. & González, M. Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food Chem.* 96, 654–664 (2006).
- Washko, P. W., Hartzell, W. O. & Levine, M. Ascorbic acid analysis using highperformance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection. *Anal. Biochem.* 181, 276–282 (1989).
- 134. Huh, W. K. *et al.* d-Erythroascorbic acid activates cyanide-resistant respiration in Candida albicans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 401–406 (2008).
- 135. Gallogly, M. M., Starke, D. W. & Mieyal, J. J. Mechanistic and Kinetic Details of Catalysis of Thiol-Disulfide Exchange by Glutaredoxins and Potential Mechanisms of Regulation. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 1059–1081 (2009).
- Anschau, V. Caracterização cinética da redução das 1-Cys Peroxirredoxinas por ascorbato. (Universidade de São Paulo, 2016).
- Baroja-Mazo, A. *et al.* Characterisation and biosynthesis of D-erythroascorbic acid in Phycomyces blakesleeanus. *Fungal Genet. Biol.* 42, 390–402 (2005).
- Amako, K. *et al.* NAD+-specific D-arabinose dehydrogenase and its contribution to erythroascorbic acid production in Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett.* 580, 6428–34 (2006).
- Keates, S. E., Loewu, F. A., Helms, G. L. & Zink, D. L. 5-O-(a-D-galactopyranosyl)-Dglycero-pent-2-enono-1,4-lactone: Characterization in the Oxalate-Producing Fungus, Sclerotinia sclerotiorum. *Phytochemistry* 49, 2397–2401 (1998).
- Okamura, M. Distribution of ascorbic acid analogs and associated glycosides in mushrooms. *J Nutr Sci Vitaminol* 40, 81–94 (1994).
- Sauer, M., Branduardi, P., Valli, M. & Porro, D. Production of L -Ascorbic Acid by Metabolically Engineered Saccharomyces cerevisiae and Zygosaccharomyces bailii. 70, 6086–6091 (2004).
- Huh, W. K. *et al.* D-erythroascorbic acid is an important antioxidant molecule in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Microbiol.* **30**, 895–903 (1998).

- Spickett, C. M., Smirnoff, N. & Pitt, A. R. The biosynthesis of erythroascorbate in Saccharomyces cerevisiae and its role as an antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 183– 92 (2000).
- 144. Cheah, I. K. & Halliwell, B. Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1822**, 784–793 (2012).
- Cumming, B. M., Chinta, K. C., Reddy, V. P. & Steyn, A. J. C. Role of Ergothioneine in Microbial Physiology and Pathogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* 28, ars.2017.7300 (2017).
- 146. Halliwell, B., Cheah, I. K. & Drum, C. L. Ergothioneine, an adaptive antioxidant for the protection of injured tissues? A hypothesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 470, 245– 250 (2016).
- 147. Bello, M. H., Barrera-Perez, V., Morin, D. & Epstein, L. The Neurospora crassa mutant NcΔEgt-1 identifies an ergothioneine biosynthetic gene and demonstrates that ergothioneine enhances conidial survival and protects against peroxide toxicity during conidial germination. *Fungal Genet. Biol.* **49**, 160–172 (2012).
- Olson, K. R. & Straub, K. D. The Role of Hydrogen Sulfide in Evolution and the Evolution of Hydrogen Sulfide in Metabolism and Signaling. *Physiology* 31, 60–72 (2016).
- 149. Gadalla, M. M. & Snyder, S. H. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. J. Neurochem.
 113, 14–26 (2010).
- 150. Kimura, H. Hydrogen Sulfide: From Brain to Gut. Antioxid. Redox Signal. 12, 1111– 1123 (2010).
- 151. Cuevasanta, E., Möller, M. N. & Alvarez, B. Biological chemistry of hydrogen sulfide and persulfides. *Arch. Biochem. Biophys.* **617**, 9–25 (2017).
- 152. Hugo, M. *et al.* Mycothiol/mycoredoxin 1-dependent reduction of the peroxiredoxin AhpE from mycobacterium tuberculosis. *J. Biol. Chem.* **289**, 5228–5239 (2014).
- 153. Perkins, A. *et al.* Peroxiredoxin Catalysis at Atomic Resolution. *Structure* **24**, 1668–1678 (2016).
- 154. Benipal, B., Feinstein, S. I., Chatterjee, S., Dodia, C. & Fisher, A. B. Inhibition of the phospholipase A2 activity of peroxiredoxin 6 prevents lung damage with exposure to hyperoxia. *Redox Biol.* 4, 321–327 (2015).
- 155. Manevich, Y. & Fisher, A. B. Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism ★. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 1422–1432 (2005).
- 156. Manevich, Y., Reddy, K. S., Shuvaeva, T., Feinstein, S. I. & Fisher, A. B. Structure and phospholipase function of peroxiredoxin 6: identification of the catalytic triad and its role in phospholipid substrate binding. *J. Lipid Res.* 48, 2306–2318 (2007).

- Wu, Y. *et al.* Mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation of peroxiredoxin 6 regulates its phospholipase A 2 activity. *Biochem. J.* 419, 669–679 (2009).
- Rahaman, H. *et al.* Increased Phospholipase A 2 Activity with Phosphorylation of Peroxiredoxin 6 Requires a Conformational Change in the Protein. *Biochemistry* 51, 5521–5530 (2012).
- 159. Chatterjee, S. *et al.* Peroxiredoxin 6 phosphorylation and subsequent phospholipase A2 activity are required for agonist-mediated activation of NADPH oxidase in mouse pulmonary microvascular endothelium and alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* 286, 11696–11706 (2011).
- Nevalainen, T. J. 1-Cysteine peroxiredoxin: A dual-function enzyme with peroxidase and acidic Ca2+-independent phospholipase A2 activities. *Biochimie* 92, 638–644 (2010).
- Kim, T. S. *et al.* Identification of a human cDNA clone for lysosomal type Ca2+independent phospholipase A2 and properties of the expressed protein. *J. Biol. Chem.* 272, 2542–2550 (1997).
- 162. Chen, J.-W. 1-Cys Peroxiredoxin, a Bifunctional Enzyme with Glutathione Peroxidase and Phospholipase A2 Activities. *J. Biol. Chem.* **275**, 28421–28427 (2000).
- Schu, S., Green, F. H. Y., Bachofen, H. & Tn, A. Formation and structure of surface films: captive bubble surfactometry. *Adsorpt. J. Int. Adsorpt. Soc.* 1408, 180–202 (1998).
- Olmeda, B., Villén, L., Cruz, A., Orellana, G. & Perez-Gil, J. Pulmonary surfactant layers accelerate O2 diffusion through the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta -Biomembr.* 1798, 1281–1284 (2010).
- 165. Veldhuizen, E. J. & Haagsman, H. P. Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics. *Bba* **1467**, (2000).
- 166. Fisher, a B. & Dodia, C. Lysosomal-type PLA2 and turnover of alveolar DPPC. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 280, L748–54 (2001).

167. Ambruso, D. R., Ellison, M. A., Thurman, G. W. & Leto, T. L. Peroxiredoxin 6 translocates to the plasma membrane during neutrophil activation and is required for optimal NADPH oxidase activity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1823**, 306–315 (2012).