**Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências**

Bruno Brasil Horta

**Caracterização funcional e estrutural de
peroxidases dependentes de tiól da bactéria
fitopatogênica *Xylella fastidiosa***

**São Paulo
2009**

Bruno Brasil Horta

**Caracterização funcional e estrutural de
peroxidases dependentes de tiól da bactéria
fitopatogênica *Xylella fastidiosa***

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para a obtenção do título
de Doutor em Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto

**São Paulo
2009**

Horta, Bruno Brasil

“Caracterização funcional e estrutural de peroxidases dependentes de tiól da bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa*”

176 páginas

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Peroxirredoxina. 2. Proteína comigratória com bacterioferritina. 3. Alquil hidroperóxido redutase subunidade C. 4. *Xylella fastidiosa*. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

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

À minha Carolina.

Aos meus pais, Sonia e Rubens.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto, pela orientação competente e criativa, e pelo apoio irrestrito. Um exemplo profissional e uma pessoa admirável.

À Profa. Dra. Astrid de Matos Peixoto Kleinert, Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto, Vera Lúcia Barboza Lima, Erika Harumi Takamoto de Camargo e Helder Rossi Santos Souza, pelo esforço e dedicação para a conclusão do meu curso de doutorado.

À Prof. Dra. Ohara Augusto, por permitir a utilização das facilidades de seu laboratório. Especialmente ao Danilo Bilches Medinas, pela ajuda nos ensaios de *stopped-flow* e pelas proveitosas discussões sobre cinética enzimática.

Ao Prof. Dr. Paolo Di Mascio, por permitir a utilização das facilidades de seu laboratório, e à Fernanda Manso Prado, pela ajuda nos ensaios de espectrometria de massas.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, em especial à Dra. Beatriz Guimarães, por colocar à disposição o Centro de Biologia Molecular Estrutural e a Linha de Cristalografia de Macromoléculas.

À Profa. Dra. Shirley Schreier, por colocar à disposição o espectropolarímetro Jasco, e à Joana Paulino, pela ajuda na obtenção de dados de dicroísmo circular.

Ao Prof. Dr. Shaker Chuck Farah, por disponibilizar seu laboratório de cristalização de proteínas.

À Karen Fulan Discola, pela cooperação essencial para a elucidação da estrutura da Bcp C47S, pela amizade e pelas conversas reflexivas.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira, pela ajuda dedicada no refinamento da estrutura da Bcp C47S.

Ao Dr. Daniel Carvalho Pimenta, por disponibilizar a coluna de separação de peptídeos.

Ao José Renato Rosa Cussiol, pela ajuda na obtenção das proteínas TsnC e TrxR, e pela amizade.

À Marcela Valente Pimenta, minha aluna de Iniciação Científica, pela grande ajuda nos ensaios com a AhpC e AhpF.

À Profa. Dra. Gisele Monteiro, pelo conhecimento a qualquer hora, pelas opiniões sempre pertinentes e pela divertida amizade.

À Andressa, Cinthian e Simone, pelo suporte técnico, indispensável para o andamento deste trabalho.

Aos amigos de laboratório, Gustavo, Victor, Aline, Eduardo, Lucas, Marilene, Rafaella, Tatiana e Thiago, pela agradável companhia no dia-a-dia do laboratório, além da ajuda sempre que necessária.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À Clelia, Helmut e Stefan, pela companhia que já é parte importante na minha vida.

Aos meus pais e à Paula, pelo apoio e por sempre confiarem no caminho que sigo.

À Carolina, meu amor, minha amiga e meu conforto. Por seu carinho. Para sempre ao meu lado.

"[...], Fala claro, interrompeu Jesus, Não é possível, disse Deus, as palavras dos homens são como sombras, e as sombras nunca saberiam explicar a luz, entre elas e a luz está e interpõe-se o corpo opaco que as faz nascer, [...]"

José Saramago, em "O Evangelho segundo Jesus Cristo", 1991, p. 379.

A bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa* é o agente etiológico da Clorose Variegada dos Citros (CVC), que causa perdas anuais estimadas em US\$ 100 milhões no Brasil. Durante o processo infeccioso, a geração extracelular de espécies ativas de oxigênio é um dos principais mecanismos de defesa da planta contra o patógeno. Em contrapartida, para se defender do estresse oxidativo imposto pelo hospedeiro, os fitopatógenos possuem mecanismos de defesa que incluem enzimas antioxidantes, como as peroxirredoxinas, alquil hidroperóxido redutase subunidade C (AhpC) e proteína comigratória com bacterioferritina (Bcp). As peroxirredoxinas são proteínas que utilizam suas cisteínas ativas para catalisar a redução de hidroperóxidos. Por análise proteômica, os produtos dos genes *ahpc* e *bcp* foram identificados no extrato celular protéico de *X. fastidiosa* (Smolka e col., 2003). Com o intuito de caracterizar funcional e estruturalmente as proteínas AhpC e Bcp de *X. fastidiosa*, clonamos e expressamos seus respectivos genes em *Escherichia coli* e purificamos as proteínas por cromatografia de afinidade a níquel. As proteínas recombinantes apresentaram atividade dependente de tiól de redução de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos. A atividade peroxidase da AhpC e Bcp são dependentes, respectivamente, de alquil hidroperóxido redutase subunidade F (AhpF) e do sistema tiorredoxina. Paradoxalmente, a flavoproteína AhpF possui atividade NAD(P)H oxidase, que resulta na produção de peróxido de hidrogênio. As constantes de segunda ordem da reação das proteínas com peróxido de hidrogênio (da ordem de $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), determinadas pelo ensaio de cinética competitiva com peroxidase de raiz forte, indicam que ambas possuem atividades peroxidase equivalentes às apresentadas por glutathione peroxidases dependentes de selênio e catalases, ao contrário do descrito na literatura. Por SDS-PAGE não-redutor e pela quantificação de cisteínas livres por DTNB, verificamos que as proteínas possuem mecanismos catalíticos distintos: AhpC é uma 2-Cys Prx típica (com formação de ponte dissulfeto intermolecular), enquanto Bcp é uma 2-Cys Prx atípica (com formação de ponte dissulfeto intramolecular). Para AhpC, a atividade catalítica envolve as cisteínas conservadas (Cys-47 e Cys-165), em contraste, apenas através de estudos de mutação sítio-dirigida e espectrometria de massas conseguimos identificar os resíduos de cisteínas envolvidos na atividade catalítica da Bcp (Cys-47 e Cys-83). A caracterização estrutural de AhpC por cromatografia de exclusão molecular e espalhamento dinâmico de luz mostram que a proteína nativa é um decâmero estável, independentemente do estado de oxidação de suas cisteínas. A caracterização da estrutura cristalográfica de Bcp C47S, inédita para 2-Cys Prx atípicas que possuem as cisteínas ativas separadas por 35 aminoácidos, indica que a proteína possui o enovelamento característico das peroxirredoxinas e que as cisteínas ativas estão localizadas a uma distância média de 12,4 Å. Baseado em dicroísmo circular, apresentamos dados que indicam que a aproximação das cisteínas deve envolver um significativo rearranjo estrutural, que provavelmente se inicia com a formação do intermediário ácido sulfênico na cisteína peroxidásica (Cys-47). Assim, conseguimos elucidar o papel catalítico dessas proteínas, bem como identificar seus sistemas redutores, obtendo informações que podem ser relevantes para o entendimento do mecanismo da patogenicidade da *X. fastidiosa*. Os resultados apresentados neste trabalho podem contribuir para o desenvolvimento de novas técnicas de controle de praga para a doença CVC em citrus e outras que envolvam a bactéria *X. fastidiosa*.

Abstract

The phytopathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* is the etiological agent of Citrus Variegated Chlorosis (CVC) that causes losses of about 100 millions dollars per year in Brazil. During infection, reactive oxygen species play a central role in plant pathogen defense. To survive under oxidative stress imposed by the host, microorganisms express antioxidant proteins, including the peroxiredoxins alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC) and bacterioferritin comigratory protein (Bcp). Peroxiredoxins are peroxidases, which rely on an activated cysteine residue to catalyze the reduction of hydroperoxides. By proteome analysis, Smolka et al. (2003) identified the products of *ahpc* and *bcp* genes present in whole cell extract of *X. fastidiosa*. To characterize the function and structure of AhpC and Bcp protein, their genes were cloned in *Escherichia coli* and the corresponding proteins purified by nickel affinity chromatography. Recombinant proteins presented thiol-dependent peroxidase activity against hydrogen peroxide and organic hydroperoxides. AhpC and Bcp peroxidase activities are dependent on alkyl hydroperoxide reductase subunit F (AhpF), and on thioredoxin system, respectively. Paradoxically, AhpF flavoenzyme possesses hydrogen peroxide-forming oxidase activity. Contrary to classical assumptions, competitive kinetics employing horseradish peroxidase assays showed that the second-order rate constants of AhpC and Bcp reaction with hydrogen peroxide are in the order of $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, as fast as the activity of selenium-dependent glutathione peroxidases and catalases. Non-reducing SDS-PAGE and cysteine quantification using DTNB indicated different peroxidasic mechanisms: AhpC is a typical 2-Cys peroxiredoxin (with intermolecular disulfide bond formation), while Bcp is an atypical 2-Cys peroxiredoxin (with intramolecular disulfide bond formation). In contrast to the well-conserved AhpC cysteines responsible for the peroxidase activity (Cys-47 and Cys-165), only through site-specific mutagenesis and mass spectrometry we could identified the cysteine residues involved in the Bcp peroxidase activity (Cys-47 and Cys-83). Structural characterization by size exclusion chromatography and dynamic light scattering revealed that AhpC native protein forms stable and redox state independent decamers. The crystal structure of Bcp C47S, the first 2-Cys Prx with a 35-residue between the active cysteines ever characterized, shows that protein contains the common fold of peroxiredoxins and that active cysteines lies $\sim 12.4 \text{ \AA}$ away one from the other. Based on circular dichroism, we presented data indicating that disulfide bond formation may require significant conformational changes, which probably is triggered by the peroxidatic cysteine oxidation to sulfenic acid. In conclusion, we elucidated the catalytic mechanisms and reduction systems of AhpC and Bcp proteins that may help to understand the pathogenicity mechanism of *X. fastidiosa*. These results can contribute to the development of plague control methods against *X. fastidiosa*.

AhpC	alquil hidroperóxido redutase subunidade C
AhpF	alquil hidroperóxido redutase subunidade F
AhpR	sistema alquil hidroperóxido redutase
AMS	4-acetamido-4'-maleimidil-estilbeno-2,2'-dissulfonato
Bcp	proteína comigratória com bacterioferritina
BHT	hidroxitolueno butilado
BSA	albumina bovina sérica
CD	dicroísmo circular
CHP	hidroperóxido de cumeno
CVC	clorose variegada dos citros
Cys-S _p	cisteína peroxidásica
Cys-S _r	cisteína de resolução
DLS	espalhamento dinâmico de luz (<i>dynamic light scattering</i>)
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)
DTT	1,4-ditiotreitol
EAO	espécies ativas de oxigênio
FOX	<i>ferrous oxidation in xylenol orange assay</i>
GI	identificador para cada gene (<i>gene index</i>)
GS	glutamina sintetase
GSH	glutathione
Hepes	ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HR	Resposta Hipersensitiva (<i>Hypersensitive Response</i>)
HRP	peroxidase de raiz forte
LAR	Resistência Localizada Adquirida (<i>Local Acquired Resistance</i>)
NADH	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo 2'-fosfato reduzido
NEM	N-etilmaleimida
ORF	quadro de leitura aberto (<i>open reading frame</i>)
PDB ID	código de entrada no <i>Protein Data Bank</i>
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
Prx	peroxirredoxina
PrxQ	peroxirredoxina Q
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
SAR	Resistência Sistêmica Adquirida (<i>Systemic Acquired Resistance</i>)
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante
SEC	cromatografia de exclusão molecular
SOD	superóxido dismutase

TBHP	<i>terc</i> -butilhidroperóxido
TCA	ácido tricloroacético
TCEP	cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina)
TFA	ácido trifluoroacético
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
Trx	tiorredoxina
TrxR	tiorredoxina redutase
Tsa	<i>thiol-specific antioxidant</i>
VC	volumes de coluna
WT	selvagem (<i>wild type</i>)

I. Introdução	15
A bactéria fitopatogênica <i>Xylella fastidiosa</i>	15
Geração de espécies ativas de oxigênio	16
Interação planta-patógeno e a participação das espécies ativas de oxigênio	17
Enzimas antioxidantes	18
Peroxirredoxinas de bactérias fitopatogênicas	24
Alquil hidroperóxido redutase subunidade C (AhpC)	24
Proteína comigratória com bacterioferritina (Bcp)	27
Análise <i>in silico</i> de genes de defesa antioxidante no genoma de <i>Xylella fastidiosa</i>	29
II. Objetivos	38
III. Materiais e Métodos	39
Materiais	39
Linhagens bacterianas de clonagem e expressão	39
Vetores de clonagem e expressão	40
Oligonucleotídeos:	40
Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose 1%	41
Análise de proteína por SDS-PAGE	41
Quantificação de proteínas pelo ensaio de Bradford	41
Construção das linhagens superexpressantes com o vetor pET15b	41
Construção das linhagens superexpressantes com o vetor pBAD/Thio-TOPO	42
Transformação de bactérias eletrocompetentes por eletroporação	42
Expressão em <i>E. coli</i> dos genes clonados no vetor pET15b	42
Expressão em <i>E. coli</i> dos genes clonados no vetor pBAD/Thio-TOPO	43
Vetores de expressão e condição de indução da expressão dos genes utilizados	43
Lise das células bacterianas	43
Purificação de proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade a metal	43
Gradiente de purificação das proteínas recombinantes	44
Purificação da proteína AhpF por cromatografia de troca aniônica	44
Mutagênese sítio-dirigida	44
Parâmetros das proteínas recombinantes predito <i>in silico</i>	45
Quantificação de cisteínas livres pelo ensaio do DTNB	45
Modificação química de proteínas por AMS	46
Determinação da atividade dissulfeto redutase pelo ensaio do DTNB	46
Ensaio de proteção à GS (glutamina sintetase)	46
Determinação da concentração de hidroperóxidos	46
Determinação da atividade peroxidásica pelo ensaio do DTT oxidado	46

Determinação da atividade peroxidásica pelo ensaio FOX	47
Determinação da atividade peroxidásica da proteína Bcp pelo ensaio de consumo de NADPH	47
Análise de bisubstrato da proteína Bcp pelo ensaio de consumo de NADPH	47
Cinética competitiva com HRP (peroxidase de raiz forte)	47
Análise fluorimétrica da proteína Bcp	48
Cinética direta por fluorimetria em <i>stopped-flow</i>	48
Determinação da atividade oxidase da proteína AhpF pelo ensaio de consumo de NAD(P)H	48
Determinação da atividade oxidase e dissulfeto redutase da AhpF e peroxidase da AhpC pelo uso de eletrodos específicos	48
Cromatografia de exclusão molecular (SEC)	48
Remoção da cauda de poli-histidina da proteína AhpC com trombina	49
Determinação da atividade chaperona	49
Análise da proteína Bcp por espectrometria de massas	49
Cristalização das proteínas Bcp WT e Bcp C47S	50
Cristalografia de raios-X e análise dos dados estruturais	51
Determinação da estrutura secundária da proteína Bcp por dicroísmo circular	51
IV. Resultados e Discussão	52
Clonagem dos genes de <i>Xylella fastidiosa</i>	52
Proteína comigratória com bacterioferritina (Bcp)	52
Alquil hidroperóxido redutase subunidade C (AhpC)	54
Alquil hidroperóxido redutase subunidade F (AhpF)	54
Tiorredoxinas (TsnC e TrxA) e tiorredoxina redutase (TrxR)	58
Caracterização funcional do sistema tiorredoxina (TsnC) e tiorredoxina redutase (TrxR)	59
Caracterização da proteína comigratória com bacterioferritina (Bcp)	61
Mecanismo catalítico da proteína Bcp	61
Parâmetros cinéticos da proteína Bcp	80
Estrutura cristalográfica da proteína mutante Bcp C47S	96
Caracterização funcional do sistema Alquil hidroperóxido redutase (AhpC e AhpF)	115
Caracterização da estrutura quaternária da proteína AhpC	124
V. Conclusões	130
VI. Referências	133
Anexo I	141
Anexo II	145
Anexo III	153
Anexo IV	169

A bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa*

A bactéria gram-negativa *Xylella fastidiosa* está associada a um grande número de doenças em plantas, que são restritas ao continente Americano, particularmente às regiões tropicais e sub-tropicais de inverno ameno. A maioria dessas doenças é observada em plantas de interesse comercial que são exóticas às Américas, enquanto várias plantas nativas são hospedeiros tolerantes, que suportam a colonização pela bactéria, mas não mostram sintomas, sugerindo que *X. fastidiosa* é endêmica no continente Americano desde antes da introdução de espécies exóticas (Redak e col., 2004).

X. fastidiosa é obrigatoriamente transmitida por insetos, conhecidos como cigarrinhas ou *sharpshooters* (ordem Hemiptera, subordem Homoptera, família Cicadellidae, subfamília Cicadellinae), que se alimentam de xilema. Aparentemente não há especificidade entre o vetor e a cepa de *X. fastidiosa*, e todas as espécies de vetores são capazes de transmitir todas as cepas do patógeno. A transmissão de *X. fastidiosa* do vetor para a planta é único entre os fitopatógenos, já que a bactéria pode ser transmitida sem requerer um período de latência no vetor. Ao contrário de outras bactérias fitopatogênicas, *X. fastidiosa* coloniza exclusivamente o xilema de plantas. Ainda não se conhece o exato mecanismo de patogenicidade das doenças causadas por *X. fastidiosa*, mas propõe-se que seja através da disfunção do sistema de condução de água ou produção de fitotoxina. Evidências apóiam a hipótese de que o mecanismo de patogenicidade seja a oclusão vascular causada pelo agregamento de bactérias, que resulta em um bloqueio do transporte de água. A propagação sistêmica da bactéria é limitada às membranas *pit* que separam um vaso do xilema de outro adjacente. O patógeno atravessa esta membrana através da digestão da pectina que, adicionalmente, podem ser usadas como fonte de nutriente que suplementariam a baixa quantidade de nutrientes disponíveis no xilema (Chatterjee e col., 2008).

No Brasil, *X. fastidiosa* é responsável pela doença Clorose Variegada dos Citros (CVC) que causa perdas anuais da ordem de US\$100 milhões. A CVC foi identificada oficialmente em 1987, em pomares do Triângulo Mineiro e do norte e noroeste do Estado de São Paulo. Em pomares afetados pela doença, os frutos ficam duros, pequenos e amadurecem precocemente, resultando numa rápida diminuição da produção. A perda de peso do fruto pode chegar a 75%. Onze espécies de cigarrinhas são comprovadamente capazes de transmitir *X. fastidiosa* e, portanto, são responsáveis pela disseminação da CVC em todas as regiões citrícolas do Brasil. Em 2005, num levantamento realizado pela Fundecitrus, aproximadamente 47% das plantas cultivadas no Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro estavam infectadas com CVC. A incidência da CVC é mais intensa no norte e, progressivamente, diminui em direção ao sul do Estado de São Paulo, indicando que a temperatura é um fator limitante para a disseminação da doença (Fundecitrus, 2006).

Devido à importância da cultura de citros foi iniciado no Brasil, em 1997, o Projeto Genoma *Xylella fastidiosa*. Concluído em 2000, foi o primeiro genoma sequenciado de um fitopatógeno. Com a disponibilidade das sequências tornou-se possível identificar, através de análises em bancos de dados e comparação de sequências, diversas proteínas similares à de outros organismos. As sequências do Projeto Genoma *Xylella fastidiosa* estão disponíveis publicamente nos sites: "*Xylella fastidiosa* Genome

Project" (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>) e "*Xylella fastidiosa Comparative Genome Project*" (<http://www.xylella.lncc.br/>). A ausência dos genes do sistema de secreção do tipo III e de genes *Avr* (supressores das respostas de defesa da planta hospedeira), são características marcantes do genoma de *X. fastidiosa* (Simpson e col., 2000). Por outro lado, o genoma de *X. fastidiosa* possui genes do sistema de secreção do tipo II, envolvido com o transporte das enzimas endoglucanases, poligalacturonases e proteases, cuja função é a degradação de membranas do xilema da planta, para propagação do patógeno (Dow e Daniels, 2000).

Geração de espécies ativas de oxigênio

O aparecimento de oxigênio molecular na atmosfera terrestre pela ação de organismos fotossintetizadores foi um processo que provocou profundas alterações na história evolutiva dos seres vivos. A presença de oxigênio molecular possibilitou aos seres vivos extraírem mais energia metabólica (na forma de ATP) por molécula de glicose oxidada. O aumento de oxigênio molecular (O_2) e também de ozônio (O_3) na atmosfera, há 550 milhões de anos atrás (início do período Cambriano), possibilitou o aparecimento de novas formas de vida. O grande sucesso evolutivo dos eucariontes se deveu em parte ao desenvolvimento das cadeias respiratórias mitocondriais (Bunn e Poyton, 1996). Durante o transporte de elétrons na cadeia respiratória da mitocôndria, o oxigênio molecular recebe quatro elétrons provenientes do complexo enzimático citocromo oxidase, reduzindo-se em duas moléculas de água. Todavia, em cerca de 0,1% a 0,01% das transferências, o O_2 é apenas parcialmente reduzido, o que provoca a formação das espécies ativas de oxigênio (EAO), tais como, radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical livre hidroxila ($HO^{\bullet}$; figura 1; Korshunov e col., 1997; St-Pierre e col., 2002).

Figura 1. Redução do Oxigênio Molecular.

As EAO podem provocar diversas lesões oxidativas em biomoléculas como o DNA, proteínas e lipídeos. Das EAO citadas acima, somente peróxido de hidrogênio não possui elétrons desemparelhados sendo, portanto, uma espécie não-radicalar. O radical livre hidroxila é uma das espécies químicas mais reativas que se conhece, reagindo rápida e indistintamente com a maioria das biomoléculas. Comparado ao radical hidroxila, o radical ânion superóxido é muito menos reativo, porém, é capaz de lesar diversas enzimas e sua forma protonada pode iniciar a peroxidação de ácidos graxos. A exposição de organismos a elevadas concentrações de O_2 , causa a formação *in vivo* do radical ânion superóxido acima do normal estando, portanto, relacionado com os efeitos tóxicos do O_2 (Halliwell e Gutteridge, 1999). O radical ânion superóxido também é citotóxico através da geração de espécies mais reativas, tais como peroxinitrito ($ONOO^-$), produzido pela sua reação com radical óxido nítrico ($NO^{\bullet}$, figura 2); e radical hidroxila, produzido pela sua reação com peróxido de hidrogênio, catalisada por íons de metais de transição (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Figura 2. Formação de peroxinitrito.

É crescente o número de evidências que indicam que a interação de EAO com biomoléculas está implicada em vários processos patológicos como a arteriosclerose, diabetes, envelhecimento, distrofia muscular, injúria causada por isquemia-perfusão, cataratas e câncer (Stadtman, 1990). Para combater os efeitos lesivos das EAO, os organismos possuem vários mecanismos de defesa antioxidante.

Interação planta-patógeno e a participação das espécies ativas de oxigênio

Tirando proveito dos efeitos lesivos das EAO, plantas e animais possuem diversos mecanismos de defesa à infecção de microorganismos, que envolvem o aumento da geração de EAO pela célula (Tenhaken e col., 1995). As EAO são altamente tóxicas para a célula bacteriana, por exemplo, hidroperóxidos orgânicos possuem atividade bactericida (Akaike e col., 1992).

Em plantas, a resposta à patógenos inicia-se com o reconhecimento de proteínas do microorganismo por receptores localizados na membrana celular vegetal. Todas as células das plantas são capazes de reconhecer patógenos e acionar um sistema de defesa local. As defesas induzidas pela presença do fitopatógeno, de modo geral, incluem: compostos antimicrobianos constitutivos e induzidos, para repelir o ataque do patógeno; reforço da parede celular, para impedir a entrada do patógeno; e morte celular programada, para limitar o estabelecimento e a propagação do patógeno (Abramovitch e Martin, 2004). O local específico de contato planta-patógeno é conhecido como região de Resistência Localizada Adquirida (*Local Acquired Resistance* – LAR). Nessa região ocorre uma sequência de eventos conhecida como Resposta Hipersensitiva (*Hypersensitive Response* – HR), caracterizada pela rápida ativação do sistema de defesa da planta e movimentação de organelas e do núcleo em direção ao sítio de ataque. A HR envolve: aumento na permeabilidade da membrana citoplasmática, geração de EAO, reforço da parede celular (acúmulo de calose e lignina), acúmulo de proteínas relacionadas à patogenicidade, biossíntese de aleloquímicos, produção de sinais moleculares para indução de defesa e morte celular programada (Scheel, 1998). Posteriormente, os sinais moleculares para indução de defesa resultam num segundo sistema de defesa que também envolve células vizinhas, não-infectadas, chamado de Resistência Sistêmica Adquirida (*Systemic Acquired Resistance* – SAR).

As primeiras respostas induzidas são a alteração da parede celular e a alteração na permeabilidade da membrana plasmática com influxo de cálcio e próton e o efluxo de potássio e cloreto (de Wit, 2007). Esse fluxo de íons parece ser necessário e suficiente para indução da geração de EAO extracelular, ativação de genes de defesa e produção de aleloquímicos. As EAO, geradas devido à ativação de NADPH oxidase de membrana, atuam diretamente como agentes antimicrobianos (assim como os aleloquímicos), catalisam o reforço da parede celular e também estão envolvidas na sinalização de reações de defesas, como síntese de aleloquímicos, ativação de genes de defesa e morte celular programada (Scheel, 1998). Óxido nítrico (NO) também é produzido durante a HR e atua juntamente com peróxido de hidrogênio, como sinalizador a longa distância para indução da SAR. Além das substâncias já mencionadas, também são sintetizadas substâncias reguladoras do mecanismo de defesa, como o ácido salicílico, que podem ativar genes de defesa. A ativação de genes de defesa leva

ao acúmulo de peptídeos e proteínas relacionadas à patogenicidade, como defensinas, glucanases e quitinases. As funções dessas proteínas não são totalmente conhecidas, mas podem ter função de defesa, inativando os componentes de patogenicidade sintetizados pelo patógeno, ou função de contra-ataque, degradando proteínas estruturais da parede celular.

Todas as alterações ocorridas na região da LAR são responsáveis pela amplificação da resposta de defesa com o disparo da SAR. A SAR representa a proteção vegetal inespecífica contra infecções posteriores e a ampliação dos mecanismos de defesa para os tecidos vizinhos sadios (Akaïke e col., 1992; Hahlbrock e col., 1995).

Em contrapartida à defesa da planta e para se defender dos efeitos lesivos das EAO, os organismos patogênicos também possuem vários mecanismos de defesa antioxidantes. Além disso, as células da planta também induzem proteínas antioxidantes como forma de amenizar a toxicidade das EAO para suas próprias células.

Enzimas antioxidantes

Os sistemas de defesas antioxidantes de organismos aeróbicos incluem:

- enzimas que removem EAO (como superóxido dismutase, catalase, peroxidases e peroxirredoxinas);
- proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes como íons ferro e cobre, prevenindo a formação de EAO através da inibição de reações catalisadas por estes metais (como as proteínas transferrinas e metalotioneína);
- compostos antioxidantes de baixa massa molecular que rapidamente reagem com as EAO (como glutathione, α -tocoferol e vitamina C);
- proteínas que protegem contra as lesões oxidativas através de outros mecanismos, como as proteínas *heat shock*;
- sistemas de reparo de DNA, proteínas (metionina sulfóxido redutase) e lipídeos (glutathione peroxidase), capazes de remediar os danos causados por EAOs às biomoléculas, como última defesa contra o estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1999; Netto, 2001).

A superóxido dismutase (SOD) foi uma das primeiras enzimas antioxidantes descritas, atuando especificamente na dismutação do radical ânion superóxido à peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Peróxido de hidrogênio, por sua vez, é normalmente removido por dois tipos de enzimas: catalases, que catalisam sua decomposição à oxigênio molecular e água; e peroxidases, que o removem com o auxílio de agentes redutores.

Um destes agentes redutores intracelulares mais abundantes é a glutathione, um tripeptídeo de baixa massa molecular (Gly-Cys-Glu), que está presente em animais, plantas e bactérias aeróbias, frequentemente numa concentração na escala milimolar (Halliwell e Gutteridge, 1999). A glutathione reduzida é utilizada como agente redutor de peróxido de hidrogênio pela glutathione peroxidase. Na sua forma oxidada, duas moléculas de glutathione estão unidas através de uma ponte dissulfeto intermolecular entre os dois grupos sulfidrilas de suas cisteínas. Além de peróxido de hidrogênio, as glutathione peroxidases também catalisam a redução de hidroperóxidos de ácidos graxos,

7 β -hidroperóxido de colesterol e outros hidroperóxidos sintéticos, como hidroperóxido de cumeno (CHP) e *terc*-butilhidroperóxido (TBHP; Halliwell e Gutteridge, 1999). Em todos os casos, o hidroperóxido é reduzido ao álcool correspondente (figura 3). Em células normais, a relação de glutatona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) é alta. Isso se deve, em parte, à redução de GSSG para GSH pela enzima glutatona redutase, que catalisa a reação de redução de GSSG à custa da oxidação de NADPH.

Figura 3. Redução de hidroperóxidos pela glutatona peroxidase. Onde LOOH e LOH representam, respectivamente, o hidroperóxido de ácido graxo e o álcool correspondente.

Em 1988, uma proteína antioxidante foi isolada de *Saccharomyces cerevisiae* com características peculiares. Essa proteína não possuía grupos prostéticos característicos de outras redutases, como hemes ou flavinas, e a ela não se associaram atividades catalásica, superóxido dismutásica ou glutatona peroxidásica (Kim e col., 1988). Esta enzima foi denominada Tsa1 (*thiol-specific antioxidant*) porque protegia enzimas contra a inativação causada por sistemas oxidantes que possuíam exclusivamente tióis, tais como o sistema DTT/FeCl₃/O₂ (Chae e col., 1993). Posteriormente, foi demonstrado que esta proteína possuía capacidade de decompor hidroperóxidos à custa de redutores tiólicos (como, tioredoxina ou outros componentes contendo sulfidrilas), portanto, apresentando atividade peroxidase dependente de tiól (figura 4). A especificidade da Tsa1 para tióis deve-se ao fato que somente estes agentes redutores são capazes de regenerar suas sulfidrilas livres (Netto e col., 1996). A família de proteínas homólogas à Tsa1 foi denominada família das peroxirredoxinas (família Prx). Muitas dessas proteínas utilizam tioredoxina como agente redutor, por isso, a maioria das proteínas da família das peroxirredoxinas é denominada tioredoxina peroxidase (Chae e col., 1994c; Park e col., 2000).

Figura 4. Redução de hidroperóxidos pela Tsa1 (reação geral catalisada pelas peroxirredoxinas). A Tsa1 reduz o hidroperóxido (R'OOH) ao álcool correspondente (R'OH) e água, à custa da oxidação de um redutor tiólico (RSH).

A tioredoxina é um polipeptídeo de aproximadamente 12 KDa, com dois grupos sulfidrilas adjacentes (duas cisteínas separadas por dois aminoácidos) que, quando oxidados, formam uma ponte dissulfeto intramolecular. A tioredoxina está envolvida em vários processos fisiológicos devido à sua capacidade de reduzir pontes dissulfeto em proteínas alvo (figura 5).

Figura 5. Mecanismo proposto para a redução de dissulfetos em proteínas por tioredoxina (Trx). (A) A proteína Trx possui as duas cisteínas do sítio ativo reduzidas, enquanto a proteína alvo encontra-se oxidada (com uma ponte dissulfeto). (B) O ataque nucleofílico da cisteína 32 da Trx resulta na formação de um dissulfeto misto entre a proteína e a proteína alvo. (C) Ocorre o ataque nucleofílico da cisteína 35 da Trx à ligação dissulfeto mista, resultando na Trx oxidada e a proteína alvo reduzida.

A tioredoxina oxidada é regenerada, para sua forma reduzida, pela tioredoxina redutase à custa da oxidação de NADPH (figura 6). Da mesma forma que a glutatona redutase, a tioredoxina redutase contém FAD sendo, portanto, uma flavoenzima (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Figura 6. Redução de tioredoxina (Trx) pela tioredoxina redutase.

Além do sistema tioredoxina e tioredoxina redutase, outros sistemas redutores podem regenerar as peroxirredoxinas para suas formas reduzidas, entre eles, a proteína AhpF (alquil hidroperóxido redutase subunidade F), o sistema glutarredoxina/glutaciona/glutaciona redutase, o sistema triparredoxina /tripanotiona/tripanotiona redutase e ciclofilina (Lee e col., 2001). Recentemente, demonstramos que ascorbato também é capaz de reduzir algumas peroxirredoxinas (Monteiro e col., 2008). Além de mostrar uma nova função antioxidante do ascorbato, neste trabalho modificamos o paradigma de que as peroxirredoxinas são antioxidantes dependentes apenas de tiól.

Existem homólogos à Tsa1 em todos os grandes grupos taxonômicos (Chae e col., 1994a), indicando que as peroxirredoxinas são um grupo filogeneticamente antigo de enzimas (Dietz e col., 2002). Proteínas homólogas às peroxirredoxinas também são encontradas em microrganismos, muitos dos quais patogênicos, e em alguns casos são antígenos espécie-específicos, como ocorre em *Entamoeba histolytica* (Torian e col., 1990), *Helicobacter pylori* (O'Toole e col., 1991) e *Mycobacterium avium* (Yamaguchi e col., 1992). Essas proteínas poderiam estar envolvidas na defesa desses microrganismos contra o estresse oxidativo induzido por células fagocitárias do hospedeiro. Em mamíferos, várias proteínas similares foram identificadas, todas inicialmente caracterizadas sem referência às suas atividades antioxidantes (Prospéri e col., 1993).

As proteínas da família das peroxirredoxinas podem ser divididas em três diferentes grupos, de acordo com o mecanismo de catálise envolvido. Proposto por Rhee e col. (2001), este sistema de classificação é o mais frequentemente utilizado na literatura e, apesar de ser generalista, o mais didático para a compreensão do mecanismo de catálise das peroxirredoxinas. A característica comum aos três diferentes grupos de peroxirredoxinas é a existência de uma cisteína na região N-terminal que está diretamente envolvida na redução de hidroperóxidos, sendo por isso denominada cisteína peroxidásica (Cys-S_p). A oxidação da sulfidril da cisteína peroxidásica gera um ácido sulfênico (Cys-S_pOH), com a liberação do álcool correspondente ao hidroperóxido reduzido, ou água no caso de peróxido de hidrogênio. O passo seguinte, de resolução do ácido sulfênico gerado, é característico para cada um dos três grupos de peroxirredoxinas:

- **1-Cys Prx** (figura 7A): possuem apenas a cisteína N-terminal conservada. O ácido sulfênico é estabilizado pela estrutura protéica e, posteriormente, reduzido por um tiól exógeno como, por exemplo, DTT. Na maioria das proteínas deste grupo, o redutor biológico é desconhecido, no caso da 1-Cys Prx mitocondrial de *S. cerevisiae*, é uma tioredoxina mitocondrial (Pedrajas e col., 2000). Ascorbato também é capaz de reduzir as peroxirredoxinas deste grupo (Monteiro e col., 2008).

- **2-Cys Prx típicas** (figura 7B): possuem uma segunda cisteína (chamada de cisteína de resolução – Cys-S_r). O ácido sulfênico reage rapidamente com a Cys-S_r de outra molécula da peroxirredoxina, formando uma ponte dissulfeto intermolecular.
- **2-Cys Prx atípicas** (figura 7C): estas também possuem a Cys-S_r, porém, a ponte dissulfeto formada é intramolecular.

Figura 7. Mecanismo catalítico das peroxirredoxinas.

(A) mecanismo característico das 1-Cys Prx (representado pela 1-Cys Prx humana; Kang e col., 1998). (B) mecanismo característico das 2-Cys Prx típicas (representado pela Tsa1 de *S. cerevisiae*; Chae e col., 1994a). (C) mecanismo característico das 2-Cys Prx atípicas (representado pela PrxQ de *Sedum lineare*; Kong e col., 2000). Independente do mecanismo catalítico, a soma geral das reações parciais resulta na reação geral catalisada pelas peroxirredoxinas (figura 4).

Esta classificação foi refinada por Choi e col. (2003) para dividir as 2-Cys Prx atípicas em três classes, baseado na localização da cisteína de resolução. Por outro lado, Trivelli e col. (2003) classificaram as peroxirredoxinas em cinco subgrupos (sumarizados na tabela I), conforme a sequência de aminoácidos conservada ao redor do sítio ativo. Interessantemente, apesar de bastante conservada, a localização celular e o mecanismo catalítico pode variar consideravelmente dentro de proteínas do mesmo subgrupo.

Tabela I. Classificação de peroxirredoxinas de acordo com a sequência de aminoácidos (Trivelli e col. 2003).

Sub-grupo	Motivos conservados	Localização celular	Mecanismo catalítica
A	VCP.....VCP	citoplasma (levedura, mamífero) mitocôndria (mamífero) cloroplasto (plantas)	2-Cys Prx típicas
B	VCT	citoplasma (mamíferos) mitocôndria (levedura) núcleo (plantas)	1-Cys Prx
C	<u>GCXXXAC</u>	núcleo (leveduras) cloroplasto (plantas) citossol, mitocôndria e peroxissomo (mamíferos)	2-Cys Prx atípicas
D	TCT ou TCS	peroxissomo, citossol (levedura) cloroplasto, mitocôndria, xilema e floema (plantas) citossol, mitocôndria e peroxissomo (mamíferos)	1-Cys Prx 2-Cys Prx típicas 2-Cys Prx atípicas
E	GV ₄₀ CX ₄₀ CGA	presente apenas em bactérias	2-Cys Prx atípicas

Recentemente, Copley e col. (2004) sugeriram um novo sistema de classificação em quatro classes distintas, baseado em análises de motivos e comparações estruturais:

- **classe 1:** inclui proteínas que contém um motivo TPVCTKE altamente conservado no sítio ativo.
- **classe 2:** inclui proteínas bacterianas intimamente relacionadas (com mais de 50% de similaridade de sequência de aminoácidos), que contém no sítio ativo um resíduo de serina ou glutamina no lugar de um resíduo glutamato, altamente conservado nas peroxirredoxinas da classe 1.
- **classe 3:** inclui proteínas sem o resíduo glutamato conservado das peroxirredoxinas da classe 1 mas com uma histidina conservada, distante dois aminoácidos da cisteína do sítio ativo, num motivo TPTCSXXH característico.
- **classe 4:** inclui proteínas similares às da classe 1 que possuem uma grande extensão C-terminal.

Além da diferença na sequência de aminoácidos, as peroxirredoxinas destas quatro classes também são distinguidas pela estrutura quaternária que apresentam. Estudos em proteínas da classe 1 sugerem que são monômeros em solução (Jeong e col., 2000). As proteínas da classe 2 formam dímeros por interação *face-to-edge* (denominada por Copley e col., 2004), enquanto as proteínas da classe 4 formam dímeros por interação *edge-to-edge* (denominada por Copley e col., 2004). As proteínas da classe 3, por sua vez, também formam dímeros por interação *face-to-edge* mas são distinguidas das proteínas da classe 2 pela estrutura e a natureza dos resíduos envolvidos na interface da subunidades. Algumas das proteínas da classe 4 formam decâmeros quando estão oxidadas (Wood e col., 2002; Schröder e col., 2000). Dentro das classes, apenas algumas proteínas possuem a cisteína de resolução e, quando possuem, estão em localizações diferentes na estrutura terciária (Copley e col., 2004).

Apesar dos distintos estados oligoméricos, a estrutura terciária das peroxirredoxinas é muito similar entre as quatro classes. Exceto pela presença de inserções de elementos de estrutura secundária, todas possuem um enovelamento característico conhecido como enovelamento tiorredoxina (enovelamento Trx). Este enovelamento não é exclusivo das peroxirredoxinas, mas está presente em um grande número de proteínas com variadas atividades enzimáticas (Copley e col., 2004). O enovelamento Trx consiste em uma folha β formada por quatro ou cinco fitas β que estão flanqueadas por quatro

α hélices, na configuração $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\alpha 2-\beta 3-\alpha 3-\beta 4-\beta 5-\alpha 4$ (figura 8A). Nas peroxirredoxinas, o enovelamento Trx ainda contém uma extensão N-terminal, uma inserção entre a fita $\beta 1$ e hélice $\alpha 2$ e, nas peroxirredoxinas de classe 4, uma extensão C-terminal. Em geral, as peroxirredoxinas possuem, no mínimo, sete fitas β e cinco α hélices (figura 8B).

O sítio ativo das peroxirredoxinas é formado por aminoácidos que estão localizados entre a hélice $\alpha 2$ e a fita $\beta 3$, na primeira volta da hélice $\alpha 2$ e nas fitas $\beta 3$ e $\beta 6$ (Noguera-Mazon e col., 2006). Na forma reduzida da peroxirredoxina, a cisteína peroxidásica está localizada na primeira volta da hélice $\alpha 2$, dentro de uma cavidade acessível ao solvente, formada por um motivo estrutural *loop*-hélice e cercada por três resíduos conservados em todas as classes: uma prolina (Pro), uma treonina (Thr) e uma arginina (Arg; figura 8C). A cadeia lateral da prolina limita a acessibilidade do solvente e do hidroperóxido à cisteína peroxidásica, aparentemente protegendo o intermediário reativo ácido sulfênico, formado após reação com o hidroperóxido, de sofrer oxidação posterior para ácido sulfínico ou ácido sulfônico (figura 9). A cadeia principal e a lateral da treonina posicionam o próton do grupamento tiól da cisteína

peroxidásica para abstração por uma base catalítica ainda não identificada, e a cadeia lateral da arginina facilita essa abstração, através da estabilização da carga negativa formada no enxofre da cisteína peroxidásica (Wood e col., 2003; Netto e col., 2007).

Figura 9. Produtos de oxidação de tióis. Entre parênteses, estado de oxidação do enxofre (Jacob e col., 2006).

A estabilização da forma tiolato (Cys-S^-) pela arginina é a principal responsável pela diminuição do pK_a da cisteína peroxidásica. A alta reatividade das peroxirredoxinas frente a hidroperóxidos é, em parte, devido a este baixo pK_a da cisteína peroxidásica do sítio catalítico. Como o ânion tiolato da cisteína peroxidásica é um agente mais nucleofílico que o grupamento sulfidril (Cys-SH), ele reage mais rápido com hidroperóxidos (Rhee e col., 2005). É importante salientar que a maioria dos agentes oxidantes fisiológicos que reagem com tióis apresentam maior reatividade com o ânion tiolato. Por isso, um pK_a baixo é uma propriedade chave para aumentar a reatividade de um resíduo de cisteína frente à hidroperóxido. Em apenas um pequeno conjunto de proteínas, o ambiente molecular facilita a ionização da cisteína, diminuindo o pK_a da cisteína abaixo de 7 e, portanto, sendo completamente ionizada no pH fisiológico. Na cisteína livre e na glutathione reduzida, por exemplo, os valores de pK_a são maiores que 8 e a reação com peróxido de hidrogênio é de 6 a 7 ordens de grandeza menor do que a reação de peroxirredoxinas com o peróxido de hidrogênio (Winterbourn e Hampton, 2008).

Peroxirredoxinas de bactérias fitopatogênicas

Alquil hidroperóxido redutase subunidade C (AhpC)

Em bactérias, as peroxirredoxinas possuem papel essencial na detoxificação celular de hidroperóxidos. Em *Escherichia coli*, por exemplo, a peroxirredoxina AhpC (alquil hidroperóxido redutase C22), ao invés da catalase, é a principal responsável pela redução de peróxido de hidrogênio formado endogenamente (Seaver e Imlay, 2000).

Uma das primeiras peroxirredoxinas clonadas foi a pertencente ao sistema alquil hidroperóxido redutase (AhpR) de *Salmonella typhimurium*. Este sistema é composto de duas subunidades: (1) AhpC (alquil hidroperóxido redutase subunidade C), uma peroxirredoxina com alta similaridade à Tsa1 de *S. cerevisiae* (Storz e col., 1989); e (2) AhpF (alquil hidroperóxido redutase subunidade F), uma flavoenzima que possui domínios funcionalmente similares às tioredoxina e tioredoxina redutase (Chae e col., 1994a). O mecanismo catalítico do sistema AhpR de *S. typhimurium* envolve a redução do hidroperóxido pela AhpC, através de um mecanismo 2-Cys Prx típico, com subsequente regeneração da AhpC reduzida pela AhpF, à custa da oxidação de NAD(P)H (indicativo de NADH e NADPH; Tartaglia e col., 1990). A AhpC de *S. typhimurium*, além de metabolizar hidroperóxidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (Ellis e Poole, 1997), decompõe peroxinitrito (ONOO^- ; Bryk e col., 2000).

Alinhamento de sequência entre proteínas similares à AhpC de *S. typhimurium* revelaram dois resíduos de cisteína altamente conservados, que correspondem as Cys-47 e Cys-170 da Tsa1 de

S. cerevisiae (Rhee e col., 2005). As proteínas similares à AhpC de *S. typhimurium* possuem mecanismo 2-Cys Prx típico e são obrigatoriamente homodímeros, com a cisteína peroxidásica localizada em uma subunidade diferente da qual se localiza a cisteína de resolução. Estas proteínas pertencem ao subgrupo A das peroxirredoxinas, segundo a classificação sugerida por Trivelli e col. (2003).

Estruturas cristalográficas dessas proteínas mostram que elas podem existir como homodímeros ou pentâmeros de homodímeros (decâmeros de configuração $(\alpha_2)_5$ e forma anelar), em dependência do seu estado redox. A forma reduzida da AhpC de *S. typhimurium* é decamérica em qualquer concentração, enquanto a forma oxidada (contendo ponte dissulfeto intermolecular) é uma mistura de formas oligoméricas, cuja composição depende da concentração da proteína (Wood e col., 2002). Além de estar ligado ao ciclo catalítico, o estado oligomérico contribui significativamente para a catálise através da estabilização do sítio ativo, que resulta numa maior atividade da forma decamérica em relação à forma dimérica, podendo refletir um mecanismo de regulação da atividade catalítica através de alterações no estado oligomérico da proteína (Parsonage e col., 2005).

Muitos trabalhos mostram a influência de diversos fatores sobre o estado oligomérico e a atividade enzimática, mas diferem quanto aos seus efeitos sobre diferentes 2-Cys Prx típicas. Esta observação indica que ainda não há consenso na literatura sobre quais fatores governam o estado oligomérico e a atividade enzimática das 2-Cys Prx típicas. Kitano e col. (1999) sugerem que força iônica elevada regula a oligomerização e a atividade enzimática da AhpC de *Amphibacillus xylanus*, enquanto Chauhan e Mande (2001) sugerem, em oposição, que altas concentrações de sal levam a dissociação de decâmeros em dímeros na AhpC de *Mycobacterium tuberculosis*. Kristensen e col. (1999) sugerem que a oligomerização da calpromotina, uma peroxirredoxina humana, é dependente do pH, sendo favorecida em baixos pHs. Como descrito acima, a concentração de proteína e o estado redox governam a oligomerização da AhpC de *S. typhimurium* (Wood e col., 2002; Parsonage e col., 2005), enquanto Schröder e col. (1998) sugerem que apenas a forma reduzida da calpromotina de porco é oligomérica. Outros fatores como choque térmico e estresse oxidativo em Tsa1 e Tsa2 de *S. cerevisiae* (Jang e col., 2004), e fosforilação de resíduos treonina em PrxI humana (Jang e col., 2006), também interferem no estado oligomérico e na atividade enzimática das proteínas.

Além desses fatores, os resíduos da interface dímero-dímero também influenciam o estado oligomérico e a atividade enzimática. Parsonage e col. (2005) demonstraram que mutações sítio-dirigidas num resíduo treonina (Thr-77) da AhpC de *S. typhimurium*, presente na interface dímero-dímero do decâmero da proteína, afetam sua estabilidade e, conseqüentemente, a atividade peroxidásica da proteína. Como descrito acima, Jang e col. (2006) também descreveram a importância de um resíduo treonina (Thr-90) no estado oligomérico e na atividade enzimática da PrxI humana.

A função biológica da oligomerização das 2-Cys Prx típicas foi elucidada recentemente, quando Jang e col. (2004) descreveram a atividade chaperona das Tsa1 e Tsa2 de *S. cerevisiae* e correlacionaram o estado oligomérico com a função enzimática. Semelhantemente às proteínas de *S. cerevisiae*, AhpC de *H. pylori* também possui dupla função, peroxidase e chaperona (Chuang e col., 2006). Através de estudos *in vitro* e *in vivo*, os autores demonstraram que em condições fisiológicas normais AhpC encontra-se na forma de complexos de baixa massa molecular (75-125 kDa) com atividade peroxidase e, sob condições de estresse, forma complexos de elevada massa molecular (>669 kDa) com atividade de chaperona molecular. Interessantemente, apesar da origem bacteriana,

AhpC de *H. pylori* isolada de tecidos humanos é mais similar, do ponto de vista estrutural e de sequência de aminoácidos, às peroxirredoxinas de mamíferos, ambas apresentando dupla função peroxidase e chaperona (Jang e col., 2006),.

Atuando como peroxidase, as proteínas AhpC podem ser reduzidas por diferentes sistemas, dependendo do organismo a qual pertence. Como mencionado anteriormente, um desses redutores é a flavoenzima AhpF. AhpF é expressa apenas em eubactérias e, diferentemente de tiorredoxina redutase e glutathione redutase, atua exclusivamente como AhpC redutase (Tartaglia e col., 1990). Na maior parte das bactérias, os genes estruturais das proteínas AhpC e AhpF são contíguos e constituem, provavelmente, um *operon* (Poole, 2005).

A proteína AhpF de *S. typhimurium* possui dois módulos distintos envolvidos na redução da AhpC (figura 10A). O módulo C-terminal é homólogo à tiorredoxina redutase (TrxR) de *E. coli* (com 35% de identidade) e contém o motivo CXXCD redox-ativo, requerido na TrxR para a reação com a tiorredoxina. No módulo C-terminal da AhpF, assim como na TrxR, a transferência de elétrons é realizada inicialmente do NAD(P)H para a flavina, posteriormente da flavina reduzida para o centro dissulfeto redox-ativo (motivo CXXCD) e, então, deste para o módulo N-terminal (figura 10B). Além do módulo similar à TrxR, AhpF possui um módulo N-terminal adicional que não está presente na TrxR e que possui um domínio CXXC redox-ativo similar ao presente nas tiorredoxinas. Este domínio está em comunicação funcional com o centro dissulfeto redox-ativo (CXXCD) do módulo C-terminal da proteína, possui o mesmo potencial de redução da Trx ($E^0 = -270$ mV), atuando como o acceptor final de elétrons provenientes da região C-terminal e como doador direto de elétrons para AhpC (Poole, 2005).

Figura 10. Mecanismo catalítico da redução de hidroperóxidos pela AhpC acoplada à AhpF. (A) Esquematização dos módulos da proteína AhpF de *S. typhimurium*, adaptado de Poole (2005). **(B)** Representação da transferência de elétrons. O retângulo representa a transferência de elétrons do sistema tiorredoxina (Trx) / tiorredoxina redutase (TrxR), semelhante àquele que ocorre internamente na AhpF.

Na maioria dos organismos que não possuem AhpF, a proteína AhpC tem como doador de elétrons o sistema tiorredoxina (tiorredoxina e tiorredoxina redutase). A bactéria *M. tuberculosis* também possui AhpC, mas o gene que codifica AhpF é ausente (Hillas e col., 2000). Nesse caso, a redução de AhpC envolve as proteínas AhpD, dihidrolipoamida succiniltransferase e dihidrolipoamida desidrogenase (figura 11; Bryk e col., 2002). A proteína AhpD de *M. tuberculosis* atua como uma forma especializada de tiorredoxina, possuindo um motivo CXXC similar ao da tiorredoxina, porém, sem similaridade de sequência com a mesma ou com a AhpF de *S. typhimurium*. Interessantemente, dihidrolipoamida

succiniltransferase e dihidrolipoamida desidrogenase são componentes do complexo α -cetoácido desidrogenase sendo, portanto, proteínas centrais no metabolismo energético.

Figura 11. Representação esquemática dos eventos de redução de hidroperóxidos e regeneração de AhpC por AhpD.

Abreviaturas: LpdC (dihidrolipoamida desidrogenase), SucB (dihidrolipoamida succiniltransferase). Adaptado de Bryk e col, 2002.

Também em bactérias, recentemente foi descrita uma proteína responsável pela detoxificação de hidroperóxidos, denominada Ohr (*Organic Hydroperoxide Resistance*). O gene *ohr* está presente em bactérias que, na maioria dos casos, são patogênicas para plantas ou mamíferos (Atichartpongkul e col., 2001). Mostrou-se que a deleção do gene *ohr* aumenta a sensibilidade de *Xanthomonas campestris* e *Pseudomonas aeruginosa* a hidroperóxidos orgânicos, tais como CHP e TBHP. Interessantemente, as linhagens Δohr destas bactérias não eram hiper-sensíveis a tratamentos com peróxido de hidrogênio ou compostos geradores de radical ânion superóxido, como o paraquat. Além disso, a expressão do gene *ohr* somente é induzida por hidroperóxidos orgânicos (Mongkolsuk e col., 1998; Ochsner e col., 2001). Esses dados mostram que o produto do gene *ohr* exerce uma função importante na defesa do organismo contra o estresse oxidativo induzido por hidroperóxidos orgânicos. Recentemente, foi demonstrado que Ohr também é importante na defesa contra hidroperóxidos orgânicos em *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Shea e Mulks, 2002), *Enterococcus faecalis* (Rince e col., 2001) e *Bacillus Subtilis* (Fuangthong e col., 2001).

Proteína comigratória com bacterioferritina (Bcp)

A proteína comigratória com bacterioferritina (Bcp) foi inicialmente encontrada em *E. coli* como uma proteína com massa molecular de 18 kDa que comigra com bacterioferritina em SDS-PAGE (Neidhardt e col., 1983). A análise da sequência de aminoácidos da Bcp de *E. coli* mostrou que havia similaridade com a sequência de aminoácidos de peroxirredoxinas. Muitos homólogos à Bcp foram encontrados no genoma de procariotos e eucariotos unicelulares, formando uma subfamília dentro da família das peroxirredoxinas. As proteínas homólogas à Bcp fazem parte da subfamília menos caracterizada entre as peroxirredoxinas, com pouca informação disponível na literatura a respeito de sua estrutura. Além disso, o doador fisiológico de elétrons e a localização celular dessas enzimas não são completamente conhecidos.

A proteína Bcp está envolvida na resistência de *E. coli* à vários agentes oxidantes (Jeong e col., 2000) e é superexpressa na bactéria fixadora de nitrogênio *Frankia sp.*, durante a formação de simbiose com a planta *Alnus glutinosa* (Hammad e col., 2001). Em *Arabidopsis thaliana*, a síntese de PrxQ (como foram designadas em plantas as proteínas similares à Bcp) é estimulada por luz intensa e agentes oxidantes, enquanto é inibida por agentes redutores com ascorbato, indicando que sua transcrição é

sensível a mudanças do estado redox da célula (Horling e col., 2002; Horling e col., 2003). Recentemente, Wang e col. (2005) mostraram que apesar da mutante Δbcp de *H. pylori* apresentar apenas moderada sensibilidade a hidroperóxidos orgânicos, a proteína Bcp contribui significativamente para o processo de colonização do estômago do hospedeiro, indicando um importante papel biológico na eficiência de colonização do hospedeiro.

Apesar da ampla distribuição na maioria das bactérias, incluindo as bactérias patogênicas *Haemophilus influenzae*, *H. pylori* e *M. tuberculosis*, o mecanismo catalítico de Bcp só começou a ser esclarecido a partir de 2000. Até então, a similaridade de estrutura primária entre Bcp e a família Tsa/AhpC sugeria que a proteína fosse uma peroxidase capaz de reduzir hidroperóxidos com o auxílio de tiorredoxina ou outro agente redutor tiólicos. Jeong e col. (2000) demonstraram que a Bcp de *E. coli* (com três resíduos de cisteínas Cys-45, Cys-50 e Cys-99) possui mecanismo catalítico similar ao de outras peroxidases dependentes de tiól, no que se refere à remoção de peróxido de hidrogênio, TBHP e hidroperóxido de ácido linoléico. Estudos de mutagênese mostraram que a Bcp de *E. coli* é funcional com apenas a cisteína catalítica, indicando um mecanismo de reação para redução de hidroperóxidos que envolvia a formação de ácido sulfênico na única cisteína conservada (Cys-45), que posteriormente seria reduzida pela ação de uma tiorredoxina num mecanismo da tipo 1-Cys Prx (Jeong e col., 2000).

Em plantas, proteínas similares à Bcp receberam a designação peroxirredoxina Q (PrxQ), como mencionado anteriormente. PrxQ foi primeiramente caracterizada na planta *S. lineare* (Kong e col. 2000). Esta proteína apresenta duas cisteínas adjacentes (Cys-44 e Cys-49) essenciais para a atividade peroxidásica dependente de tiorredoxina. Contraditoriamente ao mecanismo 1-Cys Prx proposto por Jeong e col. (2000), o mecanismo de reação da PrxQ de *S. lineare* envolve a oxidação pelo hidroperóxido de um das cisteínas resultando na formação de um ácido sulfênico (Cys-SOH), o qual reage com a segunda cisteína da mesma molécula para formar uma ligação dissulfeto intramolecular, característico do mecanismo 2-Cys Prx atípico, que pode ser reduzida por uma tiorredoxina. Na planta Poplar (*Populus tremula* x *P. tremuloides*), PrxQ também atua como um monômero, com formação de ponte dissulfeto intramolecular entre duas cisteínas conservadas (Cys-46 e Cys-51) e sua expressão é modificada em resposta a infecção pelo fungo *Melampsora larici-populina* (Rouhier e col., 2004).

Peroxirredoxinas similares às Bcp e PrxQ nunca foram isoladas de células de mamíferos, sendo apenas encontradas em bactérias, eucariotos unicelulares e plantas, apresentando-se como proteínas monoméricas (Kong e col., 2000). Pela classificação sugerida por Trivelli e col. (2003), as proteínas da família Bcp e PrxQ fazem parte do subgrupo C, apresentando baixa similaridade com as dos subgrupos A e B, e formando ponte dissulfeto intramolecular como intermediário do ciclo catalítico. A proteína Dot5 de *S. cerevisiae* (também conhecida como nTPxI), de localização nuclear, também faz parte do subgrupo C (Park e col, 2000; Choi e col., 2005), e apresenta similaridade de sequência com as proteínas da família Bcp e PrxQ. Em plantas, as sequências das PrxQ contêm uma extensão N-terminal de 60 a 70 aminoácidos que é proposta como uma sequência sinalizadora que direciona para o cloroplasto (Rouhier e col., 2004). Dot5 de *S. cerevisiae* também possui uma extensão N-terminal que, neste caso, a direciona para o núcleo celular (Park e col., 2000).

Enquanto a primeira cisteína é totalmente conservada, a segunda não está presente na Bcp de organismos como *H. pylori* e *Synechocystis* sp. (Rouhier e col., 2004). A cianobactéria *Anabaena* PCC 7120, possui quatro peroxirredoxinas similares às PrxQ de *Synechocystis* sp. PCC 6803 e *A. thaliana*,

das quais duas não possuem a segunda cisteína (Latifi e col., 2007). Quando a sequência de aminoácidos de várias Bcp e PrxQ são alinhadas, a segunda cisteína é encontrada em diversas posições ou não está presente. Por este motivo, Wakita e col. (2007) sugerem a nomenclatura PrxQ α , para o subgrupo que possui as duas cisteínas conservadas separadas por quatro resíduos de aminoácidos (sequência CXXXXC), e PrxQ β , para o subgrupo que possui as duas cisteínas conservadas separadas por 35 resíduos (sequência CX₃₅C; ver figura 16). Em contraste com o subgrupo das PrxQ α , pouco se conhece sobre as propriedades bioquímicas do subgrupo PrxQ β . Apenas recentemente, Wakita e col. (2007) caracterizaram uma PrxQ β , a PrxQ de *Rhodobacter sphaeroides*, como possuindo mecanismo 2-Cys Prx atípico, capaz de decompor peróxido de hidrogênio e CHP utilizando o sistema tiorredoxina como doador de elétrons.

Análise *in silico* de genes de defesa antioxidante no genoma de *Xylella fastidiosa*

Neste item, descreveremos a etapa inicial desenvolvida neste trabalho, referente à análise no banco de dados do genoma de *X. fastidiosa* de sequências similares às peroxirredoxinas AhpC e Bcp de *E. coli* e seus possíveis sistemas redutores, utilizando o algoritmo tBLASTn (busca por sequências de aminoácidos similares nos produtos de tradução em todos os quadros de leitura das sequências de nucleotídeos disponíveis no banco de dados do genoma de *X. fastidiosa*; Altschul e col., 1997). Através deste algoritmo, identificamos sequências similares às proteínas AhpC e Bcp, e também às proteínas TrxA (tiorredoxina A), TrxB (tiorredoxina redutase), AhpF (alquil hidroperóxido redutase subunidade F) e Ybbn de *E. coli* (tabela II).

Tabela II. Proteínas candidatas de *X. fastidiosa*, similares às proteínas de *E. coli*.

Proteína	Família sugerida	ORF de <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c			Comparação com proteína similar de <i>E. coli</i> ⁴	
		Coordenada ¹	ORF ²	M.M. ³	Identidade	Similaridade
AhpC	peroxirredoxina	1487808-1488368*	XF1530	20,6 kDa*	69%	85%
Bcp	peroxirredoxina	920666-921145	XF0961	17,8 kDa	34%	51%
TrxA	tiorredoxina	1152952-1153278	XF1199	11,9 kDa	32%	50%
TsnC	tiorredoxina	2576711-2577052	XF2698	12,5 kDa	49%	75%
TrxR	tiorredoxina redutase	C1391562-1392527	XF1448	34,5 kDa	70%	81%
AhpF	AhpC redutase	1488566-1490161*	XF1531	57,2 kDa*	59%	77%
Ybbn	chaperona	C2059817-2060833	XF2174	37,4 kDa	40%	60%

¹localização no cromossomo circular principal de *X. fastidiosa* cepa 9a5c, de acordo com o site Projeto Genoma *Xylella fastidiosa*. A letra C indica que o gene está localizado na fita complementar do cromossomo;

²identificação do quadro de leitura aberto de acordo com o Projeto Genoma *Xylella fastidiosa*;

³massa molecular de acordo com o Projeto Genoma *Xylella fastidiosa*;

⁴a similaridade e a identidade não se referem a toda a sequência primária das proteínas, apenas a região de maior similaridade, calculada pelo programa BLASTp 2.2.20+ (Altschul e col., 1997);

*localização e massa molecular corrigidas a partir do anotado no Projeto Genoma *Xylella fastidiosa*.

As tiorredoxinas TrxA (ORF XF1199) e TsnC (ORF XF2698) de *X. fastidiosa*, além de possuírem similaridade à TrxA de *E. coli*, são proteínas pequenas, de aproximadamente 12 kDa, com motivo CXXC relacionado à catálise de reações de troca ditiól-dissulfeto (Arnér e Holmgren, 2000). Assim como a TrxA de *E. coli*, as proteínas TrxA e TsnC de *X. fastidiosa* possuem uma prolina conservada (chamada *cis*-Pro), que no caso de TrxA de *E. coli* está localizada no sítio ativo e é requerida para interação com o substrato polipeptídico (Copley e col., 2004). Estas proteínas também apresentam um aspartato conservado, que precede em seis resíduos o motivo CXXC e tem sido relacionado com a abstração do próton da cisteína C-terminal, necessária para o ataque nucleofílico desta cisteína ao dissulfeto misto formado entre a cisteína N-terminal e a proteína alvo (Chivers e Raines, 1997). O motivo CXXC e os aminoácidos Pro e Asp conservados, sugerem que os produtos das ORFs XF1199 (TrxA) e XF2698 (TsnC) são prováveis tiorredoxinas em *X. fastidiosa* (figura 12).

Figura 12. Alinhamento de aminoácidos da proteína TrxA de *E. coli* (GI: 68304124) com as proteínas candidatas TrxA e TsnC de *X. fastidiosa*. Resíduos de aminoácidos e motivos conservados estão destacados em vermelho. Todas as figuras de alinhamentos de proteínas foram geradas com a utilização do programa *Lasergene MegAlign v.5.01* (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin, USA).

Tiorredoxina redutase (TrxR; ORF XF1448) de *X. fastidiosa*, por sua vez, possui elevada similaridade à TrxB de *E. coli*. TrxB de *E. coli* é uma flavoproteína, membro da família das piridina nucleotídeo dissulfeto oxidoreduases (Williams, 1995). Semelhantemente à TrxB de *E. coli*, a TrxR de *X. fastidiosa* possui quatro motivos de elevada similaridade entre os membros da família das tiorredoxinas redutases: (1) o primeiro motivo está localizado na região N-terminal da proteína e inclui a sequência de aminoácidos GXGXXGXXXA, precedida por três ou quatro aminoácidos hidrofóbicos, que está implicado na ligação à porção adenina do FAD; (2) o segundo motivo contém o centro redox ditiól-dissulfeto, composto pelos aminoácidos ACATCD; (3) o terceiro motivo está localizado na parte central da proteína, após o centro redox e inclui a sequência de aminoácidos VAVIGGGNTAVEEA, que está envolvido na ligação à porção adenina do NADPH; e (4) o quarto motivo está localizado na região C-terminal da proteína, inclui a sequência de aminoácidos TSXXGVFAAGD e possui função ainda desconhecida (figura 13; Russel e Model, 1988). Estas observações sugerem que o produto da ORF XF1448 (TrxR) é uma provável tiorredoxina redutase em *X. fastidiosa*.

1	-----MGTTKHSKLLI LGSGPAGYTA AVYAARANLQPVLI TGMKEGGQLTTTTEVENWPGDPNDLT	TrxB Escherichia coli
1	MSDYPASAKHSRLLI LGSGPAGYTA AVYAARANLQPVLI TGLQQGGQLMTTTEVDNWPGDAGHGLM	TrxR Xylella fastidiosa
62	GPLL MERMHEHATKFETEI I FDHI NKVDLQNRPFRLNGDNGEYTCDALI I ATGASARYLGLPSEE	TrxB Escherichia coli
66	GPDL MERMQAHAERFDTKVI FDOYKADLSTRPFTLF GDSGLYTCGLI I ATGANAKYLG I PSEE	TrxR Xylella fastidiosa
127	AFKGRGVSACATCDGFFYRNQKVAVI GGGNTAVEEALYLSNI ASEVHLI HRRDGFRAEKI LI KRL	TrxB Escherichia coli
131	AFKGRGVSACATCDGFFYRDQDVAVI GGGNTAVEEALYLSNI ARKVYLI HRRDKLRAEKI MQNKL	TrxR Xylella fastidiosa
192	MDKVENGNI I LHTNRTLEEVTGDQMGVTGVRLRDTQNSDNI ESLDVAGLFVAI GHSPNTAI FEGQ	TrxB Escherichia coli
196	FSKAATCKELI WNAVEEVLGNDA SVTGVR I RSTQDS-STRDI DVQGLFVAI GHHPNTDLFAGQ	TrxR Xylella fastidiosa
257	LELENGYI KVQSGI HGNATQTSI PGVFAAGDVM DHI YRQAI TSAGTGCMAALDAERYLDGLADAK	TrxB Escherichia coli
260	LAMNNGY LQI HSGTAGNVTQTSVEGVFAAGDVA DQHYRQAI TSAGTGCMAALDAERFLD- - - KGN	TrxR Xylella fastidiosa

Figura 13. Alinhamento de aminoácidos da proteína TrxB de *E. coli* (GI: 89107738) com a proteína candidata TrxR de *X. fastidiosa*. Motivos conservados estão destacados em vermelho.

O genoma de *X. fastidiosa* também possui a ORF XF2174 cujo produto possui elevada similaridade, na sua parte N-terminal, com TrxA de *E. coli* (identidade 40%, similaridade 60%, por BLASTp). O produto da ORF XF2174, não apresenta similaridade de sequência com a TrxB de *E. coli* mas, por outro lado, possui similaridade de sequência com a proteína Ybbn de *E. coli* (identidade 31%, similaridade 47%, figura 14). Ybbn de *E. coli* também apresenta elevada similaridade na sua parte N-terminal com a TrxA de *E. coli* mas o motivo CXXC conservado é substituído pelo motivo SXXC. Adicionalmente, Ybbn de *E. coli* possui uma parte C-terminal de 20 kDa com função desconhecida (Caldas e col., 2006). A proteína Ybbn de *E. coli*, ao invés de possuir atividade oxidoreductase, atua como uma chaperona, interagindo *in vivo* especificamente com as chaperonas DnaK e GroEL (Kthiri e col., 2008). Interessantemente, o produto da ORF XF2174 (Ybbn de *X. fastidiosa*) possui o motivo CXXC, sugerindo uma provável atividade oxidoreductase semelhante às proteínas da família tioredoxina.

1	MSKKI STTESDSMSVENI VNI NESNLQ- QVLEQSMTPVLFFYFWSERSQHCLQLTPI LES	Ybbn Escherichia coli
1	MSDKS-----HVF DVTDA DFE TAVLKKSLETPVLVDFWAPWCAFCRSLIPI LEK	Ybbn Xylella fastidiosa
60	LAAQYNGQFI LAKLDCDAEQMI AAQFGLRAI PTVYLFQNGQPVDFGQGQPPEEAI RALLD	Ybbn Escherichia coli
50	LVAEYRGGEELAKI NVDQEQVAAALQVRSPV MYYLVKDGQLVDGFP GAKPESQVREFLT	Ybbn Xylella fastidiosa
120	K- - VLPREEELKAQQAMQLMQESNYTDALPLLKDAWQLSNNGEI GLLLAETLI ALNRSE	Ybbn Escherichia coli
110	KHGI LPARSAAFGEDTPAI PLDP- - EAEVARLRQALAAEPENNDLKLDLALALLKTNVAD	Ybbn Xylella fastidiosa
178	DAEAVLKTI PLQ- DQDTRYQGLVAQI ELLKQAADTPEI QQLQQQVAENPEDAALATQAL	Ybbn Escherichia coli
168	EAAGLI DALPAKLATDDRMLRAKAMLRFI EVLNGVPSLDVLQAACAADASDFDQRHLLGV	Ybbn Xylella fastidiosa
237	QLHQVGRNEEAELELLFGLHRLKDLTAADGQTRKTFQEI LAALGTGDALASKYRRQLYALLY	Ybbn Escherichia coli
228	HLLLDGQCEVALEHFLMLRQNRDFKDGLPRKALI DAFYLI ED- KELVGRYRRKMSALLF	Ybbn Xylella fastidiosa

Figura 14. Alinhamento de aminoácidos da proteína Ybbn de *E. coli* (GI: 1786700) com a proteína candidata Ybbn de *X. fastidiosa*. Motivos conservados estão destacados em vermelho.

A análise por BLASTx das ORFs que codificam para proteínas candidatas à peroxirredoxinas, XF1530 (AhpC de *X. fastidiosa*) e XF0961 (Bcp de *X. fastidiosa*) contra o banco de dados de sequências não redundantes de proteínas do NCBI (*non-redundant protein sequences* do *National Center for Biotechnology Information*, site www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi), mostra similaridade de sequência de aminoácidos com peroxirredoxinas conhecidas. O alinhamento das sequências de peroxirredoxinas candidatas de *X. fastidiosa* com as sequências de *E. coli* (Jeong e col., 2000) e *S. typhimurium* (Poole e Ellis, 1996), cujas peroxirredoxinas já estão descritas, mostram a presença dos motivos característico de

cada uma das proteínas. Essas observações são as primeiras evidências de que essas sequências codificam para as peroxirredoxinas AhpC e Bcp em *X. fastidiosa*.

Na maioria das peroxirredoxinas similares à Bcp de *E. coli*, como descrito anteriormente, o motivo CXXXXC é conservado e, aparentemente, durante o ciclo catalítico, o ácido sulfênico resultante da oxidação da cisteína peroxidásica forma uma ponte dissulfeto intramolecular com a cisteína de resolução, localizada a uma distância de quatro aminoácidos (Jeong e col., 2000; Kong e col., 2000; Rouhier e col., 2004). A peroxirredoxina Bcp de *X. fastidiosa* não possui a cisteína C-terminal do motivo CXXXXC, apesar de apresentar alta similaridade de sequência de aminoácidos na região N-terminal adjacente a este motivo com Bcp de *E. coli* (figura 15A). É importante salientar que a cisteína N-terminal do motivo CXXXXC é conservada também em outras subfamílias das peroxirredoxinas (Rhee e col., 2005). Por outro lado, Bcp de *X. fastidiosa* possui maior similaridade de sequência de aminoácidos com a PrxQ de *R. sphaeroides* (identidade 50%, similaridade 62%, figura 15B). Bcp de *X. fastidiosa* e PrxQ de *R. sphaeroides* não possuem a cisteína C-terminal do motivo CXXXXC e conservam uma segunda cisteína distante 35 aminoácidos da cisteína N-terminal.

Como descrito anteriormente, as peroxirredoxinas similares à Bcp de *E. coli* podem ser divididas em dois subgrupos, PrxQ α e PrxQ β , de acordo com a posição da cisteína C-terminal (Wakita e col., 2007). O subgrupo PrxQ β possui menos representantes que o subgrupo PrxQ α e, talvez por este motivo, é o menos estudados entre as peroxirredoxinas. Atualmente, PrxQ de *R. sphaeroides* é o único representante do subgrupo PrxQ β caracterizado (Wakita e col., 2007). A similaridade de sequência de Bcp de *X. fastidiosa* com a PrxQ de *R. sphaeroides*, sugere que a proteína de *X. fastidiosa* também seja uma representante do subgrupo PrxQ β (figura 16).

Apesar da designação Bcp (proteína comigratória com bacterioferritina) não acrescentar informação funcional à proteína, esta é a forma mais comumente utilizada para proteínas similares à Bcp de *E. coli*, em bactérias e eucariotos unicelulares (Choi e col., 2005) e, por isso, foi mantida neste trabalho para designar a proteína de *X. fastidiosa*. A designação PrxQ foi proposta por Kong e col. (2000), como uma forma de agregar informação funcional ao nome da proteína da planta *S. lineare*, que possui similaridade de sequência de aminoácidos com a Bcp de *E. coli*.

Figura 15. Alinhamento de aminoácidos das proteínas (A) Bcp de *E. coli* (GI: 1788825) e (B) PrxQ de *R. sphaeroides* (GI: 77387949) com a proteína candidata Bcp de *X. fastidiosa*. Cisteínas conservadas estão indicadas por setas vermelhas, outras cisteínas da proteína Bcp de *X. fastidiosa* estão indicadas por setas azuis.

60	SLKGLI FAKVNGQAAPDFTLKD- QNGKPVSLKKYKGKPVVLYFYPADETPGCTKQACAF	PrxQ Arabidopsis thaliana
57	SVKNTI FAKVNGQAAPPSTFLKD- QDGKTL SL SKFKGKPVVLYFYPADETPGCTKQACAF	PrxQ Poplar
29	LRKNSI FAKVTKGSTPPPTFLKD- QEGRPVSL SKFKGKPVVLYFYPADETPGCTKQACAF	PrxQ Sedum lineare
1	----- MLSI GTKAPEFTLED- KDGKVSMSDFKGGKVVVLYFYPKDNTPGCTRQACAF	Bcp Clostridium difficile
1	----- MNPLKAGDI APKFSLPD- QDGEQVNL TDF QGQRVLVYFYPKAMTPGCTVQACGL	Bcp Escherichia coli
1	----- MNPLSVGNQAPAF TLLN- QQEKVVSLSDFRGKKVLI YFYPKALT PGCTTQACGL	Bcp Haemophilus influenzae
1	----- MTPLKAGDI APKFSLPD- QDGEVNL TDF QGQRVLVYFYPKAMTPGCTVQACGL	Bcp Klebsiella pneumoniae
1	--- MTKTTRLTPGDKAPAF TLPD- ADGNNVSLADYRGRRVI YFYPAASTPGCTKQACDF	Bcp Mycobacterium tuberculosis
1	----- MNPLKAGDI APKFSLPD- QDGEQVNL TDF QGQRVLVYFYPKAMTPGCTVQACGL	Bcp Salmonella typhimurium
3	----- DA- - G- QTAPDFTLPR- DGGSTVSL SGLRP GKVVVLYFYPKDDTSGCTLEAQEF	PrxQ Rhodobacter sphaeroides
27	TAYALGGKLPAL NQPADPFTLPTNT GDGKLSLADF RGKVVLYFYPKDFTSGCTI EARRF	Bcp Anabaena variabilis
29	PTYALGGI QPELDQAPLFTLPSTT GEGEVNL TDYRGQWVLYFYQDFTPGCTLEAQRF	Bcp Synechocystis
22	PSVALGGELPPLNAPADPFLPSSVNGQLI SLKDYRGKVVLYFYPKDFTSGCTLEAQRF	Bcp Thermosynechococcus elongatus
5	----- DT- - LNHSLLNHPLML- SGSTCKT LSDYT NQWLVLYFYPKDNTPGCTEGLEF	Bcp Xylella fastidiosa
119	RDSYEKFKKAGAEVI GI SGDDSSHAKAFASKYKLPYTLL SDEGNKVRKDWGVP GD- - LFG	PrxQ Arabidopsis thaliana
116	RDSYEKFKKAGAEVVGI SGDDSSHAKAFASKYKLPYTLL SDEGNKI RKEWGV PAD- - LFG	PrxQ Poplar
88	RDSYEKFKKAGAEVVGI SGDSSESHAKAFASKYKLPYTLL SDEGNKVRKEWGV PSD- - LFG	PrxQ Sedum lineare
52	RNAYDGGFKKEDI QVI GI SKDSI KSHQKFAEKHEL PFI LLSDPDLVAI KAFDVWKEKKMYG	Bcp Clostridium difficile
54	RDNMDELKKA GVDVLGI STDKPEKLSRFAEKELLNF TLLSDEHQVCEQF GVVWGEKSF MG	Bcp Escherichia coli
54	RDSKSEL DVLGLVVLGI SPDAPKKLAQFI EKELNF TLLSDPDHQVAEQF GVVWGEKKF MG	Bcp Haemophilus influenzae
54	RDNMDDLKKA GVEVLGI STDKPEKLSRFAEKELLNF TLLSDENHQVCEQF GVVWGEKSF MG	Bcp Klebsiella pneumoniae
57	RDNLDGFTTAGLNVVGI SPDKPEKLATFRDAQGLTF PLLSDPDREVLTAWGAYGEKQMYG	Bcp Mycobacterium tuberculosis
54	RDNMDELKKA GVDVLGI STDKPEKLSRFAEKELLNF TLLSDENHQVCEQF GVVWGEKSF MG	Bcp Salmonella typhimurium
52	TALAPQFAEI GTTVI GI SKDSVKSHDKFCAKHGLGI VLASDEGATTAE DYGVVWKEKNMYG	PrxQ Rhodobacter sphaeroides
87	QDLDPTYVDKNVQI I GVSADDI DSHAFC DSEGLKFLLADTDGAVSKAYGSW G- - - -	Bcp Anabaena variabilis
89	QRDLTKYQALNAQVI GVSVDLDSHEAFCDAEGLKFLLADSDGAVI KTYGSWLS- - - -	Bcp Synechocystis
82	QRDI EQFHAHNAEVI GVSADSVDSHQDFCDSEGLTF PLLSDPDGQVSKAYGSWLG- - - -	Bcp Thermosynechococcus elongatus
55	NLLLPQFEQI NATVLGVS RDSVKSHDSFCAKQGGTFPLVSDSDAI LCKAFDVI KEKTMYG	Bcp Xylella fastidiosa

Figura 16. Alinhamento parcial de aminoácidos de várias proteínas similares à Bcp de *E. coli*. As cisteínas conservadas estão destacadas em vermelho. A linha azul separa os subgrupos PrxQ α (superior) e PrxQ β (inferior). Subgrupo PrxQ α é representado por: PrxQ de *Arabidopsis thaliana* (GI: 9279611), PrxQ de Poplar (*Populus balsamifera* subsp. *trichocarpa* x *Populus deltoides*; GI: 42795441), PrxQ de *Sedum lineare* (GI: 75336180), Bcp de *Clostridium difficile* (GI: 126699430), Bcp de *E. coli* (GI: 1788825), Bcp de *Haemophilus influenzae* (GI: 1573220), Bcp de *Klebsiella pneumoniae* (GI: 152971345), Bcp de *Mycobacterium tuberculosis* (GI: 2791423) e Bcp de *Salmonella typhimurium* (GI: 16765811). Subgrupo PrxQ β é representado por: PrxQ de *Rhodobacter sphaeroides* (GI: 77387949), Bcp de *Anabaena variabilis* (GI: 75906708), Bcp de *Synechocystis* sp. (GI: 16329318), Bcp de *Thermosynechococcus elongatus* (GI: 22298737) e Bcp de *Xylella fastidiosa*.

A peroxirredoxina AhpC de *X. fastidiosa*, por sua vez, possui elevada similaridade às proteínas AhpC de *E. coli* e *S. typhimurium* (neste último caso, identidade 70% e similaridade 84%). Nestas proteínas, a cisteína peroxidásica (N-terminal) está localizada num motivo fortemente conservado (motivo YPADFTFVCPTTEL) e a cisteína de resolução (C-terminal) está localizada num motivo VCP (figura 17), motivos estes característico de peroxirredoxinas com mecanismo 2-Cys Prx típico (Copley e col., 2004).

1	MSLI NTKI KPFGNQAFKNGEFI EI TEKDTEGRWSVFFFYPADFTFVCPTTEL GDVADHYEELQK	AhpC Escherichia coli
1	MSLI NTKI KPFGNQAFKNGEFI EVTEKDTEGRWSVFFFYPADFTFVCPTTEL GDVADHYEELQK	AhpC Salmonella typhimurium
1	MSVLNTEI LSFKATAYKNGQFMEVSEAVFKGKAVFVFYPADFTFVCPTTEL EDLADHYEEFQK	AhpC Xylella fastidiosa
64	LGVDVYAVSTDTHFTHKAWHSSSETI AKI KYAMI GDPTGALTRNF DNMRDEGLADRATFVVD	AhpC Escherichia coli
64	LGVDVYVSTDTHFTHKAWHSSSETI AKI KYAMI GDPTGALTRNF DNMRDEGLADRATFVVD	AhpC Salmonella typhimurium
64	YGVETYSVSTDTHFSHKAWHDI SPAI GKI KYAMI GDPTHEI SRNFNVLRPS-GLADRGTFTID	AhpC Xylella fastidiosa
127	PQGI I QAI EVTAEGI GRDASDLLRKI KAAQYVASHPGEVCPAKWKEGATLAPSLDLVGKI	AhpC Escherichia coli
127	PQGI I QAI EVTAEGI GRDASDLLRKI KAAQYVASHPGEVCPAKWKEGATLAPSLDLVGKI	AhpC Salmonella typhimurium
126	PQGI QSVETI TAEGI GRDAKELLRKVKAAT YVANHPGEVCPAKWKEGKTLAPSLDLVGKI	AhpC Xylella fastidiosa

Figura 17. Alinhamento de aminoácidos das proteínas AhpC de *E. coli* (GI: 16128588) e de *S. typhimurium* (GI: 16763985) com a proteína candidata AhpC de *X. fastidiosa*. Motivos conservados estão destacados em vermelho. A sequência da AhpC mostrada é aquela que se inicia na segunda metionina da sequência anotada no site do Projeto Genoma *Xylella fastidiosa*, conforme discutido a seguir.

Além dos dois motivos VCP conservados, as peroxirredoxinas com mecanismo 2-Cys Prx típico podem ser divididas em resistentes e sensíveis à superoxidação por hidroperóxido. Essa característica está relacionada com a presença de motivos adicionais nas 2-Cys Prx típicas de mamíferos, plantas e leveduras, que conferem sensibilidade à superoxidação por hidroperóxidos (ver figura 9). Diferentemente das 2-Cys Prx típicas bacterianas, que são resistentes a superoxidação, as 2-Cys Prx sensíveis possuem: (1) uma inserção de três aminoácidos associados a um motivo GGLG conservado e (2) uma extensão C-terminal composta por uma α hélice com um motivo YF conservado (figura 18; Wood e col., 2003). Estas duas características estruturais dificultam a mudança conformacional requerida para formação da ponte dissulfeto intermolecular e, conseqüentemente, facilitam a superoxidação (Poole, 2005). AhpC de *X. fastidiosa*, como outras 2-Cys Prx típicas bacterianas, não possui estes motivos adicionais e, provavelmente, é resistente a superoxidação por hidroperóxidos. A sensibilidade à superoxidação é considerada uma característica adquirida evolutivamente pelas peroxirredoxinas que passaram a também atuar na regulação de processos de sinalização por peróxido de hidrogênio (Wood e col., 2003).

1	-----MSVLNTEI LSFKATAYK- NGQFVEVSEAVFKG- KWAVVFV	YPADFTFVCPT	EDLADHYEEF	AhpC <i>Xylella fastidiosa</i>
1	-----MSLI NTKI KPFKNQAFK- NGEFI EI TEKDTEG- RWSVFFF	YPADFTFVCPT	GDVADHYEEL	AhpC <i>Escherichia coli</i>
1	-----MSLI NTKI KPFKNQAFK- NGEFI EVTEKDTEG- RWSVFFF	YPADFTFVCPT	GDVADHYEEL	AhpC <i>Salmonella typhimurium</i>
1	-----MSLVGKEMVEFSAQAYH- QGEFVTNNEDVKG- KWAVFCF	YPADF SFVCPT	GDLEQYATL	AhpC <i>Streptococcus mutans</i>
65	VKAQADDPLVGNKAPDFEAEAVF- DQEFI KVKLSDYI GKYYVI LFF	YPLDFTFVCPT	TAF SDRHSEF	Bas1 <i>Arabidopsis thaliana</i>
65	VKAQADDPLVGNKAPDFEAEAVF- DQEFI KVKLSDYI GKYYVI LFF	YPLDFTFVCPT	TAF SDRHSEF	Bas1 <i>Spinacia oleracea</i>
1	---MSSGNAKI GHPAPNFKATAVMPDGQFKDI SLSDYKG- KYVVFF	YPLDFTFVCPT	AF SDRAEF	Prx1 <i>Homo sapiens</i>
1	---MASGNARI GKAPDFKATAVMPDGQFKDI SLSDYKG- KYVVFF	YPLDFTFVCPT	AF SNRAEDF	Prx2 <i>Homo sapiens</i>
55	STSSSCHAPAVTQHAPYFKGTAVV- NGEFKDL SLDDFKG- KYLVLF	YPLDFTFVCPT	VAF SDKANEF	Prx3 <i>Homo sapiens</i>
71	DHSLHLSKAKI SKPAPYWGTAIV- DGEFKELKLTDRG- KYLVFF	YPLDFTFVCPT	AF GDRLEEF	Prx4 <i>Homo sapiens</i>
1	-----MSLQI GKAPDFKGTAVV- NGAFEEI KLADYKG- KWWFLG	YPLDFTFVCPT	VAF SEAAKF	Tpx1 <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
1	-----MVAQVQKQAPTFFKGTAVV- DGVFDEVSLDKYKG- KYVVLAF	PLAFTFVCPT	AF SEAAKF	Tsa1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
62	QKYGVEI YSVSTDTHFSHKAWHDI --- SPAI GKI KYAMI GDPTHEI SRNF NVLRPS- GLADRGTFI I DPQ			AhpC <i>Xylella fastidiosa</i>
62	QKLGVDDVYAVSTDTHFTHKAWHSS- --- SETI AKI KYAMI GDPTGALTRNF DNMRDEGLADRATFVVD PQ			AhpC <i>Escherichia coli</i>
62	QKLGVDDVYAVSTDTHFTHKAWHSS- --- SETI AKI KYAMI GDPTGALTRNF DNMRDEGLADRATFVVD PQ			AhpC <i>Salmonella typhimurium</i>
62	QSLGVEVYVSTDTHFVHKAWHDD- --- SDVVTGI TYTMI GDP SHVLSQGFVVL GED- GLAQRGTFI VDPD			AhpC <i>Streptococcus mutans</i>
134	EKLNTEVLGVSVDSVFSHLAWQTDRKSGGLGDLNPLI SDVTKSI SKSF GVL I HDQGI ALRGLFI I DKE			Bas1 <i>Arabidopsis thaliana</i>
134	EKLNTEVLGVSVDSVFSHLAWQTDRKSGGLGDLNPLI SDVTKSI SKSF GVL I HDQGI ALRGLFI I DKE			Bas1 <i>Spinacia oleracea</i>
67	KKLNCQVI GASVDSHFCHLAWNTPKKQGLGPI RI PLLSDLTHQI SKDYGVYLED SGHTLRGLFI I DDK			Prx1 <i>Homo sapiens</i>
66	RKLGCVELGVSVDSQFTHLAW NTPRKEGGLGPI NI PLLADVT RRLSEDY GVLKTDEGI AYRGLFI I DGK			Prx2 <i>Homo sapiens</i>
123	HDVNCEVAVSVDSHFCHLAW NTPRKNGGLGHMNI ALLSDLTKQI SRDYGVLL EGSGLALRGLFI I DPN			Prx3 <i>Homo sapiens</i>
139	RSI NTEVAVCSVDSQFTHLAW NTPRRQGLGPI RI PLLSDLTHQI SKDYGVYLED SGHTLRGLFI I DDK			Prx4 <i>Homo sapiens</i>
63	AERNAQVI LTSTDSEYSHLAFI NTPRKEGGLGPI NI PLLADPSHKVSRDY GVL I EDAGVAFRGLFI I DPK			Tpx1 <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
63	EEQGAQVLFASDSEYSLAWNTI PRKEGGLGPI NI PLLADTNHSLSRDY GVL I EEEGVALRGLFI I DPK			Tsa1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
128	GVI QSVEI TAEGI GRDAKELLRKVKA I YVANHPEVCPAKWEEGKTLAPSLDLVGKI			AhpC <i>Xylella fastidiosa</i>
129	GI I QAI EVTAEGI GRDASDLLRKI KAAQYVASHPEVCPAKWKEGATLAPSLDLVGKI			AhpC <i>Escherichia coli</i>
129	GI I QAI EVTAEGI GRDASDLLRKI KAAQYVASHPEVCPAKWKEGATLAPSLDLVGKI			AhpC <i>Salmonella typhimurium</i>
128	GI I QMMEVNADGI GRDASTLI DKVRAAQYI RQHPGEVCPAKWKEGATLAPSLDLVGKI			AhpC <i>Streptococcus mutans</i>
204	GVI QHSTI NNLGI GRSVDETMRTLQALQYI QENPDEVCPAGWKPGESKMPDKLSKEYFSAI			Bas1 <i>Arabidopsis thaliana</i>
204	GVI QHSTI NNLGI GRSVDETMRTLQALQYI QENPDEVCPAGWKPGESKMPDKLSKEYFSAI			Bas1 <i>Spinacia oleracea</i>
137	GI LRQI TVNDLPVGRSVDETLRLVQAFQYTD- KHGEVCPAGWKPGSDTI KPDVQKSKEYFSKQK			Prx1 <i>Homo sapiens</i>
136	GVLRQI TVNDLPVGRSVDETLRLVQAFQYTD- EHGEVCPAGWKPGSDTI KPNVDDSKKEYFSKH			Prx2 <i>Homo sapiens</i>
193	GVI KHLVNDLPVGRSVDETLRLVQAFQYVE- THGEVCPANWTPDSPTI KPSPAASKEYFQKVNQ			Prx3 <i>Homo sapiens</i>
209	GI LRQI TLNDLPVGRSVDETLRLVQAFQYTD- KHGEVCPAGWKPGSETI I PDPAGKLYFDKLN			Prx4 <i>Homo sapiens</i>
133	GVLRQI TI NDLPVGRSVDETLRLVQAFQYVE- EHGEVCPANWHKGSPTI D- TKNPEKYFSKH			Tpx1 <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
133	GVI RHI TI NDLPVGRNVDEALRLVEAFQWTD- KNGTVLP CNWTPGAATI KPTVEDSKKEYFEANK			Tsa1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Figura 18. Alinhamento de aminoácidos de várias proteínas similares à AhpC de *X. fastidiosa*. As cisteínas conservadas e o motivo YPADFTFVCPTEL estão destacadas em vermelho e amarelo, respectivamente. Os motivos que conferem sensibilidade à superoxidação estão indicados em magenta e azul. As 2-Cys Prx típicas resistentes à superoxidação mostradas são: AhpC de *E. coli* (GI: 16128588), AhpC de *Salmonella typhimurium* (GI: 16763985) e AhpC de *Streptococcus mutans* (GI: 3062838). As 2-Cys Prx típicas sensíveis mostradas são: Bas1 de *Arabidopsis thaliana* (GI: 14916972), Bas1 de *Spinacia oleracea* (GI: 3121825), Prx1 humana (GI: 4505591), Prx2 humana (GI: 24659879), Prx3 humana (GI:37747400), Prx4 humana (GI:13937985), Tpx1 de *Schizosaccharomyces pombe* (GI: 19075930) e Tsa1 de *Saccharomyces cerevisiae* (GI: 464970). A sequência da AhpC de *X. fastidiosa* mostrada nessa figura é aquela que se inicia na segunda metionina da sequência anotada no site do Projeto Genoma *Xylella fastidiosa*, conforme discutido a seguir.

Na análise por BLASTp foi possível observar que os primeiros aminoácidos traduzidos a partir da ORF XF1530, da AhpC de *X. fastidiosa* anotada no *site* do Projeto Genoma *Xylella fastidiosa*, não apresentavam similaridade com as sequências de aminoácidos de AhpC de outros organismos (figura 18). A similaridade de sequência de aminoácidos somente se inicia a partir da segunda metionina (segundo códon ATG), localizado no que seria o aminoácido 21 (códon 21) da sequência da AhpC anotada no *site* do Projeto Genoma *Xylella fastidiosa*. É importante salientar que a similaridade também se inicia na segunda metionina da proteína, quando a comparamos com as sequências de aminoácidos de outras cepas de *X. fastidiosa* (*X. fastidiosa* Ann-1, *X. fastidiosa* Temecula1 e *X. fastidiosa* Dixon) anotadas no *GenBank*. A figura 19 mostra a sequência de nucleotídeos anotada no Projeto Genoma *Xylella fastidiosa* e a sequência de aminoácidos traduzida a partir dela, indicando a localização do primeiro e segundo ATG. De acordo com essas observações, a proteína AhpC de *X. fastidiosa* inicia-se provavelmente no segundo códon ATG, ao contrário do que está anotado no Projeto Genoma *Xylella fastidiosa*. Neste caso, a proteína teria massa predita de 20,6 kDa, ao invés de 22,9 kDa (tabela II).

Figura 19. Sequência de nucleotídeos da ORF XF1530 (proteína AhpC), anotada no site do Projeto Genoma *Xylella fastidiosa* e a sequência de aminoácidos traduzida a partir dela. Acima, a localização dos dois códons de iniciação (ATG), indicados em azul.

O indício inicial de que os genes *bcp* e *ahpC* são expressos em *X. fastidiosa* e resultam em proteínas foi a identificação destas duas proteínas por análise proteômica (Smolka e col., 2003). As proteínas Bcp e AhpC foram identificadas no extrato celular protéico de *X. fastidiosa*, enquanto apenas AhpC foi identificada também como uma proteína extracelular. AhpC é uma das quatro enzimas antioxidantes detectadas na fração extracelular, possivelmente contribuindo na proteção antioxidante contra EAO produzidas pela planta como resposta à infecção bacteriana.

Em bactérias onde AhpC possui mais de 55% de similaridade de sequência de aminoácidos com as AhpC de *E. coli* e *S. typhimurium*, existe também invariavelmente uma proteína homóloga à AhpF codificada imediatamente à 3' do gene estrutural *ahpC* (Poole, 2005). Em *X. fastidiosa*, a similaridade de sequência de aminoácidos da AhpC é de 69% e 70%, com as AhpC de *E. coli* e *S. typhimurium*,

respectivamente (figura 17). Através de análise tBLASTn entre as sequências de aminoácidos da AhpF de *E. coli* e *S. typhimurium* e os produtos de tradução em todos os quadros de leitura da sequência de nucleotídeos disponíveis no banco de dados do genoma de *X. fastidiosa*, encontramos uma sequência (ORF XF1531), imediatamente a 3' do gene estrutural *ahpC*. A similaridade de sequência de aminoácidos da AhpF de *X. fastidiosa* é de aproximadamente 60% com as AhpF de *E. coli* e *S. typhimurium* (figura 20). Estas observações indicam a existência de um provável *operon* AhpC/F em *X. fastidiosa* e a possível participação do produto do gene XF1531 (proteína AhpF) no sistema redutor de regeneração da AhpC, como ocorre em *S. typhimurium* e *E. coli* (Poole e Ellis, 1996; Jacobson e col., 1989).

A porção C-terminal da AhpF de *X. fastidiosa* (coordenadas 1489211-149011) também apresenta similaridade de sequência de aminoácidos com a TrxB de *E. coli* (identidade 32% e similaridade 51%). Semelhantemente à TrxB de *E. coli*, a porção C-terminal da AhpF de *X. fastidiosa* possui os mesmos motivos de elevada similaridades com os membros da família das tiorredoxinas redutases e contém o motivo CXXCD requerido na tiorredoxina redutase para reação de troca ditiól-dissulfeto com a tiorredoxina (figura 13 e 20; Russel e Model, 1988). Apesar de não apresentar similaridade de sequência de aminoácidos com a TrxA de *E. coli*, a porção N-terminal da AhpF de *X. fastidiosa* possui outro motivo CXXC, semelhante ao motivo redox ativo conservado nas tiorredoxinas. Na AhpF de *S. typhimurium*, o motivo CXXC está diretamente envolvido na redução da AhpC (Poole, 2005).

1	MLDTNMKTQLKAYLEKLTKPVELIATLDDSAKSAEI KELLAEI AELS- DKVTFKEDNSLP	AhpF Escherichia coli
1	MLDTNMKTQLRAYLEKLTKPVELIATLDDSAKSAEI KELLAEI AELS- DKVTFKEDNTLP	AhpF Salmonella typhimurium
1	MFDESLSKAYLKAYLDRVIRSIHI HASVDESFKSREMLDLLENI VLLSGKKVVLVHRDDD	AhpF Xylella fastidiosa
60	VRKPSFLI TNPGSNQGRPFA GSPLGHEFTSLVLALLWTGGHPSKEAQSLLEQI RHI DGDF	AhpF Escherichia coli
60	VRKPSFLI TNPGSQGRPFA GSPLGHEFTSLVLALLWTGGHPSKEAQSLLEQI RDI DGDF	AhpF Salmonella typhimurium
61	QRKPSFLGLGTPGESISIRFAGLPMGHEFASLVLLQLVGGHPKVAADDLIERVRNLDGHI	AhpF Xylella fastidiosa
120	EFETYYSLSCHNCPDVVQALNLSVLNPRI KHTAI DGGTFQNEI TDRNVMGVPVAVFVNGK	AhpF Escherichia coli
120	EFETYYSLSCHNCPDVVQALNLSVLNPRI KHTAI DGGTFQNEI TERNVMGVPVAVFVNGK	AhpF Salmonella typhimurium
121	RFETYFSSVSCQSCPDVVQALNMAAVLNPRI EHVMAI DGALFQDEVEARQI MSVPTVYLNGE	AhpF Xylella fastidiosa
180	EFQGGRMTLTEI VAKI DTGAEKRAAEELNKRDAYDVLI VGSGPAGAAAAY SARKGI RTG	AhpF Escherichia coli
180	EFQGGRMTLTEI VAKVDTGAEKRAAEELNKRDAYDVLI VGSGPAGAAAAY SARKGI RTG	AhpF Salmonella typhimurium
181	LFQGGRMTLEI VAKLDSGAARKTAESI QAKAAFDVLVVGAGPAGTAAAVYAARKGVRTG	AhpF Xylella fastidiosa
240	LMGERF GGQI LDTVDI ENYI SVPKTEGQKLALGKLVHDEYDVDVI DSQSASKLI PAAVE	AhpF Escherichia coli
240	LMGERF GGQV LDTVDI ENYI SVPKTEGQKLALGKLVHSDYDVDVI DSQSASKLVPAATE	AhpF Salmonella typhimurium
241	LVAERF GGQV LDTMTI ENFI SVPETDGPRMVAALQHLRQYEVDI MNLQRVETLVPAE-E	AhpF Xylella fastidiosa
300	GGHLHQI ETASGAVLKARSI I VATGAKWRNMNVP GEDQYRTKGVTYCPHCDGPLFKGKRVA	AhpF Escherichia coli
300	GGHLHQI ETASGAVLKARSI I IATGAKWRNMNVP GEDQYRTKGVTYCPHCDGPLFKGKRVA	AhpF Salmonella typhimurium
300	NGFI EVRLASGASLSSRTVI LSTGARWRQMNVP GEDEYRNKGVAYCPHCDGPLFKGKRVA	AhpF Xylella fastidiosa
360	VI GGGNSGVAAI DLAGI VEHVTLLEFAPEMKADQVLQDKLRSLKNVDI I LNAQTTEVKG	AhpF Escherichia coli
360	VI GGGNSGVAAI DLAGI VEHVTLLEFAPEMKADQVLQDKVRSRSLKNVDI I LNAQTTEVKG	AhpF Salmonella typhimurium
360	VI GGGNSGVAAI DLAGI ASYVTLLEFDTKLRADEVLRKLRSMNVETI MGAQTTEVKG	AhpF Xylella fastidiosa
420	DGSKVVGLEYRDRVSGDI HNI ELAGI FVQI GLLPNTNWLEGAVERNRMGEI I I DAKCETN	AhpF Escherichia coli
420	DGSKVVGLEYRDRVSGDI HSVALAGI FVQI GLLPNTNWLEGAVERNRMGEI I I DAKCETS	AhpF Salmonella typhimurium
420	DGKRVITGLVYVDRSTGGSTFLALEGVFVQI GLLPNTNWLKGRVELSPRGEI VVDECGHTS	AhpF Xylella fastidiosa
480	VKGVFAAGDCTTVPYKQI I I ATGEGAKASLSAFDYLI R-----TKTA	AhpF Escherichia coli
480	VKGVFAAGDCTTVPYKQI I I ATGEGAKASLSAFDYLI R-----TKTA	AhpF Salmonella typhimurium
480	LVGVFAAGDATTVPYKQI VI AMGEGSKALSASFADYLI RNVEI TGI AQAQAA	AhpF Xylella fastidiosa

Figura 20. Alinhamento de aminoácidos por BLASTp das proteínas AhpF de *E. coli* (GI: 89107474) e de *S. typhimurium* (GI: 16763986) com a proteína candidata AhpF de *X. fastidiosa*. Motivos CXXC estão destacados em vermelho. Motivos similares aos encontrados na TrxB de *E. coli* (GI: 89107738) estão destacados em azul. Os resíduos de conexão entre os domínios N- e C-terminal estão destacados em magenta. A sequência da AhpF de *X. fastidiosa* mostrada é aquela que se inicia na segunda metionina da sequência anotada no site do Projeto Genoma *Xylella fastidiosa*, conforme discutido a seguir.

Como ocorre com AhpC de *X. fastidiosa*, a sequência inicial de aminoácidos traduzida a partir da ORF XF1531 da AhpF, anotada no site do Projeto Genoma *Xylella fastidiosa*, não apresenta similaridade com as sequências de AhpF de outros organismos. Novamente, a similaridade se inicia somente a partir do que seria a segunda metionina (segundo códon ATG), localizado no que seria o aminoácido 41 (códon 41) da sequência anotada no site do Projeto Genoma *Xylella fastidiosa*. O mesmo fenômeno ocorre quando a sequência traduzida da ORF XF1531 é comparada com as sequências de outras cepas de *X. fastidiosa* anotadas no *GenBank*. Portanto, diferentemente do que está anotado no site do Projeto Genoma *Xylella fastidiosa*, a tradução do gene *ahpf* deve se iniciar no segundo códon ATG.

Em *M. tuberculosis*, o sistema redutor da AhpC envolve a proteína AhpD (Bryk e col., 2002), que não possui similar em *E. coli*. Adicionalmente, *M. tuberculosis* não possui uma proteína similar à AhpF de *E. coli*. Como encontramos, em *X. fastidiosa*, um gene que codifica para uma proteína similar à AhpF de *E. coli*, é pertinente supor que não haja um gene que codifique para uma proteína similar à AhpD de *M. tuberculosis*. Por tBLASTn, encontramos uma região no genoma de *X. fastidiosa* (coordenadas 360143-360208 do cromossomo circular principal) com 54% de similaridade com a sequência de aminoácidos da AhpD de *M. tuberculosis*. Mesmo sendo em apenas poucos aminoácidos (22 aminoácidos), a região de similaridade apresenta o motivo CXXC característico de AhpD, o que sugeria um papel redox para esta possível proteína. Como existe baixa similaridade entre as proteínas da família tiorredoxina (Bryk e col., 2002), acreditávamos na possibilidade de haver uma proteína similar à AhpD de *M. tuberculosis* em *X. fastidiosa*. Essa possibilidade, porém, foi descartada devido à inexistência de uma ORF que incluísse a sequência de aminoácidos que apresentou similaridade à AhpD de *M. tuberculosis* (figura 21). Essa última observação nos permitiu concluir que, provavelmente, não há uma proteína similar à AhpD em *X. fastidiosa*.

Figura 21. Sequência de nucleotídeos da região de coordenadas 359981-360247 do gene cromossômico, anotado no site do Projeto Genoma *Xylella fastidiosa* e a sequência de aminoácidos traduzida a partir dela. Em negrito, a sequência de aminoácidos com 45% de similaridade com uma região da AhpD de *M. tuberculosis*. Acima, a localização de códons de iniciação (ATG, em azul) e códon de parada (em vermelho).

Objetivos

Dado o envolvimento de espécies ativas de oxigênio na interação planta-patógeno, o objetivo deste trabalho é caracterizar funcional e estruturalmente as peroxirredoxinas AhpC e Bcp de *X. fastidiosa* e identificar os sistemas redutores biológicos envolvidos na regeneração de cada uma delas. Detalhadamente, os objetivos são:

1. clonar os genes *ahpc*, *bcp*, *ahpf*, *trxa*, *tsnc*, *trxr* e *ybbn* de *X. fastidiosa*, expressá-los em *E. coli*, e purificar cada uma das proteínas recombinantes produzidas;
2. caracterizar a atividade catalítica das peroxirredoxinas AhpC e Bcp, determinando quais são os hidroperóxidos substratos, o mecanismo de catálise e as cisteínas envolvidas na decomposição de hidroperóxidos;
3. determinar qual o sistema redutor biológico envolvido na regeneração das peroxirredoxinas e o mecanismo de catálise desta redução;
4. elucidar a estrutura tridimensional da Bcp de *X. fastidiosa* e correlacioná-la com o mecanismo de catálise da proteína;
5. elucidar a estrutura quaternária da AhpC de *X. fastidiosa* e correlacioná-la à atividade catalítica da proteína.

Através da caracterização dessas proteínas, esperamos contribuir para o entendimento dos mecanismos de patogenicidade da *X. fastidiosa* e, desta forma, criar novas perspectivas para o desenvolvimento de técnicas de controle de praga contra *X. fastidiosa*.

Materiais e Métodos

Materiais – Acrilamida, agarose, ampicilina, BHT (hidroxitolueno butilado), bis-acrilamida (N,N'-metileno-bis-acrilamida), BSA (albumina bovina sérica), canamicina, chelex 100, citrato sintase, diamida, dimedona, DTNB (ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)), DTT (1,4-ditiotreitol), Hepes (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico), L-arabinose, NADH (β -nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido), NADPH (β -nicotinamida adenina dinucleotídeo 2'-fosfato reduzido), NEM (N-etilmaleimida), HRP (peroxidase de raiz forte), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila), sulfato de amônio, sulfato de estreptomicina, sulfato ferroso, TBHP (*terc*-butilhidroperóxido), TCA (ácido tricloroacético), TCEP (cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina), tetraciclina, TFA (ácido trifluoroacético), Tris (tris(hidroximetil)aminometano), uréia e xilenol orange foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA). CHP (hidroperóxido de cumeno), peróxido de hidrogênio e β -mercaptoetanol foram obtidos da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). Brometo de etídeo, imidazol, e SDS (dodecil sulfato de sódio) foram obtidos da USB Corporation (Cleveland, Ohio, USA). Marcadores de massa molecular (*BenchMark Protein Ladder*, *Low DNA Mass Ladder*, *1 Kb Plus DNA Ladder* e λ DNA/Hind III Fragments) foram obtidos da Invitrogen Corporation (Carlsbad, Califórnia, USA). T4 DNA ligase e as enzimas de restrição BamHI, EcoRI, HindIII, NcoI e NdeI foram obtidas da New England BioLabs, Inc. (Ipswich, Massachusetts, USA). Taq DNA polimerase e dNTPs foram obtidos da Fermentas Inc. (Glen Burnie, Maryland, USA). AMS (4-acetamido-4'-maleimidil-estilbeno-2,2'-dissulfonato) foi obtido da Molecular Probes (Invitrogen Corporation). Tripsina gold foi obtido da Promega Corporation (Madison, Wisconsin, USA). Coomassie brilliant blue G-250 foi obtido da Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, Califórnia, USA). Peptona e extrato de levedura foram obtidos da Oxoid Ltd. (Basingstoke, Hampshire, Inglaterra). Acetonitrila grau HPLC foi obtido da J. T. Baker (Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, New Jersey, USA). Ácido cítrico e citrato de sódio foram obtidos da ICN Biomedicals, Inc. (Aurora, Ohio, USA). Todos os demais reagentes empregados eram grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em água tratada no sistema Milli-Q (Millipore Corporate, Billerica, Massachusetts, USA).

Linhagens bacterianas de clonagem e expressão:

- **DH5 α** – *E. coli* [endA1, hsdR17 ($r_k^- m_k^+$), supE44, thi-1, recA1, gyrA (Na^1), relA1, Δ (lacZYA-argF)_{U169} (m80lacZ Δ M15)]: linhagem de clonagem (Novagen EMD Biosciences, Inc., Merck KgaA).
- **XL1-Blue** – *E. coli* recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lac^fZ Δ M15 Tn10 (Tet^R)]: linhagem de clonagem (Stratagene, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Califórnia, USA).
- **TOP10 One Shot Electrocomp** – *E. coli* F^- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG: linhagem de clonagem e expressão (Invitrogen Corporation).
- **BL21(DE3)** – *E. coli* [F^- ompT hsdS_B ($r_B^- m_B^-$) gal dcm (DE3)]: linhagem de expressão (Novagen EMD Biosciences, Inc.).
- **Origami(DE3)** – *E. coli* Δ (ara-leu)7697 Δ lacX74 Δ phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F' [lac⁺ lac^f pro] (DE3) gor522::Tn10 trxB (Kan^R, Str^R, Tet^R): linhagem de expressão (Novagen EMD Biosciences, Inc.).

- **AD494(DE3)** – *E. coli* $\Delta(\text{ara leu})7967 \Delta\text{lacX74} \Delta\text{phoA}$ PvuII *phoR* ΔmalF3 F'[*lac*⁺ *lacI*^q *pro*] *trxB::kan* (DE3) (Kan^R): linhagem de expressão (Novagen EMD Biosciences, Inc.).

Vetores de clonagem e expressão:

- **pET15b** (Novagen EMD Biosciences, Inc.): vetores de expressão com o promotor viral T7lac que é desreprimido por IPTG. Codifica uma cauda de poli-histidina N-terminal.
- **pBAD/Thio-TOPO** (Invitrogen Corporation): vetor de expressão dirigido pelo promotor *araBAD* (P_{BAD}) que é estimulado por L-arabinose. Codifica cauda de poli-histidina C-terminal e, opcionalmente, cauda tiorredoxina N-terminal.

Oligonucleotídeos:

Para amplificação e clonagem dos genes indicados:

Gene	Sentido	Sequência (5'→3')	Restrição
<i>bcp</i>	<i>forward</i>	GGAATTCCATATGAACATCGGCGACACC	NdeI
<i>bcp</i>	<i>reverse</i>	CGCGGATCCTTATTGCTCGGCATG	BamHI
<i>ahpc</i>	<i>forward</i>	GGAATTCCATATGTCTGTTCTCAACACTGAAATACTTTC	NdeI
<i>ahpc</i>	<i>reverse</i>	CGCGGATCCTCAGATTTTACCGACC	BamHI
<i>ahpf</i>	<i>forward</i>	ACCATGGGCTTTGATGAAAGTTTGAAGG	NcoI
<i>ahpf</i>	<i>reverse</i>	CGCTGCCTGTGCCTGAG	---
<i>tsnc</i>	<i>forward</i>	CCGGAATTCATGAGCGACTATGTTCTAC	EcoRI
<i>tsnc</i>	<i>reverse</i>	CCCAAGCTTTGAGTCGGTGTTC	HindIII
<i>trxa</i>	<i>forward</i>	GGAATTCCATATGCAGATCATTACCGCTACG	NdeI
<i>trxa</i>	<i>reverse</i>	CGGGATCCTTAAAGATACGTCTGTACAGC	BamHI
<i>trxr</i>	<i>forward</i>	CGCCATATGAGCGATTATCCTGC	NdeI
<i>trxr</i>	<i>reverse</i>	CGCGGATCCTCAGTTAC	BamHI
<i>ybbn</i>	<i>forward</i>	CGCCATATGCATGGTTTTACTC	NdeI
<i>ybbn</i>	<i>reverse</i>	CGCGGATCCTCAAAACAAC	BamHI
<i>ahpf</i> [1-203]	<i>forward</i>	GGAATTCCATATGTTTGATGAAAGTTTGAAGGCTCAGC	NdeI
<i>ahpf</i> [1-203]	<i>reverse</i>	CGGGATCCTCAGCGCTTGCC	BamHI
<i>ahpf</i> [209-531]	<i>forward</i>	ACCATGGGCCAGGCTAAGG	NcoI

Para amplificação e sequenciamento dos genes inseridos nos vetores indicados:

Vetor	Sentido	Sequência (5'→3')	Sigla
pET15b	<i>forward</i>	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGG	T7fw
pET15b	<i>reverse</i>	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	T7rv
pBAD/Thio-TOPO	<i>forward</i>	CGCAACTCTCTACTGTTTC	BAD/Thio-TOPOfw
pBAD/Thio-TOPO	<i>reverse</i>	TGATTTAATCTGTATCAGGCTG	BAD/Thio-TOPOfw

Para mutação de simples troca de aminoácido nos genes indicados (os exatos reversos complementares também foram utilizados; as mutações introduzidas são mostradas em negrito e sublinhadas):

Gene	Sequência (5'→3')	Mutação
<i>bcp</i>	GGCAGCACCC <u>AGC</u> AAAACACTGAG	C23S
<i>bcp</i>	CACGCCAGGC <u>TCT</u> AGCACAGAAG	C47S
<i>bcp</i>	CGACAGCTTCT <u>TCT</u> GCCAAACAGGG	C83S
<i>bcp</i>	GTGACGCAATACTG <u>TCT</u> AAAGCATTGACG	C101S
<i>ahpc</i>	GATTTTACTTTTCGTC <u>AGC</u> CCGACTGAAC	C47S
<i>ahpc</i>	GGGTGAGGTT <u>TCT</u> CCAGCTAAGTGG	C165S
<i>ahpf[1-203]</i>	GAGACCTATTTTTCAGTTT <u>GGT</u> GTCAGAGTTGCCCGGATG	S129W

Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose 1% – conduzida no sistema *Mini-Sub* (Bio-Rad Laboratories, Inc.), foi o método empregado para analisar amostras de DNA, durante as clonagens. As amostras foram visualizadas e quantificadas utilizando brometo de etídeo.

Análise de proteína por SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliácridamida 15%, bis-acrilamida 0,4% e SDS 0,1%, conduzida no sistema *Mini-PROTEAN II* (Bio-Rad Laboratories Inc.), foi empregado para visualizar o perfil protéico de extratos protéicos e o grau de pureza de proteínas recombinantes após purificação. Utilizou-se como corante coomassie brilliant blue G-250 0,1%.

Quantificação de proteínas pelo ensaio de Bradford – este método colorimétrico foi empregado para quantificar o conteúdo protéico de extratos e soluções através da absorbância a 595 nm, utilizando BSA como padrão externo e o reagente *Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Este reagente também foi utilizado para verificar a presença de proteínas em frações eluídas durante a purificação das proteínas recombinantes. **Todos os ensaios espectrofotométricos foram realizados num espectrofotômetro UV/Vis Hitachi U-2001 (Hitachi, Ltd., Tóquio, Japão).**

Construção das linhagens superexpressantes com o vetor pET15b – amplificamos o gene de interesse, a partir de cosmídeos contendo genes de *X. fastidiosa* disponibilizados pelo Projeto Genoma *Xylella fastidiosa*, por reação de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos que continham sítios para as enzimas de restrição necessárias. Para a execução de todas as reações de PCR descritas utilizamos o termociclador *Perkin-Elmer 9700* (Applied Biosystems) e a enzima Taq DNA polimerase. A amplificação dos genes de interesse foi confirmada por eletroforese em gel de agarose.

O produto de PCR referente ao gene de interesse e o vetor de expressão pET15b foram simultaneamente digeridos com as enzimas de restrição adequadas. Ao final da digestão, os produtos, gene e vetor de expressão, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e os fragmentos correspondentes foram extraídos do gel utilizando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up system* (Promega Corporation), segundo o protocolo do fabricante. Após extração, o gene e o vetor de expressão foram ligados utilizando a enzima T4 DNA ligase e o produto da ligação foi inserido na bactéria *E. coli* DH5 α por transformação por eletroporação. Após crescimento em meio sólido seletivo LB/Amp (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, cloreto de sódio 1% e ágar 2%, com ampicilina

50 µg/ml), algumas colônias transformantes foram selecionadas para confirmação do inserto por reação de PCR a partir da colônia, seguido de eletroforese em gel de agarose. Aquelas transformadas foram crescidas em meio líquido LB/Amp e o vetor ligado com o gene foi isolado utilizando o *Perfectprep-Plasmid mini* (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha), segundo as orientações do fabricante. A presença do vetor com o gene foi confirmada por eletroforese em gel de agarose, assim como a confirmação do inserto por reação de PCR. Após confirmação, o vetor foi inserido em linhagens bacterianas de expressão, por transformação por eletroporação, para expressão do produto gênico. Todas as linhagens transformadas foram estocadas em glicerol 20% a -70°C.

Construção das linhagens superexpressantes com o vetor pBAD/Thio-TOPO – amplificamos o gene de interesse como citado acima. O produto de PCR referente ao gene foi ligado ao vetor pBAD/Thio-TOPO incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. O produto de ligação foi transformado em *E. coli* TOP10 *One Shot Electrocomp* por eletroporação. Após crescimento em meio sólido LB/Amp, algumas colônias foram selecionadas para confirmação do inserto por PCR. Aquelas positivas foram crescidas em meio líquido LB/Amp, o vetor foi isolado e, então, digerido com NcoI por 2 horas a 37°C, para clivar o gene que codifica para a cauda de tiorredoxina. O produto de digestão resultante foi religado utilizando a enzima T4 DNA ligase e transformado na bactéria *E. coli* TOP10 por eletroporação. Colônias positivas foram utilizadas para expressão do produto gênico. As linhagens transformadas foram estocadas em glicerol 20% a -70°C.

Transformação de bactérias eletrocompetentes por eletroporação – o vetor de interesse e a bactéria eletrocompetente foram colocados numa cubeta de eletroporação e sujeitos a um pulso de voltagem no eletroporador *Gene Pulser II Electroporation System* (Bio-Rad Laboratories), ajustado em 2,5 kV de voltagem e 25 µF de capacitância. Após o pulso de voltagem, as células foram ressuspensas em 1 ml de LB sem ampicilina e deixadas sob agitação a 37°C por 1 hora. Quando, então, foram plaqueadas em meio sólido seletivo LB/Amp e incubadas overnight a 37°C, para o crescimento das bactérias transformadas com o vetor.

O mesmo protocolo foi utilizado para transformação nas linhagens Origami(DE3) e AD494(DE3), com a diferença da adição dos antibióticos canamicina (15 µg/ml) e tetraciclina (12,5 µg/ml) para a linhagem Origami(DE3) e canamicina para a linhagem AD494(DE3).

Expressão em *E. coli* dos genes clonados no vetor pET15b – as linhagens bacterianas de expressão transformadas foram inoculadas em 50 ml de LB/Amp e crescidas *overnight* a 37°C. No dia seguinte, as células foram diluídas em 1 litro de meio LB/Amp para a OD_{600nm} 0,2. Quando atingiram a OD_{600nm} 0,6, o meio foi suplementado com IPTG (1 mM, concentração final) e deixado por mais 3 horas sob agitação para indução da expressão do gene clonado. Em alguns casos, a indução foi realizada *overnight* a 20°C com metade da concentração de IPTG (0,5 mM). Após indução, as células foram coletadas por centrifugação a 5000 RPM, lavadas com água fria e congeladas a -20°C. Para expressão na linhagem AD494(DE3), o meio foi suplementado com canamicina, enquanto na linhagem Origami(DE3), foi suplementado com canamicina e tetraciclina.

Expressão em *E. coli* dos genes clonados no vetor pBAD/Thio-TOPO – as linhagens de *E. coli* TOP10 transformadas foram inoculadas em 50 ml de LB/Amp e crescidas *overnight* a 37°C. No dia seguinte, as células foram diluídas em 1 litro de meio LB/Amp para a OD_{600nm} 0,02. Quando atingiram a OD_{600nm} 0,5, o meio foi suplementado com L-arabinose e deixado por mais 3 horas sob agitação para indução da expressão do gene clonado. Para o gene *ahpf*, a indução foi realizada *overnight* a 20°C com L-arabinose 0,2%. Após indução, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas com água fria e congeladas a -20°C.

Vetores de expressão e condição de indução da expressão dos genes utilizados:

Gene	Vetor de Expressão	Linhagem de Expressão	Condição de Indução da Expressão
<i>ahpc</i>	pET15b	BL21(DE3)	1 mM IPTG, 3h, 37°C
<i>ahpf</i>	pBAD/Thio-TOPO	TOP10	0,2% L-arabinose, <i>overnight</i> , 20°C
<i>bcp</i>	pET15b	BL21(DE3)	0,5 mM IPTG, <i>overnight</i> , 20°C
<i>trxr</i>	pET15b	BL21(DE3)	0,5 mM IPTG, <i>overnight</i> , 20°C
<i>tsnc</i>	pET15b	Origami(DE3) ou AD494(DE3)	0,5 mM IPTG, <i>overnight</i> , 20°C

Lise das células bacterianas – após serem induzidas, as células foram ressuspensas em tampão de lise celular (tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, NaCl 500 mM e imidazol 20 mM), num volume de 0,05 ml de tampão para cada 1 ml de meio LB/Amp utilizado no crescimento. As células foram submetidas a diversos ciclos de sonicação por um período de 30 segundos no aparelho *Branson Digital Sonifier 450* (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, Connecticut, USA), seguidos de 30 segundos de descanso em gelo. Após lise, adicionou-se, sob agitação em banho de gelo, sulfato de estreptomicina na concentração final de 1%. Após 20 minutos, as células foram centrifugadas (16000 RPM, 20 minutos, 4°C) e o extrato protéico solúvel foi utilizado na purificação da proteína de interesse. Para verificar a existência da proteína de interesse em corpos de inclusão, os precipitados foram analisados por SDS-PAGE. O precipitado foi ressuscitado em água (1 ml para cada 100 ml de meio de cultura utilizado no crescimento) e em 2 µl dessa suspensão adicionou-se 10 µl de tampão de solubilização (tampão Tris-HCl 60 mM pH 6,8, β-mercaptoetanol 1%, glicerol 10%, SDS 1% e azul de bromofenol 0,01%). Após 10 minutos a 95°C, as amostras foram analisadas por SDS-PAGE.

Purificação de proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade a metal – para verificar a expressão das proteínas de fusão com poli-histidina, elas foram purificadas utilizando-se coluna de afinidade a níquel *HisTrap HP* de 1 ml e bomba peristáltica *P1* (GE Healthcare, General Electric Co., Chalfont St. Giles, Reino Unido). As amostras foram purificadas utilizando: tampão de ligação (tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, NaCl 500 mM e imidazol 10 mM) e tampão de eluição (tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, NaCl 500 mM e imidazol 500 mM). Antes de se iniciar a purificação, a coluna foi preparada lavando-se com 5 VC (volumes de coluna) de água, seguido da aplicação de 0,5 ml de solução de níquel 0,1 M e retirada do excesso de níquel por lavagem com mais 5 VC de água. Na purificação, realizada sob fluxo constante de 1 ml/min, a coluna foi equilibrada com 10 VC de tampão de ligação e o extrato aplicado, seguido de lavagem com 10 VC de tampão de ligação. A eluição foi realizada com 10 VC de tampão de eluição, coletando-se o eluente em frações de 1 ml.

As frações eluídas foram analisadas por SDS-PAGE, para verificar a qualidade da purificação.

Nos procedimentos de purificação em maiores quantidades e para definir o melhor gradiente de purificação, utilizou-se o sistema de purificação *ÄKTA FPLC* com *Frac-900* e coluna *HisTrap FF crude* de 5 ml (GE Healthcare), com gradiente de eluição de imidazol de 20 a 500 mM. As amostras foram purificadas utilizando os tampões: de ligação (tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, NaCl 500 mM e imidazol 20 mM) e de eluição (tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, NaCl 500 mM e imidazol 500 mM, com gradiente de eluição de imidazol de até 500 mM). Depois de definido o melhor gradiente de purificação, utilizou-se bomba peristáltica *P1*. Para os ensaios enzimáticos, as frações puras foram agrupadas e o tampão foi trocado para tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4 e NaCl 50 mM, utilizando coluna *PD-10 Desalting* ou *HiTrap Desalting* (GE Healthcare). Após, a proteína foi concentrada através de ultrafiltração por centrifugação em unidade filtrante *Amicon Ultra* (Millipore Corporate) e sua concentração determinada por espectrofotometria a 280 nm.

Gradiente de purificação das proteínas recombinantes (após aplicação do extrato protéico bruto):

- Bcp WT (selvagem, wild type) e proteínas mutantes: 5 VC de tampão de ligação com imidazol 20 mM, 4 VC de tampão de ligação com imidazol 50 mM, 4 VC de tampão de ligação com imidazol 100 mM e eluição com 4 VC de tampão de eluição com imidazol 400 mM.
- AhpC e AhpF: 5 VC de tampão de ligação com imidazol 20 mM, 4 VC de tampão de ligação com imidazol 50 mM, 4 VC de tampão de ligação com imidazol 100 mM e eluição com 4 VC de tampão de eluição com imidazol 500 mM.
- TsnC e TrxR: 5 VC de tampão de ligação com imidazol 20 mM, 4 VC de tampão de ligação com imidazol 50 mM, 4 VC de tampão de ligação com imidazol 150 mM e eluição com 4 VC de tampão de eluição com imidazol 500 mM.

Purificação da proteína AhpF por cromatografia de troca aniônica – utilizou-se o sistema de purificação *ÄKTA FPLC* com *Frac-900* e coluna *Mono Q HR 10/10* (GE Healthcare). Em fluxo de 5 ml/min, AhpF foi purificada com gradiente linear de eluição de NaCl 0,1 M a 1 M em 100 ml (em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4). Para os ensaios enzimáticos, as frações puras foram agrupadas e o tampão trocado para o mais conveniente, utilizando coluna *PD-10 Desalting* ou *HiTrap Desalting* (GE Healthcare). Após, a proteína foi concentrada através de ultrafiltração por centrifugação em unidade filtrante *Amicon Ultra* (Millipore Corporate).

Mutagênese sítio-dirigida – os genes das proteínas mutantes foram geradas utilizando como molde, os vetores de expressão com os respectivos genes selvagens clonados. As mutações foram realizadas utilizando o protocolo padrão do *kit QuikChange Site-directed Mutagenesis* (Stratagene) e os oligonucleotídeos citados acima. Em 50 µL de reação foram adicionados: vetor molde 30 ng, cada oligonucleotídeo 12,5 pmol, dNTPs 200 µM e *Pfu* Turbo polimerase 2,5 U. Após amplificação e digestão do DNA molde com DpnI 10 U, os produtos de mutagênese foram transformados em células XL1-Blue por eletroporação. Após crescimento em meio sólido seletivo LB/Amp, algumas colônias foram selecionadas para confirmação do inserto por reação de PCR. Aquelas positivas foram crescidas em meio líquido LB/Amp e o vetor com o gene foi isolado como indicado anteriormente. A região

codificante do vetor isolado foi sequenciada para verificação da geração das mutações e os vetores com as respectivas mutações confirmadas foram transformados em linhagens de *E. coli* de expressão.

Parâmetros das proteínas recombinantes predito *in silico* – a massa molecular e o coeficiente de extinção molar a 280 nm foram estimados por meio da ferramenta *ProtParam* (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>). Para os cálculos de concentração das proteínas recombinantes com cauda de poli-histidina, os seguintes parâmetros foram adotados:

Proteína	Massa Molecular (Da)	$\epsilon_{280nm} (M^{-1}.cm^{-1})$
AhpC	22769,8	27055
AhpF	60371,9	29130
AhpF[1-203]	24654,1	6085
AhpF[209-531]	37458,7	23045
TsnC	14715,9	15595
TrxR	36679,2	31650

Para a Bcp, diferentes coeficientes de extinção molar a 280 nm foram utilizados, dependente do estado redox da proteína:

Proteína	Massa Molecular (Da)	$\epsilon_{280nm} (M^{-1}.cm^{-1})$	
		Oxidada	Reduzida
Bcp WT	19976,7	17085	16960
Bcp C23S	19960,6	16960	16960
Bcp C47S		17085	16960
Bcp C83S		17085	16960
Bcp C101S		16960	16960

Quantificação de cisteínas livres pelo ensaio do DTNB – o produto resultante da reação de tiól (R-SH) ou tiolato (R-S⁻) com DTNB gera o composto tionitrobenzonato (TNB), que pode ser quantificado por espectrofotometria a 412 nm. Neste ensaio, 170 µg de proteína foi precipitado com um volume de TCA 20% por 30 minutos no gelo, após, a amostra foi centrifugada na velocidade máxima por 20 minutos e lavada duas vezes com TCA 2%. O pellet resultante foi ressuspenso em 400 µL de tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,0, EDTA 1 mM e uréia 8 M. Destes, 370 µL foram transferidos para placa de *ELISA* e a absorbância medida a 280 nm num leitor de placas *Zenyth 200st* (Anthos Labtec Instruments GmbH, Wals, Áustria). Após determinação da concentração de proteína, DTNB foi adicionado para concentração final de 100 µM e a placa foi incubada no escuro por uma hora à temperatura ambiente. A absorbância do TNB foi lida a 412 nm e o coeficiente de extinção molar de 13600 M⁻¹.cm⁻¹ foi utilizado para determinar a concentração de TNB em condição desnaturante.

A quantificação também foi realizada em soluções, sem necessidade de precipitação com TCA, pela adição direta de DTNB em condições nativa ou desnaturante. Neste caso, 170 µg de proteína foi adicionada a um volume final de 370 µL de tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, com ou sem

uréia 8 M, e o procedimento foi realizado conforme descrito acima. Agentes oxidantes e redutores, quando utilizados, foram removidos por ultrafiltração ou cromatografia de exclusão molecular. Para amostras nativas (sem adição de uréia), o coeficiente de extinção molar do TNB é $14150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Modificação química de proteínas por AMS – o reagente AMS alquila especificamente tiól (R–SH) ou tiolato (R–S⁻), resultando em aumento de aproximadamente 500 Da na massa molecular da proteína por cisteína modificada. O pellet resultante da precipitação com TCA (descrito acima) foi ressuspensionado em 20 µl de uma solução contendo SDS 1% e AMS 15 mM em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5. A solução foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente e analisada por SDS-PAGE.

Determinação da atividade dissulfeto redutase pelo ensaio do DTNB – este ensaio mede a redução do composto DTNB a TNB pelo sistema tioredoxina/tioredoxina redutase/NADPH ou AhpF/NAD(P)H, conforme Riddles e col. (1979). Em 1 ml de reação, foram incubados NADPH 200 µM, DTNB 500 µM, EDTA 1 mM, TrxR 0,1 µM e quantidades variáveis de TsnC, em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,5. A redução de DTNB a TNB ($\epsilon_{412\text{nm}} = 14150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) foi iniciada pela adição de DTNB e acompanhada a 37°C. Este ensaio também foi realizado no leitor de placas *Zenyth 200st* (Anthos Labtec Instruments GmbH) em um volume de reação de 370 µl.

Para a determinação da atividade dissulfeto redutase da AhpF foi utilizado NAD(P)H 300 µM, DTNB 500 µM, DTPA 0,5 mM e AhpF 0,1 µM, em 1 ml de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4. A reação foi iniciada pela adição do NAD(P)H e a produção de TNB foi acompanhada a 412 nm.

Ensaio de proteção à GS (glutamina sintetase) – a atividade peroxidásica da Bcp foi monitorada indiretamente pela atividade residual da GS que não foi inativada pelo sistema $\text{Fe}^{+3}/\text{O}_2/\text{DTT}$ gerador de peróxido de hidrogênio, conforme Kim e col. (1988). Em 50 µl, GS 2 µg/µl de *E. coli* foi incubada com Bcp 10 µM, FeCl_3 3 µM e DTT 10 mM, em tampão Hepes-NaOH 25 mM pH 7,4. Após 15 minutos a 37°C, foi adicionado 2 ml de uma solução contendo ADP 0,4 mM, glutamina 150 mM, arsenato de potássio 10 mM, hidroxilamina 20 mM e MnCl_2 0,4 mM em tampão Hepes-NaOH 100 mM pH 7,4. Após 30 minutos a 37°C, a reação foi terminada pela adição de 0,2 ml de uma solução de FeCl_3 200 mM, TCA 120 mM e ácido clorídrico 200 mM. A atividade remanescente da glutamina sintetase foi, então, medida pela absorbância resultante do complexo γ -glutamilhidroxamato- Fe^{3+} a 540 nm.

Determinação da concentração de hidroperóxidos – a concentração da solução estoque de peróxido de hidrogênio foi medida pela absorbância a 240 nm ($\epsilon_{240\text{nm}} = 43,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). A concentração das soluções estoques de TBHP e CHP foram determinadas espectrofotometricamente a 340 nm seguindo a oxidação de NADPH a 37°C, numa reação contendo volume conhecido de hidroperóxido, glutathione 500 µM, glutathione redutase 6 µg/µl, glutathione peroxidase 15 ηg/µl e NADPH 200 µM, em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e DTPA 0,1 mM. E a concentração de peroxinitrito foi medida a 302 nm ($\epsilon_{302\text{nm}} = 1670 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Determinação da atividade peroxidásica pelo ensaio do DTT oxidado – a atividade peroxidásica foi medida pela velocidade de oxidação do DTT a 37°C, conforme Chauhan e Mande (2002). Em 1 ml de reação, foram incubados DTT 10 mM, hidroperóxido 2 mM e a Bcp 20 µM, em tampão fosfato de sódio

100 mM pH 7,5 contendo EDTA 1 mM. A velocidade de oxidação do DTT foi monitorada a 310 nm, após adição do DTT ($\epsilon_{310\text{nm}} = 110 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ do DTT oxidado).

Determinação da atividade peroxidásica pelo ensaio FOX (*ferrous oxidation in xylenol orange*) –

a determinação do consumo de hidroperóxidos foi realizada conforme Jiang e col. (1992). Em tampão Hepes-NaOH 50 mM pH 7,4, azida 1 mM, DTPA 0,1 mM, DTT 0,5-2,0 mM, quantidades variáveis do hidroperóxido e quantidades variáveis de peroxirredoxinas foram testadas, num volume de reação de 100 μl . As reações foram incubadas a 37°C e, em diferentes tempos, foram terminadas pela adição de 900 μl do reagente FOX2 gelado (sulfato ferroso 25 mM, xilenol orange 100 μM , BHT 4 mM e ácido sulfúrico 250 mM, pH $\sim 1,6$). Após 30 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 560 nm. A concentração remanescente de hidroperóxido foi determinada em comparação a absorbância a 560 nm de uma amostra padrão de hidroperóxido. O ensaio foi realizado na presença e ausência da peroxirredoxina, logo, a diferença no consumo de hidroperóxido das duas condições refletiu apenas a atividade enzimática.

Determinação da atividade peroxidásica da proteína Bcp pelo ensaio de consumo de NADPH –

o consumo de NADPH ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) pelo sistema tioredoxina foi monitorado a 340 nm pelo decaimento da absorbância devido à oxidação a NADP^+ , conforme Chae e col. (1994c). A reação foi realizada a 37°C em 1 ml contendo NADPH 300 μM , concentrações variáveis de hidroperóxido, quantidades conhecidas de Bcp, TsnC e TrxR de *X. fastidiosa* (ou Trx e TrxR de *E. coli*), em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0. A reação foi iniciada pela adição do hidroperóxido e a atividade peroxidásica foi monitorada a 340 nm. Como controle, amostras sem a adição de Bcp também foram monitoradas.

Análise de bisubstrato da proteína Bcp pelo ensaio de consumo de NADPH –

o consumo de NADPH foi realizado como mostrado acima. A reação foi realizada a 37°C contendo NADPH 200 μM , concentrações variáveis de peróxido de hidrogênio e de TsnC, e concentração fixa de Bcp (0,2 μM) e de TrxR (0,2 μM ou 5,0 μM), em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4. A reação foi iniciada pela adição do hidroperóxido e a atividade peroxidásica foi monitorada a 340 nm, num leitor de placas *Zenyth 200st* (Anthos Labtec Instruments) ou *Infinite M200* (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suíça). Como controle, amostras sem Bcp também foram monitoradas.

Cinética competitiva com HRP (peroxidase de raiz forte) –

este ensaio possibilita a determinação da constante de segunda ordem aparente pela competição das proteínas AhpC ou Bcp com a HRP por peróxido de hidrogênio ou peroxinitrito, conforme Ogusucu e col. (2007). Numa solução de HRP 8 μM ($\epsilon_{403\text{nm}} = 102000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $k_{\text{HRP}} = 1,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para peróxido de hidrogênio; e $k_{\text{HRP}} = 1,02 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para peroxinitrito) e diferentes concentrações da proteína de interesse pré-reduzida, foi adicionado peróxido de hidrogênio (4 μM) ou peroxinitrito (8 μM), em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4 e DTPA 0,1 mM. Depois de 2 minutos de incubação, a oxidação da HRP para o composto I foi monitorada a 403 nm, num leitor de placas *Zenyth 200st* (Anthos Labtec Instruments). Para a determinação de pK_a , a constante de segunda ordem da proteína foi determinada em diferentes pHs.

Análise fluorimétrica da proteína Bcp – a proteína (2 μM) foi analisada em tampão citrato de sódio 5 mM pH 5,0, num espectrofluorímetro *Hitachi F-4010 fluorescence spectrophotometer* (Hitachi, Ltd.). A amostra foi excitada a 280 nm e o espectro de emissão foi registrado de 300 a 500 nm. Também acompanhamos a fluorescência ao longo do tempo, utilizando $\lambda_{\text{excitação}}$ 280 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 330 nm.

Cinética direta por fluorimetria em *stopped-flow* – este ensaio possibilita a determinação de cinéticas rápidas, na tentativa de obter a constante de segunda ordem aparente da Bcp pela mudança de fluorescência de resíduos de triptofano quando oxidada pelo hidróperóxido. A proteína foi pré-reduzida com TCEP 10 mM por 30 minutos a temperatura ambiente e o redutor foi removido utilizando coluna *HiTrap Desalting* (GE Healthcare). Bcp pré-reduzida 5-10 μM (em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4 e DTPA 0,1 mM) em uma seringa foi misturada com peróxido de hidrogênio em excesso molar maior ou igual a 10 vezes em uma segunda seringa num espectrofotômetro *stopped-flow SX-18MV* (Applied Photophysics Ltd, Surrey, Reino Unido). A mudança de fluorescência foi observada a $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$, excitando a 280 nm e registrando o total de emissão acima de 320 nm (utilizando filtro de emissão e a fotomultiplicadora para fluorescência acoplada diretamente no módulo da cubeta).

Determinação da atividade oxidase da proteína AhpF pelo ensaio de consumo de NAD(P)H – o consumo de NAD(P)H pela AhpF foi monitorado a 340 nm pelo decaimento da absorbância devido à oxidação a NAD(P)^+ , conforme Poole e Ellis (1996). A reação foi realizada a 37°C em 1 ml contendo NAD(P)H (300 μM), AhpF 1 μM , sulfato de amônio 100 mM e DTPA 0,5 mM, em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0. A reação foi iniciada pela adição do NAD(P)H.

Determinação da atividade oxidase e dissulfeto redutase da AhpF e peroxidase da AhpC pelo uso de eletrodos específicos – o consumo de oxigênio molecular e a produção de peróxido de hidrogênio foram monitorados amperometricamente utilizando os eletrodos *ISO-OXY-2* (voltagem de polarização 700 mV) e *ISO-HPO-2* (voltagem de polarização 450 mV), respectivamente, acoplados a um registrador analógico *TBR4100 Four-channel Free Radical Analyzer* (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, Flórida, USA). O sinal analógico foi transferido para um computador utilizando o *hardware Lab-Trax digital recorder* e analisado pelo programa *DataTrax* (World Precision Instruments). O ensaio foi realizado a temperatura ambiente em 1 ml de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4 e DTPA 0,1 mM, contendo AhpF 1,5 μM e NAD(P)H 600 μM . A reação foi iniciada pela adição de NAD(P)H. Quando indicado, AhpC 7,5 μM , catalase 15 μg ou NEM 150 μM foram adicionados à reação.

Cromatografia de exclusão molecular (SEC) – o estado de oligomerização de proteínas foi determinado por HPLC analítico num sistema *Shimadzu* série *vp* equipado com injetor *Rheodyne* e os detectores de fluorescência (*Shimadzu mod. RF-10Ax1*) e *Photodiode Array* (*Shimadzu mod. SPD-M10Avp*; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). As amostras foram separadas por cromatografia de exclusão molecular utilizando coluna *Phenomenex BioSep-SEC-S4000* (7,8 $\times$ 300 mm, 5 μm , faixa de separação 15 a 2000 kDa, Phenomenex, Inc., Torrance, Califórnia, USA) ou *TOSOHAAS TSK-GEL G3000SWxl* (7,8 $\times$ 300 mm, 5 μm , faixa de separação 10 a 500 kDa; Tosoh Bioscience LLC, Tóquio, Japão), equilibrada num fluxo isocrático de 0,5 ml/min, em tampão Hepes-NaOH 50mM pH 7,0 e NaCl 100 mM. A eluição dos componentes foi monitorada por UV e por fluorescência usando 280 nm e

330 nm como excitação e emissão, respectivamente. Os cromatogramas foram analisados com o auxílio do programa *Class-vp* (Shimadzu Co.). Utilizou-se como padrões de massa molecular, as proteínas: ovalbumina (43 kDa), conalbumina (75 kDa), aldolase (158 kDa), ferritina (440 kDa), tireoglobulina (669 kDa) e blue dextran 2000 (do *Gel Filtration Calibration Kit High Molecular Weight*, GE Healthcare); e α -lactalbumina (14,2 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ovalbumina (45 kDa) e albumina bovina sérica (66 e 132 kDa; da Sigma-Aldrich Co.).

Remoção da cauda de poli-histidina da proteína AhpC com trombina – foi utilizado o kit *Thrombin CleanCleave* (Sigma-Aldrich Co.). A proteína foi diluída em tampão de clivagem (CaCl_2 10 mM, Tris-HCl 50mM pH 8,0) e incubada com a resina (1 mg de proteína para 50 μl de resina) em tampão de clivagem sob agitação, *overnight* e a temperatura ambiente. Após, a reação foi centrifugada (500 RPM) e o sobrenadante recuperado. Para remover a cauda de poli-histidina clivada e o restante de proteína que ainda possuía cauda, a reação foi passada na coluna *HisTrap FF crude* de 5 ml (GE Healthcare), equilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM pH7,4, NaCl 50 mM e imidazol 20 mM.

Determinação da atividade chaperona – a atividade chaperona foi medida pelo uso da proteína citrato sintase. O método está baseado na supressão de agregação térmica devido à possível atividade chaperona molecular de peroxirredoxinas, monitorado pela turbidez do meio de reação a 360 nm. Citrato sintase 1 μM foi incubada com AhpC 3 μM a 43°C, em Hepes-NaOH 50 mM pH 7,0. Como controle negativo utilizamos BSA 3 μM . A agregação foi monitorada a 360 nm por 20 minutos no espectrofotômetro.

Análise da proteína Bcp por espectrometria de massas – Bcp foi pré-reduzida com TCEP 5 mM por 30 minutos a temperatura ambiente e o TCEP foi removido utilizando coluna *HiTrap Desalting* (GE Healthcare). Bcp pré-reduzida foi, então, tratada com peróxido de hidrogênio (na proporção molar de 1 Bcp : 1,1 H_2O_2) por 30 minutos a temperatura ambiente e o hidroperóxido foi removido utilizando coluna *HiTrap Desalting* e tampão citrato de sódio 5 mM pH 5,0. Posteriormente, as sulfidrilas livres remanescentes foram alquiladas com NEM (excesso molar de 100 $\times$) por 1 hora a temperatura ambiente. Após tratamento com NEM, a amostra foi desnaturada com guanidina 6 M e quantidade suficiente de tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 foi adicionado para diminuir a concentração de guanidina para menos de 1 M. A proteína foi, então, digerida *overnight* a 37°C com tripsina *gold* (grau espectrômetro de massas, Promega Corp.), na razão de 1 protease: 20 Bcp (m:m).

Os peptídeos obtidos por digestão triptica foram submetidos a HPLC de fase reversa (sistema *Shimadzu* série *vp*), utilizando coluna C18 (*ACE 5 C-18 HL*, 150 $\times$ 3,00 mm, 5 μm ; Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Escócia), fluxo de 0,4 ml/min e fases móveis A (TFA 0,1%) e B (TFA 0,1% e acetonitrila 90%). Os peptídeos foram separados mantendo 25% da fase B por 5 minutos, seguido de gradiente linear até 65% da fase B por 25 minutos. A eluição dos peptídeos foi monitorada por UV a 214 e 280 nm e por fluorescência usando 280 nm e 330 nm como excitação e emissão, respectivamente.

Os peptídeos coletados foram analisados por injeção direta em um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (*Micromass Quattro II*, Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA), no modo de ionização *electrospray* positivo (MS/ESI+). As condições de ionização utilizadas foram: voltagem do

capilar de 2 kV, voltagem do cone de amostragem de 35 V, voltagem do cone extrator de 5 V, voltagem das lentes RF de 0,5 V, temperatura da fonte e de dessolvatação 100 e 250°C, respectivamente. O fluxo de gás de secagem e nebulização foi 300 l/h e 15 l/h, respectivamente. Os dados foram analisados utilizando o software *MassLynx* v.3.2 (Waters Corp.).

O produto de digestão triptica também foi analisado por espectrometria de massas acoplada ao *HPLC Shimadzu* (HPLC/MS/ESI+; Shimadzu Co.), utilizando o procedimento cromatográfico e os ajustes do espectrômetro conforme descrito acima. Para passagem do HPLC ao espectrômetro foi acoplado divisor de fluxo com passagem para 150 µl/min de amostra.

Numa abordagem alternativa, realizada na *Proteomics Platform* do Eastern Quebec Genomics Center (Quebec, Canadá), a proteína alquilada com NEM foi reduzida com DTT 10 mM e alquilada com iodoacetamida 55 mM, antes de ser digerida com tripsina. O produto dessa digestão triptica foi analisado por espectrometria de massas com ionização *electrospray* (ESI/MS/MS) acoplada a um *nanoLC* de fase reversa. Os experimentos foram realizados com uma bomba Thermo Surveyor MS conectada a um *LTD linear ion trap mass spectrometer* equipado com *nanoelectrospray ion source* (Thermo Electron Co., Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Os peptídeos foram separados numa coluna *BioBasic PicoFrit C18* (New Objective, Inc., Woburn, Massachusetts, USA), utilizando um gradiente linear de 2 a 50% de solvente B (acetonitrila, 0,1% ácido fórmico) em 30 minutos, num fluxo de 200 nL/min (obtido por divisor de fluxo). Os espectros de massa foram adquiridos utilizando o programa *Xcalibur* v.2.0 (Thermo Electron Co.). Cada escaneamento do espectro de massa (400 a 2000 m/z) foi seguido de dissociação induzida por colisão dos sete íons mais intensos. A função *Dynamic Exclusion* (de duração de 30 s) estava ativada e a *relative collisional fragmentation energy* foi ajustada para 35%. Todas as amostras MS/MS obtidas foram analisadas utilizando o programa *Mascot* (Matrix Science Ltd., Londres, Reino Unido) e o programa *Scaffold* (Proteome Software, Inc., Portland, Oregon, USA). O programa *Mascot* foi programado para buscar por peptídeos utilizando como base de dados a sequência da Bcp WT e assumindo digestão por tripsina. O programa buscou por peptídeos com 0,5 Da de *fragment ion mass tolerance* e 2,0 Da de *parent ion tolerance*. Derivados de cisteínas com iodoacetamida e NEM foram especificados como modificações fixas, enquanto oxidação de metionina foi especificada como modificação variável. Foram permitidas perda de dois sítios de clivagem pela tripsina. O programa *Scaffold* foi utilizado para validar a identificação dos peptídeos baseado nos dados MS/MS com probabilidade $\geq 95\%$.

Cristalização das proteínas Bcp WT e Bcp C47S – as triagens iniciais foram realizadas no Laboratório Robotizado de Cristalização de Proteínas (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Centro de Biologia Molecular Estrutural, Campinas – SP), utilizando as proteínas nas concentrações 5, 10 e 15 µg/µl em tampão citrato de sódio 5 mM pH 5,0. As placas de cristalização foram montadas com o auxílio do sistema automatizado *Honeybee*, utilizando soluções baseadas nos *kits* de cristalização: *Crystal Screen I e II* (Hampton Research Corp., Aliso Viejo, Califórnia, USA), *Wizard I e II* (Emerald BioSystems, Inc., Bainbridge Island, Washington, USA), *PACT* (Nextal, Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), *JCSG+* (Nextal, Qiagen GmbH), *SaltRx* (Hampton Research Corp.) e *Precipitant Synergy* (Emerald BioSystems, Inc.). Os experimentos foram realizados pelo método da gota sentada e temperatura de cristalização de 18°C. O volume final das gotas foi 1 µl (0,5 µl da solução de proteína e

0,5 μ l da solução de cristalização) e o volume da solução de cristalização no poço foi 80 μ l. As proteínas foram testadas: sem tratamento, tratada com peróxido de hidrogênio 1 mM e tratada com TCEP 10 mM (ou DTT 10 mM). A proteína, depois de tratada, foi mantida a temperatura ambiente por uma hora. Exceto durante o tratamento, a proteína foi mantida em gelo até o término dos experimentos de cristalização. Após montagem, as placas foram observadas periodicamente com o auxílio de lupa.

Nos refinamentos das condições de cristalização utilizamos gotas com um volume final de até 10 μ l. Neste caso, foram variados o pH e a concentração de sais e precipitantes, com o intuito de obter cristais adequados aos experimentos de difração.

Os cristais da proteína mutante Bcp C47S utilizados para os experimentos de difração de raios-X foram obtidos a partir da proteína tratada com DTT 10 mM. A condição ótima foi obtida utilizando a solução de cristalização: Hepes-NaOH 100 mM pH 7,5 e 20% PEG-8000.

Cristalografia de raios-X e análise dos dados estruturais – com os cristais de proteína mutante Bcp C47S obtidos, realizamos experimentos de difração de raios-X, utilizando a radiação gerada pela luz síncrotron. Todos os procedimentos de coleta dos dados resultantes de difrações de raios-X foram realizados no LNLS (Campinas – SP), na Linha de Cristalografia de Macromoléculas 2 – W01B-MX2, com auxílio da doutoranda Karen Fulan Discola. Os cristais foram mergulhados numa solução crioprotetora composta por 2 μ l da solução de cristalização e 20% (v/v) glicerol. As coletas foram feitas em temperatura criogênica (110 K), através de fluxo de nitrogênio líquido sobre a amostra. No comprimento de onda de 1,65 Å, os dados de difração de raios-X foram coletados em detector *MarMosaic 225* numa distância de 70 mm e 3s de exposição.

Os dados de difração foram processados utilizando os programas *MOSFLM* (Leslie, 1992) e *SCALA* (Kabsch, 1988; Blessing, 1995), do pacote *CCP4* (Collaborative Computational Project, 1994). A estrutura cristalográfica da Bcp C47S foi determinada pelo método de substituição molecular usando o programa *Phaser* (McCoy e col., 2007). O modelo teórico foi construído, baseado nas coordenadas da triparredoxina peroxidase de *Crithidia fasciculata* (PDB ID: 1E2Y; Alphey e col., 2000), que possui 30% de identidade com a Bcp de *X. fastidiosa*. O refinamento foi realizado através do programa *REFMAC 5.0* (Pannu, 1998). O programa *Coot* v.0.5.2 (Emsley e Cowtan, 2004) foi utilizado para inspeção visual, substituição de aminoácidos e ajuste da molécula no interior do mapa de densidade eletrônica. Todas as representações gráficas mostradas neste trabalho foram geradas com a utilização do programa *PyMOL* v.0.99rc6 (DeLano Scientific LLC, San Carlos, Califórnia, USA; www.pymol.org).

Determinação da estrutura secundária da proteína Bcp por dicroísmo circular – os experimentos de dicroísmo circular foram realizados no espectropolarímetro Jasco J-720 (Jasco Inc., Easton, Maryland, USA) a 20°C. As amostras foram diluídas em tampão citrato de sódio 5 mM pH 6,2 e utilizou-se cela de quartzo de 0,1 cm. A elipticidade foi medida de 260 nm a 190 nm, num total de oito espectros adquiridos para cada amostra. O espectro de dicroísmo circular da solução de referência foi subtraído daquele das amostras. As medidas de dicroísmo circular estão indicadas em elipticidade média por resíduo, na unidade de $\text{deg.cm}^2/\text{dmol}$.

Os espectros de dicroísmo foram analisados através do programa *CDPro*, utilizando o método *CDSSTR* e o conjunto SMP56 de padrões de referência, composto por 43 proteínas solúveis e 13 proteínas de membrana (Sreerama e Woody, 2000).

Resultados e Discussão

Clonagem dos genes de *Xylella fastidiosa*

Proteína comigratória com bacterioferritina (Bcp)

O gene *bcp*, amplificado por PCR a partir do cosmídeo 08D10, com o uso de oligonucleotídeos específicos, e digerido com NdeI e BamHI, possui 482 pb. O produto de amplificação foi ligado ao vetor pET15b (5708 pb), também digerido com NdeI e BamHI (figura 22), e transformados na linhagem de *E. coli* DH5 α . Cinco colônias foram analisadas por PCR e a presença do gene foi verificada por PCR.

Figura 22. Clonagem do gene *bcp* no vetor de expressão pET15b. Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Raia 1 – padrão de massa molecular *1kb Plus DNA Ladder* (400, 500, 650, 850, 1000, 1650 e 2000 bp); 2 – produto de dupla-digestão com NdeI e BamHI do vetor pET15b (5708 pb); 3 – produto de dupla-digestão com NdeI e BamHI do gene *bcp* amplificado do cosmídeo 08D10 (482 pb). Esta imagem é a imagem negativa do original corado com brometo de etídeo.

Um clone transformado foi selecionado, o vetor isolado e o inserto amplificado por PCR, para confirmar a construção do vetor de expressão pET15b-*bcp*. O gene *bcp* inserido no vetor pET15b foi confirmado por seqüenciamento, utilizando oligonucleotídeos específicos do vetor pET15b (T7fw e T7rv). O vetor de expressão pET15b-*bcp* foi transformado na linhagem de *E. coli* BL21(DE3), e esta linhagem foi, então, testada para expressão da proteína Bcp. As proteínas produzidas através do vetor pET15b possuem cauda de poli-histidina N-terminal e, portanto, podem ser purificadas por cromatografia de afinidade a metal.

A expressão da Bcp (~20,0 kDa com cauda de poli-histidina) foi verificada por cromatografia de afinidade a níquel e análise por SDS-PAGE mas, mesmo obtendo quantidade considerável de proteína solúvel, uma grande proporção encontrava-se precipitada quando a bactéria era crescida e induzida a 37°C (figura 23A). A expressão foi testada em diferentes temperaturas e concentrações do indutor IPTG (não mostrado), e a condição que apresentou melhor rendimento foi a realizada *overnight* a 20°C com IPTG 0,5 mM (figura 23B). Devido à elevada expressão, ainda era possível observar por SDS-PAGE uma pequena proporção de proteína na forma precipitada.

A obtenção de Bcp em maior grau de pureza, para a realização de ensaios enzimáticos e estudos de cristalização, foi alcançada com a utilização de um gradiente de purificação que consistia na lavagem da proteína com tampão de ligação contendo imidazol 50 mM e 100 mM, consecutivamente, e eluição com tampão de eluição contendo imidazol 400 mM (figura 24).

Figura 23. Verificação da purificação da Bcp (20 kDa) por SDS-PAGE redutor. (A) Purificação do extrato protéico de células induzidas com IPTG 1 mM a 37°C por 3 horas. Raia 1 – padrão de massa molecular *BenchMark Protein Ladder* (10, 15, 20 *highlight*, 25, 30, 40, 50 *highlight*, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160 e 220 kDa); 2 a 4 – frações purificadas; 5 – fração eluída com imidazol 50 mM; 6 – fração eluída com imidazol 150 mM; 7 – fração precipitada. **(B) Purificação do extrato protéico de células induzidas com IPTG 0,5 mM a 20°C, *overnight*.** Raia 1 – padrão de massa molecular *BenchMark Protein Ladder*; 2 a 15 – frações purificadas. Purificação por cromatografia de afinidade a níquel. Antes de serem analisadas por SDS-PAGE, as amostras foram tratadas com DTT 0,1 M por 30 minutos a 37°C.

Figura 24. Verificação da pureza da Bcp por SDS-PAGE redutor. Raia 1 – padrão de massa molecular *BenchMark Protein Ladder* (10, 15, 20 *highlight*, 25, 30, 40, 50 *highlight*, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160 e 220 kDa); 2 – Bcp purificada (~20 kDa). Purificação por cromatografia de afinidade a níquel. Antes de serem analisadas por SDS-PAGE, as amostras foram tratadas com DTT 0,1 M por 30 minutos a 37°C.

Para investigar o papel catalítico das cisteínas da Bcp de *X. fastidiosa* (Cys-23, Cys-47, Cys-83 e Cys-101), cada um dos resíduos foi individualmente substituído por serina, gerando as proteínas mutantes Bcp C23S, Bcp C47S, Bcp C83S e Bcp C101S. Através da utilização do *kit QuikChange Site-directed Mutagenesis* (Stratagene), construímos os vetores de expressão pET15b-*bcpC23S*, pET15b-*bcpC47S*, pET15b-*bcpC83S* e pET15b-*bcpC101S*. Após confirmação das mutações por sequenciamento, as proteínas mutantes foram expressas na linhagem de *E. coli* BL21(DE3) e purificadas por cromatografia de afinidade a níquel, da mesma forma que a Bcp WT (figura 25).

Figura 25. Verificação da purificação das proteínas mutantes Bcp Cys→Ser por SDS-PAGE. Raia 1 – padrão de massa molecular *BenchMark Protein Ladder* (15, 20 *highlight*, 25, 30, 40, 50 kDa *highlight*); 2 – Bcp C23S; 3 – Bcp C47S; 4 – Bcp C83S; 5 – Bcp C101S. Proteínas purificadas por cromatografia de afinidade a níquel. Antes de serem analisadas por SDS-PAGE, as amostras foram tratadas com DTT 0,1 M por 30 minutos a 37°C.

Alquil hidroperóxido redutase subunidade C (AhpC)

A clonagem do gene *ahpc* (561 pb) foi realizada a partir do segundo códon ATG da ORF XF1530 anotada no banco de dados do Projeto Genoma *Xylella fastidiosa*, de acordo com a análise *in silico* descrita na Introdução. O vetor pET15b-*ahpc* foi construído em condições semelhantes às descritas para o vetor pET15b-*bcp*, a partir do cosmídeo 07B05, com o uso de oligonucleotídeos específicos com sítios de restrição para NdeI e BamHI. A expressão foi verificada em diferentes temperaturas e concentrações do indutor IPTG (não mostrado) e a condição que apresentou melhor rendimento foi aquela realizada por 3 horas a 37°C com IPTG 1,0 mM, na linhagem de expressão de *E. coli* BL21(DE3). O gene *ahpc* inserido no vetor pET15b foi confirmado por seqüenciamento, utilizando oligonucleotídeos específicos do vetor pET15b.

Como indicado em Materiais e Métodos, a purificação da proteína AhpC (~22,8 kDa com cauda de poli-histidina) em pureza suficiente para a realização de ensaios enzimáticos *in vitro* foi alcançada com a utilização de um gradiente de purificação que consistia na lavagem da proteína com tampão de ligação contendo imidazol 50 mM e 100 mM, consecutivamente, e eluição com tampão de eluição contendo imidazol 500 mM (figura 26). As análises por SDS-PAGE redutor e não-redutor mostram que a AhpC oxidada apresenta-se como homodímero, indicando a formação de ponte dissulfeto intermolecular. A observação do homodímero na proteína oxidada e a presença das apenas duas cisteínas altamente conservadas, indicam que a AhpC possui mecanismo 2-Cys Prx típico, como esperado.

Figura 26. Verificação da pureza da AhpC por SDS-PAGE não-redutor (A) e redutor (B). Raia 1 – Padrão de massa molecular *BenchMark Protein Ladder* (10, 15, 20 *highlight*, 25, 30, 40, 50 *highlight*, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160 e 220 KDa); 2 a 4 – frações purificadas (45,6 kDa em A, e 22,8 kDa em B). Purificação por cromatografia de afinidade a níquel. No gel de SDS-PAGE redutor, as amostras foram previamente tratadas com DTT 0,1 M por 30 minutos a 37°C.

Alquil hidroperóxido redutase subunidade F (AhpF)

Como mostrado anteriormente, a proteína AhpF de *X. fastidiosa*, assim como a AhpF de *S. typhimurium*, possui construção modular com uma flavoproteína dissulfeto redutase (similar à TrxR) ligada a um módulo funcionalmente similar à Trx (Poole, 2005). Estes dois módulos podem ser separados em duas unidades funcionais, sem o comprometimento das propriedades funcionais de cada unidade, apesar de apresentarem menor eficiência de transferência de elétrons entre elas (Poole e col., 2000a). Na AhpF de *S. typhimurium*, o domínio N-terminal foi delimitado baseado na localização de um sítio sensível a tripsina no lado C-terminal da Arg-202, enquanto o domínio C-terminal foi delimitado baseado em estudos de fragmentos C-terminal contendo flavina gerados por proteólise limitada da AhpF (Poole, 1996). Com a intenção de estudá-los em separado, geramos os módulos N- e C-terminal de AhpF segundo a seqüência dos módulos gerados para a AhpF de *S. typhimurium* (figura 20). Neste

sentido, construímos a proteína íntegra AhpF e as proteínas truncadas AhpF[1-203] (módulo N-terminal) e AhpF[209-531] (módulo C-terminal).

As clonagens foram realizadas a partir do segundo códon ATG da ORF XF1531 anotada no banco de dados do Projeto Genoma *Xylella fastidiosa*, de acordo com a análise *in silico* descrita na Introdução, utilizando o cosmídeo 07B05. Dentre as três construções, somente o gene que codifica para a proteína truncada AhpF[1-203] (631 pb) foi clonado no vetor pET15b, utilizando oligonucleotídeos específicos com sítios de restrição para NdeI e BamHI (figura 27A). O gene *ahpf*[1-203] inserido no vetor pET15b foi confirmado por seqüenciamento, utilizando oligonucleotídeos específicos do vetor pET15b. A indução da expressão da proteína AhpF[1-203] (~24,6 kDa com cauda de poli-histidina) foi realizada por 3 horas a 37°C com IPTG 1,0 mM, na linhagem de *E. coli* BL21(DE3), condição esta que produziu boa quantidade de proteína solúvel (figura 27B).

Figura 27. Clonagem do gene e expressão da proteína truncada AhpF[1-203]. (A) Amplificação por PCR do gene truncado *ahpf* [1-203].

Raia 1 – Padrão de massa molecular *1kb Plus DNA Ladder* (300, 400, 500, 650, 850, 1000, 1650 e 2000 bp); 2 – produto de PCR do gene *ahpf*[1-203] (631 pb). Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.

(B) Verificação da expressão da proteína truncada AhpF[1-203] por SDS-PAGE redutor.

Raia 1 – padrão de massa molecular *BenchMark Protein Ladder* (10, 15, 20 *highlight*, 25, 30, 40, 50 *highlight*, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160 e 220 KDa); 2 e 3 – frações purificadas (~24,6 kDa). Purificação por cromatografia de afinidade a níquel. As amostras foram previamente tratadas com DTT 0,1 M por 30 minutos a 37°C.

A existência de diversos sítios de restrição no gene *ahpf* impediu sua clonagem em vetores de expressão convencionais que utilizam extremidades coesivas geradas por enzimas de restrição para ligação do gene ao vetor. Por isso, para a clonagem do gene *ahpf* (1596 bp) e do gene que codifica para a proteína truncada AhpF[209-531] (974 pb) utilizamos o vetor pBAD/Thio-TOPO (4454 pb), que permite a inserção direta do produto de PCR amplificado pela *Taq* polimerase, sem a necessidade da existência de extremidades coesivas e de utilização da T4 DNA ligase.

O vetor pBAD/Thio-TOPO foi utilizado com sucesso para produção da AhpC de *H. pylori* (Papinutto e col., 2005). Neste sistema, as proteínas recombinantes são expressas em fusão com uma cauda tiorredoxina N-terminal e uma cauda de poli-histidina C-terminal. A cauda tiorredoxina pode ser removida por digestão com NcoI, desde que o oligonucleotídeo *forward* possua sítio de restrição para NcoI. A expressão do gene inserido no vetor pBAD/Thio-TOPO em *E. coli* é controlada pelo promotor *araBAD* (P_{BAD}). Este promotor é regulado pelo produto do gene *arac*, que está codificado no vetor pBAD/Thio-TOPO. A proteína AraC é um regulador transcricional que, na presença de L-arabinose, permite a transcrição do gene de interesse.

Os genes *ahpf* e *ahpf*[209-531] foram amplificados por PCR, a partir do cosmídeo 07B05, utilizando oligonucleotídeos específicos (os oligonucleotídeos *forward* possuíam sítio de restrição para NcoI). Os produtos de PCR (figura 28) foram diretamente ligados ao vetor pBAD/Thio-TOPO e transformados na linhagem de *E. coli* TOP10 *One Shot Electrocomp*. Dez colônias foram analisadas por PCR utilizando os oligonucleotídeos específicos de cada gene, para verificar a presença dos genes.

Figura 28. Amplificação por PCR dos genes *ahpf* e *ahpf*[209-531] a partir do cosmídeo 07B05. Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Raia 1 – Padrão de massa molecular *1kb Plus DNA Ladder* (650, 850, 1000, 1650 e 2000 bp); 2 – produto de PCR do gene *ahpf* (1598 pb); 3 – produto de PCR do gene truncado *ahpf*[209-531] (974 pb).

É importante salientar que os genes são ligados ao vetor pBAD/Thio-TOPO sem a utilização de extremidades coesivas e, portanto, são inseridos em qualquer orientação. Como os oligonucleotídeos *forward* e o vetor pBAD/Thio-TOPO possuíam sítio de restrição para *NcoI* (o gene *ahpf* não possui sítio de restrição para *NcoI*), era possível determinar, em gel de agarose, a orientação dos genes pelo tamanho dos fragmentos de digestão por *NcoI* produzidos (esquemático na figura 29A). Das colônias positivas, cinco tiveram seus vetores isolados e analisados por digestão com a enzima de restrição *NcoI*, para verificar a inserção dos genes na correta orientação (figura 29B).

A orientação

B

Figura 29. Verificação da orientação dos genes inseridos no vetor pBAD/Thio-TOPO por digestão com *NcoI*. (A) **Esquema da verificação da orientação dos genes.** As setas indicam sítios de restrição da enzima *NcoI*. O gene *trx* refere-se ao gene que codifica para a cauda de tiorredoxina N-terminal. É importante salientar que esta sequência de DNA não é linear, mas circular. (B) **Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.** Raia 1 – Padrão de massa molecular *1kb Plus DNA Ladder* (850, 1000, 1650 e 2000 bp); 2 a 5 – vetores com o gene *ahpf* inserido; 6 a 11 – vetores com o gene *ahpf*[209-531] inserido. Raias 3, 4, 7, 8, 10 e 11, indicam inserção dos genes no sentido 5'→3' correto. A digestão com *NcoI* foi realizada por 2 horas a 37°C.

Os vetores pBAD/Thio-*ahpf* e pBAD/Thio-*ahpf*[209-531] com a orientação correta dos genes, foram digeridos com *NcoI*, para clivar o gene da cauda de tiorredoxina, e as extremidades do produto de digestão foram religadas com o uso da T4 DNA ligase. Os produtos de ligação foram transformados na linhagem de *E. coli* TOP10 *One Shot Electrocomp*. Cinco colônias foram analisadas por PCR utilizando

os oligonucleotídeos específicos de cada gene e, após confirmação por sequenciamento, um clone de cada construção foi testado para expressão das proteínas AhpF e AhpF[209-531].

Conforme recomendações do fabricante, testamos a expressão das proteínas em escala piloto de 10 ml, variando a quantidade de L-arabinose utilizada para indução de 0,00002% a 0,2% (p/v), para determinar a quantidade necessária para máxima expressão das proteínas. Neste ensaio piloto, a indução foi realizada a 37°C por 4 horas. Provavelmente devido à baixa expressão das proteínas, não conseguimos verificar a indução por SDS-PAGE nos extratos protéicos brutos (não mostrado). A expressão das proteínas somente foi efetiva quando realizada a 20°C, e o nível ótimo de expressão foi obtido quando as células foram induzidas a 20°C *overnight* com L-arabinose 0,2% e 0,075% (p/v), para as proteínas AhpF (~60,4 kDa com cauda de poli-histidina) e AhpF[209-528] (~37,4 kDa com cauda de poli-histidina), respectivamente (figura 30).

Figura 30. Verificação da expressão das proteínas AhpF 60,4 kDa (A) e AhpF[209-531] 37,4 kDa (B) por SDS-PAGE redutor. Raia 1 – padrão de massa molecular *BenchMark Protein Ladder* (10, 15, 20 *highlight*, 25, 30, 40, 50 *highlight*, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160 e 220 KDa); 2 a 6 – frações purificadas. Purificação por cromatografia de afinidade a níquel.

A proteína AhpF foi purificada no sistema *ÄKTA FPLC*, usando coluna *HisTrap Crude* de 5ml, com gradiente de eluição de imidazol 20 a 500 mM em 50 ml. Como AhpF elui em concentrações baixas de imidazol (~300 mM), tivemos dificuldades em obtê-la com pureza satisfatória, já que muitos contaminantes coeluíam com a proteína (figura 31A). Através de uma segunda etapa de purificação por cromatografia de troca aniônica, utilizando coluna *Mono Q* no sistema *ÄKTA FPLC*, conseguimos purificar a proteína com um alto grau de pureza (a proteína elui com 350 mM de NaCl; figura 31B), porém, com considerável diminuição no rendimento.

Figura 31. Verificação da purificação da proteína AhpF (60,4 kDa) por SDS-PAGE. (A) Primeira etapa de purificação. Purificação por cromatografia de afinidade a níquel no sistema *Äkta FPLC*. Raia 1 – padrão de massa molecular *BenchMark Protein Ladder* (15, 20 *highlight*, 25, 30, 40, 50 KDa *highlight*); 2 a 5 – frações purificadas. **(B) Segunda etapa de purificação.** Purificação por cromatografia de troca aniônica no sistema *Äkta FPLC*. Raia 1 – padrão de massa molecular *BenchMark Protein Ladder* (15, 20 *highlight*, 25, 30, 40, 50 KDa *highlight*); 2 a 5 – frações purificadas.

A proteína AhpF tem cor amarela e suas propriedades espectrais (espectro de absorção a > 310 nm) indicam, como esperado, que a proteína possui um grupamento flavina coordenado em sua estrutura protéica (figura 32). Este espectro de absorção é característico da forma oxidada da flavina (FAD), já que a sua redução conduz a perda da absorbância a 450 nm e geração de uma banda de forte absorbância centrada entre 575 e 580 nm (correspondente a forma semi-quinona $\text{FADH}^\bullet$), que também é perdida na forma totalmente reduzida da flavina (FADH_2 ; Poole, 1996).

Figura 32. Espectro de absorção UV-vis da AhpF. A proteína (64 μM) foi analisada em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4 e NaCl 150 mM. Picos de máxima absorbância em 382,5 nm e 447,5 nm.

Tiorredoxinas (TsnC e TrxA) e tiorredoxina redutase (TrxR)

Os genes que codificam para as proteínas TrxR (~36,7 kDa com cauda de poli-histidina) e TsnC (tiorredoxina, ~14,7 kDa com cauda de poli-histidina) foram clonados pelo aluno de doutorado José Renato R. Cussiol. Os genes *trxr* (963 pb) e *tsnC* (339 pb) foram inseridos no vetor de expressão pET15b e expressos nas linhagens de *E. coli* BL21(DE3) e AD494(DE3), respectivamente. A condição ótima de indução da expressão foi a realizada a 20 °C *overnight* com IPTG 0,5 mM (figura 33).

Figura 33. Verificação da purificação das proteínas TsnC 14,7 kDa (A) e TrxR 36,7 kDa (B) por SDS-PAGE redutor. Raia 1 – padrão de massa molecular *BenchMark Protein Ladder* (10, 15, 20 *highlight*, 25, 30, 40, 50 *highlight*, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160 e 220 KDa); 2 a 4 – frações purificadas. Purificação por cromatografia de afinidade a níquel.

Os genes *trxa* (327 pb) e *ybbn* (1017 pb) foram clonados no vetor de expressão pET15b (figura 34), porém, apesar das diversas tentativas de expressão em várias linhagens de expressão de *E. coli*, não conseguimos obter as proteínas na forma solúvel.

Figura 34. Amplificação por PCR dos genes *trxa* e *ybbn*. Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Raia 1 – Padrão de massa molecular *1kb Plus DNA Ladder* (200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000, 1650, 2000 bp); 2 – produto de PCR do gene *ybbn* (1017 pb), amplificado a partir do cosmídeo 07C07; 3 – produto de PCR do gene *trxa* (327 pb), amplificado a partir do cosmídeo 07C06.

Caracterização funcional do sistema tiorredoxina (TsnC) e tiorredoxina redutase (TrxR)

A atividade dissulfeto redutase da tiorredoxina (TsnC de *X. fastidiosa*) acoplada à tiorredoxina redutase (TrxR de *X. fastidiosa*) foi confirmada pelo ensaio do DTNB (figura 35), indicando que há interação e, portanto, troca ditiól-dissulfeto entre TsnC e TrxR de *X. fastidiosa*, à custa da oxidação de NADPH (esquematizado na figura 36).

Figura 35. Atividade dissulfeto redutase da TsnC acoplada a TrxR pelo ensaio do DTNB. Redução de DTNB foi monitorada a 37°C a 412 nm. A reação (1 ml) foi realizada em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,5, na presença de NADPH 0,2 mM, EDTA 1 mM, TsnC 1 μM, TrxR 0,1 μM e BSA 1 mg/ml. A reação foi iniciada pela adição de DTNB 0,5 mM. As curvas representam a cinética de redução do DTNB pelo sistema completo (triângulo vazio), na ausência de TsnC (triângulo cheio) e na ausência de TrxR (quadrado vazio).

Figura 36. Reações envolvidas na redução de DTNB pela TsnC acoplada à TrxR e à custa de NADPH.

Para caracterizar o sistema redutor TsnC e TrxR, determinamos os parâmetros enzimáticos de TrxR em relação a TsnC (figura 37A). A velocidade de reação foi medida pelo ensaio do DTNB em concentrações variáveis de TsnC, saturantes de DTNB e NADPH, e fixa de TrxR. Dessa forma, foi feita uma análise enzimática considerando somente TsnC como substrato de TrxR. Os parâmetros enzimáticos da TrxR em relação a TsnC são:

$$V_{\max} = 0,05 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1} \quad K_{M(\text{TsnC})} = 3,4 \mu\text{M} \quad k_{\text{cat}} = 0,50 \text{ s}^{-1} \quad k_{\text{cat}}/K_{M(\text{TsnC})} = 1,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

O K_M da TrxR de *X. fastidiosa* para a TsnC é semelhante ao da TrxR para a TrxA em *E. coli* ($K_{M(TrxA)} = 2,9 \mu\text{M}$; Prongay e col., 1989), indicando que as tioredoxina redutases destes organismos possuem afinidades semelhantes às respectivas tioredoxinas.

Utilizamos concentrações maiores de TsnC com o intuito de atingir a velocidade máxima da reação, porém, em concentrações maiores que $20 \mu\text{M}$, ocorre diminuição da velocidade. Esta diminuição da velocidade está associada ao consumo não-enzimático do DTNB pela TsnC (não catalisado pela TrxR), que aumenta exponencialmente com o aumento da concentração de TsnC, sem atingir a saturação esperada para reações enzimáticas (figura 37B). Conseqüentemente, no sistema completo (DTNB/TsnC/TrxR/NADPH), a contribuição da reação não-enzimática na velocidade total da reação (somatória da reação enzimática e não-enzimática) aumenta exponencialmente, ao contrário da reação enzimática que é saturável. Dessa forma, em concentrações de TsnC progressivamente maiores, a velocidade da reação não-enzimática continuará aumentando, enquanto a velocidade da reação enzimática permanecerá constante. Nesta situação, a velocidade da reação enzimática será progressivamente menor se descontarmos a reação não-enzimática. Por exemplo, com TsnC $2,5 \mu\text{M}$ a reação não-catalítica contribui com 10% na velocidade total enquanto com $20 \mu\text{M}$ essa contribuição é de 55%. Como não estamos monitorando a oxidação do NADPH, não podemos afirmar se o consumo de DTNB pela TsnC ocorre à custa do NADPH ou pela fração de TsnC que já se encontrava reduzida no início do ensaio.

Figura 37. Caracterização da atividade dissulfeto redutase da TsnC acoplada a TrxR. (A) Efeito da concentração de TsnC na atividade dissulfeto redutase da TrxR. Redução de DTNB foi monitorada a 37°C a 412 nm . A reação ($370 \mu\text{l}$) foi realizada em tampão fosfato de sódio 100 mM $\text{pH } 7,5$, na presença de EDTA 1 mM , NADPH $0,2 \text{ mM}$, TrxR $0,1 \mu\text{M}$ e diferentes concentrações de TsnC. A reação foi iniciada pela adição de DTNB $0,5 \text{ mM}$. Em cada concentração de TsnC, descontamos o consumo de DTNB que ocorre na ausência da TrxR. Descontamos também o consumo de DTNB que ocorre na ausência da TsnC. **(B) Efeito da concentração de TsnC na redução de DTNB.** Este ensaio foi realizado conforme o item A, na ausência de TrxR.

Infelizmente, não pudemos trabalhar com as proteínas TrxA e Ybbn de *X. fastidiosa*. Como há duas tioredoxinas (TsnC e TrxA) em *X. fastidiosa*, seria importante verificar se há especificidade na redução destas tioredoxinas pela TrxR e, também, se há especificidade de redução das peroxirredoxinas pelas tioredoxinas. Também seria importante verificar se Ybbn possui atividade dissulfeto redutase de regeneração das tioredoxinas de *X. fastidiosa*.

Caracterização da proteína comigratória com bacterioferritina (Bcp)

Mecanismo catalítico da proteína Bcp

Os primeiros ensaios da atividade peroxidásica indicaram que a proteína Bcp possuía atividade antioxidante de proteção da glutamina sintetase contra a inativação pelo sistema $\text{Fe}^{+3}/\text{O}_2/\text{DTT}$, mas não pelo sistema $\text{Fe}^{+3}/\text{O}_2/\text{ascorbato}$ (ver figura 46), indicando que a Bcp de *X. fastidiosa* possui atividade antioxidante dependente de tiól.

Pelo ensaio FOX, Bcp apresentou atividade peroxidásica para peróxido de hidrogênio, TBHP e CHP, apenas se DTT estivesse presente na mistura de reação numa concentração não inferior a 2 mM (figura 38). Nestas condições, DTT consome espontaneamente peróxido de hidrogênio, dificultando a determinação do consumo de peróxido de hidrogênio pelo ensaio FOX. A atividade específica de Bcp foi 0,12 e 0,06 $\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$ quando, respectivamente, CHP e TBHP foram utilizados como substrato.

Figura 38. Atividade Peroxidásica da Bcp e especificidade de substrato. A concentração de hidroperóxido foi determinada pelo ensaio FOX. A reação (100 μl) foi realizada a 37 °C, em tampão Hepes-NaOH 50 mM pH 7,4, na presença de azida 1 mM e DTPA 0,1 mM. A concentração de hidroperóxido no tempo inicial era de 150 μM . A reação foi iniciada pela adição de DTT 2 mM na presença de Bcp 25 μM . As curvas representam a cinética de decomposição dos hidroperóxidos, TBHP (quadrado cheio) e CHP (quadrado vazio). As reações sem DTT não mostraram qualquer decomposição de hidroperóxido, mesmo na presença de Bcp. Cada tempo foi analisado em triplicata.

A atividade peroxidásica foi aumentada pela adição da TsnC de *X. fastidiosa*, mostrando que a tiorredoxina é capaz de reduzir a forma oxidada de Bcp, mesmo em concentrações de DTT 0,5 mM (figura 39). A atividade ótima foi obtida quando a proporção Bcp:TsnC atingiu 1:1,4 (não mostrado). A atividade dissulfeto redutase da TsnC e sua capacidade de reduzir a forma oxidada de Bcp sugerem o envolvimento de pontes dissulfeto no mecanismo de catálise da Bcp de *X. fastidiosa*.

Figura 39. Efeito da TsnC sobre a atividade peroxidásica da Bcp. A concentração de CHP foi determinada pelo ensaio FOX. A reação (100 µl) foi realizada a 37°C, em tampão Hepes-NaOH 50 mM pH 7,4, na presença de azida 1 mM, DTPA 0,1 mM e CHP 200 µM. A reação foi iniciada pela adição de DTT 0,5 mM. As curvas representam a cinética de decomposição de CHP na presença de Bcp 5 µM (quadrado cheio), TsnC 10 µM (triângulo vazio) e Bcp 5 µM e TsnC 10 µM (quadrado vazio). As reações sem DTT não mostraram qualquer decomposição de CHP, mesmo na presença de Bcp e/ou TsnC.

Na presença da TsnC, a atividade específica da Bcp foi aumentada 30 vezes, sendo 4,68, 3,62 e 1,78 µM/min/µg quando, respectivamente, peróxido de hidrogênio, CHP e TBHP foram usados como substratos (figura 40). Estes resultados indicam que Bcp é mais eficiente na remoção de peróxido de hidrogênio e CHP que de TBHP. O aumento da atividade específica pela TsnC, além de indicar que a TsnC reduz Bcp mais eficientemente que o DTT, sugere que a TsnC deve atuar como um doador fisiológico de elétrons para a redução da Bcp em *X. fastidiosa*. Estes resultados também confirmam que a Bcp de *X. fastidiosa* é uma peroxidase dependente de tiól.

Figura 40. Especificidade de substrato da Bcp na presença de TsnC. A concentração de hidróperóxido foi determinada pelo ensaio FOX. A reação (20 µl) foi realizada a 37°C, em tampão Hepes-NaOH 50 mM pH 7,4, na presença de azida 1 mM, DTPA 0,1 mM, hidróperóxido 200 µM, Bcp 5 µM e TsnC 7 µM. A reação foi iniciada pela adição de DTT 0,5 mM. As curvas representam a cinética de decomposição de peróxido de hidrogênio (quadrado vazio), TBHP (triângulo vazio) e CHP (quadrado cheio). As reações sem DTT não mostraram decomposição de hidróperóxido, mesmo na presença de Bcp e/ou TsnC. Cada tempo foi analisado em triplicata.

Como Bcp mostrou atividade dependente de tiorredoxina, testamos sua habilidade em reduzir hidroperóxidos com a tiorredoxina (TsnC) e a tiorredoxina redutase (TrxR) de *X. fastidiosa*, atuando como sistema redutor. Bcp apresentou atividade peroxidásica de decomposição de peróxido de hidrogênio, indiretamente verificada pela diminuição da absorbância a 340 nm devido a oxidação de NADPH, apenas na presença da TsnC e da TrxR, indicando que a atividade de Bcp é dependente do sistema tiorredoxina (figura 41). Por outro lado, o sistema tiorredoxina (TsnC e TrxR de *X. fastidiosa*) não sustenta a atividade peroxidásica da proteína AhpC de *X. fastidiosa*.

Figura 41. Atividade peroxidásica da Bcp ligada a oxidação de NADPH via sistema TsnC e TrxR. A oxidação de NADPH foi monitorada a 37°C pela diminuição da absorbância a 340 nm. A reação (1 ml) foi realizada em tampão Hepes-NaOH 50 mM pH 7,0, na presença de NADPH 250 μ M, TsnC 0,8 μ M, TrxR 0,3 μ M e Bcp ou AhpC 1 μ M. A reação foi iniciada pela adição de peróxido de hidrogênio 500 μ M. As curvas representam a cinética de oxidação de NADPH pelo sistema completo com Bcp (triângulo cheio), sistema completo com AhpC (quadrado vazio), na ausência de Bcp e AhpC (triângulo vazio) e na ausência de TsnC e TrxR (quadrado cheio).

Por outro lado, resultados obtidos pelo aluno de doutorado José R. R. Cussiol indicam que o sistema dihidrolipoamida succiniltransferase e dihidrolipoamida desidrogenase de *X. fastidiosa*, que foi identificado como o sistema redutor de regeneração da AhpC em *M. tuberculosis* (Bryk e col., 2002), não é capaz de reduzir as proteínas Bcp e AhpC de *X. fastidiosa* (não mostrado).

A análise da Bcp por SDS-PAGE e tratada com diferentes agentes oxidantes e redutores mostrou que a proteína se comporta como monômero independente do estado de oxidação (figura 42), sugerindo a ausência de formação de ponte dissulfeto entre moléculas, como é observado na AhpC (ver figuras 26 e 91). O tratamento com hidroperóxidos parece levar a formação de uma banda que migra ligeiramente mais rápido que a banda referente ao estado reduzido. Este fenômeno fica evidente quando a proteína foi tratada com diamida, um composto que induz a formação de pontes dissulfeto (Kosower e col., 1969). Como duas bandas podem ser observadas nos géis de SDS-PAGE com o tamanho aproximado de uma molécula de Bcp (~20 KDa), elas devem representar diferentes conformações do monômero da proteína. A banda mais inferior deve corresponder a forma oxidada de Bcp, que é gerada após tratamento com os hidroperóxidos e diamida, como também é observado em outras proteínas, como a Ohr de *X. fastidiosa* (Oliveira e col., 2006). O tratamento com diamida, porém, resulta em uma conformação diferente da obtida por tratamento com hidroperóxido.

Figura 42. Análise por SDS-PAGE da proteína Bcp tratada com diferentes agentes oxidantes e redutores. Raia 1 – Padrão de massa molecular *BenchMark Protein Ladder* (15, 20, 25, 30, 40 e 50 KDa); 2 – Bcp não tratada; 3 – 1 Bcp : 1 hidroperóxido; 4 – 1 Bcp : 5 hidroperóxido; D – 1 Bcp : 20 diamida. As amostras foram tratadas em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4 por 2 horas a temperatura ambiente, nas proporções indicadas. Em cada raia foi aplicado o equivalente a 4 µg de proteína. As amostras foram previamente reduzidas com DTT 0,1 M, *overnight* em geladeira e o DTT foi retirado utilizando coluna *Desalting PD-10*.

A ausência de migração da proteína Bcp na forma oxidada como homodímero em SDS-PAGE permite descartar a possibilidade da formação de ponte dissulfeto intermolecular durante seu ciclo catalítico mas não permite distinguir entre a formação de uma ponte dissulfeto intramolecular ou a formação de um ácido sulfênico estável. Neste sentido, quantificamos por DTNB, o número de cisteínas livres reduzidas (sulfidrilas, Cys–SH) na Bcp WT, reduzida e tratada com peróxido de hidrogênio (figura 44, tabelas III). A diferença de duas sulfidrilas entre as duas formas de Bcp WT indica a formação de uma ponte dissulfeto intramolecular, definindo a Bcp de *X. fastidiosa* como pertencente à família das peroxirredoxinas 2-Cys Prx atípicas (ver figura 7C).

Para verificar quais cisteínas da Bcp (Cys-23, Cys-47, Cys-83 e Cys-101) estavam envolvidas no ciclo catalítico, cada um dos quatro resíduos foi individualmente substituído por serina, gerando as proteínas mutantes Bcp C23S, Bcp C47S, Bcp C83S e Bcp C101S. As proteínas mutantes foram individualmente analisadas quanto ao número de sulfidrilas livres por molécula, através do ensaio do DTNB. Para um controle preciso do estado de oxidação das cisteínas das proteínas, analisamos o número de sulfidrilas livres por molécula nas proteínas reduzidas e posteriormente tratadas com doses estequiométricas de peróxido de hidrogênio (esquematizado na figura 43). Quando comparamos o número de sulfidrilas livres nas proteínas mutantes, verificamos que apenas na proteína mutante Bcp C47S não é mantida a diferença de dois equivalentes de sulfidrilas livres por molécula, entre a amostra reduzida e a tratada com peróxido de hidrogênio, indicando que apenas nesta proteína mutante não há oxidação de cisteínas (figura 44 e tabela III). Também analisamos as proteínas na forma nativa e desnaturada, para verificar o acesso do DTNB a cada cisteína. Além disso, as amostras também foram analisadas por SDS-PAGE, utilizando o agente alquilante tiól-específico AMS que, ao se adicionar a grupos sulfidrilas livres, provoca o aumento de ~0,5 kDa na massa molecular da proteína, para cada sulfidrilas livre existente (figura 45).

A

mutação Cys→Ser nas cisteínas não-envolvidas na catálise

mutação Cys→Ser na cisteína de resolução

mutação Cys→Ser na cisteína peroxidásica

Figura 43. Esquema do efeito de mutação Cys→Ser sobre o mecanismo catalítico da proteína Bcp. As letras sub-escritas p e r, representam as cisteínas peroxidásica e de resolução, respectivamente. Na proteína mutante sem a cisteína de resolução, a formação da ponte dissulfeto pode ocorrer com qualquer cisteína remanescente do mesmo ou de outro monômero, principalmente em condição desnaturante.

B

Figura 44. Determinação do conteúdo de sulfidrilas livres nas proteínas Bcp WT e mutantes Cys→Ser pelo ensaio do DTNB. As proteínas (150 μ M) foram inicialmente reduzidas com TCEP 10 mM por 30 minutos a temperatura ambiente e o TCEP foi removido utilizando coluna *HiTrap Desalting* (amostra reduzida). As proteínas foram, então, tratadas com 1,5 equivalentes de peróxido de hidrogênio por 30 minutos a temperatura ambiente e o hidroperóxido foi removido utilizando coluna *HiTrap Desalting* (amostra tratada com H_2O_2). O conteúdo de sulfidrilas livres foi determinado pelo ensaio do DTNB na amostra nativa (realizada em tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,0, NaCl 50 mM e EDTA 1 mM) e desnaturada (realizada em tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,0, uréia 8 M e EDTA 1 mM). Os valores representam a média de cinco experimentos $\pm$ desvio padrão e estão mostrados na tabela III.

Tabela III. Conteúdo de sulfidrilas livres nas proteínas Bcp WT e mutantes (resultado numérico da figura 44).

	[Cys]/[Bcp] ± desvio padrão				Δ[Cys]/[Bcp] ¹ desnaturada
	reduzidas		tratadas com H ₂ O ₂		
	nativa	desnaturada	nativa	desnaturada	
Bcp WT	3,15 ± 0,06	3,80 ± 0,20	1,74 ± 0,04	1,88 ± 0,01	1,92
Bcp C23S	2,60 ± 0,02	3,38 ± 0,02	0,64 ± 0,01	1,06 ± 0,01	2,32
Bcp C47S	2,70 ± 0,03	3,06 ± 0,02	2,45 ± 0,03	2,78 ± 0,03	0,28
Bcp C83S	1,99 ± 0,03	2,75 ± 0,02	0,79 ± 0,02	1,12 ± 0,01	1,63
Bcp C101S	2,33 ± 0,03	2,64 ± 0,03	0,85 ± 0,01	0,89 ± 0,04	1,75

¹ Δ [Cys]/[Bcp] desnaturada refere-se a diferença entre o número de sulfidrilas por molécula de proteína das formas reduzida e tratada com peróxido de hidrogênio, obtida em condição desnaturante.

Figura 45. Modificação por AMS das proteínas Bcp WT e mutantes Cys→Ser, reduzidas e tratadas com peróxido de hidrogênio. As proteínas, tratadas conforme descrito na figura 44, foram modificadas com AMS 15 mM por 30 minutos a temperatura ambiente. O equivalente a 4 µg de proteína foi analisado por SDS-PAGE. Padrão de massa molecular *BenchMark* Protein Ladder (10, 15, 20, 25, 30, 40, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160 e 220 kDa).

Para maior clareza, discutiremos cada proteína individualmente:

- **Bcp WT:** a proteína reduzida e no estado nativo possui uma cisteína inacessível ao DTNB que, na presença do agente desnaturante, é exposta à reação com o reagente (figura 44). A proteína tratada com peróxido de hidrogênio possui duas sulfidrilas a menos que a forma reduzida (tanto quando comparamos as formas desnaturadas, como as formas nativas), indicando a formação de uma ponte dissulfeto. O tratamento com AMS indica formação de uma ponte dissulfeto intramolecular, pois ocorre um retardo menor de migração devido à adição de AMS na forma tratada com peróxido de hidrogênio em comparação à forma reduzida e não há formação de dímeros covalentes (figura 43);
- **Bcp C23S:** a proteína tratada com peróxido de hidrogênio possui duas sulfidrilas a menos que a forma reduzida (tanto a forma desnaturada, como a nativa), indicando a presença de uma ponte dissulfeto entre duas das cisteínas remanescente (figura 44). O efeito do AMS na migração da proteína é semelhante ao apresentado pela Bcp WT, indicando menor adição de AMS à forma oxidada provavelmente devido à presença da ponte dissulfeto intramolecular (figura 45);
- **Bcp C47S:** a proteína tratada com peróxido de hidrogênio possui aproximadamente a mesma quantidade de sulfidrilas da proteína reduzida (tanto as formas desnaturadas, como as nativas), indicando a ausência de ponte dissulfeto entre as cisteínas remanescentes e/ou ácido sulfênico (figura 44). Esse resultado é consistente com a proposição de que a Cys-47 é a cisteína

peroxidásica da Bcp de *X. fastidiosa*, diretamente envolvida na reação com hidroperóxidos. Aparentemente nenhuma das três cisteínas dessa proteína mutante foi oxidada. Confirmando essa proposição, os perfis de modificação por AMS são semelhantes entre as proteínas reduzida e tratada com peróxido de hidrogênio (figura 45);

- **Bcp C83S:** a proteína tratada com peróxido de hidrogênio possui de uma a duas sulfidrilas a menos que a forma reduzida (tanto as formas desnaturadas, como as nativas), sendo possível a formação de uma ponte dissulfeto entre duas das cisteínas remanescentes (figura 44). Por outro lado, a fato das formas reduzidas e tratadas com peróxido de hidrogênio migrarem da mesma forma quando tratadas com AMS (bandas principais), indica que a ponte dissulfeto pode não ser formada (figura 45). Provavelmente, o ácido sulfênico formado na Cys-47 deve ser estabilizado devido à mutação da Cys-83. Dessa forma, em parte das proteínas, Cys-47 pode estar oxidada à ácido sulfênico e, em outra parte, condensada à outra cisteína, de acordo com a razão de 1,63 observada pelo ensaio de DTNB (tabela III). Além disso, a presença de vários estados de oligomerização após tratamento com peróxido de hidrogênio é consistente com a formação de ácido sulfênico na Cys-47, capaz de se condensar com outras cisteínas de outra molécula de Bcp C83S, formando pontes dissulfeto intermoleculares na condição desnaturante do SDS-PAGE;
- **Bcp C101S:** a proteína tratada com peróxido de hidrogênio também possui entre uma e duas sulfidrilas a menos que a forma reduzida (figura 44). Nesse caso, também é possível a formação de uma ponte dissulfeto intramolecular entre duas das cisteínas remanescentes. De fato, o efeito do AMS na migração da proteína é, mais uma vez, semelhante ao apresentado pela Bcp WT, indicando menor adição de AMS à forma tratada com peróxido de hidrogênio (figura 45), provavelmente devido à presença de uma ponte dissulfeto intramolecular.

A partir dessas informações, podemos concluir que a Cys-47 é a cisteína peroxidásica da Bcp de *X. fastidiosa*. Esta conclusão é principalmente sustentada pela ausência de formação de ponte dissulfeto na Bcp C47S devido à ausência da cisteína capaz de reagir com o peróxido de hidrogênio.

A formação de dímeros e tetrâmeros na Bcp C83S, diferentemente das outras proteínas, sugere que a Cys-83 é a cisteína de resolução da Bcp de *X. fastidiosa*. Na ausência da Cys-83, o ácido sulfênico gerado pela oxidação da cisteína peroxidásica persiste tempo suficiente para ser oxidado a ácido sulfínico e sulfônico (Cys-SO₂H e Cys-SO₃H, respectivamente) ou reagir com outra cisteína acessível na mesma ou em outra molécula, especialmente na condição desnaturante dos experimentos de eletroforese. Na Bcp C83S, a formação do ácido sulfênico na cisteína reativa (Cys-47) seria seguida da formação de outras pontes dissulfeto inter e intramoleculares, viáveis apenas na ausência da cisteína de resolução, cuja reação com a cisteína peroxidásica é fortemente favorecida na proteína selvagem.

As análises da quantidade de cisteínas livres nas proteínas quando nativas ou desnaturadas não mostram resultados inequívocos. Apenas podemos citar que uma das cisteínas da Bcp é inacessível à reação com DTNB e, portanto, deve estar internalizada na estrutura protéica. Através destes resultados, não podemos determinar qual é a cisteína inacessível, porém, com a elucidação da estrutura tridimensional da proteína (como mostrado adiante), foi possível verificar que a Cys-101 é a cisteína mais enterrada na estrutura protéica e, provavelmente, a menos acessível ao solvente.

Também analisamos a capacidade em decompor hidroperóxido de cada proteína mutante Cys→Ser. Inicialmente, verificamos que a Bcp WT e as proteínas mutantes Cys→Ser, com exceção da Bcp C47S, protegem a GS contra a inativação pelo sistema $\text{Fe}^{3+}/\text{O}_2/\text{DTT}$ (figura 46). Estes dados confirmam que a Cys-47 é essencial para a atividade peroxidásica da Bcp. Como DTT é capaz de reduzir tanto ácido sulfênico como pontes dissulfeto, a ausência da cisteína de resolução não é capaz de interferir na atividade peroxidásica da proteína, portanto, não pudemos determinar, através do ensaio da GS, qual é a cisteína de resolução. Nenhuma das proteínas possuía atividade antioxidante de proteção da GS contra a inativação pelo sistema $\text{Fe}^{3+}/\text{O}_2/\text{ascorbato}$, como esperado para as peroxidases dependentes de tiól. Das proteínas mutantes, Bcp C101S foi a que apresentou maior instabilidade, precipitando facilmente em solução. Esta instabilidade pode estar relacionada com a moderada queda na atividade protetora da Bcp C101S. Mesmo não participando do ciclo catalítico, a cisteína Cys-101 parece possuir algum papel estrutural de manutenção da estabilidade protéica. É interessante notar que a Cys-101 está conservada nas Bcp de *E. coli*, de *S. typhimurium* e de *K. pneumonia* (ver figuras 15 e 16).

Figure 46. Efeito da mutação Cys→Ser na atividade antioxidante da proteína Bcp pelo ensaio de proteção a glutamina sintetase. Em tampão Hepes-NaOH 25 mM pH 7,4, as reações continham: Fe^{3+} 3 μM , GS 0,2 mg/ml, Bcp WT ou proteínas mutantes 10 μM , DTT ou ascorbato 10 mM. As reações foram realizadas a 37°C por 20 minutos, antes da verificação da atividade remanescente da glutamina sintetase. Os valores representam a média de três experimentos $\pm$ desvio padrão.

Através do ensaio FOX, medimos a atividade peroxidásica de cada proteína mutante Cys→Ser usando CHP, como substrato, e DTT, como agente redutor. O CHP foi escolhido como substrato por apresentar baixa taxa de redução não-catalítica na concentração de DTT necessária para a atividade da Bcp ($[\text{DTT}] \geq 2\text{mM}$, ver figura 38). No ensaio FOX, as proteínas mutantes Bcp C23S e Bcp C101S apresentaram atividade semelhante à Bcp WT (figura 47). De modo semelhante aos dados do ensaio da GS, Bcp C47S não apresentou atividade peroxidásica, mais uma vez confirmando a Cys-47 como a cisteína peroxidásica da Bcp de *X. fastidiosa*. Interessantemente, Bcp C83S apresentou atividade peroxidásica duas vezes maior que a Bcp WT (atividade peroxidásica específica: Bcp WT = 0,69 $\mu\text{M}_{\text{CHP}}/\text{min.}/\mu\text{M}_{\text{Bcp}}$; Bcp C83S = 1,52 $\mu\text{M}_{\text{CHP}}/\text{min.}/\mu\text{M}_{\text{Bcp}}$). Com a diminuição da concentração de DTT para 0,5 mM, a atividade da Bcp C83S foi cinco vezes maior que a atividade da Bcp WT (atividade peroxidásica específica: Bcp WT = 0,33 $\mu\text{M}_{\text{CHP}}/\text{min.}/\mu\text{M}_{\text{Bcp}}$; Bcp C83S = 1,56 $\mu\text{M}_{\text{CHP}}/\text{min.}/\mu\text{M}_{\text{Bcp}}$).

Esta diferença de atividade pode estar relacionada com o passo de redução das proteínas pelo DTT, que estaria atuando com passo limitante da reação, e o papel da Cys-83 como cisteína de resolução. A redução por DTT envolve dois eventos: (1°) um passo lento de formação de um dissulfeto misto entre a proteína e o DTT e (2°) um passo rápido de redução deste dissulfeto misto pelo segundo tiól do DTT. O primeiro passo ocorre de maneira distinta nas proteínas Bcp WT e Bcp C83S. Na Bcp WT, a Cys-83 reage rapidamente com o ácido sulfênico formado pela oxidação da Cys-47, levando a formação de uma ponte dissulfeto intramolecular estável. Através de uma reação de troca ditiól-dissulfeto, ocorre a formação de um dissulfeto misto entre uma das cisteínas da proteína e o DTT que, rapidamente, é atacada pela segunda cisteína do DTT, formando DTT oxidado e a proteína reduzida. Por outro lado, na Bcp C83S, o ácido sulfênico formado na Cys-47 persiste por tempo suficiente para reagir diretamente com DTT, formando um dissulfeto misto entre a Cys-47 e uma das sulfidrilas do DTT que, rapidamente, é atacado pela segunda sulfidrilas do DTT, gerando a proteína reduzida e o DTT oxidado. Nossos dados indicam que o passo de formação do dissulfeto misto entre a proteína e o DTT é mais rápido na proteína mutante Bcp C83S que na Bcp WT, provavelmente porque o grupamento hidroxila do ácido sulfênico formado na Cys-47 atua como um grupo de partida melhor do que o tiolato, resultando numa velocidade de reação maior do DTT com o ácido sulfênico da Bcp C83S que do DTT com o dissulfeto intramolecular da Bcp WT. Outra possibilidade seria que a formação da ponte dissulfeto na Bcp WT poderia criar impedimentos estéricos que dificultariam a reação com DTT. No caso da proteína mutante Bcp C83S, não seria possível a formação da ponte dissulfeto intramolecular entre Cys47 e Cys83, deixando menos obstáculos ao acesso de DTT à cisteína peroxidásica. De fato, as análises da estrutura de Bcp, apresentadas a seguir, indicam que a formação da ponte dissulfeto entre as Cys-47 e Cys-83 requer um considerável desenovelamento na proteína.

Figura 47. Efeito da mutação Cys→Ser na atividade peroxidásica da Bcp pelo ensaio FOX. A reação (20 μ l) foi realizada a 37°C, em tampão Hepes-NaOH 50 mM pH 7,4, azida 1 mM, DTPA 0,1 mM, CHP 200 μ M e Bcp WT ou proteínas mutantes 25 μ M. A reação foi iniciada pela adição de DTT 2 mM. As curvas representam a cinética de decomposição do CHP pelas proteínas: Bcp WT (quadrado vazio), Bcp C23S (triângulo cheio), Bcp C47S (triângulo vazio), Bcp C83S (círculo cheio) e Bcp C101S (círculo vazio). Como branco entende-se a reação sem adição de proteína (quadrado cheio). Cada tempo foi analisado em triplicata.

Através do ensaio do DTT oxidado, confirmamos que a velocidade de redução da Bcp C83S é significativamente maior que da Bcp WT e das outras proteínas mutantes (figura 48). É interessante

notar que a velocidade de oxidação do DTT pela Bcp WT e pelas proteínas mutantes Bcp C23S e Bcp C47S é muito próximo do *background* de oxidação do DTT pelo CHP na ausência das enzimas, nas condições analisadas. Após totalmente reduzida, Bcp C83S começa a precipitar, conforme é possível observar pelo ligeiro aumento da linha de base. Também devido à precipitação da proteína, na condição do ensaio do DTT oxidado, não conseguimos medir a atividade da Bcp C101S.

Figura 48. Efeito da mutação C83S na atividade peroxidásica da Bcp pelo ensaio do DTT oxidado. A reação (1 ml) foi realizada a 37°C, em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 na presença de EDTA 1 mM, DTT 10 mM e Bcp WT ou proteínas mutantes 20 µM. Após 1 minuto de aclimação, a reação foi iniciada pela adição de CHP 2 mM. As curvas representam a cinética de oxidação do DTT, monitorada a 310nm. Com branco entende-se a reação sem adição de proteína. As flechas indicam a adição de CHP e o início da precipitação da Bcp C83S.

Como será mostrado adiante, comparamos as constantes de segunda ordem da reação das proteínas Bcp WT e Bcp C83S com peróxido de hidrogênio, obtidas através de cinética rápida por competição com HRP (ver figura 63). Através deste ensaio verificamos que as constantes de segunda ordem são semelhantes e, portanto, não há diferença de reatividade da cisteína peroxidásica nas proteínas Bcp WT e Bcp C83S.

Também testamos a habilidade das proteínas mutantes em reduzir CHP pelo ensaio de consumo de NADPH (figura 49). Neste caso, utilizamos as proteínas tiorredoxina e tiorredoxina redutase de *E. coli*, como sistema redutor que, como será mostrado adiante, é capaz de reduzir a Bcp de *X. fastidiosa*. Novamente, Bcp C47S não apresentou atividade de consumo de NADPH, de acordo com a proposição de que a Cys-47 é a cisteína peroxidásica. Novamente, Bcp C23S e Bcp C101S apresentaram atividade semelhante à Bcp WT, sugerindo que os resíduos Cys-23 e Cys-101 não estão envolvidos no ciclo catalítico. Bcp C83S, por sua vez, apresentou atividade menor que Bcp WT, mas não nula como ocorre com a Bcp C47S, provavelmente devido a inativação da proteína pelo hidroperóxido. Esta interpretação está de acordo com o papel da Cys-83 como a cisteína de resolução, capaz de proteger a Cys-47 da superoxidação por substrato. Na ausência da Cys-83, o ácido sulfênico formado pela oxidação da Cys-47 persiste tempo suficiente para ser superoxidado pelo substrato e, portanto, ser inativado. Além disso, aparentemente o sistema tiorredoxina/tiorredoxina redutase/NADPH não é tão eficiente em reduzir o ácido sulfênico gerado na Bcp C83S, contribuindo na progressiva perda de atividade peroxidásica.

Figura 49. Efeito da mutação Cys→Ser na atividade peroxidásica da Bcp ligada a oxidação de NADPH via sistema tiorredoxina de *E. coli*. Oxidação de NADPH foi monitorada a 37°C pela diminuição da absorvância a 340 nm. A reação (1 ml) foi realizada em tampão Hepes-NaOH 50 mM pH 7,0 na presença de NADPH 200 μM, Trx 1,0 μM, TrxR 0,1 μM e Bcp WT ou proteínas mutantes 1 μM. A reação foi iniciada pela adição de CHP 250 μM. Como branco entende-se a reação sem Bcp WT ou proteína mutante.

Com o intuito de confirmar que a Cys-83 é a cisteína de resolução, testamos o efeito da pré-incubação com dimedona sobre a atividade peroxidásica dependente de DTT no ensaio FOX. Este ensaio baseia-se no fato de que dimedona reage especificamente com ácido sulfênico (mas não com sulfidrilas ou dissulfetos), gerado após tratamento de proteínas contendo cisteínas reativas com peróxido de hidrogênio. Como a alquilação com dimedona não é revertida por DTT, haverá inibição da atividade peroxidásica dependente de DTT apenas se o ácido sulfênico persistir por tempo suficiente para reagir com dimedona (esquematizado na figura 50). A inibição da atividade peroxidásica foi detectada apenas na Bcp C83S (figura 51A), reforçando a hipótese de que a Cys-83 é a cisteína de resolução. Na Bcp WT, a Cys-83 deve reagir rapidamente com o ácido sulfênico formado na Cys-47, impedindo que dimedona alquile a Cys-47. Paralelamente, mostramos que dimedona protege Bcp C83S da precipitação induzida por peróxido de hidrogênio em gel SDS-PAGE (figura 51B). Neste caso, dimedona impede que o ácido sulfênico, que persiste na ausência da Cys-83, forme ponte dissulfeto intermolecular inespecíficas na condição desnaturante do gel SDS-PAGE.

Figura 51. Modificação das proteínas Bcp WT e Bcp C83S por tratamento com dimedona. (A) Inibição da atividade enzimática. Antes de iniciar o ensaio FOX, Bcp WT e Bcp C83S foram incubadas com 1,1 equimolar de peróxido de hidrogênio por 30 minutos a temperatura ambiente, na ausência e na presença de 1000 equimolares de dimedona. O ensaio FOX foi realizado a 37°C, em tampão Hepes-NaOH 50 mM pH 7,4, azida 1 mM, DTPA 0,1 mM, TBHP 300 µM, Trx de *E. coli* 1 µM e Bcp WT ou proteínas mutantes 10 µM. A reação foi iniciada pela adição de DTT 1 mM. Os valores são a média de três experimentos ± desvio padrão, e foram normalizados considerando, como 100% de atividade peroxidásica, a atividade da proteína Bcp WT na ausência de dimedona. **(B) Análise por SDS-PAGE.** As proteínas foram incubadas com peróxido de hidrogênio (1,1 equimolar) e/ou dimedona (1000 equimolares), como indicado acima do eletroferograma, por 30 minutos a temperatura ambiente. Cada raia contém 2,5 µg de proteína.

Para demonstrar, de modo direto e inequívoco, a interação de ponte dissulfeto entre as Cys-47 e Cys-83, realizamos experimentos de espectrometria de massas. Inicialmente, analisamos diferencialmente Bcp WT, reduzida e tratada com peróxido de hidrogênio, através da geração de fragmentos de digestão por tripsina e análise por espectrometria de massas triplo quadrupolo com ionização por *electrospray* (MS/ESI+).

Após digestão com tripsina da Bcp WT tratada com peróxido de hidrogênio (portanto, com ponte dissulfeto intramolecular), duas estratégias foram utilizadas. Na primeira, após separação dos peptídeos por HPLC de fase reversa (HPLC-C18) e detecção a 214 nm, buscamos por um pico (referente ao peptídeo com a ponte dissulfeto) que, quando tratado com DTT, geraria dois outros picos (resultantes da redução da ponte dissulfeto). Após identificar o peptídeo com ponte dissulfeto, o coletamos de uma corrida HPLC-C18 e o analisamos por MS/ESI+ com injeção direta. Também analisamos o peptídeo após tratamento com DTT, buscando identificar diferencialmente os peptídeos gerados devido a redução da ponte dissulfeto. Na segunda estratégia, por espectrometria de massas acoplada ao HPLC de fase reversa (HPLC-C18/MS/ESI+), analisamos a digestão trípica diretamente e, também, após tratamento com DTT (as estratégias estão esquematizadas na figura 52).

Para evitar artefatos devido à formação de pontes dissulfetos não-específicas na condição da digestão trípica, as cisteínas remanescentes foram alquiladas com *N*-etilmaleimida (NEM), após o tratamento com peróxido de hidrogênio. Como Bcp WT possui quatro cisteínas, sendo a Cys-47 reconhecidamente a cisteína peroxidásica, a digestão trípica da proteína tratada com peróxido de hidrogênio poderia, em princípio, gerar três possíveis peptídeos com ponte dissulfeto: Cys-47-S-S-Cys-23, Cys-47-S-S-Cys-83 e Cys-47-S-S-Cys-101 (tabela IV).

Figura 52. Esquema das estratégias utilizadas para análise dos peptídeos. Os peptídeos estão representados por retângulos e numerados de acordo com a tabela IV. A linha mais larga representa a ponte dissulfeto formada devido ao tratamento com peróxido de hidrogênio. Sequencialmente, Bcp WT é tratada com peróxido de hidrogênio, alquilada com NEM e digerida com tripsina. Os peptídeos são separados por HPLC-C18, o de interesse foi coletado durante a cromatografia e analisado por espectrometria de massas. Em uma segunda estratégia, o produto de digestão foi analisado diretamente por HPLC-C18/MS/ESI+. Em ambos os casos, analisou-se também as amostras posteriormente tratadas com um redutor tiólico.

Tabela IV. Peptídeos gerados por digestão triptica *in silico* da Bcp WT tratada com peróxido de hidrogênio e NEM, e possíveis peptídeos derivados da formação de pontes dissulfeto inter-peptídeos e/ou alquilação de cisteínas com NEM. Os peptídeos estão organizados em ordem cronológica. Não estão presentes peptídeos gerados por digestão parcial. As estratégias utilizadas estão esquematizadas na figura 52.

Sequência do peptídeo	Cys	Massa monoisotópica [M] (Da)		
		Peptídeo	Peptídeos com possível ponte dissulfeto com Cys-47	Peptídeo com NEM
(1) MGSSHHHHHSSGLVPR	---	1898,8819	---	---
(2) GSHMNIGDTLNHSLNHLPLMLSGSTCK	23	2876,3731	6336,0721	2999,4885
(3) TLDYTNQWLVLVLYFYPK	---	2150,0724	---	---
(4) DNTPGCSTEGLEFNLLLPQFEQINATVLGVSR	47	3461,7136	---	3584,8290
(5) DSVK	---	447,2329	---	---
(6) SHDSFCAK	83	893,3701	4353,0691	1016,4855
(7) QGFTFPLVSDSDAILCK	101	1839,9076	5299,6066	1963,0230
(8) AFDVIK	---	691,3904	---	---
(9) EK	---	275,1481	---	---
(10) TMYGR	---	626,2846	---	---
(11) QVIGIER	---	813,4708	---	---
(12) STFLIGPTR	---	1127,6087	---	---
(13) IVEAWR	---	772,4231	---	---
(14) QVK	---	373,2325	---	---
(15) VPGHAEVLNK	---	1191,6247	---	---
(16) LK	---	259,1896	---	---
(17) AHAEQ	---	554,2449	---	---

Na primeira estratégia, identificamos um pico no cromatograma da proteína Bcp WT tratada com peróxido de hidrogênio/NEM/tripsina que estava ausente no cromatograma dessa mesma amostra tratada com DTT (figura 53A). Adicionalmente, este pico não absorve a 280 nm e não emite fluorescência a 330 nm (quando excitado a 280 nm), como era esperado, já que os peptídeos preditos por digestão triptica da Bcp WT e que possuem cisteínas, não possuem triptofano e tirosina em sua estrutura primária. Este pico, que chamaremos de peptídeo de interesse, foi coletado para posterior análise por MS/ESI+. A re-injeção do peptídeo de interesse no sistema HPLC-C18 indicou que havia um peptídeo coeluinto com o de interesse (figura 53B). Além disso, não conseguimos identificar dois novos picos na amostra tratada com DTT, apenas um pico é claramente identificado (figura 53A). Provavelmente, o segundo pico esteja coeluinto com outro no cromatograma apresentado na figura 53A.

Figura 53. Análise por HPLC-C18 dos peptídeos gerados por digestão triptica da proteína Bcp WT. (A) Bcp WT pré-reduzida foi sequencialmente tratada com peróxido de hidrogênio (1:1), NEM (em excesso molar) e digerida com tripsina, conforme descrito em Materiais e Métodos. O equivalente a 6 µg desta amostra foi aplicado no HPLC-C18 (amostra não tratada com DTT, **linha tracejada**). Esta mesma quantidade de amostra foi reduzida com DTT 10 mM por 30 minutos a temperatura ambiente e aplicada no HPLC-C18 (amostra tratada com DTT, **linha contínua**). A **seta cheia** indica o pico presente apenas na amostra não tratada com DTT e a **seta vazia** indica o pico presente apenas na amostra tratada com DTT. **(B)** Cromatograma da fração coletada a partir da amostra não-tratada com DTT (pico indicado pela seta cheia em A). A **seta cinza** indica o peptídeo de interesse. Cromatogramas com detecção por espectrofotometria a 214 nm, realizado conforme descrito em Materiais e Métodos.

Os experimentos de espectrometria de massas foram realizados com a ajuda da técnica de nível superior Fernanda Manso Prado, utilizando as facilidades do laboratório do Prof. Dr. Paolo Di Mascio (Departamento de Bioquímica – IQ/USP). Analisamos por MS/ESI+ e injeção direta: (1) o peptídeo de interesse; e (2) o peptídeo de interesse reduzido com TCEP 10 mM. Os íons observados no espectro de MS/ESI+ do peptídeo de interesse (figura 54A, superior) confirmam a formação de uma ponte dissulfeto entre as Cys-47 e Cys-83, enquanto apenas no espectro do peptídeo de interesse reduzido com TCEP

podemos observar o peptídeo que contém a Cys-83 na forma reduzida (figura 54A, inferior). Adicionalmente, identificamos o peptídeo que coelui com o de interesse, como sendo aquele que contém a Cys-101 alquilada com NEM (os dados obtidos estão sumarizados na figura 54B).

Figura 54. Espectros de MS/ESI+ do peptídeo de interesse. (A, superior) injeção direta do peptídeo de interesse. (A, inferior) injeção direta do peptídeo de interesse após redução com TCEP (10 mM) por 30 minutos a temperatura ambiente. Os asteriscos indicam os íons identificados a partir da tabela IV. (B) Massa dos íons identificados nos espectros em A e as respectivas modificações encontradas.

Na segunda estratégia, a digestão trípica (sem separação prévia do peptídeo de interesse por HPLC-C18) foi analisada por espectrometria de massas acoplada ao HPLC (HPLC-C18/MS/ESI+). Analisamos: (1) a digestão trípica da proteína Bcp WT tratada com peróxido de hidrogênio/NEM; e (2) a digestão trípica da Bcp WT tratada com peróxido de hidrogênio/NEM e, posteriormente, reduzida

com TCEP 10 mM. Os dados obtidos estão sumarizados na tabela V, os cromatogramas com detecção por espectrofotometria a 214 nm e os espectros dos tempos de retenção indicados na tabela V são mostrados na figura 55.

A identificação do peptídeo contendo a ponte dissulfeto intramolecular na amostra não-tratada com TCEP e do peptídeo contendo a Cys-47 na amostra tratada com TCEP, confirmam a formação da ponte dissulfeto intramolecular entre as Cys-47 e Cys-83. Não encontramos peptídeos com pontes dissulfeto diferentes da formada entre as Cys-47 e Cys-83. Adicionalmente, identificamos os peptídeos contendo a Cys-23 e a Cys-101, ambos alquilados com NEM, que confirmam a ausência da participação destas cisteínas no ciclo catalítico da Bcp de *X. fastidiosa*. Como na análise por injeção direta, não conseguimos identificar o peptídeo contendo a Cys-83 na amostra reduzida com TCEP, provavelmente devido à sua baixa hidrofobicidade, já que sua sequência de aminoácidos (SHDSFCAK) é composta predominantemente por aminoácidos polares. Este peptídeo interage fracamente com a fase estacionária da coluna C18 e, por isso, deve eluir prematuramente durante o procedimento cromatográfico. A baixa hidrofobicidade deste peptídeo também explica o aumento no tempo de retenção do peptídeo contendo a Cys-47, em relação ao peptídeo que contém a ponte dissulfeto intramolecular.

Tabela V. Íons identificados nas análises por HPLC-C18/MS/ESI+ da digestão triptica da Bcp WT tratada com peróxido de hidrogênio/NEM e, posteriormente, reduzida com TCEP. Os tempos de retenção referem-se aos cromatogramas com detecção por espectrofotometria a 214 nm.

Digestão triptica da Bcp WT tratada com peróxido de hidrogênio/NEM

Peptídeo	Modificação	T _{retenção} (min.)	Massa dos íons (Da)			Espectro fig. 55
			(M+nH) ⁿ⁺	Calculada	Medida	
DNTPGCSTEGLEFNLLLPQFEQINATVLGVSR SHDSFCAK	Ponte Dissulfeto (Cys-47–Cys-83)	15,66	(M+3H) ³⁺ (M+4H) ⁴⁺	1452,0 1089,3	1453,2 1089,6	C
GSHMNIGDTLNHSLLNHPLMLSGSTCK	Cys-23 + NEM	11,31	(M+2H) ²⁺ (M+3H) ³⁺ (M+4H) ⁴⁺	1500,8 1000,8 750,9	1502,7 1001,9 751,5	D
QGFTFPLVSDSDAILCK	Cys-101 + NEM	15,46	(M+2H) ²⁺	982,5	983,7	E
DNTPGCSTEGLEFNLLLPQFEQINATVLGVSR	Cys-47 reduzido	ausente	(M+2H) ²⁺ (M+3H) ³⁺ (M+4H) ⁴⁺	1731,9 1154,9 866,4	--- --- ---	---

Digestão triptica da Bcp WT tratada com peróxido de hidrogênio/NEM e, posteriormente, reduzida com TCEP

Peptídeo	Modificação	T _{retenção} (min.)	Massa dos íons (Da)			Espectro fig. 55
			(M+nH) ⁿ⁺	Calculada	Medida	
DNTPGCSTEGLEFNLLLPQFEQINATVLGVSR SHDSFCAK	Ponte Dissulfeto (Cys-47–Cys-83)	ausente	(M+3H) ³⁺ (M+4H) ⁴⁺	1452,0 1089,3	--- ---	---
GSHMNIGDTLNHSLLNHPLMLSGSTCK	Cys-23 + NEM	11,32	(M+2H) ²⁺ (M+3H) ³⁺ (M+4H) ⁴⁺	1500,8 1000,8 750,9	1503,0 1002,1 751,7	G
QGFTFPLVSDSDAILCK	Cys-101 + NEM	15,57	(M+1H) ¹⁺ (M+2H) ²⁺	1964,0 982,5	1966,9 983,8	H
DNTPGCSTEGLEFNLLLPQFEQINATVLGVSR	Cys-47 reduzido	16,97	(M+2H) ²⁺ (M+3H) ³⁺ (M+4H) ⁴⁺	1731,9 1154,9 866,4	1732,8 1155,3 866,8	F

Figura 55. Cromatogramas e espectros da análise por HPLC-C18/MS/ESI+ da digestão trípica da Bcp WT tratada com peróxido de hidrogênio/NEM. (A) cromatograma da digestão trípica. (B) cromatograma da digestão trípica reduzida com TCEP 10 mM (30 minutos a temperatura ambiente). Cromatogramas com detecção por espectrofotometria a 214 nm. As flechas e letras indicam os tempos de retenção dos quais derivam os espectros de MS/ESI+ (C) a (H), sumarizados na Tabela V. Experimento realizado conforme descrito em Materiais e Métodos.

Em outra abordagem, realizada em colaboração com a MSc Isabelle Kelly (*Proteomics Platform* do Eastern Quebec Genomics Center, Quebec, Canadá), a proteína Bcp WT tratada com peróxido de hidrogênio e NEM foi reduzida e alquilada com iodoacetamida. A análise da digestão triptica dessa amostra por MS/MS, mostrou quais cisteínas estavam modificadas com NEM (que adiciona 125 Da ao peptídeo) e quais estavam modificadas com carbamidometil (produto da alquilação com iodoacetamida, que adiciona 57 Da ao peptídeo). Os peptídeos com cisteínas modificadas com carbamidometil seriam aqueles que formavam ponte dissulfeto intramolecular, que só ficaram disponíveis para alquilação após redução com DTT. Através desta estratégia, determinamos que a maioria das modificações com NEM estava presente nos peptídeos que continham as Cys-23 e Cys-101, enquanto a maioria das modificações com carbamidometil estava presente nos peptídeos que continham as Cys-47 e Cys-83, mostrando que a ponte dissulfeto intramolecular foi formada entre as Cys-47 e Cys-83 (Tabela VI e VII).

Tabela VI. Peptídeos identificados por MS/MS da digestão triptica da proteína Bcp WT tratada sequencialmente com peróxido de hidrogênio/NEM/DTT/iodoacetamida. Modificações observadas: IAA (alquilação com iodoacetamida), NEM (alquilação com NEM) e Met Ox (oxidação de metionina). Da sequência da Bcp WT, 99% foi coberta pela análise MS/MS, num total de 500 espectros e identificação de 33 peptídeos únicos.

Sequência dos peptídeos	Modificações	Posição	Número de Espectros	Cys
(R)GSHMNIGDTLNHSLLNHPLMLSGSTCK(T)	IAA	18-44	1	23
	Met Ox, IAA	18-44	1	23
	Met Ox, Met Ox, IAA	18-44	1	23
	NEM	18-44	3	23
	Met Ox, NEM	18-44	3	23
	Met Ox, Met Ox, NEM	18-44	2	23
	NEM	18-44	2	23
	Met Ox, NEM	18-44	2	23
	Met Ox, Met Ox, NEM	18-44	1	23
(K)TLDYTNQWLVLVYFYPKDNTPGCSTEGLEFNLLLPQFEQINATVLGVSR(D)	IAA	45-93	1	47
(K)DNTPGCSTEGLEFNLLLPQFEQINATVLGVSR(D)	IAA	62-93	3	47
(K)DNTPGCSTEGLEFNLLLPQFEQINATVLGVSRDSVK(S)	IAA	62-97	1	47
(R)DSVKSHDSFCAK(Q)	IAA	94-105	59	83
	NEM	94-105	2	83
(R)DSVKSHDSFCAKQGFTFPLVSDSDAILCK(A)	IAA, NEM	94-122	1	83/101
(K)SHDSFCAK(Q)	IAA	98-105	5	83
(K)SHDSFCAKQGFTFPLVSDSDAILCK(A)	IAA, NEM	98-122	3	83/101
(K)QGFTFPLVSDSDAILCK(A)	IAA	106-122	9	101
	NEM	106-122	46	101
(K)QGFTFPLVSDSDAILCKAFDVIK(E)	NEM	106-128	1	101
(K)QGFTFPLVSDSDAILCKAFDVIKEK(T)	IAA	106-130	1	101
	NEM	106-130	4	101
(K)QGFTFPLVSDSDAILCKAFDVIKEKTMVGR(Q)	NEM	106-135	1	101

Tabela VII. Número de espectros obtidos para cada modificação nas cisteínas dos peptídeos gerados.

Cisteína contida nos peptídeos	Quantidade de espectros obtidos com modificação	
	NEM	IAA
Cys-23	13	3
Cys-47	0	5
Cys-83	2	68
Cys-101	56	10

Os resultados obtidos nas análises por espectrometria de massas, inequivocamente, confirmam a formação de uma ponte dissulfeto intramolecular entre as Cys-47 e Cys-83 da Bcp de *X. fastidiosa*.

A partir dos resultados obtidos, propomos que, no mecanismo catalítico de redução de hidroperóxidos pela Bcp, as Cys-47 e Cys-83 atuam como cisteína peroxidásica e cisteína de resolução, respectivamente. Além disso, propomos que as proteínas TsnC e TrxR possivelmente atuam como sistema doador de elétrons fisiológico para a Bcp de *X. fastidiosa*. A figura 56 esquematiza o mecanismo catalítico proposto para a redução de hidroperóxidos pela proteína Bcp de *X. fastidiosa* e a redução da forma oxidada pelo sistema TsnC/TrxR de *X. fastidiosa*.

Figura 56. Representação esquemática do mecanismo catalítico de redução de hidroperóxidos pela Bcp de *X. fastidiosa*.

A cisteína peroxidásica (Cys-47) reduz o hidroperóxido e é oxidada para o ácido sulfênico intermediário que rapidamente reage com a cisteína de resolução (Cys-83), formando uma ponte dissulfeto intramolecular. A ponte dissulfeto é, então, reduzida pelas proteínas TsnC e TrxR de *X. fastidiosa* à custa de NADPH, regenerando a forma reduzida da proteína Bcp.

Parâmetros cinéticos da proteína Bcp

Como verificamos que o sistema tiorredoxina (TsnC e TrxR) de *X. fastidiosa* sustenta a atividade peroxidásica da proteína Bcp à custa de equivalentes redutores do NADPH (ver figura 41), utilizamos inicialmente o ensaio de oxidação do NADPH para determinar os parâmetros cinéticos de decomposição de hidroperóxidos pela Bcp de *X. fastidiosa*, utilizando equações de cinética de estado estacionário (*steady-state kinetic*) e variando somente a concentração do hidroperóxido.

$$\text{Equações de Estado Estacionário:} \quad K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

A velocidade inicial da catálise mediada pela Bcp foi determinada pelo ensaio de oxidação de NADPH em várias concentrações de hidroperóxidos, na presença de TsnC e TrxR de *X. fastidiosa* (figura 57). Os valores obtidos de K_M da Bcp para peróxido de hidrogênio, TBHP e CHP foram 1,9, 24 e 3,2 μM , respectivamente, e mostram a maior afinidade de Bcp por peróxido de hidrogênio e CHP. Os valores de $V_{\max}$ para peróxido de hidrogênio, TBHP e CHP foram 7,52, 8,58 e 7,01 $\mu\text{mol}_{\text{hidroperóxido}}/\text{min}/\mu\text{mol}_{\text{Bcp}}$, respectivamente. Estes valores de $V_{\max}$ estão próximos daqueles obtidos para a Bcp de *E. coli* (7,01, 1,93 e 8,23 $\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{mol}$ para peróxido de hidrogênio, TBHP e hidroperóxido do ácido linoléico, respectivamente; Jeong e col., 2000). Os valores de $V_{\max}/K_M$ da Bcp de *X. fastidiosa* para peróxido de hidrogênio, TBHP e CHP, de 3,96, 0,36 e 2,19 $\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{mol}$, respectivamente, estão de acordo com as atividades determinadas para cada substrato através do ensaio FOX (ver figura 40).

A velocidade de consumo de hidroperóxido pela Bcp também foi medida em várias concentrações de substrato, na presença de tiorredoxina (TrxA) e tiorredoxina redutase (TrxB) de *E. coli* (figura 58). Os resultados de K_M da Bcp para peróxido de hidrogênio, TBHP e CHP foram 18, 92 e 14 μM , respectivamente, estando em concordância com os dados obtidos com TsnC e TrxR de *X. fastidiosa*.

Os parâmetros cinéticos obtidos para a Bcp de *X. fastidiosa* com os dois sistemas redutores (TsnC e TrxR de *X. fastidiosa* e TrxA e TrxB de *E. coli*) estão sumarizados na tabela VIII. A eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) da Bcp, utilizando os dois sistemas redutores, novamente está de acordo com os resultados de preferência de substrato da Bcp por peróxido de hidrogênio e CHP verificados pelo ensaio FOX.

Devido a pouca disponibilidade das proteínas do sistema tiorredoxina, tanto de *X. fastidiosa* como *E. coli*, provavelmente não conseguimos trabalhar em condições saturantes, como seria necessário para a determinação dos parâmetros cinéticos de decomposição de hidroperóxido pela Bcp de *X. fastidiosa*. Os parâmetros obtidos são, portanto, aparentes e somente são úteis para comparação da preferência de substrato hidroperóxido da Bcp de *X. fastidiosa*.

Tabela VIII. Parâmetros cinéticos da Bcp com diferentes sistemas redutores.

	TsnC e TrxR de <i>X. fastidiosa</i>				TrxA e TrxB de <i>E. coli</i>			
	$V_{\max, \text{app}}$ ($\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$)	$K_{M, \text{app}}$ (M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$)	$V_{\max, \text{app}}$ ($\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$)	$K_{M, \text{app}}$ (M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$)
H₂O₂	$1,25 \cdot 10^{-8}$	$1,94 \cdot 10^{-6}$	$1,25 \cdot 10^{-2}$	$6,46 \cdot 10^3$	$2,14 \cdot 10^{-7}$	$18,1 \cdot 10^{-6}$	$6,15 \cdot 10^{-2}$	$3,40 \cdot 10^3$
CHP	$1,16 \cdot 10^{-8}$	$3,23 \cdot 10^{-6}$	$1,17 \cdot 10^{-2}$	$3,61 \cdot 10^3$	$1,83 \cdot 10^{-7}$	$13,5 \cdot 10^{-6}$	$5,25 \cdot 10^{-2}$	$3,89 \cdot 10^3$
TBHP	$1,43 \cdot 10^{-8}$	$24,0 \cdot 10^{-6}$	$1,43 \cdot 10^{-2}$	$0,60 \cdot 10^3$	$1,94 \cdot 10^{-7}$	$92,4 \cdot 10^{-6}$	$5,58 \cdot 10^{-2}$	$0,60 \cdot 10^3$

Figura 57. Efeito da concentração de hidroperóxido na atividade peroxidásica da Bcp ligada a oxidação de NADPH via TsnC e TrxR de *X. fastidiosa*. A oxidação de NADPH foi monitorada a 37°C pela diminuição da absorbância a 340 nm. A reação (1 ml) foi realizada em tampão Hepes-NaOH 50 mM pH 7,0 na presença de NADPH 260 μM , TsnC 0,8 μM , TrxR 0,3 μM , Bcp 1 μM e diferentes concentrações de hidroperóxidos. A reação foi iniciada pela adição do hidroperóxido. As curvas representam a velocidade de oxidação de NADPH em diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio, CHP e TBHP.

Figura 58. Efeito da concentração de hidroperóxido na atividade peroxidásica da Bcp ligada a oxidação de NADPH via TrxA e TrxB de *E. coli*. A oxidação de NADPH foi monitorada a 37°C pela diminuição da absorbância a 340 nm. A reação (1 ml) foi realizada em tampão Hepes-NaOH 50 mM pH 7,0 na presença de NADPH 300 μM , TrxA 1,0 μM , TrxB 0,1 μM , Bcp 3,5 μM e diferentes concentrações de hidroperóxidos. A reação foi iniciada pela adição do hidroperóxido. As curvas representam a velocidade de oxidação de NADPH em diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio, CHP e TBHP.

Através do ensaio de oxidação de NADPH também determinamos os parâmetros cinéticos da Bcp em relação à TsnC de *X. fastidiosa* (figura 59), em concentrações saturantes de peróxido de hidrogênio e NADPH, e fixas de Bcp e TrxR de *X. fastidiosa*. Os parâmetros cinéticos da Bcp em relação à TsnC são:

$V_{\max} = 0,0477 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$	$K_{M(\text{TsnC})} = 1,912 \mu\text{M}$
$k_{\text{cat}} = 0,24 \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{cat}}/K_{M(\text{TsnC})} = 1,25 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$

Figura 59. Efeito da concentração de TsnC na atividade peroxidásica da Bcp ligada a oxidação de NADPH via TrxR. A oxidação de NADPH foi monitorada a 37°C pela diminuição da absorbância a 340 nm. A reação (370 μl) foi realizada em tampão Hepes-NaOH 50 mM pH 7,0, na presença de NADPH 200 μM, TrxR 0,2 μM, Bcp 0,2 μM e diferentes concentrações de TsnC. A reação foi iniciada pela adição de peróxido de hidrogênio 200 μM. Neste ensaio utilizamos Bcp, TsnC e TrxR de *X. fastidiosa*.

É importante salientar que o mecanismo catalítico descrito para peroxirredoxinas e proposto neste trabalho para a Bcp de *X. fastidiosa*, conforme pode ser visto na figura 56, é do tipo Bi Bi Ping Pong, ou seja, a enzima possui dois substratos (o hidroperóxido e a tiorredoxina reduzida), produz dois produtos (o álcool correspondente e a tiorredoxina oxidada) e a liberação de produto ocorre de forma intercalada à entrada de substrato no sítio ativo (figura 60).

Figura 60. Representação esquemática do mecanismo catalítico do tipo Bi Bi Ping Pong da Bcp.

No mecanismo do tipo Bi Bi Ping Pong, a velocidade inicial da catálise é dependente da concentração de ambos os substratos (hidroperóxido e TsnC), assim, a forma mais adequada de analisar os parâmetros cinéticos deste sistema é através de uma análise de bisubstrato, no qual a velocidade inicial da reação é determinada em diferentes concentrações dos dois substratos. A velocidade de reação foi novamente determinada pelo ensaio de oxidação de NADPH. Como a

transferência de elétrons do NADPH para o sistema peróxido de hidrogênio/Bcp/TsnC é realizado pela enzima tiorredoxina redutase (TrxR de *X. fastidiosa*), assumindo que a reação catalisada pela TrxR não é passo limitante da reação (por esse motivo, utilizamos excesso molar dessa enzima). Neste ensaio, realizado a 37°C, trabalhamos com quantidades constantes de Bcp (0,2 µM), TrxR (5,0 µM) e NADPH (200 µM), e quantidades variáveis de cada hidroperóxido (0, 50, 100 e 150 µM, para peróxido de hidrogênio e CHP; e 0, 75, 150 e 300 µM, para TBHP) e TsnC (1, 2, 3 e 4 µM). Os gráficos *velocidade inicial* × *concentração de substrato* indicam que as interações de Bcp com os hidroperóxidos são fenômenos saturáveis que, portanto, podem ser analisados através de uma aproximação não-linear, utilizando a equação de Michaelis-Menten. O conjunto de retas paralelas dos gráficos de duplo-recíproco ($1/v \times 1/[\text{substrato}]$) indicam o mecanismo bimolecular Bi Bi Ping Pong. A inclinação do gráfico para um substrato (A) não se altera com a variação da concentração do outro substrato (B), neste sentido, a equação 1 rege estes gráficos paralelos. E, portanto, o replote do intercepto em y do gráfico ($1/v \times 1/[A]$) × $1/[B]$ é regido pela equação 2. Neste replote, o intercepto em y ($x=0$) é $1/V_{\max}$ e o intercepto em x ($y=0$) é $-1/K_B$. Os parâmetros cinéticos da Bcp em relação aos hidroperóxidos e à TsnC de *X. fastidiosa*, obtidos através desta abordagem (figura 61) e calculados com o auxílio do programa *Prism 4* (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, USA), estão sumarizados na tabela IX.

$$\text{Equação de Michaelis-Menten: } v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

$$\text{Equação 1: } \frac{1}{v} = \frac{K_A}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)$$

$$\text{Equação 2: } y - \text{intercepto} = \frac{1}{V_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)$$

Tabela IX. Parâmetros cinéticos da Bcp calculados pelo ensaio de bisubstrato mostrado na figura 61.

Parâmetros cinéticos	Ensaio de Bisubstrato					
	H ₂ O ₂ + TsnC		TBHP + TsnC		CHP + TsnC	
	H ₂ O ₂	TsnC	TBHP	TsnC	CHP	TsnC
$V_{\max}$ (µM.s ⁻¹)	0,24		0,09		0,44	
K_M (µM)	22,77	6,78	72,47	3,03	37,49	12,2
k_{cat} (s ⁻¹)	1,10		0,41		2,00	
k_{cat}/K_M (M ⁻¹ .s ⁻¹)	$0,48 \cdot 10^5$	$1,62 \cdot 10^5$	$0,06 \cdot 10^5$	$1,34 \cdot 10^5$	$0,53 \cdot 10^5$	$1,64 \cdot 10^5$

Figura 61. Ensaio de bisubstrato da atividade peroxidase da Bcp ligada a oxidação de NADPH via TrxR. A oxidação de NADPH foi monitorada a 37°C pela diminuição da absorvância a 340 nm. A reação (250 μl) foi realizada em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4 na presença de Bcp 0,2 μM, TrxR 5 μM, NADPH 200 μM e TsnC (1 μM, 2 μM, 3 μM e 4 μM). A reação foi iniciada pela adição de hidroperóxido: peróxido de hidrogênio e CHP (50 μM, 100 μM e 200 μM), e TBHP (75 μM, 150 μM e 300 μM). À esquerda, duplo-recíproco de $1/v \times 1/[TsnC]$ e, à direita, replote do intercepto em y no duplo-recíproco $\times 1/[hidroperóxido]$. Cada concentração de hidroperóxido e TsnC foi analisada em triplicata.

A eficiência catalítica de redução de hidroperóxidos relativamente baixa (k_{cat}/K_M da ordem de $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), como as mostradas acima, levaram muitos autores a descreverem as peroxirredoxinas como proteínas de reatividade moderada com hidroperóxidos, em comparação à outras enzimas detoxificantes de hidroperóxidos, como as glutatona peroxidases dependentes de selênio e catalases ($k \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Por outro lado, mais recentemente, vários estudos têm levantado a hipótese de que a eficiência catalítica baixa esteja relacionada com limitações experimentais do método que segue a oxidação de NADPH.

Determinações por métodos de estado estacionário subestimam as constantes de segunda ordem da reação de peroxirredoxinas com os hidroperóxidos (Ogusucu e col., 2007). Além disso, a descrição do ciclo catalítico das peroxirredoxinas como uma sequência de duas reações bimoleculares (mecanismo do tipo Bi Bi Ping Pong, como descrito nas figuras 56 e 60) é a simplificação de um ciclo catalítico complexo que envolve diversas reações parciais, ao invés de somente dois passos elementares (figura 62A). Considerando que determinamos os parâmetros cinéticos pelo método que segue a oxidação de NADPH, as reações parciais de oxido-redução da tiorredoxina e da tiorredoxina redutase tornam o ciclo catalítico da Bcp ainda mais complexo (figura 62B).

A

B

Figura 62. Complexidade dos ciclos catalíticos envolvidos na determinação dos parâmetros cinéticos da Bcp pelo método da oxidação de NADPH. (A) Mecanismo catalítico da Bcp de *X. fastidiosa*. Baseado nos mecanismos descritos por Trujillo e col. (2007), para as 2-Cys Prx típicas, e Flohé e col. (2002), para a triparredoxina peroxidase de *Crithidia fasciculata*. **(B) Mecanismo catalítico da tiorredoxina redutase,** de acordo com o descrito por Wang e col. (1996), para redução da tiorredoxina, aqui representada pela TsnC de *X. fastidiosa*.

Para contornar as limitações dos métodos de estado estacionário, foram desenvolvidos métodos de determinação direta das constantes de velocidade envolvidas na catálise de peroxirredoxinas. Recentemente, Parsonage e col. (2005) desenvolveram um método fluorimétrico que mostrou uma eficiência catalítica da ordem de $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para a AhpC de *S. typhimurium*. Com propósito semelhante, o grupo da Profa. Dra. Ohara Augusto em colaboração com nosso grupo, desenvolveu um método de cinética competitiva com HRP para determinar a constante de segunda ordem da reação do peróxido de hidrogênio e peroxinitrito com peroxirredoxinas (Ogusucu e col., 2007). Através deste método, as constantes de segunda ordem das reações das proteínas Tsa1 e Tsa2 de *S. cerevisiae* foram determinadas e estão na mesma ordem de grandeza de glutathione peroxidases dependentes de selênio e catalases ($k \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

Dessa forma, utilizamos o método de cinética competitiva com HRP para determinar a constante de segunda ordem da reação do peróxido de hidrogênio com a Bcp de *X. fastidiosa*. A constante foi determinada a partir da equação 3, onde $(F/1-F)$ é a porcentagem de inibição da oxidação de HRP. A constante de segunda ordem da reação do peróxido de hidrogênio com a proteína é dada pela inclinação do gráfico de $(F/1-F) \cdot k_{\text{HRP}} \cdot [\text{HRP}] \times [\text{proteína}]$. Através deste método, a constante de segunda ordem aparente para a reação do peróxido de hidrogênio com a Bcp é $k_{\text{Bcp WT}} = 4,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ no pH 7,4 (figura 63A). Este resultado mostra que, ao contrário da eficiência catalítica subestimada na figura 61, a remoção catalítica de peróxido de hidrogênio pela Bcp é tão eficiente quanto a remoção por glutathione peroxidases dependentes de selênio e catalases. A constante de segunda ordem aparente da proteína mutante Bcp C83S ($k_{\text{Bcp C83S}} = 1,1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), medida pelo ensaio de cinética competitiva com HRP, também é da mesma ordem de grandeza daquela obtida para a Bcp WT (figura 63B), indicando que a reação de condensação entre o ácido sulfênico (Cys-47-SOH) e a cisteína de resolução (Cys-83) não interferiu significativamente na determinação.

$$\text{Equação 3: } \left(\frac{F}{1-F} \right) \cdot k_{\text{HRP}} \cdot [\text{HRP}] = k_{\text{Bcp}} \cdot [\text{Bcp}]$$

Figura 63. Determinação da constante de velocidade da reação entre as proteínas Bcp WT ou Bcp C83S e peróxido de hidrogênio por cinética competitiva com HRP. A reação (200 μl) foi realizada em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4 na presença de DTPA 0,1 mM, HRP 8 μM e concentrações variáveis de Bcp WT (em A) ou Bcp C83S (em B) reduzida (0 - 16 μM) a 37°C. Após 2 minutos da adição de peróxido de hidrogênio (4 μM), a formação do composto I da HRP foi monitorada a 403nm. Cada concentração de proteína foi analisada em triplicata.

A equivalência entre as constantes de segunda ordem aparente para a reação do peróxido de hidrogênio com as proteínas Bcp WT e Bcp C83S indica que, provavelmente, a maior atividade de Bcp C83S, verificada pelo ensaio FOX (ver figura 47), foi devido a maior facilidade de redução pelo DTT do ácido sulfênico formado na proteína, em comparação com a redução da ponte dissulfeto intramolecular formada na Bcp WT, que propriamente à uma possível maior reatividade da Cys-47 na Bcp C83S para hidroperóxidos. Fatores estruturais envolvidos na formação da ponte dissulfeto entre as Cys-47 e Cys-83 poderiam criar um impedimento estérico ao DTT (ver resultados descritos a seguir).

O método de cinética competitiva com HRP também foi utilizado para determinar o pK_a da cisteína do sítio ativo da proteína Bcp. A constante de segunda ordem para a reação do peróxido de hidrogênio com Bcp foi determinada em diversos pHs (figura 64), do mesmo modo que na figura 63. Como a constante de segunda ordem da reação do peróxido de hidrogênio com HRP é independente do pH somente na faixa entre pH 4,5 e 7,0 (Ogusucu e col., 2007), não foi possível atingir o platô superior da curva $k_{Bcp} \times pH$, porém, conseguimos traçar uma curva sigmoidal que se ajustou com aceitável correlação ($R^2 = 0,9919$) ao modelo sigmoidal de Boltzmann do programa *Prism 4*. O perfil da curva $k_{Bcp} \times pH$ mostrou um padrão monoprotico com pK_a igual a 6,2. O aumento do k_{Bcp} , com o aumento do pH, reflete o aumento da concentração da espécie desprotonada da cisteína peroxidásica (Cys-47), já que esta forma reage mais rapidamente com hidroperóxidos que a forma protonada. Portanto, este valor de pK_a corresponde ao pK_a da Cys-47 da Bcp de *X. fastidiosa*. Esse resultado indica que em pH fisiológico aproximadamente 90% da sulfidril da Cys-47 encontra-se na forma desprotonada (tiolato), que é mais reativa para redução de hidroperóxidos.

Figura 64. Variação da constante de segunda ordem da reação entre a Bcp e peróxido de hidrogênio em função do pH.

Este ensaio foi realizado na condição descrita na figura 63, exceto o tampão de trabalho utilizado em cada ponto: tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4,5 a 5,5) e tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,0 a 7,5).

Também aplicamos o método de cinética competitiva com HRP para a determinação da constante de segunda ordem da reação do peroxinitrito ($ONOO^-$) com Bcp. Através deste método, mostramos que Bcp é capaz de remover peroxinitrito com constante de segunda ordem aparente de $1,0.10^6 M^{-1}.s^{-1}$ (figura 65). Interessantemente, Bcp de *X. fastidiosa* possui constante de reação com peroxinitrito semelhante às AhpC de *S. typhimurium*, *M. tuberculosis* e *H. pylori* (Bryk e col., 2000) e às triparredoxina

peroxidases de *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi* (Trujillo e col., 2004), mas maior que as de Tsa1 e Tsa2 de *S. cerevisiae* ($k \sim 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, Ogasu e col., 2007).

Figura 65. Determinação da constante de velocidade da reação entre Bcp e peroxinitrito por cinética competitiva com HRP. A reação (200 μl) foi realizada em tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,4, na presença de DTPA 0,1 mM, HRP 8 μM e concentrações variáveis de Bcp reduzida (0 – 10 μM) a 37°C. Após 2 minutos da adição de peroxinitrito 8 μM, a formação do composto I da HRP foi monitorada a 403nm. Cada concentração de proteína foi analisada em triplicata.

O método de cinética competitiva com HRP é limitado à determinação da constante de segunda ordem da reação do peróxido de hidrogênio ou peroxinitrito com peroxirredoxinas. Uma possibilidade para determinar a constante de segunda ordem da proteína Bcp com outros hidroperóxidos seria utilizar a fluorescência intrínseca da proteína relacionada à resíduos de triptofano, como descrito por Trujillo e col. (2007). Este método é baseado no fato de que a intensidade de fluorescência intrínseca do triptofano varia com o estado de oxidação da proteína, devido à diferença de acessibilidade ao solvente. Diferentemente do método desenvolvido por Parsonage e col. (2005), que utiliza a fluorescência do resíduo de triptofano de uma tioredoxina, este método acompanha a mudança de fluorescência do triptofano da peroxirredoxina (a Prdx5 humana, no método descrito por Trujillo e col., 2007), que ocorre quando a proteína é oxidada pelo hidroperóxido. Bcp de *X. fastidiosa* possui dois resíduos de triptofano (Trp-33 e Trp-137) e apresenta um espectro de emissão de fluorescência característico destes resíduos quando excitados a 280 nm. Além disso, a oxidação com peróxido de hidrogênio da Bcp pré-reduzida resulta numa diminuição da intensidade do espectro de emissão de fluorescência, com aproximadamente 10% de diminuição no comprimento de máxima emissão (figura 66). Também conseguimos detectar a mudança da intensidade de fluorescência quando acompanhamos a oxidação da proteína com peróxido de hidrogênio e, posteriormente, a redução com TCEP (figura 67). Estes resultados indicaram que o método de mudança da fluorescência poderia ser útil para a determinação das constantes de velocidade da oxidação de Bcp por diferentes hidroperóxidos. Como a oxidação deve ser um processo muito rápido para ser monitorado em um fluorímetro comum, utilizamos um *stopped-flow spectrophotometer* (do laboratório da Profa. Dra. Ohara Augusto, Departamento de Bioquímica – IQ/USP) e acompanhamos a mudança de fluorescência, excitando a 280 nm e registrando o total de emissão a comprimentos acima de 320 nm (utilizando filtro de emissão). Estes estudos contaram com a ajuda do aluno de doutorado Danilo B. Medinas, orientado pela Profa. Dra. Ohara Augusto.

Figura 66. Mudança no espectro de emissão do Bcp após oxidação. A proteína Bcp pré-reduzida 2 μ M (em preto) foi tratada com peróxido de hidrogênio (20 μ M) por cinco minutos (em cinza) em tampão citrato de sódio 5 mM pH 5,0. Em ambos os casos, as amostras foram excitadas a 280 nm ($\lambda_{\text{excitação}} = 280$ nm).

Figura 67. Mudança na fluorescência da Bcp após tratamento com agentes oxidantes e redutores. Após zerar o fluorímetro, adicionamos a proteína Bcp WT pré-reduzida 2 μ M (indicado pela seta Bcp WT) e esperamos a fluorescência estabilizar. Então, adicionamos peróxido de hidrogênio 36 μ M (indicado pela seta H_2O_2), novamente peróxido de hidrogênio 36 μ M e, por fim, TCEP 125 μ M (indicado pela seta TCEP). O gráfico representa a intensidade de fluorescência emitida a 330 nm ($\lambda_{\text{excitação}} = 280$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 330$ nm).

Com o objetivo de validar o método de mudança da fluorescência de Bcp de *X. fastidiosa*, iniciamos nossos estudos utilizando peróxido de hidrogênio como substrato, cuja constante de segunda ordem foi determinada por cinética competitiva com HRP (figura 63). A cinética da oxidação de Bcp WT pelo peróxido de hidrogênio mostrou um comportamento exponencial de diminuição da intensidade de fluorescência em função do tempo, que se ajustou com aceitável correlação ($R^2 > 0,95$) à equação de decaimento exponencial ($Y = \text{platô} + Y_0 \cdot e^{-K \cdot X}$) do programa *Prism 4*. Através da utilização do programa *Prism 4* e trabalhando em condições de pseudo-primeira ordem (ou seja, com excesso molar de 10 vezes ou mais de peróxido de hidrogênio em relação à Bcp), determinamos as constantes de

velocidade observadas (k_{obs}). A constante de velocidade de segunda ordem para a reação entre Bcp pré-reduzida e peróxido de hidrogênio foi obtida a partir da inclinação da regressão linear de $k_{\text{obs}} \times [\text{hidroperóxido}]$ (figura 68A). A constante de velocidade de segunda ordem obtida ($k_{\text{Bcp WT}} \sim 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), porém, é três ordens de grandeza menor que aquela obtida pelo ensaio de cinética competitiva com HRP ($k_{\text{Bcp WT}} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, figura 63A).

Figura 68. Cinética de oxidação das proteínas Bcp WT e Bcp C83S mediada por peróxido de hidrogênio. A proteína pré-reduzida (5 μM) foi rapidamente misturada com peróxido de hidrogênio 250 μM em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4 contendo DTPA 0,1 mM, a 25°C, e o total de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} > 320 \text{ nm}$) foi monitorado ao longo de tempo. Gráfico interno: efeito do aumento da concentração de peróxido de hidrogênio na constante de velocidade observada (k_{obs}) para a mudança de intensidade de fluorescência da proteína. Cada concentração de peróxido de hidrogênio foi analisada em triplicata. Em **(A)**, cinética da oxidação da proteína Bcp WT. Em **(B)**, cinética da oxidação da proteína mutante Bcp C83S.

A mudança de fluorescência na Bcp WT pode ser o resultado de duas reações sequenciais:

Dependendo destas duas constantes de velocidade (k_A e k_B) e da concentração de peróxido de hidrogênio, o passo limitante na oxidação da enzima poderia ser a reação 1 ou a reação 2. Porém, se a reação 2 fosse a etapa limitante, implicaria que a constante de velocidade observada da oxidação da proteína (k_{obs}) não seria linearmente dependente da concentração de peróxido de hidrogênio (Trujillo e col., 2007), ao contrário do que foi observado (figura 68A, quadro interno). Apesar de ter encontrado linearidade na curva $k_{\text{obs}} \times [\text{peróxido de hidrogênio}]$ relativo a Bcp WT, não podemos definir qual das duas reações é o passo limitante da velocidade.

Para verificar experimentalmente se a formação da ponte dissulfeto intramolecular (k_B , reação 2) está limitando a velocidade de oxidação de Bcp pelo peróxido de hidrogênio (k_A , reação 1), monitoramos a mudança de fluorescência devido à oxidação da proteína mutante Bcp C83S, no qual a reação 2 de formação da ponte dissulfeto intramolecular não ocorre (figura 68B). Porém, Bcp C83S apresentou constante de segunda ordem semelhante à Bcp WT ($\sim 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), permitindo excluir a possibilidade de que a formação da ponte dissulfeto intramolecular esteja limitando a reação de oxidação da proteína pelo hidroperóxido. Como pode ser observado na figura 68, somente a amplitude da mudança de fluorescência entre as proteínas Bcp WT ($\Delta \sim 0,45$) e Bcp C83S ($\Delta \sim 0,30$), numa mesma concentração de peróxido de hidrogênio, é alterada pela ausência da cisteína de resolução (Cys-83).

Outra possibilidade para os valores comparativamente baixos obtidos nos experimentos de fluorescência seria que, ao invés de medir a velocidade de oxidação da Bcp, estaríamos medindo a velocidade de superoxidação da proteína, como descrito pela reação 3.:

Neste caso, a mudança de fluorescência seria decorrente da superoxidação e não da oxidação da proteína e, portanto, a constante de segunda ordem obtida seria a velocidade de oxidação do ácido sulfênico formado na Cys-47 à ácido sulfínico, representada na reação 3 por k_C . Para corroborar ou excluir essa possibilidade, acompanhamos a emissão de fluorescência durante a oxidação de Bcp WT com equivalentes equimolares ou submolares de peróxido de hidrogênio. Nessas condições, a possibilidade de superoxidação é muito baixa e, portanto, não deveria haver mudança de emissão de fluorescência se ela estivesse relacionada com a superoxidação da proteína.

A inclinação inicial relativa à mudança de fluorescência e a amplitude desta mudança, porém, foram equivalentes à apresentada pela oxidação da Bcp WT com quantidade maior ou igual a 10 equivalentes molares de peróxido de hidrogênio (figura 69A). Mesmo com um pequeno excesso de peróxido de hidrogênio, não houve mudança na amplitude da mudança da fluorescência (figura 69A, linha laranja). Para Bcp C83S, onde o ácido sulfênico não é resolvido devido a ausência da cisteína de resolução, a oxidação com um pequeno excesso de hidroperóxido (1 Bcp:1,5 H_2O_2) parece conduzir a um aumento na emissão de fluorescência (figura 69B). Esse aumento da fluorescência, porém, ocorre

apenas quando toda a proteína está oxidada. Do mesmo modo, as amplitudes da mudança de fluorescência da Bcp WT e da Bcp C83S devido a oxidação com excesso de peróxido de hidrogênio foram constantes em todos os experimentos realizados, indicando que é pouco provável que a superoxidação, mesmo num excesso de 50 vezes de peróxido de hidrogênio (1 Bcp:50 H_2O_2), interfira na velocidade de oxidação pelo hidroperóxido.

Figura 69. Efeito de concentrações equimolares de peróxido de hidrogênio na cinética de oxidação das proteína Bcp WT e Bcp C83S. A proteína pré-reduzida (5 μM) foi rapidamente misturada com quantidades crescentes de peróxido de hidrogênio – 1,25 μM (preto), 2,50 μM (azul), 3,75 μM (vermelho), 5,00 μM (verde) e 7,50 μM (laranja) – em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4 contendo DTPA 0,1 mM, a 25°C, e o total de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} > 320 \text{ nm}$) foi monitorado ao longo de tempo. Em **(A)**, cinética da oxidação da proteína Bcp WT. Em **(B)**, cinética da oxidação da proteína Bcp C83S.

Como a mudança na intensidade da fluorescência do triptofano ocorre devido à diferença de acessibilidade ao solvente entre as formas reduzida ou oxidada, pode ser que o rearranjo estrutural responsável por essa mudança ocorra em uma velocidade mais lenta que a velocidade de oxidação da Cys-47 na Bcp. Como as proteínas Bcp WT e a Bcp C83S possuem constantes de velocidade, medida pelo método de fluorescência, na mesma ordem de grandeza ($k \sim 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), podemos especular que a constante que estamos medindo refere-se a uma mudança conformacional que ocorre num evento posterior a oxidação por peróxido de hidrogênio da Cys-47 à ácido sulfênico, conforme a reação:

Em princípio, se o passo referente à reação 4 é responsável pela mudança na intensidade de fluorescência, o processo seria de ordem zero em relação a concentração de hidróperóxido e, portanto, não deveria ser dependente da concentração de hidróperóxido. Este não é o caso, pois a constante de segunda ordem depende da concentração de peróxido de hidrogênio (figura 68).

Outra possibilidade seria a existência de uma reação de segunda ordem da Bcp com o peróxido de hidrogênio (distinta do tiolato da cisteína peroxidásica), que resultaria numa constante na ordem de $10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Esta reação alternativa, que poderia incluir a reação de outras cisteínas, não ocorre porém na ausência da cisteína peroxidásica (figura 70), indicando o envolvimento da Cys-47 na mudança de intensidade de fluorescência medida.

Figura 70. Efeito do peróxido de hidrogênio na intensidade de fluorescência da proteína mutante Bcp C47S. Bcp C47S pré-reduzida (5 μM) foi rapidamente misturada com peróxido de hidrogênio 250 μM em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4 contendo DTPA 0,1 mM, a 25°C, e o total de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} > 320 \text{ nm}$) foi monitorado ao longo de tempo.

Desta forma, a compreensão dos mecanismos envolvidos na mudança de fluorescência dependente do estado redox da Bcp de *X. fastidiosa* não é clara. Como será mostrado adiante, o conhecimento do microambiente estrutural no qual esses resíduos de triptofano estão inseridos, adicionam novos dados para o entendimento desse processo (ver figura 89).

Os parâmetros cinéticos obtidos nos estudos realizados estão compilados na tabela X. Independente das limitações de cada método utilizado para a determinação dos parâmetros cinéticos da

proteína Bcp, podemos concluir que a eficiência de redução de hidroperóxidos é da mesma ordem de grandeza ($k \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) que a eficiência catalítica de glutathione peroxidases dependentes de selênio e catalases. Se considerarmos que a proteína possui eficiência catalítica ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) semelhante para peróxido de hidrogênio e CHP, e relativamente menor para TBHP, podemos afirmar que Bcp é capaz de reduzir CHP com a mesma eficiência que reduz peróxido de hidrogênio ($k \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) conforme foi determinado pelo método de cinética competitiva com HRP.

Tabela X. Compilação dos parâmetros cinéticos da Bcp WT.

Substrato	Parâmetros Cinéticos					Ensaio Enzimático
	$V_{\text{max}} (\text{M} \cdot \text{s}^{-1})$	$K_{\text{M}} (\text{M})$	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$k (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	
H ₂ O ₂	$1,25 \cdot 10^{-8}$	$1,94 \cdot 10^{-6}$	$1,25 \cdot 10^{-2}$	$6,46 \cdot 10^3$	---	Estado estacionário (monosubstrato)
TBHP	$1,43 \cdot 10^{-8}$	$24,0 \cdot 10^{-6}$	$1,43 \cdot 10^{-2}$	$0,60 \cdot 10^3$	---	
CHP	$1,16 \cdot 10^{-8}$	$3,23 \cdot 10^{-6}$	$1,17 \cdot 10^{-2}$	$3,61 \cdot 10^3$	---	
H ₂ O ₂	$2,14 \cdot 10^{-7}$	$18,1 \cdot 10^{-6}$	$6,15 \cdot 10^{-2}$	$3,40 \cdot 10^3$	---	
TBHP	$1,94 \cdot 10^{-7}$	$92,4 \cdot 10^{-6}$	$5,58 \cdot 10^{-2}$	$0,60 \cdot 10^3$	---	
CHP	$1,83 \cdot 10^{-7}$	$13,5 \cdot 10^{-6}$	$5,25 \cdot 10^{-2}$	$3,89 \cdot 10^3$	---	
TsnC	$4,77 \cdot 10^{-8}$	$1,91 \cdot 10^{-6}$	$23,8 \cdot 10^{-2}$	$1,25 \cdot 10^5$	---	
H ₂ O ₂	$2,43 \cdot 10^{-7}$	$22,8 \cdot 10^{-6}$	$110 \cdot 10^{-2}$	$4,84 \cdot 10^4$	---	Estado estacionário (bisubstrato)
TsnC		$6,78 \cdot 10^{-6}$		$1,62 \cdot 10^5$	---	
TBHP	$0,89 \cdot 10^{-7}$	$72,5 \cdot 10^{-6}$	$40,8 \cdot 10^{-2}$	$0,56 \cdot 10^4$	---	
TsnC		$3,03 \cdot 10^{-6}$		$1,34 \cdot 10^5$	---	
CHP	$4,41 \cdot 10^{-7}$	$37,5 \cdot 10^{-6}$	$200 \cdot 10^{-2}$	$5,34 \cdot 10^4$	---	
TsnC		$12,2 \cdot 10^{-6}$		$1,64 \cdot 10^5$	---	
H ₂ O ₂	---	---	---	---	$4,53 \cdot 10^7$	Competição com HRP
ONOO ⁻	---	---	---	---	$1,04 \cdot 10^6$	
H ₂ O ₂	---	---	---	---	$2,12 \cdot 10^4$	Fluorimétrico

Em princípio, a razão $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ reflete as respectivas constantes de segunda ordem porém, como mencionado acima, as análises em estado estacionário compreendem outros processos além de reações de óxido-redução. Aparentemente, nas análises em estado estacionário, a afinidade de Bcp por TsnC é maior que a afinidade pelos hidroperóxidos ($K_{\text{M(TsnC)}} < K_{\text{M(hidroperóxido)}}$) e, portanto, *in vitro* a proteína é saturada mais rapidamente pela tioredoxina que pelo hidroperóxido. O K_{M} menor para a TsnC implica que a eficiência catalítica de redução da Bcp pela TsnC é maior que a eficiência catalítica de

redução de hidroperóxido pela Bcp (onde $\frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{M}}} = \frac{V_{\text{max}} \cdot [\text{Bcp}]^{-1}}{K_{\text{M}}}$). Este resultado é concordante com o

apresentado por Rouhier e col. (2004), no qual a PrxQ de Poplar (*Populus tremula* x *Populus tremuloides*) é saturável com concentrações de tioredoxina entre 5 e 10 μM ($K_{\text{M(Trx h3)}} = 1,5 \mu\text{M}$) e possui K_{M} para peróxido de hidrogênio de 375 μM , que reflete uma eficiência catalítica para o hidroperóxido de $7,98 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Estes resultados para peróxido de hidrogênio também são comparáveis àqueles obtidos para a Bcp de *E. coli* ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 2,45 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; Jeong e col., 2000) e para a 2-Cys Prx de *Hordeum*

vulgare ($k_{\text{cat}}/K_M = 3,6 \cdot 10^4$; Konig e col., 2002). É importante salientar que os resultados da literatura também foram obtidos através do ensaio de oxidação de NADPH dependente do sistema tiorredoxina.

Como discutido anteriormente, atualmente é aceito que a eficiência das peroxirredoxinas é mais adequadamente comparada pelo uso da constante de segunda ordem ($k_{\text{hidroperóxido}}$), calculada através da reação bimolecular da proteína reduzida com o hidroperóxido por cinética rápida, e pela concentração relativa das proteínas em consideração (Fourquet e col., 2008). Neste sentido, a caracterização destas proteínas pelo uso da eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), que obedece a equação de Michaelis-Menten, não pode ser extrapolada para as condições fisiológicas de baixa razão hidroperóxido/peroxirredoxina. Como mostrado anteriormente, a determinação da constante de segunda ordem por métodos diretos (Trujillo e col., 2007) ou de competição (Ogusucu e col., 2007) indicam que as peroxirredoxinas são tão eficientes quanto glutational peroxidases dependentes de selênio e catalases. Além disso, se considerarmos sua alta concentração intracelular, as peroxirredoxinas podem ser consideradas importante decompositores de hidroperóxidos. As catalases, porém, serão mais eficientes que as peroxirredoxinas em níveis elevados de hidroperóxidos, uma vez que peroxirredoxinas são enzimas saturáveis, ao contrário das catalases. Nesta situação, a velocidade de regeneração torna-se limitada pela baixa constante de segunda ordem de redução da peroxirredoxina (por exemplo, pelo sistema tiorredoxina), pela concentração de tiorredoxina ou pelo rápido consumo da tiorredoxina reduzida. Em condições de alta concentração de hidroperóxido, por exemplo, a baixa concentração de tiorredoxina impede que as peroxirredoxinas sejam tão eficientes quanto glutational peroxidase, que são favorecidas pelas altas concentrações intracelulares de glutational. Assim, a alta reatividade das peroxirredoxinas frente à hidroperóxidos e sua abundância permitem que estas proteínas eficientemente reduzam baixos níveis de hidroperóxidos.

Como sugerido para a Prx2 de eritrócitos, as peroxirredoxinas atuam como coletores não-catalíticos de hidroperóxidos (Low e col., 2007). Portanto, a importância fisiológica das peroxirredoxinas não pode ser determinada apenas a partir de sua eficiência catalítica (ou seja, o quão rapidamente a proteína reage com hidroperóxido), mas também depende de sua concentração, sendo regido pela equação de velocidade: $v = k_{\text{peroxirredoxina}} [\text{peroxirredoxina}] [\text{hidroperóxido}]$. Neste contexto, o papel antioxidante das peroxirredoxinas é favorecido pela sua alta constante de segunda ordem da reação com hidroperóxido e também pela sua alta abundância (Winterbourn, 2008).

Estrutura cristalográfica da proteína mutante Bcp C47S

Os experimentos para cristalização e refinamento da condição de cristalização da proteína Bcp WT não resultaram em cristais de boa qualidade para os experimentos de difração de raios-X. Testamos 544 condições diferentes e, para cada condição, a proteína foi testada sem tratamento, tratada com TCEP (10 mM) e com peróxido de hidrogênio (1 mM), em três diferentes concentrações de proteína (5, 10 e 15 mg/ml). Infelizmente, em nenhuma das condições encontramos cristais promissores para posterior refinamento. Como alternativa, realizamos triagens, nas mesmas condições descritas acima, utilizando a proteína mutante Bcp C47S. Como a Cys-47 é a cisteína peroxidásica da Bcp WT e deve ter grande mobilidade no ambiente protéico, havia a possibilidade desta cisteína atrapalhar a cristalização da proteína e também a qualidade dos dados de difração a serem obtidos. Coerentemente à essa idéia, obtivemos cristais em diversas condições de cristalização da Bcp C47S na triagem inicial e, para o refinamento da condição de cristalização, elegemos o tampão que consistia em Hepes-NaOH 100 mM pH 7,5 e PEG-8000 20% (m/v), como condição inicial. O refinamento da condição de cristalização, realizado através do método Reichert, não resultou em cristais de melhor qualidade que os obtido na triagem inicial, por isso utilizamos estes cristais nos experimentos de difração de raios-X (figura 71A).

Os dados de difração de raios-X do cristal de Bcp C47S, coletados na linha W01B-MX2 do LNLS revelaram significativa difração com resolução de até 1,55 Å (figura 71B). O processamento dos dados, utilizando o programa *MOSFLM* (Leslie e col., 1992), mostrou que o cristal de Bcp C47S pertence ao grupo espacial $P2_12_12_1$ (sistema cristalino ortorrômbico). O coeficiente de Matthews sugeriu a existência de apenas uma molécula por unidade assimétrica, com V_M igual a $1,9 \text{ Å}^3 \cdot \text{Da}^{-1}$ e um conteúdo de solvente de 35,9%. Os experimentos de cristalização, a coleta de dados de difração de raios-X e o processamento dos dados obtidos foram realizados com o auxílio da aluna de doutorado Karen Fulan Discola.

Figura 71. Cristais e padrão de difração de raios-X da proteína mutante Bcp C47S de *X. fastidiosa*. (A) Cristais obtidos pelo método de gota sentada. Nesta imagem, o tamanho dos cristais não reflete seu tamanho original. **(B)** Padrão de difração de raios-X na resolução de 1,55 Å.

O refinamento da estrutura de Bcp C47S foi efetuado em cooperação com o Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira (Departamento de Biologia, Campus Experimental do Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista – UNESP). A estrutura de Bcp C47S foi resolvida através da utilização das coordenadas da triparredoxina peroxidase de *Crithidia fasciculata* (PDB 1E2Y; com 30% de identidade com a Bcp de *X. fastidiosa*; Alphey e col., 2000). Apesar da baixa identidade entre as proteínas, o ciclo inicial de refinamento, utilizando o programa *REFMAC 5.0* (Pannu, 1998), resultou em $R_{\text{factor}} = 42,3$ e $R_{\text{free}} = 56,4$. Após a inspeção visual da molécula, utilizando o programa *Coot v.0.5.2* (Emsley e col., 2004), os aminoácidos foram mutados e ajustados ao mapa de densidade eletrônica, e aqueles que não apresentavam densidade de boa qualidade no mapa 2fo-fc ($\sigma_{1,3}$) foram removidos, o que resultou em fatores mais próximos entre si ($R_{\text{factor}} = 46,4$ e $R_{\text{free}} = 51,2$). Após 32 ciclos de refinamento e reconstrução, o modelo final da Bcp C47S apresentou $R_{\text{factor}} = 19,3$ e $R_{\text{free}} = 23,6$, o que demonstra uma notável queda nos fatores e indica um bom refinamento da estrutura. Os dados cristalográficos e as estatísticas de refinamento estão sumarizados na tabela XI. A análise de Ramachandran, utilizando o programa *Procheck v.3.4.4* (Laskowski e col., 1993), revela que todos os aminoácidos possuem combinações de ϕ (ângulo de rotação phi) e ψ (ângulo de rotação psi) em regiões não conflitantes do diagrama (figura 72).

Tabela XI. Dados cristalográficos e estatísticas de refinamento da Bcp C47S¹.

Resolução (Å)	49,94 – 1,60 (1,64 – 1,60)	Átomos não-hidrogênio	
Grupo Espacial	$P2_12_12_1$	proteína	1232
Parâmetros da Célula Unitária		água	192
a (Å)	38,97	$R_{\text{factor}}/R_{\text{free}}$ (%)	19,3/23,6
b (Å)	39,74	RMSD ²	
c (Å)	99,84	ligações (Å)	0,013
$\alpha = \beta = \gamma$ (°)	90,00	ângulos (°)	1,410
Comprimento de onda (Å)	1,55	B-factor	
Temperatura (K)	100	cadeia principal	17,17
Número de reflexões únicas	19697	cadeias laterais e águas	22,31
Número de reflexões		Análise de Ramachandran (%)	
de trabalho	15312	regiões mais favorecidas	93,3
teste	1385	regiões adicionais permitidas	6,7
Completeza (%)	98,01 (95,46)		
I/σ (I)	31,8 (6,1)		
R_{sym} (%)	6,3 (36,9)		

¹os valores em parênteses referem-se aos dados obtidos na maior camada de resolução atingida.

²root mean square deviation

Figura 72. Diagrama de Ramachandran da estrutura cristalográfica da Bcp C47S de *X. fastidiosa*. Dos 158 resíduos de aminoácidos presentes no modelo final, 93,3% se localizam em regiões mais favorecidas (A, B e L), enquanto 6,7% se localizam em regiões adicionalmente favorecidas, desconsiderando os resíduos de glicina e prolina (10 e 7 resíduos, respectivamente).

O modelo final da Bcp C47S possui 158 aminoácidos do total de 179 resíduos presentes na proteína, sendo os três aminoácidos N-terminais pertencentes à cauda de poli-histidina (Gly[-2], Ser[-1] e His[0]), e 192 moléculas de água. Devido à ausência de densidade eletrônica definida, não foi possível modelar integralmente as cadeias laterais dos resíduos de Lys-41, Asp-97 e Lys-141. Também não foi possível modelar as cadeias laterais dos resíduos Lys-157 e Glu-158, que foram assinalados como alaninas. Por não apresentarem densidade eletrônica, não foram incluídos no modelo os resíduos de aminoácidos de 111 a 116, que estão contidos em um *loop* central da proteína, e o aminoácido C-terminal Gln-159. A ausência de densidade eletrônica destes resíduos pode ser explicada pela grande mobilidade destas regiões protéicas (figura 73).

Figura 73. Distribuição do fator de temperatura da Bcp C47S de *X. fastidiosa*. A proteína apresenta um fator B médio de 17,6. O fator B se apresenta muito aumentado nas regiões N-terminal e C-terminal, ultrapassando 30 unidades, e na região do *loop* central (aminoácidos de 111 a 116). Os pontos pretos indicam o fator B dos resíduos de cisteína.

Como todas as peroxirredoxinas já descritas, a Bcp de *X. fastidiosa* apresenta o enovelamento básico tiorredoxina, que se caracteriza por uma folha β central formada por fitas β (neste caso cinco fitas β) que são flanqueadas por cinco α hélices (Declercq e col., 2001). A unidade assimétrica é constituída por um monômero (figura 74) e, provavelmente, equivale a unidade biológica, pois ortólogos de Bcp são

monoméricos (Copley e col., 2004). A estrutura de Bcp C47S de *X. fastidiosa* é do tipo α/β , formada por seis α hélices e nove fitas β , que se ordenam da porção N-terminal para a porção C-terminal de forma $\alpha 1$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 2$ - $\beta 3$ - $\alpha 3$ - $\beta 4$ - $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$ - $\beta 6$ - $\beta 7$ - $\beta 8$ - $\beta 9$ - $\alpha 6$ (figura 75). Portanto, existem inserções e extensões de estruturas secundárias ao enovelamento tiorredoxina básico. A composição de estruturas secundárias da Bcp de *X. fastidiosa*, determinada pelo programa *DSSP* (Kabsch e Sander, 1983), é de 38,7 % de α hélices (com 60 aminoácidos envolvidos), 24,5 % de fitas β (com 38 aminoácidos envolvidos) e 36,8 % de outras estruturas (com 57 aminoácidos envolvidos).

Figura 74. Estrutura de Bcp C47S de *X. fastidiosa* em visão estéreo. A estrutura está representada em *cartoon* e são assinaladas a porção N-terminal, C-terminal e a região do *loop* contendo os resíduos de aminoácidos de 111 a 116, que está ausente na estrutura final. Todas as representações gráficas mostradas neste capítulo foram geradas com a utilização do programa *PyMOL* (DeLano Scientific LLC.)

Legenda:

estrutura secundária: α hélice fita β enovelamento randômico
 acessibilidade estimada ao solvente: mais enterrada mais acessível
 região de Ramachandran: favorecido permitido

Figura 75. Elementos da estrutura secundária da Bcp C47S e acessibilidade estimada dos aminoácidos. Ao longo da cadeia, da porção N-terminal para C-terminal, o diagrama mostra a ordenação dos elementos estruturais, a posição de cada aminoácido no diagrama de Ramachandran (ver figura 72) e sua acessibilidade ao solvente. Obtido através do programa *PROCHECK* (Laskowski e col., 1993).

A comparação da estrutura de Bcp C47S de *X. fastidiosa*, utilizando o programa *Coot* v.0.5.2 (Emsley e Cowtan, 2004), com peroxirredoxinas das classes II, III e IV (de acordo com a classificação sugerida por Copley e col., 2004), revela que os elementos da estrutura secundária e a organização terciária são altamente conservadas, apesar da baixa ou ausente homologia compartilhada na sequência de aminoácidos (tabela XII, figura 76).

Tabela XII. Alinhamento de estrutura terciária da Bcp C47S de *X. fastidiosa* com outras peroxirredoxinas.

classe ¹	proteína representante	GI	PDB ID ²	Identidade ³	número de C _α alinhados ⁴	RMSD ⁴	figura 76
II	TPx de <i>S. pneumoniae</i>	116517222	1PSQ	--- ⁵	139	1,910 Å	A
III	PrxV humana	6563212	1OC3	40 % ⁶	135	1,904 Å	B
IV	TPx humana	32189392	1QMV	35 % ⁷	143	1,483 Å	C

¹ classificação sugerida por Copley e col. (2004);

² PDB ID: 1PSQ (Kniewel e col., New York SGX Research Center for Structural Genomics (NYSXRC), "Structure of a probable thiol peroxidase from *Streptococcus pneumoniae*", dados não publicados); 1OC3 (Evrard e col., 2004); e 1QMV (Schröder e col., 2000);

³ identidade de sequência de aminoácidos, determinada pelo programa BLASTP 2.2.20+;

⁴ alinhamento de estrutura terciária determinado pelo programa *Coot* v0.5.2 (Emsley e Cowtan, 2004);

⁵ sem identidade significativa em 159 aminoácidos da TPx de *S. pneumoniae*;

⁶ identidade em 20 de 162 aminoácidos da PrxV humana;

⁷ identidade em 90 de 198 aminoácidos da TPx humana.

Figura 76. Alinhamento da estrutura terciária da peroxirredoxina Bcp C47S com peroxirredoxinas das diferentes classes estruturais. A estrutura de Bcp C47S de *X. fastidiosa* (em azul) foi espacialmente alinhada com: (A) TPx de *S. pneumoniae* (em vermelho; PDB ID: 1PSQ); (B) PrxV humana (em laranja; PDB ID: 1OC3); e (C) TPx de eritrócito humano (em ciano; PDB ID: 1QMV).

Apesar da estrutura de Bcp C47S de *X. fastidiosa* ter sido resolvida, utilizando a estrutura da triparredoxina peroxidase de *C. fasciculata* (PDB ID: 1E2Y; Alpey e col., 2000) como modelo, havia três estruturas cristalográficas de proteínas da mesma classe da Bcp de *X. fastidiosa* (classe estrutural I das peroxirredoxinas, pela classificação sugerida por Copley e col., 2004) depositadas no *RCSB Protein Data*

Bank: duas estruturas da Bcp de *Aeropyrum pernix* K1 (PDB ID: 2CX3 e 2CX4; Mizohata e col., RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative (RSGI), “Crystal structure of a bacterioferritin comigratory protein peroxiredoxin from the *Aeropyrum pernix* K1 (form-1 and form-2 crystals)”, dados não publicados) e uma estrutura de peroxirredoxina de *Sulfolobus tokodaii* (PDB 2YWN; Ebihara e col., RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative (RSGI), “Crystal structure of peroxiredoxin-like protein from *Sulfolobus tokodaii*”, dados não publicados). Diferentemente da Bcp de *X. fastidiosa*, que pertence ao subgrupo das PrxQ β (de acordo com a divisão proposta por Wakita e col., 2007), estas proteínas pertencem ao subgrupo das PrxQ α (ver figura 16). A utilização das coordenadas destas PrxQ α não possibilitaram a resolução da estrutura da proteína de *X. fastidiosa* em protocolos de substituição molecular, devido ou a baixa identidade da sequência de aminoácidos entre a Bcp de *X. fastidiosa* e as PrxQ α (figura 77), e/ou a diferenças significativas do enovelamento terciário das proteínas.

A

```

1  - MNI GDTLNHSLLNHPLMLSGSTCKT LSDYTNQWL VLYFYPKDNTPGCSTEGLEF Bcp Xylella fastidiosa
1  MVELGEKAPDFTLPNQDFEPVNLVEVLK- - RGRPAVLFFPAAFSPVCTKELCTF Bcp Aeropyrum pernix

55 NLLLPQFEQI NATVLGVS RDSVKSHDSFCAKQGFTFPLVSDSDAI LCKAFDVI KE Bcp Xylella fastidiosa
54 RDKMAQLKANAELVLAISVDSPWCLKKFKDENRLAFNLSDYNREVI KLYNVYHE Bcp Aeropyrum pernix

110 KTMYGROVI GI ERSTFLI GPTHRI VEAWR- - - QVKVPGHAEVLNKLKAHAEO Bcp Xylella fastidiosa
109 D- LKGLKMW- AKRAVEI VKPDGTVA YKWVT DNPLNEPYDEI VVREANKI AGE LVA Bcp Aeropyrum pernix

```

B

```

1  - MNI GDTLNHSLLNHPLMLSGSTCKT LSDYTNQWL VLYFYPKDNTPGCSTEGLEF Bcp Xylella fastidiosa
1  MVEI GELAPDFELPDTELKK- - - VKLSALKGKVVVLAFYPAAFITQVCTKEMCTF Prx Sulfolobus tokodaii

55 NLLLPQFEQI NATVLGVS RDSVKSHDSFCAKQGFTFPLVSDSDAI LCKAFDVI KE Bcp Xylella fastidiosa
52 RDSMAKFNQVNAVVLGISVDPPFSNKAFKEHNKLNETI LSDYNREVVKKYNVAVE Prx Sulfolobus tokodaii

110 KTMYGROVI GI ERSTFLI GPTHRI VEAWR- - - QVKVPGHAEVLNKLKAHAEO Bcp Xylella fastidiosa
107 FPALPGYVL- AKRAVEI DKEGKVRYKWSDDPTKEP: PYDEI EKVVKSLS Prx Sulfolobus tokodaii

```

Figura 77. Alinhamento de aminoácidos da Bcp de *X. fastidiosa* com as proteínas **(A)** Bcp de *A. pernix* (PDB ID: 2CX3 e 2CX4; GI: 118431740) e **(B)** Prx de *S. tokodaii* (PDB ID: 2YWN; GI: 15922097). Bcp de *X. fastidiosa* apresenta 29% de identidade com as proteínas Bcp de *A. pernix* e Prx de *S. tokodaii* (determinadas por BLASTP 2.2.20+).

Todas as estruturas protéicas das PrxQ α presentes no *RCSB Protein Data Bank* foram determinadas em projetos de genoma estrutural, depositadas entre 2005 e 2007, mas em nenhum caso foram publicados artigos em periódicos indexados, descrevendo detalhes das respectivas estruturas. O alinhamento da estrutura terciária da Bcp C47S de *X. fastidiosa* com as duas estruturas da Bcp de *A. pernix* depositadas resultam em RMSD de 1,821 Å (com 125 C α alinhados, PDB ID: 2CX3, figura 78A) e 1,785 Å (com 139 C α alinhados, PDB ID: 2CX4, figura 78B). O alinhamento da estrutura terciária da Bcp C47S de *X. fastidiosa* com a estrutura da Prx de *S. tokodaii* (PDB ID: 2YWN) resultou, por sua vez, em RMSD de 1.973 Å, com 124 C α alinhados (figura 78C). Os desvios observados nos alinhamentos (~1,8 Å) demonstram que, apesar de pertencerem à mesma classe estrutural, a Bcp de *X. fastidiosa* apresenta maior identidade terciária com proteínas da classe IV (~ 1,5 Å, ver tabela XII e figura 76C). Desta forma, os resultados obtidos nos alinhamentos explicam o motivo dos protocolos de substituição molecular não obterem sucesso quando foram utilizadas coordenadas de proteínas do subgrupo das PrxQ α .

Figura 78. Alinhamento da estrutura terciária da Bcp C47S de *X. fastidiosa* com as proteínas do subgrupo das PrxQ α . (A) Alinhamento da Bcp C47S de *X. fastidiosa* (em azul) com a forma cristalográfica 1 da Bcp de *A. pernix* (em rosa; PDB ID: 2CX3, cadeia A); (B) alinhamento com a forma cristalográfica 2 da Bcp de *A. pernix* (em verde; PDB ID: 2CX4, cadeia D); e (C) alinhamento com a Prx de *S. tokodaii* (em amarelo, PDB ID: 2YWN).

Como mencionado anteriormente, para a obtenção do cristal foi necessário a substituição da Cys-47 por uma serina. A análise deste resíduo, na estrutura final, revela que a Ser-47 é encontrada em duas formas rotaméricas (denominadas, rotâmeros A e B; figura 79). O rotâmero A é estabilizado por interações polares diretas do átomo O γ da cadeia lateral da Ser-47, com os átomos da cadeia principal da Lys-41 (átomo O), da cadeia lateral da Thr-44 (átomo O γ) e da cadeia lateral da Arg-122 (átomo N $_{\eta 1}$). Adicionalmente, uma molécula de água (H $_2$ O-118) articula interações indiretas entre a Ser-47 (átomo O γ) e os átomos dos aminoácidos Lys-41 (átomos O e N) e Thr-44 (átomo O γ). No rotâmero B, por sua vez, são encontradas apenas interações polares diretas da Ser-47 (átomo O γ) com os átomos dos aminoácidos Lys-41 (átomo O), Thr-44 (átomos O, N e O γ) e Ser-48 (átomo N).

Figura 79. Estabilização dos rotâmeros da Ser-47. Rotâmero A estabilizado por várias interações polares diretas e indiretas (intermediada pela H $_2$ O 118). **Rotâmero B** estabilizado por interações polares diretas. A cadeia principal da Arg-122 e da Ser-47 não estão mostradas. Apenas a cadeia principal da Lys-41 e parte da cadeia principal da Ser-48 estão mostradas. Os aminoácidos estão coloridos pelo esquema CPK: carbono (verde), oxigênio (vermelho) e nitrogênio (azul). A molécula de água está representada como uma esfera magenta.

A conformação do rotâmero A apresenta semelhanças com a tríade catalítica (Arg, Cys e Thr) das peroxirredoxinas (Flohé e col., 2002; Wood e col., 2003). Na estrutura de Bcp C47S, o átomo S_γ no aminoácido 47, foi substituído por um oxigênio (mutação Cys→Ser), como em diversas estruturas descritas para peroxirredoxinas, até o momento. Portanto, a forma mais provável assumida pela cadeia lateral da Cys-47 seria aquela representada pelo rotâmero A, no qual o átomo distal da cadeia lateral (átomo S_γ) é estabilizado diretamente pela cadeia lateral da Arg-122, que está a uma distância de 3,22 Å. Esta proposição é justificada pelo fato de que a alta reatividade da cisteína peroxidásica (Cys-47) está relacionada com o ambiente protéico, no qual é necessária a existência de um aminoácido de caráter básico responsável pela desprotonação da cisteína peroxidásica (normalmente um resíduo de arginina ou histidina), como foi demonstrado para diversas peroxirredoxinas (Wood e col., 2003).

A análise estrutural do sítio catalítico da Bcp C47S de *X. fastidiosa*, modelada com o resíduo de cisteína na posição do rotâmero A da Ser-47, mostra que o resíduo Arg-122 está numa posição vicinal a cisteína peroxidásica (Cys-47), provavelmente auxiliando na sua desprotonação (figura 80). Esta configuração parece ser mantida pela contribuição de um resíduo Glu-50, que forma ponte salina com a Arg-122, posicionando-a em relação a Cys-47. Também encontramos outros resíduos que contribuem para a arquitetura do sítio catalítico, como a Pro-40, que limita a acessibilidade do solvente e do hidroperóxido à cisteína peroxidásica, protegendo o intermediário ácido sulfênico da superoxidação (Wood e col., 2003), e a Thr-44 que, através de ponte de hidrogênio com a cisteína peroxidásica, a orienta em relação a Arg-122 e a posiciona para o ataque nucleofílico ao substrato (Copley e col., 2004). Apesar do aminoácido 41 não ser conservado em peroxirredoxinas (na Bcp de *X. fastidiosa* é uma lisina), a conformação da sua cadeia principal é funcionalmente importante. A amida da ligação peptídica do resíduo 41 interage indiretamente com a S_γ da Cys-47, enquanto o oxigênio carbonílico forma uma ponte de hidrogênio com o átomo S_γ da Cys-47 (Wood e col., 2003). Estas características são apontadas como os principais responsáveis pelo baixo pK_a da cisteína peroxidásica, conforme determinado neste trabalho ($pK_a = 6,2$; ver figura 64).

Figura 80. Interações polares no sítio catalítico da Bcp de *X. fastidiosa*. Apenas as cadeias laterais de alguns aminoácidos selecionados são mostradas. As interações polares são representadas por tracejados pretos. Os resíduos estão representados por esferas e bastões, coloridos pelo esquema CPK: carbono (verde), oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul) e enxofre (amarelo). Nesta estrutura, a Ser-47 (rotâmero A) está substituída por cisteína (Cys-47). Em magenta, molécula de H₂O-118.

Além disso, as interações mostradas acima indicam que a substituição Cys→Ser na posição 47, possivelmente não interfere nas interações esperadas na proteína selvagem. Provavelmente, a estrutura cristalográfica de Bcp C47S, elucidada neste trabalho, mimetiza a estrutura da Bcp WT no seu estado

reduzido, ou seja, com as cisteínas peroxidásica e de resolução na forma de tióis. No estado reduzido, como será mostrado adiante, a cisteína peroxidásica de 2-Cys Prx se encontram em uma α hélice, ao passo que na forma oxidada, parte da estrutura secundária é desfeita (Wood e col., 2003).

As localizações das outras cisteínas em relação a Ser-47, na estrutura de Bcp de *X. fastidiosa* (Cys-23, Cys-83 e Cys-101), reforçam o papel da Cys-83 como cisteína de resolução. A Cys-23 está localizada na extremidade oposta da estrutura, distante aproximadamente 23 Å da Cys-47, impossibilitando a interação intramolecular entre estes resíduos. A Cys-101, por sua vez, apesar de estar numa distância menor de aproximadamente 13 Å da Cys-47, é interposta por um *loop* (resíduos 39 a 41) e por resíduos com cadeias laterais volumosos (como a Tyr-39), que devem impedir a interação entre os resíduos. Finalmente, a Cys-83 é o único resíduo de cisteína relativamente desimpedido para interação com a Cys-47, sem a cadeia polipeptídica e com resíduos pouco volumosos interpondo-as.

A análise da área superficial acessível ao solvente dos resíduos de cisteína, realizada através do programa *ArealMol* do pacote *CCP4i* (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) e usando raio de sonda de 1,4 Å, revelou que a Cys-101 é a mais interna na estrutura de Bcp C47S, não possuindo acesso à superfície da proteína (área acessível nula). Por outro lado, Cys-23 e Cys-83 são as mais expostas ao solvente, com área acessível de 94,6 e 25,0 Å², respectivamente. Interessantemente, Ser-47 possui pequena área acessível ao solvente (0,3 Å²) e, aparentemente, o rotâmero A está mais acessível que o rotâmero B (a área superficial pode ser visualmente percebida nas figuras 81A e 81B). Estas análises estruturais estão de acordo com a observação de que a reação da Cys-101 com DTNB é ineficiente em relação às demais cisteínas (como verificado na figura 44 e tabela III). A pequena área exposta ao solvente da Ser-47 deve estar relacionada ao seu enterramento parcial no sítio ativo, numa cavidade relativamente rasa da superfície protéica. As densidades eletrônicas dos aminoácidos da vizinhança (aqueles envolvidos nas interações mostradas na figura 80) devem diminuir a área superficial acessível ao solvente da Ser-47, calculada pelo programa *ArealMol* (figura 81B). De qualquer modo, estas observações reforçam a hipótese que a forma mais provável assumida pela cadeia lateral da Cys-47 seja aquela representada pelo rotâmero A. Finalmente, o fato da Bcp WT de *X. fastidiosa* reagir com aproximadamente a mesma eficiência com peróxido de hidrogênio, TBHP e CHP (ver figuras 57, 58 e 61) está de acordo com a localização da Ser-47 na cavidade rasa formada pelo sítio ativo.

O potencial eletrostático da superfície de Bcp de *X. fastidiosa*, calculado pelo programa *APBS* (Baker e col., 2001) com dados gerados pelo programa *PDB2PQR* (Dolinsky e col., 2004), claramente indica que a superfície do sítio catalítico possui potencial eletrostático predominantemente positivo (figura 81C). As interações eletrostáticas entre o tiolato e resíduos carregados positivamente da região do sítio catalítico, já foram descritas como envolvidas na estabilização da carga negativa das cisteínas ativas de PDI (proteína dissulfeto isomerase), sendo um dos responsáveis pelo baixo pK_a das cisteínas reativas (Sun e col., 1998). Portanto, a ionização da Cys-47 na Bcp de *X. fastidiosa* deve ser favorecida pelo campo eletrostático da região em que se encontra a Cys-47. Outro fator que poderia influenciar o pK_a baixo da Cys-47 é o efeito dipolo intrínseco de α hélice (Kortemme e Creighton, 1995). A presença de α hélices influencia a ionização do grupamentos tiól de cisteínas localizadas na região terminal destas hélices, sendo favorecidas na região N-terminal e desfavorecidas na região C-terminal. Na Bcp de *X. fastidiosa*, o posicionamento da Cys-47 na região N-terminal da hélice $\alpha 3$ deve contribuir para o baixo valor de pK_a observado.

Como determinado neste trabalho, durante o ciclo catalítico da Bcp de *X. fastidiosa*, a cisteína peroxidásica (Cys-47) forma uma ponte dissulfeto intramolecular com a cisteína de resolução (Cys-83) e, portanto, deveria haver grande proximidade entre estes resíduos. Entretanto, a análise da estrutura revela que a Ser-47 (que substitui a cisteína peroxidásica na Bcp C47S) está localizada na primeira volta da hélice α_3 , enquanto a cisteína de resolução localiza-se numa região mais distal da hélice α_4 , resultando em uma distância entre 10,74 e 14,07 Å dos átomos S_γ (figura 82 e 83A). Esta distância indica que deve ocorrer um rearranjo estrutural significativo durante o ciclo catalítico da Bcp de *X. fastidiosa*, para que seja formada uma ponte dissulfeto intramolecular entre as Cys-47 e Cys-83.

Figura 82. Distâncias entre os aminoácidos Ser-47, Cys-83 e Arg-122 na Bcp C47S de *X. fastidiosa*. (A) Representação gráfica das distâncias. Apenas as cadeias laterais dos aminoácidos são mostradas, representadas por esferas e bastões, e coloridos pelo esquema CPK: C (verde), O (vermelho), N (azul) e S (amarelo); (B) Tabela das distâncias mostradas em A.

Pela análise das estruturas da Bcp de *A. pernix* (pertencente ao subgrupo das PrxQ α , de acordo com a divisão proposta por Wakita e col., 2007) fica evidente a formação de uma ponte dissulfeto intramolecular entre as Cys-49 e Cys-54 (a forma cristalográfica 1 possui uma ponte dissulfeto entre Cys-49 e Cys-54, ausente na forma cristalográfica 2). Na forma cristalográfica 2 de Bcp de *A. pernix* (PDB ID: 2CX4), a cisteína peroxidásica (Cys-49) está separada por somente quatro aminoácidos da cisteína de resolução (Cys-54), porém, os átomos S γ destes resíduos estão orientados em sentidos opostos na hélice α 2, distantes 10,73 Å entre si (figura 83B). Apesar de separados por apenas quatro aminoácidos, também deve ocorrer um remodelamento estrutural para a formação do dissulfeto intramolecular. Este remodelamento é claramente observado na forma cristalográfica 1 (PDB ID: 2CX3), no qual a hélice α 2 está totalmente desenovelada, formando um grande *loop*, com as cisteínas Cys-49 e Cys-54 em ponte dissulfeto intramolecular (figura 83C). A análise da estrutura secundária, realizada com o programa *DSSP* (Kabsch e Sander, 1983), indica que o desenovelamento da hélice α 2 (que corresponde a hélice α 3 na Bcp de *X. fastidiosa*), devido à formação da ponte dissulfeto intramolecular, acarreta uma diminuição de 6,9% no conteúdo de α hélices (com o envolvimento de 11 aminoácidos) na Bcp de *A. pernix*.

Figura 83. Localização e distância das cisteínas nas peroxirredoxinas: (A) Bcp C47S de *X. fastidiosa*, distância entre Ser-47 e Cys-83 está descrita na figura 82. A Ser-47 e a Cys-83 estão mostradas na orientação dos rotâmeros A. (B) Bcp de *A. pernix* (forma cristalográfica 2, PDB ID: 2CX4), as cisteínas peroxidásica e de resolução (Cys-49 e Cys-54, respectivamente) estão separadas por 10,73 Å, enquanto a Cys-80 está separada por 10,37 Å da Cys-49. Em vermelho, *loop* que se interpõe entre as Cys-49 e Cys-80. (C) Bcp de *A. pernix* (forma cristalográfica 1, PDB ID: 2CX3), a Cys-80 está separada por 18,12 Å da Cys-49. Os quadros inferiores são ampliações das regiões delimitadas na parte superior.

Essas análises nos levaram a propor a hipótese de que um desenovelamento similar ao observado pela hélice $\alpha 2$ na Bcp de *A. pernix* poderia ocorrer durante o ciclo catalítico da Bcp de *X. fastidiosa*. Além dos resíduos de cisteína envolvidos na formação da ponte dissulfeto intramolecular (Cys-49 e Cys-54), a Bcp de *A. pernix* possui outro resíduo (Cys-80) localizado na região proximal da hélice $\alpha 3$, em uma posição bastante similar à ocupada pela cisteína de resolução (Cys-83) na Bcp de *X. fastidiosa*. Interessantemente, na forma cristalográfica 2 de Bcp de *A. pernix* (PDB ID: 2CX4), as cisteínas Cys-49 e Cys-80 estão separadas por uma distância de 10,37 Å, inferior à distância que separa as cisteínas que formam a ponte dissulfeto intramolecular (10,73 Å entre Cys-49 e Cys-54; figura 83B). As cisteínas Cys-49 e Cys-80, porém, estão interpostas por um *loop* (resíduos 43 a 45, *loop* em vermelho na figura 84B), que deve impedir a interação entre elas. Na estrutura de Bcp C47S de *X. fastidiosa*, por sua vez, a cadeia polipeptídica não se interpõe entre as cisteínas Cys-47 e Cys-83 e, portanto, não deve causar impedimento estérico na aproximação para formação da ponte dissulfeto intramolecular (figura 84A).

Figura 84. Regiões entre as cisteínas nas estruturas das peroxirredoxinas. (A) Bcp C47S de *X. fastidiosa*, representação da região entre Ser-47 e Cys-83. Resíduos volumosos (Phe-82, Phe-88 e Leu-92) estão representados por esferas e bastões. A Ser-47 e a Cys-83 estão mostradas na orientação dos rotâmeros A. (B) Bcp de *A. pernix* (forma cristalográfica 2, PDB ID: 2CX4), representação da região entre Cys-49 e Cys-80. O *loop* (composto pelos resíduos Ala-43, Ala-44 e Phe-45) que se interpõe entre as cisteínas está representado em vermelho. O resíduo volumoso (Phe-41) está representado por esferas e bastões.

Em cada uma das quatro classes, a cisteína de resolução, quando presente, está em uma localização diferente na estrutura terciária, sugerindo que a natureza encontrou diferentes soluções para a regeneração da cisteína peroxidásica (Copley e col., 2004). Futuramente, seria interessante verificar qual a consequência da presença de um resíduo de cisteína na Bcp de *X. fastidiosa*, em uma posição equivalente àquela ocupada pela Cys-54 na Bcp de *A. pernix*.

Como não existe a análise publicada dos dados estruturais da Bcp de *A. pernix*, não é possível comparar detalhadamente os dados disponibilizados. Os dados mencionados acima, porém, demonstram que a hélice $\alpha 2$, no qual se encontra a cisteína peroxidásica (Cys-49), é capaz de se desenovelar, aproximando-a da Cys-54 e diminuindo em 8,6 Å a distância entre elas. Provavelmente, uma reestruturação e um movimento desta magnitude, na estrutura de Bcp de *X. fastidiosa*, deve aproximar as cisteínas catalíticas (Cys-47 e Cys-83) numa distância suficiente para a formação da ponte

dissulfeto intramolecular. A análise dos fatores B das proteínas Bcp C47S de *X. fastidiosa* e Bcp de *A. pernix* (estrutura cristalográfica 2, PDB ID: 2CX4) indicam que os fatores de temperatura da região protéica que contém a cisteína peroxidásica estão relativamente baixos, refletindo uma grande estabilidade da α hélice na forma reduzida das proteínas (figuras 85A e 85B). Por outro lado, os fatores B da forma cristalográfica 1 de Bcp de *A. pernix* (PDB ID: 2CX3) mostra um aumento dos fatores de temperatura na região da ponte dissulfeto, sugerindo que uma grande movimentação deve ocorrer em meio aquoso (figura 85C).

Figura 85. Variação dos fatores de temperatura nas estruturas das peroxirredoxinas: (A) Bcp C47S de *X. fastidiosa*; (B) Bcp de *A. pernix*, forma cristalográfica 2 (PDB ID: 2CX4); e (C) Bcp de *A. pernix*, forma cristalográfica 1 (PDB ID: 2CX3). Na parte superior está mostrada a variação dos fatores B nas cadeias polipeptídicas. A linha pontilhada delimita a média dos fatores B em cada estrutura. Nas representações estruturais, parte inferior, são mostradas a gradação dos fatores B (da cor azul, para fatores mais baixos, até a cor vermelha, para fatores mais altos). Nas estruturas também são mostradas as cadeias laterais dos resíduos de cisteínas e de serina (substituída na Bcp C47S de *X. fastidiosa*). Os átomos destes aminoácidos estão representados por bastões e seguem as cores: verde (carbono), amarelo (enxofre) e vermelho (oxigênio).

Na Bcp de *X. fastidiosa*, concomitante à formação do intermediário ácido sulfênico na cisteína peroxidásica Cys-47 (que é relativamente mais volumoso e eletronegativo que o tiól), provavelmente, as interações entre os resíduos do sítio catalítico (descritas na figura 80) devem ser gradativamente desfeitas, culminando com a ausência de interações devido a formação da ponte dissulfeto intramolecular entre as Cys-47 e Cys-83. Provavelmente, este processo deve dar início e resultar no desenovelamento da hélice α_3 , semelhante àquele que ocorre na Bcp de *A. pernix* (figura 86). No caso da Bcp de *A. pernix* (forma cristalográfica 1), os resíduos Arg-122 e Glu-52 estão localizados em regiões distantes da cisteína peroxidásica (Cys-49), em virtude do desenovelamento da hélice α_2 , que provavelmente ocorre devido a formação da ponte dissulfeto intramolecular.

Figura 86. Comparação das interações polares no sítio catalítico da Bcp de *A. pernix* em diferentes estados redox. (A) forma cristalográfica 2 (PDB ID: 2CX4) e (B) forma cristalográfica 1 (PDB ID: 2CX3). Apenas as cadeias laterais dos aminoácidos são mostradas. As interações polares são representadas por linhas tracejada. Os resíduos de aminoácidos estão representados por esferas e bastões, coloridos pelo esquema CPK: C (verde), O (vermelho), N (azul) e S (amarelo).

A mudança na estrutura secundária da Bcp de *X. fastidiosa*, relacionada a mudança no estado redox das cisteínas Cys-47 e Cys-83 durante o ciclo catalítico, também foi verificada por dicroísmo circular (CD; figura 87), com o auxílio da aluna de mestrado Joana Paulino e utilizando as facilidades do laboratório da Profa. Shirley Schreier (Departamento de Bioquímica – IQ/USP). A comparação visual dos espectros de CD da Bcp WT sinaliza para diminuição do conteúdo de α hélice devido à oxidação por peróxido de hidrogênio (diminuição da elipticidade molar a 222 nm). A análise da estrutura secundária, realizada com o programa *CDPro* e o método *CDSSTR* (Sreerama e Woody, 2000), que estima o conteúdo de α hélice e fita β a partir do espectro de CD, indica que a formação da ponte dissulfeto na Bcp de *X. fastidiosa* resulta em diminuição de 17,4 % no conteúdo estimado de α hélices. Como as hélices $\alpha 3$ e $\alpha 4$, nas quais estão localizadas as cisteínas envolvidas na formação da ponte dissulfeto intramolecular (Cys-47 e Cys-83, respectivamente), correspondem a 19,3 % do conteúdo de α hélice da proteína, determinado pelo programa *DSSP* (Kabsch e Sander, 1983), podemos considerar que estes dois elementos da estrutura secundária sofrem, quase que na sua totalidade, o desenovelamento estrutural devido à mudança no estado redox da proteína. Estas observações reforçam a hipótese da ocorrência de desenovelamento parcial na Bcp de *X. fastidiosa* durante seu ciclo catalítico.

Figura 87. Estrutura secundária da Bcp de *X. fastidiosa* por CD. A Bcp de *X. fastidiosa* em tampão citrato de sódio 5 mM pH 6,2, foi inicialmente reduzida com TCEP 5 mM por 30 minutos, a temperatura ambiente e o TCEP foi removido utilizando coluna *HiTrap Desalting* (espectro de CD azul). A proteína reduzida foi, então, tratada com 1,2 equivalentes de peróxido de hidrogênio por 30 minutos, a temperatura ambiente e o hidroperóxido foi removido utilizando coluna *HiTrap Desalting* (espectro de CD vermelho). A concentração de proteína foi ajustada à 10 mM e a espectro de CD foi adquirido a 20 °C, utilizando caminho óptico de 1 mm.

O desenovelamento de elementos da estrutura secundária, para permitir a formação de pontes dissulfeto, foi também descrito para 2-Cys Prx típicas, que apresentam ponte dissulfeto intermolecular durante o ciclo catalítico. Nesses casos, a conformação enovelada é denominada *Fully Folded* (FF), enquanto a conformação desenovelada é denominada *Locally Unfolded* (LU). Nestas proteínas, os estados que contêm pontes dissulfeto estão na conformação LU, enquanto os que não contêm estão na conformação FF (Wood e col., 2003). Em HPB23 de *Ratus norvegicus* (peroxirredoxina representante da classe IV, na classificação sugerida por Copley e col., 2004), por exemplo, ocorre um desenovelamento parcial da α hélice, que contém a cisteína peroxidásica, para a formação de uma ponte dissulfeto intermolecular (figura 88A e 88B). Na PrxV humana (representante da classe III), as cisteínas peroxidásica e de resolução estão distantes em 13,8 Å, sendo necessária uma grande mudança estrutural, no qual a α hélice que contém a cisteína peroxidásica é quase totalmente desenovelada para permitir a formação da ponte dissulfeto intermolecular (figura 88C e 88D). Desta forma, com base nos argumentos discutidos acima, acreditamos que um processo semelhante está envolvido na formação da ponte dissulfeto intramolecular na Bcp de *X. fastidiosa*.

Figura 88. Mudanças estruturais em peroxirredoxinas nos diferentes estados redox. (A) HPB23 C52S de *R. norvegicus*, mimetiza o estado reduzido (distância entre S_γ de 13,17 Å; PDB ID: 2Z9S, Matsumura e col., 2008); (B) HPB23 de *R. norvegicus* no estado oxidado (PDB ID: 1QQ2, Hirotsu e col., 1999); (C) PrxV humana no estado reduzido (distância entre S_γ de 14,07 Å; PDB ID: 2VL3, cadeia A; Smeets e col., 2008) e (D) oxidado (PDB ID: 2VL3, cadeia C; Smeets e col., 2008). Apenas as cadeias laterais dos aminoácidos são mostradas. As cisteínas e serinas estão representadas por esferas e bastões, coloridos pelo esquema CPK: carbono (verde), enxofre (amarelo) e oxigênio (vermelho).

A análise da estrutura de Bcp C47S de *X. fastidiosa* também nos permite especular sobre a provável explicação para os resultados obtidos com a utilização do método de mudança da fluorescência da proteína para determinação da constante de velocidade da oxidação de Bcp por peróxido de hidrogênio. Como a mudança na intensidade de fluorescência do triptofano ocorre devido a diferença de acessibilidade ao solvente entre as formas reduzida e oxidada da proteína, investigamos comparativamente às peroxirredoxinas Bcp de *A. pernix* e PrxV humana, a posição dos resíduos de triptofano na estrutura de Bcp C47S de *X. fastidiosa*. É importante salientar que o método de mudança da fluorescência do triptofano para determinação da constante de velocidade da oxidação de peroxirredoxinas por hidroperóxido foi inicialmente proposto e utilizado com sucesso por Trujillo e col. (2007), utilizando como modelo a PrxV humana.

A Bcp de *X. fastidiosa* possui dois resíduos de triptofano, Trp-33 e Trp-137, localizados no início da fita β 3 e no fim da fita β 9, respectivamente (figura 89A). Na estrutura de Bcp C47S de *X. fastidiosa* é possível observar que estes resíduos estão distantes e não interagem, mesmo que indiretamente, com as cisteínas envolvidas na atividade catalítica (Cys-47 e Cys-83). A análise da área de exposição ao solvente, através do programa *ArealMol* (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) e usando raio de sonda de 1,4 Å, indica que os resíduos de triptofano da Bcp de *X. fastidiosa* são relativamente acessíveis ao solvente (área exposta de 53,80 Å² e 29,10 Å², para o Trp-33 e Trp-137, respectivamente). A Bcp de *A. pernix* também possui dois resíduos de triptofano que, semelhantemente à Bcp de *X. fastidiosa*, estão distantes das cisteínas envolvidas na atividade catalítica e bastante acessíveis ao solvente (área exposta de 185,0 Å² e 52,55 Å², para o Trp-79 e o Trp-137, respectivamente). Estes resíduos não sofrem acentuadas mudanças de acessibilidade ao solvente devido à formação da ponte dissulfeto intramolecular (suas áreas aumentam para 190,9 Å² e 68,92 Å², respectivamente; figura 89B e 89C). Também é possível notar que os componentes da estrutura secundária, da qual os resíduos de triptofano fazem parte, não sofrem alterações conformacionais, permanecendo enovelados mesmo com a formação da ponte dissulfeto intramolecular. Estas observações e a semelhança de posição e acessibilidade ao solvente, nos permitem especular que a formação da ponte dissulfeto intramolecular não deve alterar dramaticamente a conformação dos componentes da estrutura secundária da qual fazem parte os resíduos de triptofano da Bcp de *X. fastidiosa* e, portanto, não deve influenciar de forma acentuada a acessibilidade destes resíduos ao solvente.

Figura 89. Localização dos resíduos de triptofano nas estruturas das Bcp de *X. fastidiosa* e *A. pernix*. (A) Bcp de *X. fastidiosa*; (B) Bcp de *A. pernix*, forma cristalográfica 2 (PDB ID: 2CX4); e (C) Bcp de *A. pernix*, forma cristalográfica 1 (PDB ID: 2CX3). Apenas as cadeias laterais dos aminoácidos são mostradas e estão representadas por esferas e bastões. As cisteínas e a serina estão coloridos em verde, enquanto os triptofanos estão coloridos em magenta. Na parte superior, as estruturas estão mostradas em *cartoon*. Na parte inferior, estão representadas as áreas superficiais da cada proteína (superfície de Connolly) e as respectivas áreas ocupadas por cada resíduo. Estas áreas não correspondem à área calculada pelo programa *ArealMol*.

Por outro lado, a PrxV humana possui apenas um resíduo de triptofano (Trp-84). A análise das estruturas reduzida e oxidada da PrxV humana (PDB ID: 2VL3, cadeias A e C, respectivamente; Smeets e col., 2008), realizada de forma semelhante à descrita por Trujillo e col. (2007), revelou que a área do Trp-84 acessível ao solvente é aumentada em aproximadamente 16 vezes (de 0,20 Å² para 3,10 Å²). Na estrutura reduzida, o Trp-84 está bastante inacessível ao solvente, sendo completamente obstruído por aminoácidos da vizinhança, principalmente pelo resíduo Ser-48, que também interage diretamente com a Cys-47 (figura 90A). Na estrutura oxidada, com a formação da ponte dissulfeto intramolecular, ocorre um desenovelamento parcial da α hélice que contém a Cys-47 (cisteína peroxidásica) e a Ser-48, promovendo o acesso de parte da superfície do Trp-84 ao solvente (figura 90B).

Figura 90. Localização dos resíduos de triptofano nas estruturas da PrxV humana. (A) Estrutura reduzida (PDB ID: 2VL3, cadeia A; Smeets e col., 2008) e (B) Estrutura oxidada (PDB ID: 2VL3, cadeia C). Na parte superior, as estruturas estão mostradas em *cartoon* e as cadeias laterais dos aminoácidos estão representadas por esferas e bastões. As cisteínas (Cys-47 e Cys-151) estão coloridas em azul, a Ser-48, em ciano e o Trp-84, em magenta. Na parte inferior, estão representadas as áreas superficiais da cada proteína (superfície de Connolly) e as respectivas áreas ocupadas pelos resíduos: Phe-43 (em laranja), Thr-44 (em vermelho), Cys-47 e Cys-151 (em azul), Ser-48 (em ciano), Ala-87 (em amarelo) e His-88 (em verde).

Adicionalmente, um ensaio semelhante ao proposto por Trujillo e col. (2007) foi aplicado, com sucesso, para a determinação dos parâmetros cinéticos de decomposição de peróxido de hidrogênio pela AhpC de *S. typhimurium*, baseado na diminuição da fluorescência devido a oxidação da proteína S128W NTD (fragmento N-terminal da AhpF de *S. typhimurium*; Parsonage e col., 2005). Nesta proteína, o resíduo de triptofano foi inserido em uma posição adjacente às cisteínas do sítio ativo e, portanto, interage diretamente com as cisteínas ativas.

A intensidade da fluorescência do triptofano é influenciada principalmente pela polaridade do solvente (quanto maior sua polaridade, menor a intensidade da fluorescência do triptofano) e pelo efeito supressor de aminoácidos do microambiente que circunda o triptofano (Holmgren, 1972). As influências destas duas variáveis são claramente evidenciadas pelo diferente efeito da exposição dos resíduos de triptofano na PrxV humana e na Bcp de *X. fastidiosa*. Se a exposição ao solvente fosse a única variável envolvida na intensidade da fluorescência do Trp-84 na PrxV humana, seria esperado que a maior exposição do Trp-84 resultasse em diminuição da fluorescência. Porém, a mudança na conformação da proteína, além de ter aumentado a acessibilidade do Trp-84, aboliu parte das interações com outros aminoácidos que provavelmente suprimiam a emissão de fluorescência, resultando em maior intensidade

da fluorescência do triptofano. Na Bcp de *X. fastidiosa*, por sua vez, a exposição ao solvente contribui mais significativamente na intensidade da fluorescência, resultando na sua diminuição devido à oxidação da proteína. Este efeito, além de reforçar a hipótese de que ocorram mudanças estruturais na Bcp de *X. fastidiosa* relacionada a mudança no estado redox das cisteínas Cys-47 e Cys-83 durante o ciclo catalítico, permite supor que não há efeito de supressão da emissão de fluorescência devido à aminoácidos dos microambientes que circundam os triptofanos na estrutura reduzida da proteína.

O aumento da exposição dos resíduos de triptofano nas peroxirredoxinas PrxV humana e Bcp de *X. fastidiosa* também são resultado de diferentes rearranjos na estrutura das proteínas. Na PrxV humana, a exposição do Trp-84 deve envolver apenas o desenovelamento parcial da α hélice que contém a Cys-47 e a Ser-48, como pode ser observado acima. Na Bcp de *X. fastidiosa*, porém, a exposição dos resíduos de triptofano, Trp-33 e Trp-137, deve exigir um extenso rearranjo estrutural, já que estes resíduos estão distantes das cisteínas envolvidas na atividade catalítica. Possivelmente, esse rearranjo seja muito mais lento do que a oxidação de Cys-47, o que explicaria o fato de que a constante de segunda ordem determinada pelo método de competição é três ordens de grandeza maior do que a constante determinada por fluorescência (ver tabela X).

Além disso, como a fluorescência intrínseca da Bcp de *X. fastidiosa* é resultado da contribuição da fluorescência de dois resíduos de triptofano, o efeito do rearranjo estrutural é mais complexo que na PrxV humana, já que a fluorescência de cada resíduo de triptofano é influenciada por diferentes microambientes, que resultaram em diferentes intensidades de emissão de fluorescência. Como a mudança de fluorescência também ocorre na proteína mutante Bcp C83S (ver figura 68B), a formação do intermediário ácido sulfênico na cisteína peroxidásica Cys-47 já é suficiente para ocasionar o rearranjo estrutural necessário para exposição dos resíduos de triptofano. Cronologicamente, a formação do intermediário ácido sulfênico na Cys-47, desfaz as interações entre os resíduos do sitio catalítico (descritas na figura 80), propagando diversas alterações estruturais que resultam, independentemente, na formação da ponte dissulfeto intramolecular e na exposição dos resíduos de triptofano da proteína.

Caracterização funcional do sistema Alquil hidroperóxido redutase (AhpC e AhpF)

Como mostrado anteriormente, a proteína AhpC de *X. fastidiosa* possui mecanismo 2-Cys Prx típico, que envolve a formação de ponte dissulfeto intermolecular durante o ciclo catalítico (ver figura 7B). A quantificação por DTNB do número de cisteínas livres na AhpC, reduzida e tratada com peróxido de hidrogênio (tabela XIII) e a formação de homodímeros na proteína oxidada em SDS-PAGE (figura 91), indicam a formação de duas pontes dissulfeto intermoleculares entre as duas subunidades do homodímero. A quantificação de cisteínas livres por DTNB, em condições nativa e desnaturante, também indica que as duas cisteínas da AhpC de *X. fastidiosa* são bastante acessíveis ao solvente. Como AhpC de *X. fastidiosa* possui apenas duas cisteínas, justamente aquelas conservadas dentre as peroxirredoxinas da família 2-Cys Prx típicas (ver figuras 17 e 18), é possível atribuir o envolvimento destes dois resíduos na atividade catalítica da AhpC de *X. fastidiosa*. A presença dos dois resíduos em posições conservadas e equivalentes às cisteínas catalíticas de 2-Cys Prx típicas extensamente caracterizadas, como Tsa1 de *S. cerevisiae* (Chae e col., 1994b), AhpC de *S. typhimurium* (Ellis e Poole, 1997) e AhpC de *M. tuberculosis* (Guimarães e col., 2005), indicam que as Cys-47 e Cys-165 atuam, respectivamente, como cisteína peroxidásica e cisteína de resolução na proteína AhpC de *X. fastidiosa*.

Tabela XIII. Conteúdo de sulfidrilas livres na AhpC reduzida e tratada com peróxido de hidrogênio.

	[Cys]/[AhpC] $\pm$ desvio padrão			
	Reduzida		Tratada com H ₂ O ₂ ¹	
	Nativa	Desnaturada	Nativa	Desnaturada
AhpC	2,06 $\pm$ 0,01	2,09 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01

¹AhpC (100 μ M) foi inicialmente reduzida com TCEP 10 mM por 30 minutos, a temperatura ambiente e o TCEP foi removido utilizando coluna *HiTrap Desalting*. A proteína reduzida foi, então, tratada com 1,2 equivalentes de peróxido de hidrogênio por 30 minutos a temperatura ambiente e o hidroperóxido foi removido utilizando coluna *HiTrap Desalting*. O conteúdo de sulfidrilas livres foi determinado pelo ensaio do DTNB em condições nativa (tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,0, NaCl 50 mM e EDTA 1 mM) e desnaturante (tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,0, uréia 8 M e EDTA 1 mM). Os valores representam a média de três experimentos $\pm$ desvio padrão.

Figura 91. Análise por SDS-PAGE da AhpC reduzida e tratada com peróxido de hidrogênio. Raia 1 – Padrão de massa molecular *BenchMark Protein Ladder* (15, 20, 25, 30, 40 e 50 kDa); 2 – AhpC pré-reduzida; 3 – AhpC tratada com peróxido de hidrogênio. A amostra foi tratada em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4 por 30 minutos, a temperatura ambiente, na proporção molar de 1 AhpC : 1,2 H₂O₂. Em cada raia foi aplicado o equivalente a 5 μ g de proteína. A amostra foi previamente reduzida com TCEP, conforme indicado na tabela XIII.

Ensaio preliminares da atividade peroxidásica indicaram que AhpC possuía atividade antioxidante de proteção da glutamina sintetase contra a inativação pelo sistema Fe⁺³/O₂/DTT, mas não pelo sistema Fe⁺³/O₂/ascorbato (dados não mostrados), indicando que a AhpC de *X. fastidiosa* possui atividade antioxidante dependente de tiól.

Pelo ensaio FOX, AhpC de *X. fastidiosa* apresentou atividade peroxidásica para peróxido de hidrogênio, TBHP e CHP, utilizando DTT 1,5mM como agente redutor (figura 92). As atividades específicas da AhpC (2,58; 2,25 e 1,85 $\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$ para peróxido de hidrogênio, CHP e TBHP, respectivamente) indicam que a proteína não apresenta preferência de substrato, ao contrário do indicado na sua denominação alquil hidroperóxido redutase subunidade C. Comparado com a atividade específica da Bcp de *X. fastidiosa*, determinada também pelo ensaio FOX com DTT como agente redutor, AhpC apresentou atividade peroxidásica de 20 a 30 vezes maior, mesmo trabalhando numa concentração menor de DTT.

Figura 92. Atividade peroxidásica da AhpC e especificidade de substrato. A concentração de hidroperóxido foi determinada pelo ensaio FOX. A reação (100 μl) foi realizada a 37°C, em tampão Hepes-NaOH 50 mM pH 7,4, na presença de azida 1 mM e DTPA 0,1 mM. A concentração de hidroperóxido no tempo inicial era de 150 μM . A reação foi iniciada pela adição de DTT 1,5 mM na presença de AhpC 15 μM . As curvas representam a cinética de decomposição de peróxido de hidrogênio (quadrado vazio), TBHP (triângulo vazio) e CHP (quadrado cheio). As reações sem DTT não mostraram qualquer decomposição de hidroperóxido, mesmo na presença da AhpC. Cada tempo foi analisado em triplicata.

Com o intuito de reconstituir *in vitro* o sistema AhpR (alquil hidroperóxido redutase) e, posteriormente, utilizá-lo para a caracterização dos parâmetros enzimáticos da AhpC de *X. fastidiosa*, testamos se a proteína AhpF de *X. fastidiosa* era capaz de sustentar a atividade peroxidásica da AhpC à custa de NAD(P)H, através do método de consumo de piridil nucleotídeos. É importante salientar que, como mostrado anteriormente, o sistema tiorredoxina de *X. fastidiosa* não sustenta a atividade peroxidásica da AhpC de *X. fastidiosa* (ver figura 41). Nos ensaios preliminares, porém, verificamos que AhpF oxidava NAD(P)H, mesmo na ausência de AhpC (dados não mostrados). A oxidação de NAD(P)H pela AhpF persistiu mesmo com o aperfeiçoamento da purificação da proteína por cromatografia de troca aniônica (visando a remoção de proteínas contaminantes), com o tratamento de soluções de purificação, da proteína e do meio de reação com Chelex 100 (visando a remoção de íons de metais de transição), e com a adição de DTPA ao meio de reação (também visando a remoção de metais contaminantes). O único procedimento que inibiu a atividade de oxidação do NAD(P)H pela AhpF, foi a remoção do oxigênio molecular dissolvido na reação, através do borbulhamento de nitrogênio molecular. Este procedimento diminuiu consideravelmente a velocidade da reação, mas não extinguiu completamente a oxidação do NAD(P)H, mesmo após 100 minutos de borbulhamento de N₂ no meio de reação (figura 93),

sugerindo que o oxigênio molecular deveria atuar como acceptor final de elétrons provenientes do NAD(P)H, via AhpF.

Figura 93. Efeito do borbulhamento de N₂ na atividade de oxidação de NADH pela AhpF. A oxidação de NADH foi monitorada a 37°C pela diminuição da absorbância a 340 nm. A reação (1 ml) foi realizada em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 na presença de AhpF 1,0 µM, DTPA 0,5 mM e sulfato de amônio 100 mM. A reação foi iniciada pela adição de NADH 150 µM. O tempo de borbulhamento de N₂ no meio de reação, antes da adição do NADH e da AhpF, está indicado à direita.

A atividade de oxidação de NAD(P)H pela AhpF, utilizando o oxigênio molecular como acceptor final de elétrons (denominada de atividade NAD(P)H oxidase), foi caracterizada anteriormente para AhpF de *S. typhimurium*. Além das atividades oxidase e dissulfeto redutase, AhpF de *S. typhimurium*, como outras flavoproteínas desidrogenases, também possui atividade diaforase (catalisa a oxidação de NADH com corantes, como azul de metileno) e atividade oxidase com NAD(P)H (Poole e Ellis, 1996). O consumo de oxigênio molecular à custa de NAD(P)H exige que todos os ensaios que envolvam NAD(P)H, como doador de elétrons, e AhpF fossem realizados em condições anaeróbicas, o que dificultou consideravelmente a execução de ensaios posteriores.

Mesmo não trabalhando em condições anaeróbicas, verificamos que AhpF de *X. fastidiosa* possuía atividade dissulfeto redutase através do ensaio do DTNB, sugerindo que a proteína deveria sustentar a atividade peroxidásica da AhpC, reduzindo-a à custa de NAD(P)H (figura 94). É interessante notar o efeito exercido pelo sulfato de amônio sobre a atividade dissulfeto redutase da AhpF. Este efeito foi descrito anteriormente como sendo devido à facilitação da transferência de elétrons da flavina para o dissulfeto C-terminal da proteína (e não ao oxigênio molecular) devido ao aumento da força iônica do meio de reação (Poole e Ellis, 1996). A velocidade inicial de formação de TNB, na presença ou ausência de sulfato de amônio, é maior quando NADH é usado como substrato redutor, sugerindo que NADH seja o doador biológico de elétrons para AhpF. Por outro lado, essa diferença de velocidade inicial pode refletir diferença no K_M da AhpF para NADH e NADPH. Provavelmente, o K_M para NADH seja significativamente menor que o K_M para NADPH, mas a V_{max} seja similar para os dois substratos, como ocorre com a AhpF de *S. typhimurium* (Poole e Ellis, 1996). A redução de DTNB pela AhpF à custa de NADH, porém, atinge um platô que não é observado quando a redução ocorre à custa de NADPH. Poole e Ellis (1996) sugerem que este fenômeno ocorra devido à forte inibição pelo substrato NADH.

Como a velocidade inicial é maior quando NADH é o substrato redutor, nas mesmas concentrações de substrato, é mais coerente afirmar que ocorra inibição pelo produto NAD^+ , que se acumula ao longo do tempo de reação, e não pelo substrato NADH, que é consumido ao longo do tempo.

Figura 94. Atividade DTNB redutase da AhpF e efeito do sulfato de amônio. A redução de DTNB foi monitorada a 37°C pelo aumento da absorbância a 412 nm. A reação (1 ml) foi realizada em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0, na presença de DTPA 0,5 mM, AhpF 0,1 μM, DTNB 500 μM e sulfato de amônio 150 μM (quando indicado na legenda). A reação foi iniciada pela adição de NAD(P)H 300 μM (como indicado na legenda). Realizado em condições aeróbicas.

Podemos considerar que há três diferentes tipos de oxidases, de acordo com o número de elétrons transferidos para o oxigênio molecular e a preferência de substrato doador de elétrons (NADH ou NADPH). As NADH oxidase são encontradas em diversos microorganismos e podem ser divididas em dois tipos: oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio (denominadas Nox1) e oxidases produtoras de H_2O (denominadas Nox2; Higuchi e col., 1994). Em *Streptococcus mutans*, por exemplo, estes dois tipos de NADH oxidases foram caracterizados (Higuchi e col., 1999). As NADPH oxidases, por sua vez, foram caracterizadas principalmente em plantas (Jones e col., 2007; Foreman e col., 2003) e em humanos (Diekmann e col., 1994), mas também foram encontradas em fungos (Egan e col., 2007). As NADPH oxidases, também denominadas NOX, formam o grupo das oxidases produtoras de radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). As oxidases produtoras de $\text{O}_2^{\bullet-}$, peróxido de hidrogênio e H_2O , transferem 1, 2 e 4 elétrons do piridil nucleotídeo para o oxigênio molecular, respectivamente, conforme mostrado nas reações abaixo:

Com o intuito de verificar qual é o produto da atividade oxidase da AhpF de *X. fastidiosa*, a atividade NAD(P)H oxidase foi monitorada através da utilização de eletrodos específicos para oxigênio molecular e peróxido. Com a utilização destes eletrodos, detectamos o consumo de O_2 e a produção de

peróxido de hidrogênio pela AhpF, que ocorre à custa do redutor NADH (figura 95A, apesar de não mostrado, NADPH também sustenta a atividade oxidase). O consumo de O₂ foi mais rápido na presença de NADH do que NADPH (dados não mostrados), corroborando a hipótese de que NADH seja o doador biológico de elétrons para a AhpF de *X. fastidiosa*. Além disso, sulfato de amônio não interfere na atividade oxidase da proteína (dados não mostrados). Como o eletrodo de peróxido não é seletivo para peróxido de hidrogênio, reagindo com outros hidroperóxidos, como TBPH e CHP, utilizamos a enzima catalase como forma de confirmar o acúmulo de peróxido de hidrogênio no meio de reação, devido à atividade oxidase da AhpF. Os eletrodos de peróxido e de oxigênio molecular podem ser utilizados para detecção simultânea do reagente e do produto da reação catalisada pela catalase, que degrada especificamente peróxido de hidrogênio com produção de meio equivalente de O₂ (Apel e Hirt, 2004), através da reação:

Através deste experimento, também verificamos que a AhpF de *X. fastidiosa* sustenta a atividade peroxidásica da AhpC de *X. fastidiosa* (figura 95A). Considerando que a concentração de peróxido de hidrogênio acumulada devido a atividade oxidase da AhpF é 20 vezes maior que a concentração inicial de AhpC, no momento de sua adição ao meio de reação, todo o consumo de peróxido de hidrogênio só é possível se AhpC for regenerada pela AhpF que, por sua vez, é regenerada por NADH (a concentração inicial de AhpF é 90 vezes menor que a de peróxido de hidrogênio acumulado na reação). Podemos, portanto, concluir que AhpF possui atividade dissulfeto redutase dedicada à regeneração de AhpC à sua forma reduzida.

A adição de NEM à reação não impede a produção de peróxido de hidrogênio, mas inibe seu consumo (figura 95B), indicando que a modificação das cisteínas não interfere na atividade oxidase de AhpF e, portanto, que suas cisteínas não possuem papel catalítico relacionado com a atividade oxidase da proteína. Estes resultados corroboram aqueles obtidos para a AhpF de *S. typhimurium*, cujo tratamento com NEM também resultava em retenção da atividade oxidase e, também, da atividade transhidrogenase (Poole e Ellis, 1996). Por outro lado, a modificação das cisteínas por NEM resulta em completa perda das atividades peroxidase da AhpC e dissulfeto redutase da AhpF, suportando a hipótese de que as cisteínas possuem papel catalítico para estas atividades.

Interessantemente, das atividades catalíticas descritas da AhpF de *S. typhimurium*, apenas a atividade oxidase não é afetada pela adição de sulfato de amônio (Poole e Ellis, 1996). A atividade oxidase da AhpF de *S. typhimurium*, porém, é estimulada pela adição de FAD livre. Estes resultados, em adição aos obtidos em nosso trabalho, indicam que a flavina coordenada à AhpF é a responsável pela atividade oxidase formadora de peróxido de hidrogênio, enquanto a flavina e as cisteínas da proteína são necessárias para a atividade dissulfeto redutase.

A

B

Figura 95. Verificação das atividades NADH oxidase e dissulfeto redutase da AhpF e atividade peroxidase da AhpC.

Em 1 ml de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4 e DTPA 0,1 mM, as concentrações de oxigênio molecular (em azul) e de peróxido de hidrogênio (em vermelho) foram monitoradas, após a adição sucessiva de NADH 600 μM , AhpF 2,25 μM , AhpC 10,0 μM e catalase 15 μg , conforme indicado pelas linhas tracejadas, e utilizando eletrodos específicos (descritos em Materiais e Métodos). Os experimentos foram realizados (A) na ausência ou (B) na presença de NEM 150 μM , a temperatura ambiente.

É interessante notar que a velocidade de consumo de oxigênio pela AhpF sofre pequeno aumento na presença de AhpC, condição na qual AhpF possui dupla atividade catalítica (oxidase e dissulfeto redutase; figura 96B e 96C). A ausência de acúmulo de peróxido de hidrogênio, mesmo com consumo de oxigênio, reforça a interação entre as proteínas AhpF e AhpC, onde AhpF sustenta a atividade peroxidásica da AhpC através de sua atividade dissulfeto redutase e à custa de NAD(P)H. Provavelmente, na presença da AhpC, o consumo de NAD(P)H pela AhpF por molécula de oxigênio deve ser duas vezes maior que na ausência da AhpC e não resulta em acúmulo de peróxido de hidrogênio, ou seja, o resultado final é a produção de água, através da transferência de 4 elétrons do NAD(P)H para o oxigênio molecular, conforme pode ser observado nas reações mostradas a seguir.

Figura 96. Interação funcional das proteínas AhpF e AhpC de *X. fastidiosa*. Em 1 ml de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4, e DTPA 0,1 mM, as concentrações de oxigênio molecular (em azul) e de peróxido de hidrogênio (em vermelho) foram monitoradas, utilizando eletrodos específicos (descritos em Materiais e Métodos). As reações continham: **(A)** AhpC 7,5 μM; **(B)** AhpF 1,5 μM; e **(C)** AhpC 7,5 μM e AhpF 1,5 μM. As reações foram iniciadas pela adição de NADH 600 μM (indicado pela linha tracejada), a temperatura ambiente.

O ensaio apresentado acima, porém, não é útil para determinar os parâmetros enzimáticos da decomposição de hidroperóxido pela AhpC devido à produção constante de peróxido de hidrogênio pela AhpF, que não permite fixar a concentração inicial de hidroperóxido na reação. Além disso, por se tratar de um ensaio de cinética de estado estacionário, ele reflete um processo complexo como o descrito para a Bcp de *X. fastidiosa* (ver figura 62). Porém, através do ensaio de cinética competitiva com HRP, verificamos que a constante de velocidade de segunda ordem da AhpC (figura 97) é da mesma ordem de grandeza da obtida para a Bcp ($k_{\text{Bcp WT}} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), mostrando que essas duas enzimas podem competir na decomposição de peróxido de hidrogênio, desde que estejam no mesmo compartimento celular, em concentrações equivalentes e possuam afinidades semelhantes aos substratos hidroperóxidos.

Figura 97. Determinação da constante de velocidade da reação entre AhpC e peróxido de hidrogênio por cinética competitiva com HRP. A reação (200 μl) foi realizada em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4, na presença de DTPA 0,1 mM, HRP 4 μM e concentrações variáveis da AhpC reduzida (0 – 16 μM) a 37°C. Após 2 minutos da adição de peróxido de hidrogênio 4 μM, a formação do composto I da HRP foi monitorada a 403 nm.

Na caracterização enzimática da AhpC de *S. typhimurium*, a velocidade da reação catalisada pela proteína mostrou pouca dependência ou nenhuma em relação a concentração do hidroperóxido utilizado como substrato, mesmo na presença de quantidades limitantes de proteína. A ausência de dependência em relação ao substrato não era devido a baixa reatividade da proteína por hidroperóxidos mas devido à lenta redução da proteína pela AhpF (Parsonage e col., 2005). Por isso, os autores desenvolveram um método para medir os parâmetros enzimáticos da AhpC baseado na mudança de fluorescência de um resíduo de triptofano introduzido por mutação pontual (S128W) numa posição adjacente ao sítio redox ativo de uma forma truncada da AhpF, que consiste apenas da sua porção N-terminal (doador direto de elétrons para AhpC). Através deste método, os autores observaram que a eficiência catalítica da AhpC com peróxido de hidrogênio é da mesma ordem de grandeza ($k_{\text{cat}}/K_M \sim 10^7 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) da constante de velocidade de segunda ordem da AhpC de *X. fastidiosa*, obtida através do ensaio de cinética competitiva com HRP.

A AhpF de *X. fastidiosa* também possui esse resíduo serina na posição 129 adjacente ao sítio redox ativo (serina adjacente ao primeiro sítio conservado, que está destacado em vermelho na figura 20), o que permitiria a realização de ensaios similares com o módulo N-terminal no qual o resíduo serina seria substituído por um resíduo triptofano (AhpF[1-203]S129W). Através deste método, poderíamos determinar as constantes de segunda ordem entre AhpC de *X. fastidiosa* e outros hidroperóxidos, além de peróxido de hidrogênio. A partir do vetor pET15b/ahpf[1-203], construído como mostrado anteriormente (ver figura 27), construímos a proteína mutante AhpF[1-203]S129W, utilizando o *kit QuikChange Site-directed Mutagenesis* (Stratagene). Infelizmente, não tivemos tempo suficiente para utilizar este substrato fluorescente no ensaio da atividade peroxidásica da AhpC por fluorescência num fluorímetro *stopped-flow*, permanecendo como uma possibilidade futura para a caracterização enzimática da proteína de *X. fastidiosa*.

Da caracterização das atividades oxidase formadora de peróxido de hidrogênio da AhpF e peroxidase dependente de AhpF da AhpC surgem perspectivas promissoras para a busca por inibidores específicos para o controle químico da *X. fastidiosa* em culturas de citrus. A AhpC de *X. fastidiosa* seria um alvo de inibição importante que, além de impedir a atividade peroxidásica (antioxidante) da proteína, aumentaria a atividade pró-oxidante da AhpF. Como mostrado anteriormente, com a inibição de AhpC haveria a transferência de somente dois elétrons para o oxigênio molecular e, portanto, um provável favorecimento da atividade oxidase de produção de peróxido de hidrogênio pela AhpF.

O papel fisiológico proposto para a atividade NADH oxidase é a regeneração de NAD^+ a partir do NADH produzido no metabolismo aeróbico (pela via glicolítica e via de oxidação de piruvato) de bactérias que não possuem cadeia respiratória devido à ausência da via metabólica de síntese de heme, como a bactéria anaeróbica facultativa *A. xylanus* (Niimura e col., 2000). Como não há síntese de heme, estes organismos não possuem heme proteínas, como catalase e heme peroxidase. Em condições aeróbicas e na ausência de catalase e heme peroxidases, presume-se que haja o acúmulo de grande quantidade de peróxido de hidrogênio e, portanto, a função de decomposição de hidroperóxido por outras peroxidases deve ser crucial para a viabilidade celular. A bactéria *A. xylanus*, por exemplo, possui uma peroxirredoxina similar à AhpC de *S. typhimurium*, imediatamente a 5' do gene estrutural da NADH oxidase (Niimura e col., 2000). A bactéria *S. mutans*, por sua vez, possui as proteínas Nox1 (NADH oxidase formadora de peróxido de hidrogênio; Higuchi e col., 1999) e AhpC (imediatamente a 5' do gene estrutural da Nox1; Poole e col., 2000b), mas não catalase e cadeia respiratória. Interessantemente, o mutante de *S. mutans* deficiente em AhpC (mutante ΔahpC) não possui sensibilidade à CHP e peróxido de hidrogênio, indicando que outro sistema antioxidante compensa a deficiência de AhpC (Higuchi e col., 1999). Por outro lado, na bactéria *S. typhimurium*, que possui cadeia respiratória, a atividade NADH oxidase é menor que da enzima similar de *A. xylanus* (Niimura, 2007), minimizando o consumo de NADH e a formação de peróxido de hidrogênio.

A análise da sequência genômica de diferentes cepas de *X. fastidiosa* revelou que a bactéria possui vias metabólicas de respiração aeróbica e anaeróbica (Chatterjee e col., 2008), porém, devido à ausência do complexo cbb_3 (citocromo c oxidase com alta afinidade à oxigênio), a bactéria é incapaz de viver em ambiente anaeróbico (Moreira e col., 2004), justificando o motivo de ser restrita a condição especificamente aeróbica do xilema. *X. fastidiosa* possui vias metabólicas de síntese de heme, genes de componentes da cadeia respiratória e gene de catalase (ORF XF2232). Além disso, a bactéria também possui genes que codificam para outras proteínas envolvidas em decomposição de hidroperóxidos como glutatona peroxidase (ORF XF1890) e proteína Ohr (ORF XF1827), além das proteínas AhpC e Bcp.

Apesar da necessidade de estudos de viabilidade com mutantes de *X. fastidiosa* deficientes de AhpC e AhpF, para avaliar o efeito de uma possível inibição da AhpC de *X. fastidiosa*, a redundância funcional de enzimas antioxidantes pode ser um empecilho para a utilização da inibição como forma de controle para a infecção por *X. fastidiosa*, como proposto acima. Provavelmente, a inibição da AhpC seria compensada por outras proteínas antioxidantes expressas em *X. fastidiosa*, não resultando em um fenótipo de sensibilidade. É importante salientar que, além AhpC e Bcp, a proteína catalase também foi identificada no extrato celular protéico de *X. fastidiosa* (Smolka e col., 2003). Além disso, como *X. fastidiosa* possui cadeia respiratória, a atividade NADH oxidase não deve ser necessária para a regeneração de NAD^+ e, portanto, esta atividade da AhpF não deve ser essencial para a bactéria. Neste sentido, também seria necessário a realização de estudos comparativos com NADH oxidases de outras bactérias, a fim de verificar a relevância da atividade oxidase.

Caracterização da estrutura quaternária da proteína AhpC

A proteína AhpC de *X. fastidiosa*, como mostrado anteriormente, possui 70% de identidade e 84% de similaridade de sequência de aminoácidos com a AhpC de *S. typhimurium*. De acordo com a classificação sugerida por Copley e col. (2004), a AhpC de *S. typhimurium* é integrante da classe IV das peroxirredoxinas. Nesta classe está incluída a peroxirredoxina TPx de eritrócito humano (Schröder e col., 2000) que, assim como a AhpC de *S. typhimurium* (Wood e col., 2002), forma decâmero quando está oxidada. Estes decâmeros possuem forma anelar e configuração $(\alpha_2)_5$, que consiste em uma organização pentamérica de homodímeros (figura 98). Nas 2-Cys Prx típicas, dois motivos conservados foram identificados como necessários para a formação do decâmero, a região I (P₄₄XDFTFVCPTE₅₄, onde está localizada a cisteína peroxidásica, sublinhada) e a região II (XD₇₈(S/T)X(F/Y)XHXWXX(T/S/V)₈₉X), que formam uma superfície complementar (região I + região II) entre dímeros adjacentes (Wood e col., 2003). AhpC de *X. fastidiosa*, além de possuir elevada homologia com as proteínas da classe IV (de acordo com a classificação de Copley e col., 2004), apresenta as regiões I e II necessárias para a formação do decâmero (ver figura 18) e, portanto, também pode formar decâmeros.

Figura 98. Estrutura decamérica da AhpC C46S de *S. typhimurium* (PDB ID: 1N8J, Wood e col., 2003). A estrutura está representada em *cartoon* e cada monômero é mostrado numa cor diferente.

Visando estudar a influência do estado de oxidação das cisteínas ativas (Cys-47 e Cys-165) no estado oligomérico de AhpC de *X. fastidiosa*, analisamos a proteína por cromatografia de exclusão molecular (SEC) em condição nativa, e verificamos que havia pequena diferença no tempo de retenção da proteína reduzida (cisteínas na forma de tióis) e da proteína oxidada (cisteínas formando pontes dissulfeto intermoleculares, figura 99A). Em ambos os estados de oxidação, detectamos apenas estados com mais de 132 kDa, indicando que monômeros ou dímeros da AhpC, no seu estado nativo, estavam unidos através de forças fracas, formando um complexo oligomérico de elevada massa molecular. É interessante notar que a forma oxidada da proteína possui massa molecular aparentemente maior que a forma reduzida. Como a separação cromatográfica no método SEC depende não só da massa molecular, como também da forma espacial da proteína, provavelmente a forma oligomérica da AhpC oxidada possui uma estrutura maior que a forma reduzida (o que resulta em menor tempo de retenção). Essa diferença fica clara quando oxidamos a AhpC com equivalentes molares crescentes de peróxido de hidrogênio (figura 99B). Quanto maior o número de pontes dissulfeto intermoleculares formadas, relativamente maior o oligômero e, conseqüentemente, menor seu tempo de retenção.

Figura 99. Estado oligomérico da AhpC de *X. fastidiosa* por SEC. A proteína foi previamente reduzida com TCEP 10 mM por 30 minutos a temperatura ambiente e o TCEP foi removido utilizando coluna *HiTrap Desalting*. **(A) AhpC tratada com diferentes agentes oxidantes e redutores.** Linha preta (AhpC pré-reduzida, sem tratamento); linha azul (AhpC tratada com peróxido de hidrogênio, em excesso molar de 1,2 vezes); linha vermelha (AhpC tratada com diamida, em excesso molar de 10 vezes). Pico eluído em 26 minutos refere-se a diamida. **(B) AhpC tratada com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.** A proteína foi tratada com: linha preta – AhpC pré-reduzida (sem tratamento); linha verde – AhpC:H₂O₂ (1:0,125); linha magenta – AhpC:H₂O₂ (1:0,25); linha azul – AhpC: H₂O₂ (1:0,5); linha vermelha – AhpC: H₂O₂ (1:1). Tratamentos de 30 minutos a temperatura ambiente. Para comparação do tempo de retenção, todos os cromatogramas estão normalizados. Cada injeção equivale a 1,8 μ mol de proteína, utilizando a coluna TOSHAAS TSK-GEL G3000SW_{XL}, equilibrada com tampão Hepes-NaOH 50 mM pH 7,0, NaCl 50 mM. Como padrão de massa molecular utilizamos: albumina (66 e 132 kDa). O tempo de retenção de 132 kDa está indicado como uma linha pontilhada.

A AhpC de *X. fastidiosa*, reduzida e oxidada, também foi analisada em condições nativas por espalhamento dinâmico de luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*) em colaboração com o Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira (Departamento de Biologia, Campus Experimental do Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista – UNESP), utilizando equipamento do Centro de Biologia Molecular Estrutural do LNLS (Campinas – SP). Os resultados de DLS indicaram que a massa molecular das partículas de AhpC,

estimado a partir do raio das partículas modeladas como esferas, é de 212 kDa e 237 kDa, na amostra reduzida e oxidada, respectivamente (tabela XIV). Como o monômero da AhpC possui ~22,8 kDa, AhpC nativa provavelmente forma decâmeros estáveis em solução, independentemente do estado de oxidação de suas cisteínas.

Tabela XIV. Análise por DLS da AhpC de *X. fastidiosa* em condição nativa¹.

	R (nm)	Pd (nm)	M.M. _R (kDa)	%Int	%Massa
AhpC reduzida²					
Pico 1	5,9	16,8526	212	89,3	100,0
Pico 2	50,9	13,9538	33204	7,7	0,0
Pico 3	3870,8	0	835447000	3,0	0,0
AhpC oxidada²					
Pico 1	6,2	21,3944	237	55,0	99,8
Pico 2	81,6	21,2192	100134	36,4	0,0
Pico 3	3944,4	0	873062000	8,6	0,1

¹Parâmetros do experimento de DLS: intensidade do laser a 880 nm: 100%; meio: H₂O; temperatura: 25°C; concentração da amostra: 500 ng/ml; volume: 55 µl; tempo de aquisição: 10 s; volume: 55 µl; leituras: 200 (10 subleitura por leitura); modelo: esferas.

²Tabela de resultados: R (raio médio, em nm); Pd (polidispersividade, em nm); M.M._R (massa molecular estimado a partir do raio medido, em kDa); %Int (quantidade relativa de luz espalhada por cada população); e %Massa (quantidade relativa estimada de massa de cada pico).

³AhpC de *X. fastidiosa* foi previamente reduzida com TCEP 10 mM por 30 minutos a temperatura ambiente e o TCEP foi removido utilizando coluna *HiTrap Desalting* (AhpC pré-reduzida). Após, a proteína foi tratada com peróxido de hidrogênio 1 mM por 30 minutos a temperatura ambiente (AhpC oxidada).

A partir das observações que: (1) por SDS-PAGE, AhpC reduzida é monomérica e a forma oxidada é dimérica; (2) com o uso do DTNB, AhpC reduzida possui duas sulfidrilas livres por molécula, enquanto a forma oxidada não possui sulfidrilas livres; (3) por SEC e DLS, a AhpC é um decâmero estável, independentemente do estado de oxidação; podemos assumir que a proteína AhpC de *X. fastidiosa* é uma peroxirredoxina com mecanismo 2-Cys Prx típico, que está organizada num complexo decamérico, no qual cinco homodímeros estão unidos através de interações fracas, independente da existência ou não de pontes dissulfeto entre as subunidades de cada homodímero. De acordo com o proposto na literatura, o decâmero da AhpC de *X. fastidiosa*, como outras 2-Cys Prx típicas, deve estar organizado na configuração (α_2)₅ (Copley e col., 2004; Wood e col., 2002).

Como mostrado por Wood e col. (2002), a forma reduzida da AhpC de *S. typhimurium* é decamérica em qualquer concentração, enquanto o estado oligomérico da forma oxidada é dependente da concentração da proteína, sendo dimérica em baixas concentrações (2,5 µM), uma mistura de oligômeros em concentrações intermediárias (9 a 330 µM) e decamérica em altas concentrações (485 µM). Analisamos a AhpC de *X. fastidiosa* oxidada por SEC em diferentes concentrações (4,7 – 300 µM) e, ao contrário dos resultados obtidos por Wood e col. (2002), não observamos alteração do estado oligomérico em decorrência da concentração da proteína (dados não mostrados). Chauhan e Mande (2001), por outro lado, sugerem efeito da força iônica na atividade e no estado oligomérico da AhpC de *M. tuberculosis*, com a forma decamérica sendo mais estável em baixas concentrações de

NaCl. Estudos com AhpC de *X. fastidiosa*, na ausência ou presença de NaCl (50 mM), também não mostraram diferença no estado oligomérico (dados não mostrados).

Recentemente, Chuang e col. (2006) demonstraram que a AhpC de *H. pylori* possui não somente atividade peroxidase, mas também, em situações de estresse oxidativo, uma função chaperona condicionada à formação de complexos de elevada massa molecular (maiores que decâmeros). A dupla atividade chaperona/peroxidase foi mostrada pela primeira vez para peroxirredoxinas citosólicas de leveduras (Tsa1 e Tsa2; Jang e col., 2004) e, posteriormente, para a peroxirredoxina humana (hPrx1; Jang e col, 2006). Estudos preliminares de uma possível atividade chaperona da AhpC de *X. fastidiosa* foram realizados, utilizando o ensaio de inibição da agregação térmica da citrato sintase, porém, não observamos atividade chaperona da AhpC de *X. fastidiosa* (dados não mostrados).

Para verificar se a cauda de poli-histidina interferia no estado oligomérico de AhpC de *X. fastidiosa*, a mesma foi removida por clivagem com trombina (o vetor pET15b, no qual a proteína foi clonada, carrega uma sequência N-terminal que codifica a cauda de poli-histidina ligada à sequência da proteína por um sítio de clivagem de trombina; figura 100). A análise por SEC indicou que o perfil cromatográfico era semelhante ao da proteína com cauda de poli-histidina, mostrando que não havia interferência no estado oligomérico da proteína (dados não mostrados).

Figura 100. Verificação da clivagem por trombina da cauda de poli-histidina da AhpC de *X. fastidiosa* por SDS-PAGE. Raia 1 – padrão de massa molecular BenchMark Protein Ladder (30, 40, 50, 60 e 70 kDa); 2 – AhpC clivada (20,9 kDa); 3 – AhpC não clivada (22,8 kDa). Gel SDS-PAGE não-redutor, as proteínas estão na forma dimérica, unidas por ponte dissulfeto intermolecular. O equivalente a 10 µg de proteína foi analisado por SDS-PAGE.

De acordo com Jang e col. (2004), Tsa1 de *S. cerevisiae* quando submetida a estresse térmico ou oxidativo converte-se de complexos de baixa massa molecular para complexos de elevada massa molecular que, quando analisados por SDS-PAGE, revelam que a proteína migra como monômero e, portanto, não possui pontes dissulfeto intermoleculares. Ao contrário dos complexos de baixa massa molecular, que possuem apenas atividade peroxidásica, os complexos de elevada massa molecular possuem exclusivamente atividade chaperona. As mesmas mudanças estruturais e funcionais são observadas quando Tsa1 de *S. cerevisiae* é tratada com peróxido de hidrogênio na presença do sistema tiorredoxina. É interessante notar que não ocorrem mudanças quando a proteína é tratada apenas com excesso de peróxido de hidrogênio. Chuang e col. (2006) mostram que tratamentos prolongados com peróxido de hidrogênio (10 mM por 12 horas) induzem oligomerização e aumentam a atividade chaperona da AhpC de *H. pylori*. Os autores também mostram que não há formação de pontes dissulfeto na proteína oxidada e que o produto de oxidação é resistente à redução por DTT. A partir dessas observações, foi sugerido que as mudanças estruturais e funcionais ocorrem quando as peroxirredoxinas são superoxidadas à ácido sulfinico ou ácido sulfônico. Dessa forma, a formação de pontes dissulfeto em 2-Cys Prx impediria a superoxidação das cisteínas reativas que atuam como gatilhos para a formação de complexos de elevada massa molecular. Provavelmente, na presença de peróxido de hidrogênio e do sistema tiorredoxina (sistema redutor), qualquer ponte dissulfeto formada na Tsa1 de *S. cerevisiae* seria reduzida e estaria disponível para sofrer nova oxidação, aumentando a frequência de formação de ácido sulfênico, que pode novamente formar ponte dissulfeto ou ser oxidado à ácido sulfinico ou ácido

sulfônico (esquematizado na figura 101). Em excesso de peróxido de hidrogênio e na presença de redutor tiólico (como o sistema tioredoxina ou DTT), isso ocorreria quantas vezes fossem necessárias para que toda a proteína fosse superoxidada, já que ácido sulfínico ou sulfônico não são reduzidos pelo sistema tioredoxina, nem por DTT, o que explicaria a resistência à redução por DTT do produto de oxidação prolongada da AhpC de *H. pylori*, verificada por Chuang e col. (2006). A PrxI humana, por exemplo, é inativada por peróxido de hidrogênio apenas na presença do sistema tioredoxina. Nesta condição, somente 0,072% da peroxidoredoxina total é superoxidada a ácido sulfínico, a cada ciclo catalítico (Yang e col., 2002). Recentemente, Lim e col. (2008) relacionaram a formação de ácido sulfônico na Tsa1 de *S. cerevisiae* com formação de oligômeros de elevada massa molecular, perda da atividade peroxidásica e ganho da atividade chaperona molecular.

Figura 101. Inativação das 2-Cys Prx típicas pelo excesso de hidroperóxido e na presença do sistema redutor. Durante um ciclo catalítico, uma pequena fração das peroxidoredoxinas é superoxidada (linhas pontilhadas). Destacado em cinza, superoxidação das peroxidoredoxinas à ácido sulfínico e ácido sulfônico. É importante salientar que a transferência de elétrons do NAD(P)H para a peroxidoredoxina não é direta, mas por intermédio do sistema redutor (por exemplo, AhpF ou sistema tioredoxina). DTT também pode ser utilizado, *in vitro*, como agente redutor.

A necessidade de peroxidoredoxina estar engajada em seu ciclo catalítico para haver superoxidação da cisteína peroxidásica ficou evidente quando tentamos superoxidar a AhpC de *X. fastidiosa* com excesso de peróxido de hidrogênio (1 proteína:50 H_2O_2). Não houve diferença significativa no perfil cromatográfico em relação a proteína oxidada com 1 equivalente de peróxido de hidrogênio. Analisamos por SDS-PAGE, as amostras de AhpC oxidadas por quantidades crescentes de peróxido de hidrogênio. Como seria esperado, a superoxidação não resultaria em dimerização das proteínas, migrando como a forma monomérica em condição desnaturante. Não conseguimos superoxidar a proteína nas condições testadas, mesmo utilizando um excesso molar de 2500 vezes de peróxido de hidrogênio (figura 102). Como descrito anteriormente, as 2-Cys Prx típicas bacterianas, como a AhpC de *X. fastidiosa*, são consideradas resistentes a inativação por hidroperóxidos (Wood e col., 2003). Porém, como discutido acima, a inativação somente deve ocorrer na presença do sistema tioredoxina ou por tempos prolongados de exposição ao hidroperóxido.

Figura 102. Estudo da superoxidação de AhpC por SDS-PAGE. A proteína foi previamente reduzida com TCEP, o TCEP foi removido utilizando coluna *HiTrap Desalting* e a proteína foi tratada por 30 minutos a temperatura ambiente conforme indicado. Raia 1 – padrão de massa molecular BenchMark Protein Ladder (10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 *highlight*, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160 e 220 kDa); 2 – AhpC pré-reduzida (20 μ M); 3 – AhpC 20 μ M + H₂O₂ 1 mM; 4 – AhpC 20 μ M + H₂O₂ 5 mM; 5 – AhpC 20 μ M + H₂O₂ 10 mM; 6 – AhpC 20 μ M + H₂O₂ 20 mM; 7 – AhpC 20 μ M + H₂O₂ 50 mM; e 8 – AhpC 20 μ M + TCEP 5 mM. O equivalente a 6 μ g de proteína foi analisado por SDS-PAGE.

Como, provavelmente, o ganho da atividade chaperona molecular depende da formação de complexos de elevada massa molecular que, por sua vez, depende da superoxidação da cisteína peroxidásica, ainda buscamos por uma condição que leve a superoxidação de AhpC de *X. fastidiosa* para, futuramente, analisá-las quanto ao grau de oligomerização e comparar suas atividades enzimáticas, peroxidase e chaperona. De qualquer forma, AhpC de *X. fastidiosa* não apresenta os elementos que facilitam a superoxidação de peroxirredoxinas (inserção de três aminoácidos associados a um motivo GGLG e extensão C-terminal com um motivo YF; ver figura 18; Wood e col., 2003) e que, consequentemente, induzem a oligomerização relacionada com a atividade chaperona das peroxirredoxinas (Chuang e col. 2006; Jang e col., 2004). Essas observações sugerem que a AhpC de *X. fastidiosa* não deve apresentar atividade chaperona e, portanto, o significado biológico da formação desse decâmero ainda não é conhecido, dependendo de mais investigações para sua elucidação.

Conclusões

1. Através de busca *in silico* no banco de dados do genoma de *X. fastidiosa*, identificamos dois genes que codificam para prováveis peroxirredoxinas, AhpC (alquil hidroperóxido redutase subunidade C) e Bcp (proteína comigratória com bacterioferritina). Bcp e AhpC de *X. fastidiosa* possuem elevada similaridade de sequência de aminoácidos (maior que 50%) com peroxirredoxinas de *E. coli* e, principalmente, possuem motivos característicos das peroxirredoxinas, como sequências conservadas na região da cisteína peroxidásica e sequências da interface proteína-proteína. Alinhamento de sequência de aminoácidos com proteínas similares indica que as duas únicas cisteínas existentes na proteína AhpC de *X. fastidiosa* são aquelas conservadas em 2-Cys Prx típicas e caracterizadas como envolvidas no ciclo catalítico da proteína (Cys-47 é a peroxidásica e Cys-165 é a de resolução). A proteína Bcp de *X. fastidiosa*, porém, possui apenas um resíduo de cisteína conservado, apesar de possuir quatro resíduos em sua sequência. Na Bcp de *X. fastidiosa*, o resíduo de cisteína conservado com peroxirredoxinas similares é caracterizado como a cisteína peroxidásica (Cys-47 na Bcp de *X. fastidiosa*) mas a cisteína de resolução, que está predominantemente posicionada quatro aminoácidos no sentido C-terminal, está ausente.
2. Os genes *ahpC* e *bcp* de *X. fastidiosa* foram clonados e expressos em *E. coli* e as proteínas recombinantes foram purificadas à homogeneidade por cromatografia de afinidade a níquel. Por SDS-PAGE e quantificação do número de cisteínas livres por DTNB da AhpC, reduzida e oxidada, confirmamos a formação de ponte dissulfeto intermolecular. Além disso, a proteína possui atividade peroxidásica dependente de tiól, verificada pelos ensaios de proteção a GS e FOX, e portanto AhpC de *X. fastidiosa* é uma peroxirredoxina da família 2-Cys Prx típicas. Bcp de *X. fastidiosa* também possui atividade peroxidásica dependente de tiól mas, diferentemente da AhpC, a formação da ponte dissulfeto é intramolecular, caracterizando a Bcp de *X. fastidiosa* como uma peroxirredoxina da família 2-Cys Prx atípicas.
3. A caracterização do mecanismo redox da Bcp de *X. fastidiosa* exigiu a realização de experimentos de mutagênese. Ensaio funcionais com proteínas mutantes Bcp Cys→Ser indicavam que a Cys-47 era essencial para a atividade peroxidásica da Bcp de *X. fastidiosa* e, portanto, era a cisteína peroxidásica, mas somente conseguimos identificar inequivocamente a Cys-83 como a cisteína de resolução através de experimentos de espectrometria de massas. Basicamente, identificamos um peptídeo obtido por digestão trípica que possuía a ponte dissulfeto envolvida no ciclo catalítico (que, neste caso, é formada entre as Cys-47 e Cys-83). A identificação da Cys-83 como cisteína de resolução por espectrometria de massas corroboram os resultados obtidos nos estudos funcionais com Bcp C83S que, *a priori*, eram de difícil interpretação e pouco conclusivos.
4. As peroxirredoxinas AhpC e Bcp de *X. fastidiosa* não apresentaram significativa preferência de substrato quando medimos a atividade de decomposição de peróxido de hidrogênio, TBHP e CHP, pelo ensaio FOX e utilizando como redutor o composto tiólico sintético DTT. Apesar de pouco significativa, a atividade específica das proteínas era menor para TBHP. Utilizando DTT com redutor

no ensaio FOX, a atividade específica da Bcp foi de 20 a 30 vezes menor que a atividade específica da AhpC, porém, na presença da tiorredoxina TsnC de *X. fastidiosa*, a atividade específica da Bcp foi aumentada 30 vezes.

5. Para reconstituir *in vitro* os prováveis sistemas redutores das peroxirredoxinas de *X. fastidiosa*, clonamos e expressamos em *E. coli* os genes que codificam as proteínas tiorredoxina (TsnC), tiorredoxina redutase (TrxR) e alquil hidroperóxido redutase subunidade F (AhpF) de *X. fastidiosa*. As proteínas recombinantes também foram purificadas por cromatografia de afinidade a níquel. O gene *ahpf* de *X. fastidiosa* está imediatamente a 3' do gene estrutural *ahpc*, indicando a existência de um provável *operon* AhpC/F em *X. fastidiosa*.
6. O sistema tiorredoxina de *X. fastidiosa* (TsnC e TrxR) mostrou-se capaz de reduzir Bcp à custa de NADPH. Utilizando o ensaio de oxidação de NADPH e análise de bisubstrato, verificamos que a Bcp de *X. fastidiosa* possuía eficiência catalítica de redução de hidroperóxidos relativamente baixa ($k_{cat}/K_M \sim 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) em comparação a outras enzimas detoxificantes de hidroperóxidos, como, as glutational peroxidases dependentes de selênio e catalases ($k \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Em contraste, através do ensaio de cinética competitiva com HRP, mais adequado para a determinação de parâmetros cinéticos de peroxirredoxinas, determinamos a constante de segunda ordem da reação de peróxido de hidrogênio com a Bcp de *X. fastidiosa*, assim como com a AhpC, como sendo na mesma ordem de grandeza de glutational peroxidases dependentes de selênio e catalases. O ensaio de cinética competitiva com HRP também foi utilizado para a determinação do pK_a da cisteína peroxidásica da Bcp de *X. fastidiosa*, cujo valor baixo ($pK_a = 6,2$) confirma essa propriedade característica das peroxirredoxinas, no sentido de aumentar a reatividade da cisteína ativa frente a hidroperóxidos.
7. Em *X. fastidiosa*, a atividade peroxidásica da AhpC é sustentada pela AhpF à custa de NAD(P)H. Através da utilização de eletrodos específicos para peróxido e oxigênio, conseguimos caracterizar a atividade peroxidásica da AhpC e também mostrar que AhpF possuía atividade oxidase formadora de peróxido de hidrogênio. Adicionalmente, por cromatografia de exclusão molecular e espalhamento dinâmico de luz, verificamos que AhpC de *X. fastidiosa* é um decâmero estável, independentemente do seu estado de oxidação, composto de cinco homodímeros na configuração $(\alpha_2)_5$.
8. Elucidamos a estrutura da proteína mutante Bcp C47S de *X. fastidiosa*, a primeira estrutura de PrxQ β caracterizada até o momento. A caracterização da estrutura tridimensional permitiu estabelecer bases moleculares para o entendimento do mecanismo catalítico da Bcp de *X. fastidiosa*. A estrutura de Bcp C47S é representativa da forma reduzida da proteína selvagem e, através de comparação com estruturas de *A. pernix* e em concordância com dados de dicroísmo circular, mostramos que um rearranjo estrutural significativo é necessário para a formação da ponte dissulfeto intramolecular que foi identificada pelos estudos bioquímicos realizados. A partir da estrutura de Bcp C47S também extraímos elementos que justificavam o baixo pK_a da cisteína peroxidásica, em especial a contribuição da Arg-122 da tríade catalítica, e a impossibilidade de se utilizar a fluorescência dos resíduos de triptofano, que estão distantes das cisteínas envolvidas no ciclo catalítico, para a

determinação das constantes de segunda ordem da Bcp com outros hidroperóxidos, além de peróxido de hidrogênio.

Em síntese, caracterizamos funcionalmente as duas peroxirredoxinas de *X. fastidiosa* (Bcp e AhpC) e seus sistemas redutores (TsnC e TrxR, e AhpF, respectivamente). Também descrevemos o ciclo catalítico das peroxirredoxinas (Bcp, como uma 2-Cys Prx atípica, e AhpC, como uma 2-Cys Prx típica) e as cisteínas envolvidas na redução de hidroperóxidos (na Bcp, Cys-47 e Cys-83, e na AhpC, Cys-47 e Cys-165). Além disso, caracterizamos a estrutura quaternária da AhpC (que se comporta como decâmero estável em solução) e elucidamos a estrutura cristalográfica de Bcp C47S. Neste sentido, conseguimos entender os papéis biológicos dessas proteínas, obtendo informações relevantes para o entendimento dos mecanismos da patogenicidade da *X. fastidiosa*.

VI. Referências

- Abramovitch, R.B.; e Martin, G.B. (2004) "Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses", *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**: 356-64.
- Akaike, T.; Sato, K.; Ijiri, S.; Miyamoto, Y.; Kohno, M.; Ando, M.; e Maeda, H. (1992) "Bactericidal activity of alkyl peroxy radicals generated by heme-iron-catalyzed decomposition of organic peroxides", *Arch. Biochem. Biophys.*, **294**: 55-63.
- Alphey, M.S.; Bond, C.S.; Tetaud, E.; Fairlamb, A.H.; e Hunter, W.N. (2000) "The structure of reduced trypanothione peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2Cys-peroxiredoxins", *J. Mol. Biol.*, **300**: 903-16.
- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; e Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.*, **25**: 3389-402.
- Apel, K.; e Hirt, H. (2004) "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction", *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**: 373-99.
- Arner, E.S.; e Holmgren, A. (2000) "Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase", *Eur. J. Biochem.*, **267**: 6102-9.
- Atichartpongkul, S.; Loprasert, S.; Vattanaviboon, P.; Whangsuk, W.; Helmann, J.D.; e Mongkolsuk, S. (2001) "Bacterial Ohr and OsmC paralogues define two protein families with distinct functions and patterns of expression", *Microbiology*, **147**: 1775-82.
- Baker, N.A.; Sept, D.; Joseph, S.; Holst, M.J.; e McCammon, J.A. (2001) "Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 10037-41.
- Blessing, R.H. (1995) "An empirical correction for absorption anisotropy", *Acta Cryst.*, **A51**: 33-8.
- Bryk, R.; Griffin, P.; e Nathan, C. (2000) "Peroxy-nitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins", *Nature*, **407**: 211-15.
- Bryk, R.; Lima, C.D.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P. e Nathan, C. (2002) "Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein", *Science*, **295**: 1073-7.
- Bunn, H.F.; e Poyton, R.O. (1996) "Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia", *Physiol. Rev.*, **76**: 839-85.
- Caldas, T.; Malki, A.; Kern, R.; Abdallah, J.; e Richarme, G. (2006) "The *Escherichia coli* thioredoxin homolog YbbN/Trxsc is a chaperone and a weak protein oxidoreductase", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **343**: 780-6.
- Chae, H.Z.; Chung, S.J.; e Rhee, S.G. (1994c) "Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast", *J. Biol. Chem.*, **269**: 27670-8.
- Chae, H.Z.; Kim, I.H.; Kim, K.; e Rhee, S.G. (1993) "Cloning; sequencing; and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*", *J. Biol. Chem.*, **268**: 16815-21.
- Chae, H.Z.; Robison, K.; Poole, L.B.; Church, G.; Storz, G.; e Rhee, S.G. (1994a) "Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkylhydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 7017-21.
- Chae, H.Z.; Uhm, T.B.; e Rhee, S.G. (1994b) "Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 7022-6.
- Chatterjee, S.; Almeida, R.P.; e Lindow, S. (2008) "Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*", *Annu. Rev. Phytopathol.*, **46**: 243-71.
- Chauhan, R.; e Mande, S. (2002) "Site-directed mutagenesis reveals a novel catalytic mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* alkylhydroperoxidase C", *Biochem. J.*, **367**: 255-61.
- Chauhan, R.; e Mande, S.C. (2001) "Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv alkyl hydroperoxidase AhpC points to the importance of ionic interactions in oligomerization and activity", *Biochem. J.*, **354**: 209-15.

- Chivers, P.T.; e Raines, R.T. (1997) "General acid/base catalysis in the active site of *Escherichia coli* thioredoxin", *Biochemistry*, **36**: 15810-6.
- Choi, J.; Choi, S.; Choi, J.; Cha, M.K.; Kim, I.H.; e Shin, W. (2003) "Crystal structure of *Escherichia coli* thiol peroxidase in the oxidized state: insights into intramolecular disulfide formation and substrate binding in atypical 2-Cys peroxiredoxins", *J. Biol. Chem.*, **278**: 49478-86.
- Choi, J.; Choi, S.; Chon, J.K.; Choi, J.; Cha, M.K.; Kim, I.H.; e Shin, W. (2005) "Crystal structure of the C107S/C112S mutant of yeast nuclear 2-Cys peroxiredoxin", *Proteins*, **61**: 1146-9.
- Chuang, M.H.; Wu, M.S.; Lo, W.L.; Lin, J.T.; Wong, C.H.; e Chiou, S.H. (2006) "The antioxidant protein alkylhydroperoxide reductase of *Helicobacter pylori* switches from a peroxide reductase to a molecular chaperone function", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**: 2552-7.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) "The CCP4 suite: programs for protein crystallography", *Acta Cryst.*, **D50**: 760-3.
- Copley, S.D.; Novak, W.R.; e Babbitt, P.C. (2004) "Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor", *Biochemistry*, **43**: 13981-95.
- de Wit, P.J. (2007) "How plants recognize pathogens and defend themselves", *Cell. Mol. Life Sci.*, **64**: 2726-32.
- Declercq, J.P.; Evrard, C.; Clippe, A.; Stricht, D.V.; Bernard, A.; e Knoops, B. (2001) "Crystal structure of human peroxiredoxin 5, a novel type of mammalian peroxiredoxin at 1.5 Å resolution", *J. Mol. Biol.*, **311**: 751-59.
- Diekmann, D.; Abo, A.; Johnston, C.; Segal, A.W.; e Hall, A. (1994) "Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity", *Science*, **265**: 531-3.
- Dietz, K.J.; Horling, F.; Konig, J.; e Baier, M. (2002) "The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation", *J. Exp. Bot.*, **53**: 1321-9.
- Dolinsky, T.J.; Nielsen, J.E.; McCammon, J.A.; e Baker, N.A. (2004) "PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations", *Nucleic Acids Res.*, **32**: W665-7.
- Dow, J.M.; e Daniels, M.J. (2000) "*Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants", *Yeast*, **17**: 263-71.
- Egan, M.J.; Wang, Z.Y.; Jones, M.A.; Smirnov, N.; e Talbot, N.J. (2007) "Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**: 11772-7.
- Ellis, H.R.; e Poole, L.B. (1997) "Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*", *Biochemistry*, **36**: 13349-56.
- Emsley, P.; e Cowtan, K. (2004) "Coot: model-building tools for molecular graphics", *Acta Cryst.*, **D60**: 2126-32.
- Evrard, C.; Capron, A.; Marchand, C.; Clippe, A.; Wattiez, R.; Soumillion, P.; Knoops, B.; e Declercq, J.P. (2004) "Crystal structure of a dimeric oxidized form of human peroxiredoxin 5", *J. Mol. Biol.*, **337**: 1079-90.
- Flohé, L.; Steinert, P.; Hecht, H.J.; e Hofmann, B. (2002) "Tryparedoxin and tryparedoxin peroxidase", *Methods Enzymol.*, **347**: 244-58.
- Foreman, J.; Demidchik, V.; Bothwell, J.H.; Mylona, P.; Miedema, H.; Torres, M.A.; Linstead, P.; Costa, S.; Brownlee, C.; Jones, J.D.; Davies, J.M.; e Dolan, L. (2003) "Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth", *Nature*, **422**: 442-6.
- Fourquet, S.; Huang, M.E.; D'Autreaux, B.; e Toledano, M.B. (2008) "The dual functions of thiol-based peroxidases in H₂O₂ scavenging and signaling", *Antioxid. Redox Signal.*, **10**: 1565-76.
- Fuangthong, M.; Atichartpongkul, S.; Mongkolsuk, S.; e Helmann, J.D. (2001) "OhrR is a repressor of ohrA, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*", *J. Bacteriol.*, **183**: 4134-41.

- Fundecitrus (2006). Disponível na internet via WWW. URL: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cvc.html>. Site consultado em 5 de fevereiro de 2006.
- Guimarães, B.G.; Souchon, H.; Honoré, N.; Saint-Joanis, B.; Brosch, R.; Shepard, W.; Cole, S.T.; e Alzari, P.M. (2005) "Structure and mechanism of the alkyl hydroperoxidase AhpC, a key element of the *Mycobacterium tuberculosis* defense system against oxidative stress", *J. Biol. Chem.*, **280**: 25735-42.
- Hahlbrock, K.; Scheel, D.; Logemann, E.; Nurnberger, T.; Parniske, M.; Reinold, S.; Sacks, W.R.; e Schmelzer, E. (1995) "Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 4150-7.
- Halliwell, B.; e Gutteridge, J.M.C. (1999) "Oxidative stress: adaptation; damage; repair and death", In: Halliwell, B.; e Gutteridge, J.M.C. (Ed.), "Free Radicals in Biology and Medicine", Third edition, Oxford: Oxford University Press, p. 105-350.
- Hammad, Y.; Maréchal, J.; Cournoyer, B.; Normand, P.; e Domenach, A.M. (2001) "Modification of the protein expression pattern induced in the nitrogen-fixing actinomycete *Frankia* sp. strain ACN14a-tsr by root exudates of its symbiotic host *Alnus glutinosa* and cloning of the *sodF* gene", *Can. J. Microbiol.*, **47**: 541-47.
- Higuchi, M.; Shimada, M.; Matsumoto, J.; Yamamoto, Y.; Rhaman, A.; e Kamio, Y. (1994) "Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding the H₂O₂-forming NADH oxidase from *Streptococcus mutans*", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**: 1603-7.
- Higuchi, M.; Yamamoto, Y.; Poole, L.B.; Shimada, M.; Sato, Y.; Takahashi, N.; e Kamio, Y. (1999) "Functions of two types of NADH oxidases in energy metabolism and oxidative stress of *Streptococcus mutans*", *J. Bacteriol.*, **181**: 5940-7.
- Hillas, P.J.; del Alba, F.S.; Oyarzabal, J.; Wilks, A.; e de Montellano P.R.O. (2000) "The AhpC and AhpD antioxidant defense system of *Mycobacterium tuberculosis*", *J. Biol. Chem.*, **275**: 18801-9.
- Hirotsu, S.; Abe, Y.; Okada, K.; Nagahara, N.; Hori, H.; Nishino, T.; e Hakoshima, T. (1999) "Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 12333-8.
- Holmgren, A. (1972) "Tryptophan fluorescence study of conformational transitions of the oxidized and reduced form of thioredoxin", *J. Biol. Chem.*, **247**: 1992-8.
- Horling, F.; König, J.; e Dietz, K.J. (2002) "Type IIC peroxiredoxin, a member of the peroxiredoxin family of *Arabidopsis thaliana*: its expression and activity in comparison with other peroxiredoxins", *Plant Physiol. Biochem.*, **40**: 491-9.
- Horling, F.; Lamkemeyer, P.; König, J.; Finkemeier, I.; Kandlbinder, A.; Baier, M.; e Dietz, K.J. (2003) "Divergent light-, ascorbate-, and oxidative stress-dependent regulation of expression of the peroxiredoxin gene family in *Arabidopsis*", *Plant Physiol.*, **131**: 317-25.
- Jacob, C.; Knight, I.; Winyard, P.G. (2006) "Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways", *Biol. Chem.*, **387**: 1385-97.
- Jacobson, F.S.; Morgan, R.W.; Christman, M.F.; e Ames, B.N. (1989) "An alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium* involved in the defense of DNA against oxidative damage. Purification and properties", *J. Biol. Chem.*, **264**: 1488-96.
- Jang, H.H.; Kim, S.Y.; Park, S.K.; Jeon, H.S.; Lee, Y.M.; Jung, J.H.; Lee, S.Y.; Chae, H.B.; Jung, Y.J.; Lee, K.O.; Lim, C.O.; Chung, W.S.; Bahk, J.D.; Yun, D.J.; Cho, M.J.; e Lee, S.Y. (2006) "Phosphorylation and concomitant structural changes in human 2-Cys peroxiredoxin isotype I differentially regulate its peroxidase and molecular chaperone functions", *FEBS Lett.*, **580**: 351-5.
- Jang, H.H.; Lee, K.O.; Chi, Y.H.; Jung, B.G.; Park, S.K.; Park, J.H.; Lee, J.R.; Lee, S.S.; Moon, J.C.; Yun, J.W.; Choi, Y.O.; Kim, W.Y.; Kang, J.S.; Cheong, G.W.; Yun, D.J.; Rhee, S.G.; Cho, M.J.; Lee, S.Y. (2004) "Two enzymes in one: two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function", *Cell*, **117**: 625-35.

- Jeng, M.F.; Campbell, A.P.; Begley, T.; Holmgren, A.; Case, D.A.; Wright, P.E.; e Dyson, H.J. (1994) "High-resolution solution structures of oxidized and reduced *Escherichia coli* thioredoxin", *Structure*, **2**: 853-68.
- Jeong, W.; Cha, M.-K. e Kim, Il-H. (2000) "Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of bacterioferritin comigratory protein (BCP) as a new member of the thiol-specific antioxidant protein (TSA)/alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family", *J. Biol. Chem.*, **275**: 2924-30.
- Jiang, Z.-Y.; Hunt, J.V.; e Wolff, S.P. (1992) "Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein", *Anal. Biochem.*, **204**: 384-9.
- Jones, M.A.; Raymond, M.J.; Yang, Z.; e Smirnov, N. (2007) "NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase", *J. Exp. Bot.*, **58**: 1261-70.
- Kabsch, W. (1988) "Evaluation of single-crystal diffraction data from a position-sensitive detector", *J. Appl. Cryst.*, **21**: 916-24.
- Kabsch, W.; e Sander, C. (1983) "Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features", *Biopolymers*, **22**: 2577-637.
- Kang, S.W.; Baines, I.C.; e Rhee, S.G. (1998) "Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine", *J. Biol. Chem.*, **273**: 6303-11.
- Kim, K.; Kim, I.H.; Lee, Ki-Y.; Rhee, S.G.; e Stadtman, E.R. (1988) "The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system", *J. Biol. Chem.*, **263**: 4704-11.
- Kitano, K.; Niimura, Y.; Nishiyama, Y.; e Miki, K. (1999) "Stimulation of peroxidase activity by decamerization related to ionic strength: AhpC protein from *Amphibacillus xylanus*", *J. Biochem. (Tokyo)*, **126**: 313-19.
- Kong, W.; Shiota, S.; Shi, Y.; Nakayama, H.; e Nakayama, K. (2000) "A novel peroxiredoxin of the plant *Sedum lineare* is a homologue of *Escherichia coli* bacterioferritin co-migratory protein (Bcp)", *Biochem. J.*, **351**: 107-14.
- Konig, J.; Baier, M.; Horling, F.; Kahmann, U.; Harris, G.; Schürmann, P.; e Dietz, K.J. (2002) "The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**: 5738-43.
- Korshunov, S.S.; Skulachev, V.P.; e Starkov, A.A. (1997) "High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria", *FEBS Lett.*, **416**: 15-8.
- Kortemme, T.; e Creighton, T.E. (1995) "Ionisation of cysteine residues at the termini of model α -helical peptides. Relevance to unusual thiol pK_a values in proteins of the thioredoxin family", *J. Mol. Biol.*, **253**: 799-812.
- Kosower, N.S.; Kosower, E.M.; Wertheim, B.; e Correa, W.S. (1969) "Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**: 593-6.
- Kristensen, P.; Rasmussen, D.E.; e Kristensen, B.I. (1999) "Properties of thiol-specific anti-oxidant protein or calpromotin in solution", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **262**: 127-31.
- Kthiri, F.; Le, H.T.; Tagourti, J.; Kern, R.; Malki, A.; Caldas, T.; Abdallah, J.; Landoulsi, A.; e Richarme, G. (2008) "The thioredoxin homolog YbbN functions as a chaperone rather than as an oxidoreductase", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **374**: 668-72.
- Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S.; e Thornton, J.M. (1993) "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures", *J. Appl. Cryst.*, **26**: 283-91.
- Latifi, A.; Ruiz, M.; Jeanjean, R.; e Zhang, C.C. (2007) "PrxQ-A, a member of the peroxiredoxin Q family, plays a major role in defense against oxidative stress in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120", *Free Radic. Biol. Med.*, **42**: 424-31.
- Lee, S.P.; Hwang, Y.S.; Kim, Y.J.; Kwon, Ki-S.; Kim, H.J.; Kim, K.; e Chae, H.Z. (2001) "Cyclophilin A Binds to Peroxiredoxins and Activates Its Peroxidase Activity", *J. Biol. Chem.*, **276**: 29826-32.

- Leslie, A.G.W. (1992) "Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data", *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography*, **26**.
- Lim, J.C.; Choi, H.I.; Park, Y.S.; Nam, H.W.; Woo, H.A.; Kwon, K.S.; Kim, Y.S.; Rhee, S.G.; Kim, K.; e Chae, H.Z. (2008) "Irreversible oxidation of the active-site cysteine of peroxiredoxin to cysteine sulfonic acid for enhanced molecular chaperone activity", *J. Biol. Chem.*, **283**: 28873-80.
- Low, F.M.; Hampton, M.B.; Peskin, A.V.; e Winterbourn, C.C. (2007) "Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte", *Blood*, **109**: 2611-7.
- Matsumura, T.; Okamoto, K.; Iwahara, S.; Hori, H.; Takahashi, Y.; Nishino, T.; e Abe, Y. (2008) "Dimer-oligomer interconversion of wild-type and mutant rat 2-Cys peroxiredoxin: disulfide formation at dimer-dimer interfaces is not essential for decamerization", *J. Biol. Chem.*, **283**: 284-93.
- McCoy, A.J.; Grosse-Kunstleve, R.W.; Adams, P.D.; Winn, M.D.; Storoni, L.C.; e Read, R.J. (2007) "Phaser crystallographic software", *J. Appl. Cryst.*, **40**: 658-74.
- Mongkolsuk, S.; Praituan, W.; Loprasert, S.; Fuangthong, M.; e Chamnongpol, S. (1998) "Identification and characterization of a new organic hydroperoxide resistance (*ohr*) gene with a novel pattern of oxidative stress regulation from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*", *J. Bacteriol.*, **180**: 2636-43.
- Monteiro, G.; Horta, B.B.; Pimenta, D.C.; Augusto, O.; e Netto L.E.S. (2007) "Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**: 4886-91.
- Moreira, L.M.; de Souza, R.F.; Almeida, N.F.Jr; Setubal, J.C.; Oliveira, J.C.; Furlan, L.R.; Ferro, J.A.; e da Silva, A.C. (2004) "Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria", *Annu. Rev. Phytopathol.*, **42**: 163-84.
- Neidhardt, F.C.; Vaughn, V.; Phillips, T.A.; e Bloch, P.L. (1983) "Gene-protein index of *Escherichia coli* K-12", *Microbiol. Rev.*, **47**: 231-84.
- Netto, L.E.S. (2001) "Oxidative stress response in sugarcane", *Rev. Bras. Genet.*, **24**: 93-102.
- Netto, L.E.S.; Chae, H.Z.; Kang, S.W.; Rhee, S.G.; e Stadtman, E.R. (1996) "Removal of hydrogen peroxide is involved with the antioxidant properties of Thiol Specific Antioxidant (TSA). TSA possesses thiol peroxidase activity", *J. Biol. Chem.*, **271**: 15315-21.
- Netto, L.E.S.; de Oliveira, M.A.; Monteiro, G.; Demasi, A.P.; Cussiol, J.R.; Discola, K.F.; Demasi, M.; Silva, G.M.; Alves, S.V.; Faria, V.G.; e Horta, B.B. (2007) "Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more", *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.*, **146**: 180-93.
- Niimura, Y. (2007) "The NADH oxidase-Prx system in *Amphibacillus xylanus*", *Subcell. Biochem.*, **44**: 195-205.
- Niimura, Y.; Nishiyama, Y.; Saito, D.; Tsuji, H.; Hidaka, M.; Miyaji, T.; Watanabe, T.; e Massey, V. (2000) "A hydrogen peroxide-forming NADH oxidase that functions as an alkyl hydroperoxide reductase in *Amphibacillus xylanus*", *J. Bacteriol.*, **182**: 5046-51.
- Noguera-Mazon, V.; Krimm, I.; Walker, O.; e Lancelin, J-M. (2006) "Protein-protein interactions within peroxiredoxin systems", *Photosynth. Res.*, **89**: 277-90.
- O'Toole, P.W.; Logan, S.M.; Kostrzynska, M.; Wadstrom, T.; e Trust, T.J. (1991) "Isolation and biochemical and molecular analyses of a species-specific protein antigen from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*", *J. Bacteriol.*, **173**: 505-13.
- Ochsner, U.A.; Hasset, D.J.; e Vasil, M.L. (2001) "Genetic and physiological characterization of *ohr*, encoding a protein involved in organic hydroperoxide resistance in *Pseudomonas aeruginosa*", *J. Bacteriol.*, **183**, 773-778.
- Ogusucu, R.; Rettori, D.; Munhoz, D.C.; Netto, L.E.S.; e Augusto, O. (2007) "Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: Rate constants by competitive kinetics", *Free Rad. Biol. Med.*, **42**: 326-34.
- Oliveira, M.A.; Guimarães, B.G.; Cussiol, J.R.; Medrano, F.J.; Gozzo, F.C.; e Netto, L.E. (2006) "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.

- Pannu, N.S.; Murshudov, G.N.; Dodson, E.J.; e Read, R.J. (1998) "Incorporation of prior phase information strengthens maximum-likelihood structure refinement", *Acta Cryst.*, **D54**: 1285-94.
- Papinutto, E.; Windle, H.J.; Cendron, L.; Battistutta, R.; Kelleher, D.; e Zanotti, G. (2005) "Crystal structure of alkyl hydroperoxide-reductase (AhpC) from *Helicobacter pylori*", *Biochim. Biophys. Acta.*, **1753**: 240-6.
- Park, S.G.; Cha, M.K.; Jeong, W.; e Kim, I.H. (2000) "Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*", *J. Biol. Chem.*, **275**: 5723-32.
- Parsonage, D.; Youngblood, D.S.; Sarma, G.N.; Wood, Z.A.; Karplus, P.A.; e Poole, L.B. (2005) "Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin", *Biochemistry*, **44**, 10583-92.
- Pedrajas, J.R.; Miranda-Vizuet, A.; Javanmardy, N.; Gustafsson, J.A.; e Spyrou, G. (2000) "Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity", *J. Biol. Chem.*, **26**: 16296-301.
- Poole, L.B. (1996) "Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. 2. Cystine disulfides involved in catalysis of peroxide reduction", *Biochemistry*, **35**: 65-75.
- Poole, L.B. (2005) "Bacterial defenses against oxidants: mechanistic features of cysteine-based peroxidases and their flavoprotein reductases", *Arch. Biochem. Biophys.*, **433**: 240-54.
- Poole, L.B.; e Ellis, H.R. (1996) "Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. 1. Purification and enzymatic activities of overexpressed AhpF and AhpC proteins", *Biochemistry*, **35**: 56-64.
- Poole, L.B.; Godzik, A.; Nayeem, A.; e Schmitt, J.D. (2000a) "AhpF can be dissected into two functional units: tandem repeats of two thioredoxin-like folds in the N-terminus mediate electron transfer from the thioredoxin reductase-like C-terminus to AhpC", *Biochemistry*, **39**: 6602-15.
- Poole, L.B.; Reynolds, C. M.; Wood, Z. A.; Karplus, P. A.; Ellis, H. R.; e Calzi, M. L. (2000b) "AhpF and other NADH: peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low M_r thioredoxin reductase", *Eur. J. Biochem.*, **267**: 6126-6133.
- Prongay, A.J.; Engelke, D.R.; e Williams, C.H.Jr. (1989) "Characterization of two active site mutations of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*", *J. Biol. Chem.*, **264**: 2656-64.
- Prospéri, M.T.; Ferbus, D.; Karczinski, I.; e Goubin, G. (1993) "A human cDNA corresponding to a gene overexpressed during cell proliferation encodes a product sharing homology with amoebic and bacterial proteins", *J. Biol. Chem.*, **268**: 11050-6.
- Redak, R.A.; Purcell, A.H.; Lopes, J.R.; Blua, M.J.; Mizell, R.F.^{3rd}; e Andersen, P.C. (2004) "The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology", *Annu. Rev. Entomol.*, **49**: 243-70.
- Rhee, S.G.; Chae, H.Z.; e Kim, K. (2005) "Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling", *Free Radic. Biol. Med.*, **38**: 1543-52.
- Rhee, S.G.; Kang, S.W.; Chang, T.S.; Jeong, W.; e Kim, K. (2001) "Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases", *IUBMB Life*, **52**: 35-41.
- Riddles, P.W.; Blakeley, R.L.; e Zerner, B. (1979) "Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) - a reexamination", *Anal. Biochem.*, **94**: 75-81.
- Rince, A.; Giard, J.C.; Pichereau, V.; Flahaut, S.; e Auffray, Y. (2001) "Identification and characterization of gsp65, an organic hydroperoxide resistance (ohr) gene encoding a general stress protein in *Enterococcus faecalis*", *J. Bacteriol.*, **183**: 1482-88.
- Rouhier, N.; Gelhaye, E.; Gualberto, J.M.; Jordy, M.N.; De Fay, E.; Hirasawa, M.; Duplessis, S.; Lemaire, S.D.; Frey, P.; Martin, F.; Manieri, W.; Knaff, D.B.; e Jacquot, J.P. (2004) "Poplar peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense", *Plant Physiol.*, **134**: 1027-38.
- Russel, M.; e Model, P. (1988) "Sequence of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. Relationship to other flavoprotein disulfide oxidoreductases", *J. Biol. Chem.*, **263**: 9015-9.

- Scheel, D. (1998) "Resistance response physiology and signal transduction", *Curr. Opin. Plant Biol.*, **1**: 305-10.
- Schröder, E.; Littlechild, J.A.; Lebedev, A.A.; Errington, N.; Vagin, A.A.; e Isupov, M.N. (2000) "Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution", *Structure*, **8**: 605-15.
- Schröder, E.; Willis, A.C.; e Ponting, C.P. (1998) "Porcine natural-killer-enhancing factor-B: oligomerisation and identification as a calpain substrate *in vitro*", *Biochim. Biophys. Acta.*, **1383**: 279-91.
- Seaver, L.C.; e Imlay, J.A. (2001) "Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*", *J. Bacteriol.*, **183**: 7173-81.
- Shea, R.J.; e Mulks, M.H. (2002) "ohr, Encoding an organic hydroperoxide reductase, is an *in vivo*-induced gene in *Actinobacillus pleuropneumoniae*", *Infect. Immun.*, **70**: 794-802.
- Simpson, A.J.; Reinach, F.C.; Arruda, P.; Abreu, F.A.; Acencio, M.; Alvarenga, R.; Alves, L.M.; Araya, J.E.; Baia, G.S.; Baptista, C.S.; Barros, M.H.; Bonaccorsi, E.D.; Bordin, S.; Bove, J.M.; Briones, M.R.; Bueno, M.R.; Camargo, A.A.; Camargo, L.E.; Carraro, D.M.; Carrer, H.; Colauto, N.B.; Colombo, C.; Costa, F.F.; Costa, M.C.; Costa-Neto, C.M.; Coutinho, L.L.; Cristofani, M.; Dias-Neto, E.; Docena, C.; El-Dorry, H.; Facincani, A.P.; Ferreira, A.J.; Ferreira, V.C.; Ferro, J.A.; Fraga, J.S.; Franca, S.C.; Franco, M.C.; Frohme, M.; Furlan, L.R.; Garnier, M.; Goldman, G.H.; Goldman, M.H.; Gomes, S.L.; Gruber, A.; Ho, P.L.; Hoheisel, J.D.; Junqueira, M.L.; Kemper, E.L.; Kitajima, J.P.; Krieger, J.E.; Kuramae, E.E.; Laigret, F.; Lambais, M.R.; Leite, L.C.; Lemos, E.G.; Lemos, M.V.; Lopes, S.A.; Lopes, C.R.; Machado, J.A.; Machado, M.A.; Madeira, A.M.; Madeira, H.M.; Marino, C.L.; Marques, M.V.; Martins, E.A.; Martins, E.M.; Matsukuma, A.Y.; Menck, C.F.; Miracca, E.C.; Miyaki, C.Y.; Monteriro-Vitorello, C.B.; Moon, D.H.; Nagai, M.A.; Nascimento, A.L.; Netto, L.E.; Nhani, A.Jr; Nóbrega, F.G.; Nunes, L.R.; Oliveira, M.A.; de Oliveira, M.C.; de Oliveira, R.C.; Palmieri, D.A.; Paris, A.; Peixoto, B.R.; Pereira, G.A.; Pereira, H.A.Jr; Pesquero, J.B.; Quaggio, R.B.; Roberto, P.G.; Rodrigues, V.; de M Rosa, A.J.; de Rosa, V.E.Jr; de As, R.G.; Santelli, R.V.; Sawasaki, H.E.; da Silva, A.C.; da Silva, A.M.; da Silva, F.R.; da Silva, W.A.Jr; da Silveira, J.F.; Silvestri, M.L.; Siqueira, W.J.; de Souza, A.A.; de Souza, A.P.; Terenzi, M.F.; Truffi, D.; Tsai, S.M.; Tshako, M.H.; Vallada, H.; Van Sluys, M.A.; Verjovski-Almeida, S.; Vettore, A.L.; Zago, M.A.; Zatz, M.; Meidanis, J.; e Setúbal, J.C. (2000) "The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis", *Nature*, **406**: 151-7.
- Smeets, A.; Marchand, C.; Linard, D.; Knoop, B.; e Declercq, J.P. (2008) "The Crystal structures of oxidized forms of human peroxiredoxin 5 with an intramolecular disulfide bond confirm the proposed enzymatic mechanism for atypical 2-Cys peroxiredoxins", *Arch. Biochem. Biophys.*, **477**: 98-104.
- Smolka M.B.; Martins-de-Souza, D.; Winck, F.V.; Santoro, C.E.; Castellari, R.R.; Ferrari, F.; Brum, I.J.; Galembeck, E.; Della Coletta Filho, H.; Machado, M.A.; Marangoni, S.; e Novello, J.C. (2003) "Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution", *Proteomics*, **3**: 224-37.
- Sreerama, N.; e Woody, R.W. (2000) "Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set", *Anal. Biochem.*, **287**: 252-60.
- Stadtman, E.R. (1990) "Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences", *Free Rad. Biol. Med.*, **9**: 315-25.
- Storz, E.; Jacobson, F.S.; Tartaglia, L.A.; Morgan, R.W.; Silveira, L.A.; e Ames, B.N. (1989) "An alkyl hydroperoxide reductase induced by oxidative stress in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: genetic characterization and cloning of *ahp*", *J. Bacteriol.*, **171**: 2049-55.
- St-Pierre, J.; Buckingham, J.A.; Roebuck, S.J.; e Brand, M.D. (2002) "Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain", *J. Biol. Chem.*, **277**: 44784-90.
- Sun, C.; Berardi, M.J.; e Bushweller, J.H. (1998) "The NMR solution structure of human glutaredoxin in the fully reduced form", *J. Mol. Biol.*, **280**: 687-701.

- Tartaglia, L.A.; Storz, G.; Brodsky, M.H.; Lai, A.; e Ames, B.N. (1990) "Alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. Sequence and homology to thioredoxin reductase and other flavoprotein disulfide oxidoreductases", *J. Biol. Chem.*, **265**: 10535-40.
- Tenhaken, R.; Levine, A.; Brisson, L.F.; Dixon, R.A.; e Lamb, C. (1995) "Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 4158-63.
- Torian, B.E.; Flores, B.M.; Stroehrer, V.L.; Hagen, F.S.; e Stamm, W.E. (1990) "cDNA sequence analysis of a 29-kDa cysteine-rich surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 6358-63.
- Trivelli, X.; Krimm, I.; Ebel, C.; Verdoucq, L.; Prouzet-Mauleon, V.; Chartier, Y.; Tsan, P.; Lauquin, G.; Meyer, Y.; e Lancelin, J.M. (2003) "Characterization of the yeast peroxiredoxin Ahp1 in its reduced active and overoxidized inactive forms using NMR", *Biochemistry*, **42**: 14139-49.
- Trujillo, M.; Budde, H.; Pineyro, M. D.; Stehr, M.; Robello, C.; Flohé, L.; e Radi, R. (2004) "*Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols", *J. Biol. Chem.*, **279**: 34175-82.
- Trujillo, M.; Clippe, A.; Manta, B.; Ferrer-Sueta, G.; Smeets, A.; Declercq, J.P.; Knoop, B.; e Radi, R. (2007) "Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation", *Arch. Biochem. Biophys.*, **467**: 95-106.
- Trujillo, M.; Ferrer-Sueta, G.; Thomson, L.; Flohé, L.; e Radi, R. (2007) "Kinetics of peroxiredoxins and their role in the decomposition of peroxynitrite", *Subcell. Biochem.*, **44**: 83-113.
- Wakita, M.; Masuda, S.; Motohashi, K.; Hisabori, T.; Ohta, H.; e Takamiya, K. (2007) "The significance of type II and PrxQ peroxiredoxins for antioxidative stress response in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*", *J. Biol. Chem.*, **282**: 27792-801.
- Wang, G.; Olczak, A.A.; Walton, J.P.; e Maier, R.J. (2005) "Contribution of the *Helicobacter pylori* thiol peroxidase bacterioferritin comigratory protein to oxidative stress resistance and host colonization", *Infect. Immun.*, **73**: 378-84.
- Wang, P.F.; Veine, D.M.; Ahn, S.H.; e Williams, C.H.Jr. (1996) "A stable mixed disulfide between thioredoxin reductase and its substrate, thioredoxin: preparation and characterization", *Biochemistry*, **35**: 4812-9.
- Williams, C.H.Jr. (1995) "Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*", *FASEB J.*, **9**: 1267-76.
- Winterbourn, C.C. (2008) "Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species", *Nat. Chem. Biol.*, **4**: 278-86.
- Winterbourn, C.C.; e Hampton, M.B. (2008) "Thiol chemistry and specificity in redox signaling", *Free Radic. Biol. Med.*, **45**: 549-61.
- Wood, Z.A.; Poole, L.B.; e Karplus, P.A. (2003) "Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling" *Science*, **300**: 650-3.
- Wood, Z.A.; Poole, L.B.; Hantgan, R.R.; e Karplus, P.A. (2002) "Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins", *Biochemistry*, **41**: 5493-504.
- Wood, Z.A.; Schröder, E.; Harris, J.R.; e Poole, L.B. (2003) "Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins", *Trends Biochem. Sci.*, **28**: 32-40.
- Yamaguchi, R.; Matsuo, K.; Yamazaki, A.; Takahashi, M.; Fukasawa, Y.; Wada, M.; e Abe, C. (1992) "Cloning and expression of the gene for the Avi-3 antigen of *Mycobacterium avium* and mapping of its epitopes", *Infect. Immun.*, **60**: 1210-16.
- Yang, K.S.; Kang, S.W.; Woo, H.A.; Hwang, S.C.; Chae, H.Z.; Kim, K.; e Rhee, S.G. (2002) "Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid", *J. Biol. Chem.*, **277**: 38029-36.

Anexo I

Horta, B.B.; Discola, K.F.; Guimarães, B.G.; e Netto L.E.S. (2008) "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Peroxiredoxin Q from *Xylella fastidiosa*", *LNLS 2007 Activity Report*.

CRYSTALLIZATION AND PRELIMINARY X-RAY DIFFRACTION ANALYSIS OF PEROXIREDOXIN Q FROM *XYLELLA FASTIDIOSA*

Horta, B. B.,¹ Discola, K. F.,¹ Guimarães, B.G.,² and Netto, L.E.S.¹

¹Universidade de São Paulo - São Paulo - São Paulo SP Brazil

²Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - Campinas SP Brazil

INTRODUCTION

Xylella fastidiosa is a phytopathogenic bacterium responsible for several economically important diseases. In Brazil, *X. fastidiosa* 9a5c strain is the causal agent of Citrus Variegated Chlorosis (CVC) in sweet orange trees. During infection by the phytopathogen, reactive oxygen species play a central role in plant defense and can diffuse into cells activating many of the bacterial defenses, including detoxifying enzymes like peroxiredoxins. Peroxiredoxins are ubiquitous proteins that reduce hydroperoxides making use of reactive cysteine residues. During the catalytic cycle, the cysteine residue of the active site pocket, the peroxidatic cysteine, directly reduces the peroxide substrate and becomes oxidized to a sulfenic acid. The sulfenic acid fate differs in various peroxiredoxins, either forming an intermolecular disulfide (typical 2-Cys), forming an intramolecular disulfide (atypical 2-Cys) or remaining stable (1-Cys). Oxidized peroxiredoxins are regenerated to active form through the use of reducing equivalents provided by thiols. There are at least two peroxidases encoded in the genome of *X. fastidiosa* 9a5c. One of them is a typical 2-Cys peroxiredoxin homologue of the *Escherichia coli* alkyl-hydroperoxide reductase (AhpC) which has two well-conserved cysteine residues involved on catalytic activity. The other enzyme is a homologue of the *E. coli* bacterioferritin co-migratory protein (Bcp) [1]. Bcp homologues were thought to be present only in prokaryotes and unicellular eukaryotes, but enzymes of *Sedum lineare* [2] and of poplar [3] were characterized recently. Since the name Bcp gives no functional insight, *S. lineare* protein was designated as peroxiredoxin Q (PrxQ) [2]. Typical members of PrxQ family are monomers with an intramolecular disulfide bridge between two Cys residues separated by four amino acids [2]. The *X. fastidiosa* PrxQ does not contain one of the two conserved catalytic Cys residues but it shares 34% of amino acid similarity with *E. coli* Bcp. Similar to *X. fastidiosa* PrxQ, *Rhodobacter sphaeroides* PrxQ is the unique enzyme among all PrxQ family members that have already been characterized with only one of the two conserved Cys residues [4]. Furthermore, the tertiary structure of a PrxQ has not been reported to date. Nowadays, PrxQ family remains as the less studied peroxiredoxin family. In the present work, we report the crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of PrxQ.

EXPERIMENT

The PRXQ gene (XF0793 gene) was PCR amplified from *X. fastidiosa* 08D10 cosmid provided by the *X. fastidiosa* Genome Project using two specific primers. After NdeI and BamHI digestion of the PCR product, the fragment was ligated into NdeI and BamHI double-digested expression vector pET15b (Novagen), electroporated into *E. coli* BL21(DE3), and plated out on ampicillin-containing plates. The pET15b/PRXQ vector was then subjected to mutagenesis using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) to produce the single mutant C47S PrxQ. Protein expression was overnight induced by adding 0.5 mM isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranoside (IPTG) to cultures grown in LB medium at 293 K to OD₆₀₀ 0.8. The protein was purified by nickel-affinity chromatography with imidazole gradient and purity was confirmed by SDS-PAGE. For crystallization assays, the PrxQ C47S protein was concentrated to 5-15 mg/ml in 5 mM sodium citrate buffer pH 5.0. Crystallization trials were performed using the sitting-drop vapor diffusion method. Crystals suitable to X-ray diffraction experiments were obtained from the protein after reduction with 10 mM DTT. The optimal condition was obtained with the reservoir solution comprising 100 mM Hepes-NaOH pH 7.5 and 20% PEG 8000 at 293 K. The crystals were soaked in a solution of 2 μL of the reservoir solution containing 20% (v/v) glycerol, and then flash-frozen in a nitrogen-gas stream. Crystal X-ray diffraction data were collected using synchrotron radiation at the protein crystallography beamline W01B-MX2 of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory, LNLS. Data sets were indexed and integrated with MOSFLM [5] and scaled and merged using SCALA [6] from the CCP4 package. The crystal structure of the PrxQ was determined by molecular replacement methods using the program PHASER [7] and the coordinates of Tryparedoxin Peroxidase from *Crithidia fasciculata* (PDB code: 1E2Y, 30% sequence identity) [8]. The model is being refined using the program REFMAC5 [9].

RESULTS AND DISCUSSION

The ORF of PrxQ (XF0793) is 480 bp in length and codes 159 amino-acid residues. The expected theoretical molecular weight of PrxQ is 19,977 Da (including an affinity His-tag). In non-reducing SDS-PAGE, pre-reduced and peroxide-treated PrxQ are monomers, suggesting that an intramolecular disulfide bridge is formed during its catalytic cycle (Fig. 1).

FIG. 1: Non-reducing 10% SDS-PAGE analysis of PrxQ. Each lane contains 4 μ g of protein. PrxQ pre-reduced included 10 mM TCEP in sample buffer. PrxQ peroxide-treated was incubated with equimolar H_2O_2 for 30 minutes at room temperature. Lane 1, molecular weight standards (kDa); lane 2, PrxQ pre-reduced; lane 3, PrxQ peroxide-treated.

Intending to obtain the protein crystal, we conducted an initial screening using the automated crystal screening facility of the Laboratório Robotizado de Cristalização de Proteínas (LNLS). Unfortunately, wild-type PrxQ did not give acceptable crystals to diffraction data collection. On the other hand, initial screening using C47S PrxQ gave crystals from several conditions. We chose the buffer consisting of 100 mM Hepes-NaOH pH 7.5 and 20% PEG 8000 as the initial condition for optimization. Optimization through the Reichert method did not give good crystals, so we used the crystals obtained on the initial screening for diffraction experiment (Fig. 2a). The data revealed significant diffraction to 1.55 Å resolution (Fig. 2b). Data processing showed that the crystal belongs to space group $P2_12_12_1$ and data statistics are present in Table 1. The Matthews coefficient suggests that there is one molecule in the asymmetric unit which gives a V_M value of 1.9 Å³ Da⁻¹ and a solvent content of 35.9%. Structure refinement and analysis are in progress.

Table 1.	
Data-collection statistics	
Values in parentheses are for the highest resolution shell.	
Resolution (Å)	33.278 – 1.6
Space group	$P2_12_12_1$
Unit-cell parameters	
a (Å)	38.97
b (Å)	39.74
c (Å)	99.84
$\alpha = \beta = \gamma$ (°)	90.00
Wavelength (Å)	1.55
Temperature (K)	100
Completeness (%)	98.2 (98.2)
I/σ (I)	31.8 (6.1)
R_{sym}	0.063 (0.369)

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant 01/07539-5, the Structural Molecular Biology Network (SMOLBnet), from the

FIG. 2: (a) Crystals of *X. fastidiosa* C47S PrxQ obtained by sitting-drop vapor-diffusion method. (b) X-ray diffraction pattern at resolution of 1.6 Å.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), by the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) under proposal D03B-MX1 7568 (performed on the beamline W01B-MX2).

- [1] Jeong, W. *et al.* (2000). J. Biol. Chem. 275, 2924-2930.
- [2] Kong, W. *et al.* (2000). Biochem. J. 351, 107-114.
- [3] Rouhier, N. *et al.* (2004). Plant Physiol. 134, 1027-1038.
- [4] Wakita, M. *et al.* (2007). J. Biol. Chem. 282, 27792-27801.
- [5] Leslie, A.G.W. (1992). Int CCP4/ESF-EAMBCB Newsl. Protein Crystallogr. 26.
- [6] Evans, P.R. Proceedings of CCP4 StudyWeekend on Data Collection and Processing. (1993). 114-122.
- [7] Read, R. J. (2001). Acta Crystallogr. D57, 1373-1382.
- [8] Alphey, M.S. *et al.* (2000). J. Mol. Biol. 300, 903-916.
- [9] Murshudov, G.N. *et al.* (1997). Acta Crystallogr. D53, 240-255.

Anexo II

Monteiro, G.; Horta, B.B.; Pimenta, D.C.; Augusto, O.; e Netto L.E.S. (2007) "Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**: 4886-91.

Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C

Gisele Monteiro*, Bruno B. Horta*, Daniel Carvalho Pimenta†, Ohara Augusto‡, and Luis E. S. Netto*§

*Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão 277, CEP 05508-900, São Paulo, Brazil; †Laboratório de Espectrometria de Massa, Centro de Toxinologia Aplicada (CAT/CEPID), Instituto Butantan, CEP 05503-900, São Paulo, Brazil; and ‡Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CEP 05508-900, São Paulo, Brazil

Communicated by E. R. Stadtman, National Institutes of Health, Bethesda, MD, January 20, 2007 (received for review August 17, 2006)

Peroxiredoxins (Prx) are widely distributed peroxidases that can be divided into 1-Cys and 2-Cys Prx groups based on the number of conserved cysteine residues that participate in their catalytic cycle. Prx have been described to be strictly dependent on thiols, but here, we show that ascorbate (vitamin C) also reduces 1-Cys Prx, but not 2-Cys Prx, from several taxonomic groups. Reduction by ascorbate is partly related to the fact that the oxidized form of 1-Cys Prx is a stable sulfenic acid (Cys-SOH) instead of a disulfide. In addition, a histidine residue in the active site is required. In fact, we engineered a 2-Cys Prx with these two features, and it displayed ascorbate peroxidase activity. These data represent a breakthrough in the thiol-specific antioxidant paradigm. Ascorbate may be the long-sought-after biological reductant of 1-Cys Prx. Because ascorbate is present in high amounts in cells, the ascorbate/protein sulfenic acid pair represents an aspect of redox biochemistry that has yet to be explored *in vivo*.

peroxidase | sulfenic acid | cellular redox processes | oxidative stress | ascorbate-dependent activity

Oxygen toxicity is related to the deleterious properties of the so-called reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). Cellular defenses are comprised of a wide range of components that interact with each other to control the levels of ROS and RNS (1). One of them is vitamin C (ascorbic acid), which is not synthesized by human cells and, therefore, must be consumed in the diet. Some human diseases, such as scurvy, are related to low concentrations of vitamin C (reviewed in ref. 2). In addition to low-molecular-weight compounds, cells also rely on enzymes to cope with oxidative injury.

Peroxiredoxins (Prx) are ubiquitous enzymes that use their highly reactive cysteine residues to decompose peroxides (3). The importance of Prx enzymes is underlined by their high abundance and involvement in multiple cellular processes ranging from antioxidant defense (4, 5), parasite drug resistance (6), and cancer (5, 7, 8) to H₂O₂-mediated cellular signaling (9, 10). In addition to their well known peroxidase activity, some of these enzymes are also efficient molecular chaperones (11). The switch from chaperone to peroxidase activity is regulated by enzymes that reduce sulfenic acids only when they are generated in Prx cysteine residues (12, 13). This redox biochemistry adds a level of versatility to the well established fact that Prx recycle between disulfide/sulfenic acid to the sulfhydryl form (reviewed in ref. 14). These properties may be related to the fact that Prx protect against several stresses (15–17).

Prx can be divided into two main groups, 1-Cys and 2-Cys Prx, based on the number of conserved cysteine residues that participate in the catalytic cycle. Both 1-Cys and 2-Cys Prx contain a reactive cysteine residue, the so-called peroxidatic cysteine (Cys_p-S[−]), that is oxidized to sulfenic acid (Cys_p-SOH) when exposed to peroxides. In the 1-Cys mechanism, Cys_p-SOH is directly reduced, whereas in the 2-Cys catalytic cycle, a second Prx cysteine residue, the resolving cysteine (Cys_r-SH), condenses with the sulfenic acid to form a disulfide. Finally, the 2-Cys disulfide is reduced by another biothiol, particularly thioredoxin, a low-molecular-weight protein with two

vicinal cysteine residues (3). So far, Prx have been described as strictly depending on thiols (RSH) as reducing agents. Indeed, these enzymes have been characterized as peroxidases undergoing cycles of peroxide-dependent oxidation and thiol-dependent reduction during their catalytic activity (14), as shown in Reaction 1:

Although all Prx are assumed to be thiol-specific antioxidant enzymes, the 1-Cys Prx mechanism is not fully understood (reviewed in refs. 3 and 14). An important point to be clarified is the nature of the biological reductant of 1-Cys Prx, which remains unknown in most cases. Here, we present results showing unequivocally that 1-Cys Prx are reduced by ascorbate, and thus advance a change in the thiol-specific antioxidant paradigm. Because ascorbate is present at high-millimolar level in cells, it may be the long-sought-after biological reductant of 1-Cys Prx. Finally, our characterization of the peroxiredoxin (Prx) sulfenic acid (Cys-SOH)/ascorbate pair may open perspectives in the understanding of cellular redox processes.

Results

Ascorbate Peroxidase Activity of Yeast 1-Cys Prx. Although Prx are assumed to be peroxidases strictly dependent on thiols for regeneration of the reduced forms, we observed that a mitochondrial 1-Cys isoform from *Saccharomyces cerevisiae*, yPrx1, protected glutamine synthetase (GS) from inactivation in the presence of ascorbate. Protection was dose-dependent on yPrx1, and ascorbate and DTT were similarly effective as electron donors (Fig. 1A). The enzyme also prevented strand breaks in supercoiled plasmid DNA submitted to a similar oxidizing system (data not shown), indicating that yPrx1 is capable of protecting biomolecules by using ascorbate as reductant. The ability of yPrx1 to consume reducing equivalents from ascorbate was confirmed by the ascorbate oxidase assay, which is based on the ability of this enzyme to catalyze oxygen consumption in amounts proportional to ascorbate concentrations [see supporting information (SI) Fig. 4].

We tested other yeast Prx, all of which were expected to be oxidized to disulfide bonds during their catalytic cycles (2-Cys Prx), but none of them protected GS from inactivation in the presence

Author contributions: G.M., O.A., and L.E.S.N. designed research; G.M., B.B.H., and D.C.P. performed research; G.M., B.B.H., D.C.P., O.A., and L.E.S.N. analyzed data; and G.M., O.A., and L.E.S.N. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations: Prx, peroxiredoxin(s); RSH, thiol; ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species; SOH, sulfenic acid; RS[−], thiolate group; Cys_p, peroxidatic cysteine; Cys_r, resolving cysteine; GS, glutamine synthetase; DTT, dithiothreitol; t-BOOH, *tert*-butyl hydroperoxide; NEM, *N*-ethylmaleimide.

§To whom correspondence should be addressed. E-mail: nettoles@ib.usp.br.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0700481104/DC1.

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA

Fig. 1. Characterization of yPrx1 ascorbate-dependent peroxidase activity. (A–C) Glutamine synthetase (GS) protection from inactivation by metal-catalyzed oxidation systems containing DTT (10 mM) (gray bars) or ascorbate (10 mM) (white bars) in 15-min incubations at 37°C. GS activity was considered 100% when it was not preincubated with metal-catalyzed oxidation systems. (A) GS protection by increasing yPrx1 concentrations. (B) Inability of other yeast Prx enzymes to use ascorbate. Tsa1, gi: 464970; Tsa2, gi: 2499475; or Ahp1, gi: 1709682. (C) Inhibition of yPrx1 protective effects by inactivation of cysteine residues. yPrx1 was modified by *N*-ethylmaleimide (NEM) and by site-specific mutagenesis as described in *Experimental Procedures*. Afterward, a GS protection assay was performed as described above by using yPrx1 at 3 μM or in excess of 70 μM, indicated by *. (D) Deconvoluted MS spectra of yPrx1 in different oxidation states treated with dimedone (140 amu). Samples of reduced yPrx1 (initial), treated with H₂O₂ and dimedone (oxidized) or treated with H₂O₂, ascorbate, and dimedone (ascorbate) were prepared and analyzed as described in *Experimental Procedures*. Molecular masses were calculated by the Transform algorithm of the BioLynx Data Analysis package of MassLynx Software (Micromass). Data were acquired in an ESI-Q-TOF (Micromass) mass spectrometer under positive ionization mode. Calculated molecular masses are indicated at the right side of the corresponding spectra. These spectra were obtained by using a recombinant yPrx1 (100 μM) without the 40 first amino acids residues and containing only one cysteine residue, which is Cys_p (see supporting information on the PNAS web site for more details). All excess reagents were washed away by ultrafiltration before activity analysis.

of ascorbate (Fig. 1B). Therefore, this ascorbate-dependent property is a particular feature of yPrx1 that is not displayed by any of the tested yeast 2-Cys Prx.

Although the above assays showed that yPrx1 uses ascorbate as reductant, all of them are indirect. Therefore, dehydroascorbate, ascorbate, and peroxide concentrations were determined directly in the presence of DTPA to prevent metal-catalyzed processes. From the data of several experiments summarized in Table 1, it became clear that yPrx1 catalyzed the consumption of 1 mol of peroxide and 1 mol of ascorbate to produce 1 mol of dehydroascorbate. Thus, stoichiometric data (Table 1 and SI Fig. 5) indicated that yPrx1 catalyzes Reaction 2:

The amount of ascorbyl free radical produced in the incubations was monitored by electron spin resonance (ESR) and found to be in the nM range (SI Fig. 6). This is well below the amount of ascorbate consumed and of dehydroascorbate produced, both

≈100 μM. Because the ascorbyl free radical has a relatively long lifetime (18), our data indicated that yPrx1 ascorbate peroxidase activity is a two-electron process (SI Figs. 5 and 6) similar to the thiol-dependent activity.

More H₂O₂ than *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH) was removed by the ascorbate-dependent catalysis (Table 1), similar to the yPrx1 thiol-dependent peroxidase activity described by Pedrajas *et al.* (19). Nevertheless, independent of the peroxide nature, yPrx1 was capable of reducing it by consuming a nonthiol reductant. These results led us to verify whether yPrx1 would also accept electrons from other reductants. We tested both thiolic (glutathione, β-mercaptoethanol, and DTT) and nonthiolic reductants (trolox, which is a hydrophilic analogue of vitamin E, and urate). Of all the low-molecular-weight compounds tested, only thiols and ascorbate supported the yPrx1 activity (SI Fig. 7).

Characterization of Amino Acid Residues Involved in 1-Cys Prx Ascorbate-Dependent Catalysis. Because the thiol-dependent peroxidase activity of yPrx1 relies on a reactive cysteine residue, the

Table 1. Stoichiometry of the yPrx1 ascorbate-dependent peroxidase activity

Reaction time, min	Initial peroxide, 1 mM	Peroxide consumption, μM	Ascorbate consumption, μM	DHA produced, μM	Peroxide/ascorbate	Ascorbate/DHA
15 min	H ₂ O ₂	156 ± 10	150 ± 20	150 ± 20	1.04 ± 0.14	1.0 ± 0.1
45 min	<i>t</i> -BOOH	90 ± 15	98 ± 10	85 ± 25	0.92 ± 0.20	1.2 ± 0.3

The results are average of three independent experiments using HPLC analyses and ascorbate oxidase assay. Peroxides were measured by the FOX2 method. DHA, dehydroascorbate; initial ascorbate, 1 mM; yPrx1, 50 μM.

importance of cysteine residues in ascorbate-dependent GS protection was investigated by alkylating the sulfhydryl groups with *N*-ethylmaleimide (NEM). Protection of GS was inhibited by NEM, implicating yPrx1 cysteine residues as the site of peroxide reduction during the ascorbate-dependent activity. Furthermore, mutation of the Cys_p fully abolished DTT and ascorbate peroxidase activity, indicating that this residue is directly involved in peroxide reduction mediated by both reductants (Fig. 1C).

The results presented so far suggest that protection of biomolecules is due to yPrx1 peroxidase activity that depends on its reactive cysteine residue and ascorbate (Table 1 and Fig. 1A–C). To characterize the mechanism of ascorbate-dependent activity, the redox state of the Cys_p was analyzed by spectrophotometric and mass spectrometry methods in the presence of NBD-Cl (a thiol and sulfenic acid reagent) and dimedone (a specific sulfenic acid reagent), respectively (see also *Experimental Procedures*). The results showed that the catalytic cysteine residue was oxidized to sulfenic acid upon peroxide exposure and was rereduced upon ascorbate treatment (Fig. 1D and SI Fig. 8). To further test the hypothesis that active-site sulfenic acid is reduced by ascorbate, we examined the peroxidase activity of yPrx1 modified with dimedone. Abolishment of the yPrx1 capability to reduce H₂O₂ was observed only when the enzyme was previously oxidized and then incubated with dimedone. Treatment of reduced yPrx1 with dimedone in all other conditions (sample treated with DTT and sample oxidized then treated with DTT or ascorbate) resulted in no activity loss, suggesting that the Cys_p sulfenic acid derivative was reduced by both reductants (SI Fig. 9).

Next, we explored which specific features of 1-Cys Prx would enable them, and not 2-Cys Prx, to use reducing equivalents from ascorbate. One obvious difference between the two main mechanisms of Prx is the presence or absence of the Cys_r (2-Cys and 1-Cys Prx, respectively). The simple absence of Cys_r might predispose the sulfenic acid of 1-Cys Prx to ascorbate reduction, whereas the disulfide bond in 2-Cys Prx would be resistant. To test this hypothesis, we analyzed whether a recombinant yeast 2-Cys Prx (Tsa1-gi: 464970) whose Cys_r was mutated to a serine residue (Tsa1-C170S) acquired the ascorbate-dependent activity. An absent Cys_r provoked the appearance of a small ascorbate peroxidase activity (Fig. 2A), and the sulfenic acid derivative was detectable spectrophotometrically even after ascorbate addition (Fig. 2B). Therefore, the sulfenic acid form of Tsa1-C170S was only partially reduced by ascorbate (Fig. 2B).

Several Prx showing 1-Cys mechanism belong to the PrxVI group, which comprises proteins sharing amino acid sequence similarity (3). PrxVI proteins have a highly conserved histidine residue (SI Fig. 10) in addition to an arginine (fully conserved in all Prx) in the active site (20), probably creating a positively charged environment. This histidine is absent in 2-Cys Prx. We hypothesized that these two features, i.e., the absence of Cys_r and the presence of histidine, would render 1-Cys Prx capable of receiving electrons from ascorbate. The absence of Cys_r should increase the half-life of the sulfenic acid form of the Cys_p, whereas the presence of a positively charged histidine would further improve the sulfenic acid stabilization and favor the interaction with negatively charged molecules such as ascorbate. Therefore, we introduced a histidine residue in a position equivalent to the 1-Cys Prx group. The single addition of histidine in Tsa1 (Tsa1-I40H) did not transform it into an ascorbate peroxidase (Fig. 2A). This is probably related to the fast reaction of sulfenic acid with Cys_r, because no Cys_p-SOH was detected (Fig. 2B). Only when two mutations were introduced into Tsa1 (C170S and I40H) did this 2-Cys Prx acquire an ascorbate-dependent activity comparable with the DTT-dependent one (Fig. 2A). Furthermore, a sulfenic acid derivative was detectable in the double mutant, and it was rereduced by ascorbate (Fig. 2B). The ascorbate peroxidase activity of the Tsa1 double mutant was considerably lower than that of the natural 1-Cys Prx enzyme (yPrx1), indicating that additional structural features are required.

Fig. 2. The 2-Cys Prx engineered for acquiring the ascorbate-dependent peroxidase activity. (A) GS protection assay was used to measure DTT- (gray bars) and ascorbate-dependent (white bars) peroxidase activity of the Tsa1 mutants. Each enzyme (50 μ M) was incubated as described in the Fig. 1 legend. (B) Analysis of the oxidation state of cysteine residues from Tsa1 and the mutants C170S, I40H, and C170S-I40H by the NBD-Cl assay. Treatments and assays were performed as described in *Experimental Procedures*. Sulfhydryl and sulfenic acid adducts peak at 420 nm and 347 nm, respectively, with similar extinction coefficients (46).

Accordingly, the structures available so far in the Protein Data Bank suggest that 1-Cys Prx maintain the secondary structure near the active domain throughout the catalytic cycle, whereas the 2-Cys Prx active sites undergo an unfolding during the oxidation step (SI Fig. 11 and ref. 3). In principle, it is possible that any Prx might acquire ascorbate peroxidase activity if the appropriate amino acid changes are made.

Our results suggest that ascorbate probably supports the peroxidase activity of 1-Cys Prx because it can fully reduce sulfenic acids, but not disulfides, in a positively charged environment. Little is known about the reaction of ascorbate with oxidized forms of thiols to prove or disprove this view. In fact, we found no reported second-order rate constants for ascorbate reacting with disulfides or sulfenic acids. Nevertheless, ascorbate does not reduce the intermolecular disulfide bond of 2-Cys Prx (21) and reduces the low molecular disulfide DTNB only slowly. In our hands, reaction of ascorbate (100 mM) with DTNB (500 μ M) for 24 h at room temperature produced only 15 μ M of reduced DTNB. In contrast, DTNB reacts very fast with thiols (22). Furthermore, reduction of known proteinic and nonproteinic disulfide bonds by ascorbate is thermodynamically unfavorable (see *Thermodynamic Considerations on the Reaction of Ascorbate with Disulfides* in SI Text), but the sulfenic acid formed in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase has been reported to be reduced by ascorbate (23).

Ascorbate Peroxidase Is a Conserved Activity in 1-Cys Prx. The identity of most 1-Cys Prx electron donors are unknown, and the yPrx1 studied here is an exception because its peroxidase activity has been shown to be supported by a mitochondrial thioredoxin

Table 2. Comparison of 1-Cys Prx enzymes ascorbate- and DTT-dependent activities

1-Cys Prx protein	Species	Relative peroxidase activity (DTT/ascorbate)
yPrx1	<i>S. cerevisiae</i>	1.9 ± 0.1
Prdx6	<i>R. norvegicus</i>	0.8 ± 0.1
rPf1-Cys-Prx	<i>P. falciparum</i>	1.05 ± 0.15
AtPER1	<i>A. thaliana</i>	0.93 ± 0.21
Dpx-2540	<i>D. melanogaster</i>	0.8 ± 0.14
Dpx-6005	<i>D. melanogaster</i>	1.1 ± 0.17
AhpE	<i>M. tuberculosis</i>	0.73 ± 0.2

The FOX2 assay was used to monitor the peroxidase activity (enzyme concentration, 50 μ M; peroxide, 400 μ M; DTPA, 0.5 mM; Hepes, 50 mM; DTT or Ascorbate, 500 μ M). The results are the average of three independent experiments.

system (19). yPrx1 belongs to the PrxVI group, whose members share structural similarities, with most of them acting by the 1-Cys Prx catalytic mechanism (3). Ascorbate should also support the peroxidase activity of other PrxVI proteins because they are likely to produce stable sulfenic acid intermediates, because of the absence of a Cys_r and the presence of a histidine in the active site. Supporting this scenario, all tested PrxVI from different taxonomic groups displayed ascorbate peroxidase activity (Table 2). Therefore, the ability of ascorbate to support the peroxidase activity of 1-Cys Prx is a highly conserved property. In contrast, tested 2-Cys enzymes from diverse organisms (Ohr from *Xylella fastidiosa*, PDB code 1ZB8; 2-Cys Prx from *Crinipellis perniciosa*, ID DQ813344; and OsmC from *Escherichia coli*, PDB ID 1QW1) did not reduce peroxides in the presence of ascorbate.

We also tested the ascorbate peroxidase activity of AhpE from *Mycobacterium tuberculosis*, which shares moderate sequence identity ($\approx 25\%$) to PrxVI proteins and presents the 1-Cys Prx mechanism (24). AhpE does not possess the PrxVI conserved histidine (SI Fig. 10) but is capable of decomposing peroxides at the expense of ascorbate (Table 2). Interestingly, its active site environment contains several positively charged residues (Arg-53, His-77, Lys-78, Arg-116, Lys-133, and Arg-139) that may play the role attributed to the conserved histidine.

Next, we analyzed the enzymatic activity of Prdx6, a 1-Cys Prx from rat, in more detail by monitoring ascorbate oxidation at 265 nm (Fig. 3). Substrate consumption was continuously monitored, providing more reliable values of reaction rates than the FOX assay. Applying the bisubstrate kinetic approach and assuming a ping-pong mechanism (25), we found no evidence of enzyme saturation by ascorbate in the used range of concentrations (Fig. 3A). Because ascorbate possesses a very high absorption coefficient ($\epsilon_{265} = 14,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), it could not be added at concentrations $> 80 \mu\text{M}$. H_2O_2 concentrations were then varied under fixed ascorbate concentrations. In this case, a trend of enzyme saturation was observed (Fig. 3B) permitting a nonlinear fit through the Michaelis–Menten equation (Prism 4 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA). Thus, different $V_{\max \text{ app}}$ values were estimated and plotted against the reciprocal of the ascorbate concentration to provide the kinetic parameters shown in Fig. 3C.

Because the used ascorbate concentrations were well below the $K_{\text{M(ascorbate)}}$ (760 μM) due to experimental constraints, the performed kinetic analysis presents a high degree of uncertainty. Nevertheless, the estimated $K_{\text{M(ascorbate)}}$ value suggests that ascorbate can support Prdx6 activity *in vivo* because its intracellular concentration is in the millimolar range (2). Remarkably, the catalytic efficiency of the ascorbate-dependent activity estimated here [$k_{\text{cat}}/K_{\text{M(ascorbate)}}$ $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_{\text{cat}}/K_{\text{M(H}_2\text{O}_2\text{)}}$ $0.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$] is comparable with those previously reported for thiol-dependent processes (26). Thus, the nonthiol peroxidase activity is likely to be a major process. The ascorbate-dependent activity of

Fig. 3. Enzymatic and biological investigations of the ascorbate-dependent peroxidase activity of rat Prdx6. (A–C) Enzymatic activity was monitored by ascorbate consumption at 265 nm in incubations containing Prdx6 (0.5 nM), H_2O_2 and ascorbate at the concentrations specified in the figures. (D) The ability of rat homogenates to support the peroxidase activity of Prdx6 was investigated before and after treatment with ascorbate oxidase as described in *Experimental Procedures*. The 100% value means the amount of H_2O_2 consumed during 15 min at 37°C by each homogenate in the absence of ascorbate oxidase pretreatment. The bars represent the percentage of H_2O_2 consumed when homogenates were pretreated with ascorbate oxidase.

yPrx1 from yeast was also monitored by the $A_{265\text{nm}}$ decay. However, because yPrx1 is less efficient than its mammalian counterpart, it was not possible to determine the individual kinetic parameters with confidence. Nevertheless, it was possible to estimate that the catalytic efficiencies of yPrx1 [$k_{\text{cat}}/K_{\text{M(ascorbate)}}$ and $k_{\text{cat}}/K_{\text{M(H}_2\text{O}_2\text{)}}$] are on the order of 10^4 and $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively (data not shown). These values are also comparable with those of thiol-dependent processes (19). The detailed characterization of the ascorbate peroxidase activity of 1-Cys Prx will require novel kinetic approaches.

The biological relevance of the 1-Cys Prx activity was also indicated by experiments performed with homogenates of rat organs. As anticipated from the high content of proteinic and nonproteinic reductants in these extracts, they sustained H_2O_2 consumption that depended on Prdx6. Remarkably, however, H_2O_2 consumption consistently decreased when ascorbate was depleted by pretreatment of the homogenates with ascorbate oxidase (Fig. 3D), suggesting a major role for ascorbate in Prdx6 reduction.

Discussion

The 2-Cys Prx are involved in several physiological processes, probably because they modulate the intracellular level of H_2O_2 , an oxidant with signaling properties (14). In comparison with 2-Cys Prx, 1-Cys Prx have been little studied, partly because their biological reductant remains unknown, except for a few described exceptions (19, 26). Indeed, most 1-Cys Prx are not efficiently reduced by thioredoxin, glutaredoxin, or glutathione. Therefore, the data presented here indicated that ascorbate is a strong candidate to support 1-Cys Prx peroxidase activity *in vivo*. Furthermore, our work provides some mechanistic details about 1-Cys Prx catalysis.

The physiological relevance of the ascorbate-dependent peroxidase activity in the yeast *S. cerevisiae* may be questionable. As mentioned before, this microorganism possesses a mitochondrial thioredoxin system capable of reducing yPrx1 (19). Furthermore, *S. cerevisiae* does not synthesize ascorbate; it synthesizes an analog, erythroascorbate, whose antioxidant role remains controversial (27). At this point, it is difficult to compare the relevance of erythroascorbate with the thioredoxin system because their relative

abundance in yeast has yet to be determined. In any case, our results show that ascorbate and thioredoxin have similar catalytic efficiencies [$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}(\text{ascorbate}) \approx 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}(\text{H}_2\text{O}_2) \approx 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$].

Although it is premature to reach a conclusion about the biological relevance of the ascorbate-dependent peroxidase activity in yeast, the results obtained with mammalian enzymes favor such relevance. Despite the limitations of the assays used to monitor enzyme activity, it was possible to conclude that the ascorbate-dependent peroxidase activity of Prdx6 is comparable with the thiol-dependent process (Fig. 3 A–C). Furthermore, ascorbate depletion considerably decreased the ability of rat homogenates to support Prdx6 peroxidase activity (Fig. 3D). This is consistent with the fact that ascorbate is present at millimolar levels in most mammalian tissues (reviewed in ref. 2). It has been recently shown that 1-Cys Prx from mammals can heterodimerize with π -glutathione transferase and accept electrons from glutathione (reviewed in ref. 26). Our results indicate that ascorbate is also a significant source of reducing power for these enzymes (Fig. 3). Further studies are necessary to establish the relative importance of ascorbate and glutathione as physiological electron donors for mammalian 1-Cys Prx. Interestingly, ascorbate depletion in the rat homogenates resulted in different levels of a drop in Prdx6 activity (Fig. 3D). Among other reasons, these differences may be due to the endogenous ascorbate content of each organ, either intrinsic or that depend on the level of redox-active transition metal ions capable of promoting ascorbate oxidation (2).

It is also significant that ascorbate in mammalian tissues, especially in blood plasma, may serve as reductant for 1-Cys Prx from pathogens. Several pathogens have to cope with oxidative stress generated by phagocytic cells in blood. Diverse microorganisms such as *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi* possess no catalase or selenocysteine-dependent glutathione peroxidase and, therefore, rely on Prx to decompose peroxides (28).

An ascorbate-dependent peroxidase activity of 1-Cys Prx should be also relevant for plants (Table 2) because these organisms present very high levels of vitamin C in all subcellular compartments, particularly in chloroplasts, where 50 mM concentration can be attained (29). Consistent with these findings, intracellular redox homeostasis in plants is governed not only by GSH/GSSG ratios but also by ascorbate levels (30).

The product of the ascorbate-supported peroxidase activity of 1-Cys Prx, dehydroascorbate, is immediately reduced to ascorbate in the intracellular media, where it accumulates at millimolar levels (reviewed in ref. 2). Several mechanisms have been proposed to account for this fast reduction, such as chemical reaction with biothiols (31, 32) and enzymatic processes that depend on NADPH and glutathione (2). Glutaredoxin has often been considered an important dehydroascorbate reductase whose catalytic efficiency ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) ranges from 10^4 to $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (33, 34). However, other enzymes have also been considered to be relevant (35–39). Most likely, intracellular reduction of dehydroascorbate is a very fast reaction because many of these pathways operate together.

In conclusion, our studies extended previous observations about the redox versatility of Prx. All previously reported Prx reductants are thiol groups of low-molecular-weight substances or of proteins (thioredoxins and sulfiredoxins). Thus, the ascorbate-mediated reduction of protein sulfenic acids reported here represents a modification of the peroxiredoxin-thiol-specific antioxidant paradigm. In addition, our results reveal a previously uncharacterized antioxidant function for ascorbate. Of note, both sulfenic acids and ascorbate have been proposed in cell signaling (29, 40). The ascorbate/sulfenic acid pair may operate in the case of other proteins, representing an aspect of redox biochemistry that has yet to be explored *in vivo*. Thus, our results open perspectives in the understanding of cellular redox processes.

Experimental Procedures

Standard Reaction Buffer and Sample Preparation. The standard mixture for most experiments was Hepes (50 mM), pH 7.5, containing azide (1 mM) and DTPA (0.5 mM). All enzymes were previously reduced with DTT (100 mM) overnight at 4°C. Proteins were subsequently gel filtered (PD10; Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) to eliminate excess DTT. This procedure was performed immediately before the experiments to obtain homogeneously reduced samples.

GS Protection Assay. GS activity was measured by the γ -glutamyl-transferase assay essentially as described (41). GS protection was evaluated by the amount of γ -glutamyltransferase activity remaining in solution after metal-catalyzed oxidation. GS oxidative inactivation was carried out as described (42, 43). The reagent concentrations used were DTT or ascorbate (10 mM), GS (0.2 mg/ml), and FeCl_3 (3 μM) in Hepes (50 mM), pH 7.5, containing azide (1 mM). The incubation conditions were 15 min at 37°C. Remaining GS activity was measured by adding 1 ml of assay solution containing ADP (0.4 mM), glutamine (150 mM), Na_2HAsO_4 (10 mM), NH_2OH (20 mM), MnCl_2 (0.4 mM), and Hepes (0.1 M), pH 7.4. The reaction was incubated for 15 min at 37°C and then stopped by addition of 0.2 ml of FeCl_3 (55 mg/ml) in HCl (6 M). Absorbance of the γ -glutamylhydroxamate- Fe^{3+} complex was spectrophotometrically measured at 540 nm. The concentrations of tested enzymes are described in the corresponding figure legends. GS activity was considered 100% when the enzyme was preincubated in the absence of metal-catalyzed oxidation systems. “No Prx” is the negative control establishing the extent to which the metal-catalyzed oxidation system inactivated the GS without the antioxidant enzymes.

Mass Spectrometry. Accurate molecular mass determination was performed by mass spectrometry. Measurements were taken in positive ionization mode on a Q-TOF Ultima API fitted with an electrospray ion source (Micromass, Manchester, U.K.). The protein was solubilized in NH_4HCOOH (50 mM) and directly injected into the instrument by using a Rheodyne 7010 sample loop coupled to a LC-10A VP Shimadzu pump at a constant flow rate (20 $\mu\text{l}/\text{min}$). Instrument control and data acquisition were conducted by a MassLynx 4.0 data system (Micromass), and the experiments were performed by scanning from a mass-to-charge ratio (m/z) of 50–1,800 by using a scan time of 2 seconds applied during the entire infusion. The mass spectra corresponding to the total ion current (TIC) chromatogram were averaged, allowing an accurate molecular mass determination. External calibration of the mass scale was performed with NaI.

Ferrous Oxidation Xylenol Orange (FOX2) Assay. Peroxide concentration was determined by this method as described (44). Reaction mixtures containing standard reaction buffer with various enzyme concentrations (indicated in the legend or abscissa axis of the figures) and peroxide (500 μM) (H_2O_2 or *tert*-butyl hydroperoxide), ascorbate or DTT (1 mM) were incubated at 37°C for the indicated time. Reactions were stopped by addition of HCl at a final concentration of 0.2 M. Samples containing ascorbate were incubated for an additional 15 min with 1 unit of ascorbate oxidase (Sigma) at room temperature before ferrous xylenol orange solution addition. This was required because an excess of ascorbate reduces Fe^{+3} , interfering with peroxide quantitation. Absorbance due to the nonenzymatic reaction, i.e., standard reaction buffer plus peroxide and reductant, was subtracted from the absorbance corresponding to the whole reaction mixture. Furthermore, appropriate controls were performed in each experiment (positive control, standard reaction buffer plus peroxide; negative Prx controls, standard reaction buffer plus peroxide and Prx without addition of any reductant).

NBD-Cl Assay. The 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) reacts with both sulfhydryl (-SH) and sulfenic acid (-SOH) to generate products that can be distinguished by the UV-visible absorption spectra. Sulfhydryl adducts of NBD-Cl peak at 420 nm ($\epsilon = 13,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (45). Sulfenic acid of NBD-Cl peaks at 347 nm, with a similar extinction coefficient (46).

Modification of Proteins with Thiol or Sulfenic Acid Reagents. The proteins were previously reduced with DTT (100 mM) overnight in standard reaction buffer. Excess DTT was removed by gel filtration through a PD-10 column (Amersham Pharmacia). An aliquot, named "initial," was taken from the reduced protein and added to 10 equimolar NBD-Cl or 1,000 equimolar 5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione (dimedone). Then, the reduced protein was subsequently treated with 1.5 equimolar of H_2O_2 for 30 min at room temperature under anaerobic conditions (in the standard reaction buffer). An aliquot of this sample was treated with 10 equimolar NBD-Cl or 1,000 equimolar dimedone and named "oxidized." Finally, the residual oxidized protein was treated with ascorbate (10 mM) or DTT (10 mM) for 1 h at room temperature; the excess reductant was washed away by ultrafiltration, and the protein was incubated with a 10-fold excess of NBD-Cl or 1,000-fold excess of dimedone. This final sample was named "ascorbate." In all samples, excess NBD-Cl or dimedone were removed by ultrafiltration. Other modification was performed by incubation of reduced yPrx1 with a 100-fold excess of NEM for 3 h at room temperature. The excess NEM was washed away by ultrafiltration (by using a Microcon YM10; Millipore).

Protein Expression and Purification. yPrx1 and all other Prx used in this work were purified from bacteria by specific affinity chromatography as described by the respective researcher who kindly provided us with each one of the 1-Cys Prx overexpression vectors (described in *Experimental Procedures in SI Text*): yPrx1 (*S. cerevisiae*), yeast recombinant enzyme in fusion with T7-tag for immunoaffinity purification; AhpE (*M. tuberculosis*), recombinant enzyme in fusion with histidine tag for nickel-affinity purification; ArPer 1 (*A. thaliana*), recombinant enzyme in fusion with biotin; rPfl-Cys-Prx (*P. falciparum*), recombinant enzyme in fusion with GST-tag, purified by using a GST-Glutathione Affinity System with the AKTA Prime Liquid Chromatography system (Amersham Biosciences); Dpx-2540 and Dpx-6005 (*D. melanogaster*), recombinant proteins in fusion with histidine tags for nickel-affinity chro-

matography purification; and Prdx6 (*Rattus norvegicus*), native protein purified by anion exchange (mono Q; Amersham Biosciences) followed by cation exchange (carboxymethyl Sepharose fast flow column; Amersham Biosciences). All the enzymes were analyzed by SDS/PAGE to determine their purity and integrity.

Enzymatic Kinetic Parameters. Ascorbate peroxidase activities from yPrx1 (1 nM) and Prdx6 (0.5 nM) were assayed in a standard reaction mixture. The reaction was started with addition of H_2O_2 (200 μM) when ascorbate concentration varied from 10 to 80 μM . Ascorbate oxidation was monitored spectrophotometrically ($\epsilon_{265} = 14,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) at 37°C.

Peroxide Consumption by Prdx6 in the Presence of Rat Homogenates. The soluble fraction of rat kidney, pancreas, liver, and brain (*R. norvegicus*, strain: Sprague-Dawley) were obtained through potter homogenization of the organs in cold PBS. The homogenates were centrifuged for 45 min at 4°C and $16,000 \times g$. Purified Prdx6 (10 μM) was incubated with H_2O_2 (300 μM), and the rat organ homogenates (90 μg of protein per ml) were used as reductants. Consumption of H_2O_2 ($\approx 150 \mu\text{M}$) by Prdx6 was measured by FOX assay during 15 min at 37°C. In identical incubation conditions, homogenates were treated with ascorbate oxidase (1 unit) to deplete the reducing power derived from ascorbate, and these treated extracts were used as reductants of Prdx6. The effects of ascorbate oxidase or of extracts alone were analyzed as controls, and, in these conditions, minimal consumption was detected.

We thank S. Kawazu (Research Institute, International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan), A.B. Fisher (University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA), R. B. Aalen (University of Oslo, Oslo, Norway), B. G. Guimarães (Brazilian Synchrotron Light Laboratory, São Paulo, Brazil), and W. C. Orr (Southern Methodist University, Dallas, TX) for kindly providing expression clones; Earl R. Stadtman and Barbara Berlett (National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health) who kindly provided glutamine synthetase purified in their laboratory; Walter S. Sheppard, Marilene Demasi, and Maria C. Arias for helpful suggestions and critical reading of this manuscript; Dr. M. A. de Oliveira, Dr. E. Linares, Dr. A. J. Kowaltowski, and C. C. Caldeira for technical advice and assistance; S. Marana for helpful discussions about enzymatic procedures; and J. Hesson for revision of English grammar. This research was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de São Paulo and Conselho Nacional de Pesquisas, as part of the Instituto do Milênio Redoxoma.

1. Imlay JA (2003) *Annu Rev Microbiol* 57:395–418.
2. Rumsey SC, Levine M (1998) *J Nutr Biochem* 9:116–130.
3. Wood ZA, Schroder E, Harris JR, Poole LB (2003) *Trends Biochem Sci* 28:32–40.
4. Konig J, Baier M, Horling F, Kahmann U, Harris G, Schurmann P, Dietz KJ (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99:5738–5743.
5. Neumann CA, Krause DS, Carman CV, Das S, Dubey DP, Abraham JL, Bronson RT, Fujiwara Y, Orkin SH, Van Etten RA (2003) *Nature* 424:561–565.
6. Sherman DR, Mdluli K, Hickey MJ, Arain TM, Morris SL, Barry CE, III, Stover CK (1996) *Science* 272:1641–1643.
7. Park SH, Chung YM, Lee YS, Kim HJ, Kim JS, Chae HZ, Yoo YD (2000) *Clin Cancer Res* 6:4915–4920.
8. Chung YM, Yoo YD, Park JK, Kim YT, Kim HJ (2001) *Anticancer Res* 21:1129–1133.
9. Choi MH, Lee IK, Kim GW, Kim BU, Han YH, Yu DY, Park HS, Kim KY, Lee JS, Choi C, et al. (2005) *Nature* 435:347–353.
10. Vivancos AP, Castillo EA, Biteau B, Nicot C, Ayte J, Toledano MB, Hidalgo E (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8875–8880.
11. Jang HH, Lee KO, Chi YH, Jung BG, Park SK, Park JH, Lee JR, Lee SS, Moon JC, Yun JW, et al. (2004) *Cell* 117:625–635.
12. Biteau B, Labarre J, Toledano MB (2003) *Nature* 425:980–984.
13. Budanov AV, Sablina AA, Feinstein E, Koonin EV, Chumakov PM (2004) *Science* 304:596–600.
14. Rhee SG, Chae HZ, Kim K (2005) *Free Radical Biol Med* 38:1543–1552.
15. Demasi AP, Pereira GAG, Netto LES (2006) *FEBS J* 273:805–816.
16. Huang ME, Rio AG, Nicolas A, Kolodner RD (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11529–11534.
17. Rand JD, Grant CM (2006) *Mol Biol Cell* 17:387–401.
18. Zee JVD, Broek PJA (1998) *Free Radical Biol Med* 25:282–286.
19. Pedrajas JR, Miranda-Vizuet A, Javanmard N, Gustafsson JA, Spyrou G (2000) *J Biol Chem* 275:16296–16301.
20. Choi HJ, Kang SW, Yang CH, Rhee SG, Ryu SE (1998) *Nat Struct Biol* 5:400–406.
21. Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG (1994) *J Biol Chem* 269:27670–27678.
22. Ellman GL (1959) *Arch Biochem Biophys* 82:70–77.
23. You K-S, Benitez LV, McConachie WA, Allison WS (1975) *Biochim Biophys Acta* 384:317–330.
24. Li S, Peterson NA, Kim MY, Kim CY, Hung LW, Yu M, Lekin T, Segelke BW, Lott JS, Baker EN (2005) *J Mol Biol* 346:1035–1046.
25. Segel HI (1975) in *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems* (Wiley, New York), pp 606–621.
26. Manevich Y, Fisher AB (2005) *Free Radical Biol Med* 38:1422–1432.
27. Hancock RD, Galpin JR, Viola R (2000) *FEMS Microbiol Lett* 186:245–250.
28. Wilkinson SR, Kelly JM (2003) *Biol Chem* 384:517–525.
29. Smirnov N (2000) *Curr Opin Plant Biol* 3:229–235.
30. Pignocchi C, Foyer CH (2003) *Curr Opin Plant Biol* 6:379–389.
31. Guaiquil VH, Farber CM, Golde DW, Vera JC (1997) *J Biol Chem* 272:9915–9921.
32. Krauth-Siegel RL, Ludemann H (1996) *Mol Biochem Parasitol* 80:203–208.
33. Washburn MP, Wells WW (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 257:567–571.
34. Shimaoka T, Miyake C, Yokota A (2003) *Eur J Biochem* 270:921–928.
35. Del Bello B, Maellaro E, Sugherini L, Santucci A, Comporti M, Casini AF (1994) *Biochem J* 304:385–390.
36. Ishikawa T, Casini AF, Nishikimi M (1998) *J Biol Chem* 273:28708–28712.
37. May JM, Mendiarrata S, Hill KE, Burk RF (1997) *J Biol Chem* 272:22607–22610.
38. Wells WW, Xu DP, Yang YF, Roque PA (1990) *J Biol Chem* 265:15361–15364.
39. Whitbread AK, Masoumi A, Tetlow N, Schmuck E, Coggan M, Board PG (2005) *Methods Enzymol* 401:78–99.
40. Poole LB, Karplus PA, Claiborne A (2004) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:325–347.
41. Stadtman ER, Smyrniotis PZ, Davis JN, Wittenberger ME (1979) *Anal Biochem* 95:275–285.
42. Kim K, Rhee SG, Stadtman ER (1985) *J Biol Chem* 260:15394–15397.
43. Levine RL (1983) *J Biol Chem* 258:11828–11833.
44. Jiang ZY, Hunt JV, Wolff SP (1992) *Anal Biochem* 202:384–389.
45. Birkett DJ, Price NC, Radda GK, Salmon AG (1970) *FEBS Lett* 6:346–348.
46. Ellis HR, Poole LB (1997) *Biochemistry* 36:15013–15018.

Anexo III

Netto, L.E.S.; de Oliveira, M.A.; Monteiro, G.; Demasi, A.P.; Cussiol, J.R.; Discola, K.F.; Demasi, M.; Silva, G.M.; Alves, S.V.; Faria, V.G.; e Horta, B.B. (2007) "Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more", *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.*, **146**: 180-93.

Review

Reactive cysteine in proteins: Protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more[☆]

Luis Eduardo Soares Netto ^{a,*}, Marcos Antonio de Oliveira ^a, Gisele Monteiro ^a,
Ana Paula Dias Demasi ^a, José Renato Rosa Cussiol ^a, Karen Fulan Discola ^a, Marilene Demasi ^b,
Gustavo Monteiro Silva ^a, Simone Vidigal Alves ^a, Victor Genu Faria ^a, Bruno Brasil Horta ^a

^a Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo—SP, Brazil

^b Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan, São Paulo-SP, Brazil

Received 1 May 2006; received in revised form 13 July 2006; accepted 31 July 2006

Available online 6 September 2006

Abstract

Cysteine plays structural roles in proteins and can also participate in electron transfer reactions, when some structural folds provide appropriated environments for stabilization of its sulfhydryl group in the anionic form, called thiolate (RS[−]). In contrast, sulfhydryl group of free cysteine has a relatively high pK_a (8,5) and as a consequence is relatively inert for redox reaction in physiological conditions. Thiolate is considerable more powerful as nucleophilic agent than its protonated form, therefore, reactive cysteine are present mainly in its anionic form in proteins. In this review, we describe several processes in which reactive cysteine in proteins take part, showing a high degree of redox chemistry versatility.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Antioxidant; Cysteine; Disulfide; Peroxide; Electron transfer; Signaling; Thiols; Thiolate

Contents

1. Introduction	180
2. Roles of reactive cysteine in biology	181
2.1. Reduction of disulfide bonds	181
2.2. Formation of disulfide bonds	183
2.3. Protein S-glutathionylation	183
2.4. Antioxidant defense	184
2.5. Redox signalling	186
3. Conclusions	190
Acknowledgements	190
References	190

[☆] This paper is part of the 4th special issue of CBP dedicated to The Face of Latin American Comparative Biochemistry and Physiology organized by Marcelo Hermes-Lima (Brazil) and co-edited by Carlos Navas (Brazil), Rene Beleboni (Brazil), Rodrigo Stabeli (Brazil), Tania Zenteno-Savín (Mexico) and the editors of CBP. This issue is dedicated to the memory of two exceptional men, Peter L. Lutz, one of the pioneers of comparative and integrative physiology, and Cicero Lima, journalist, science lover and Hermes-Lima's dad.

* Corresponding author. Tel.: +55 11 30917589; fax: +55 11 30917553.

E-mail address: nettoles@ib.usp.br (L.E.S. Netto).

1. Introduction

Proteins are the final products of gene expression and are responsible to execute the biological information contained in the nucleotide sequences of their respective genes. A classical dogma in biology is that the genetic information presented in the nucleotide sequence of DNA is expressed in a two-stage

process: transcription and translation. Proteins need to adopt proper tertiary and quaternary structures to perform their biological functions. Because most proteins spontaneously fold into their native conformation under physiological conditions, the central dogma also implies that protein's primary structure dictates its tertiary structure.

Our interest is on proteins that have the ability to participate in electron transfer reactions. Most proteins rely on organic and on inorganic redox cofactors (NAD^+ , FAD, heme, Cu, Fe and other transition metals) for redox activity. In contrast, for other proteins, amino acids, mainly cysteines, are responsible for this property. Free cysteine possesses low reactivity to undergo redox transitions (Wood et al., 2003b). However, protein folding can generate environments in which cysteine residues are reactive. The reactivity of a sulfhydryl group is related to its pK_a , since its deprotonated form (thiolate = RS^-) is more nucleophilic and reacts faster with oxidants than the protonated form (R-SH). The sulfhydryl groups of most cysteines (linked to a polypeptide backbone or free cysteine) possess low reactivity, which is related to the fact that their pK_a is around 8.5 (Benesch and Benesch, 1955). In contrast, some redox proteins possess a reactive cysteine that is stabilized in the thiolate form by a basic residue, in most cases a lysine or an arginine residue (Copley et al., 2004). In conclusion, reactive cysteines in proteins are kept in a reactive form (thiolate = RS^-) by structural interactions with other amino acids. These reactive cysteines residues are compounds with very versatile redox chemistry because its sulfur atom can undergo redox transitions into any oxidation state between +6 and -2 (Jacob et al., 2003). Several proteins took advantage of this versatility to perform various biological functions as will be discussed below.

2. Roles of reactive cysteine in biology

2.1. Reduction of disulfide bonds

Many proteins with reactive cysteines are involved in controlling thiol/disulfide exchange reactions (Fig. 1A), a central theme in biology. Thiol/disulfide-exchange reactions are nucleophilic substitutions. A thiol or thiolate (RSH or RS^-) acts as a nucleophilic agent on a disulfide bond (RS-SR). These reactions are, for example, used to form and reversibly destroy structural disulfides in proteins and peptides, to regulate enzyme activity and to maintain cellular redox balance. The rate of this reaction is dependent on the pK_a of the sulfhydryl compound that is the nucleophilic agent. The lower the pK_a , higher is the amount of deprotonated form of sulfhydryl group (thiolate) and faster are the reactions at physiological pH. The tri-peptide glutathione ($\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$, GSH) is the most abundant thiol in cells and is vital for the maintenance of the intracellular redox balance, among other functions (reviewed by Jacob et al., 2003). Glutathione is almost completely protonated at physiological pH because its pK_a is 9.2 (Jung et al., 1972) which disfavor its reaction with disulfides. However, it should be also considered that glutathione levels in cells are very high, which should favor disulfide reduction, since rate of a reaction depend also on the concentration of substrates.

Besides glutathione, thiol proteins such as thioredoxin, glutaredoxin (also known as thioltransferase) and protein disulfide isomerase are also involved in the regulation of the intracellular redox balance and, therefore, they are also known as thiol/disulfide oxido-reductases. Thioredoxin appears to be a very ancient protein since it is widespread among all the living organisms. These small proteins (12–13 kDa) possess disulfide reductase activity endowed by two vicinal cysteines present in a CXXC motif (typically CGPC), which are used to reduce target proteins that are recognized by other domains of thioredoxin polypeptide. The reduction of target proteins results in a disulfide bridge between the two cysteines from the thioredoxin CXXC motif, which is then reduced by thioredoxin reductase that utilizes reducing equivalents from NADPH. Some of the target proteins of thioredoxin include ribonucleotide reductase (important for DNA synthesis), methionine sulfoxide reductase, peroxiredoxins and transcription factors such as p53 and NF- κ B (reviewed by Powis and Montfort, 2001).

Since thioredoxin plays multiple roles, it was surprising to observe that deletion of their genes in *Escherichia coli* resulted in a viable bacteria, capable to synthesize desoxyribonucleotides, among other processes. Holmgren (1976) showed that glutaredoxin was the backup for thioredoxin in the reduction of ribonucleotides. Like thioredoxin, glutaredoxin possess a CXXC motif in their active site (typically CPYC) and most of them are low molecular weight proteins (12–13 kDa). Glutaredoxin can also catalyze the reduction of disulfide bond in target proteins like thioredoxin through thiol/disulfide exchange reactions (Fig. 1A).

Furthermore, glutaredoxin also catalyzes the reduction of mixed disulfides with glutathione in a process that only the N-terminal cysteine thiolate participates (reviewed by Fernandes and Holmgren, 2004). Interestingly, some glutaredoxin isoforms possess only the N-terminal cysteine and are only capable to reduce mixed disulfides with glutathione. Thioredoxins reduce a wider range of disulfides in proteins than glutaredoxins, but cannot reduce mixed disulfides with glutathione. The disulfide form of glutaredoxin is reduced by glutathione, which is then reduced by NADPH in a reaction catalyzed by glutathione reductase.

The thioredoxin system (NAPDH+thioredoxin reductase+thioredoxin) and the glutathione system (NADPH+glutathione reductase+glutathione) are the major thiol dependent redox pathways present in the cells. Glutathione systems may or may not contain glutaredoxin, depending on the process considered. Several enzymes and other effectors can be reduced by both systems but many processes are reduced by either thioredoxin or by glutathione system. Interestingly, in platyhelminths, the thioredoxin and glutathione systems are linked in only one pathway. This worm possesses a seleno-cysteine containing enzyme named thioredoxin-glutathione reductase, which possess thioredoxin reductase, glutathione reductase and glutaredoxin activities (Sun et al., 2001).

The two electron redox potential of the cysteine/cystine couple in thiol/disulfide oxido-reductases is influenced by several factors. Thioredoxin and glutaredoxin are strong reducing agents and therefore possess a very negative redox

Fig. 1. Nucleophilic substitutions and reactive cysteines. (A) Thiol-disulfide exchange reaction. This reaction is faster when the sulfhydryl group is deprotonated (thiolate). Therefore, rate of this reaction is given by $V = k[R_n-S^-][RSSR_{lg}]$. The same rationale applies for the other reactions depicted here. (B) Peroxide reduction, resulting in a sulfenic acid derivative (Cys-SOH) and an alcohol corresponding to the peroxide. The sulfenic acid derivative can have different outcomes depending on the kind of peroxidoreductase considered (see Fig. 4) and on the environment where it is located. (C) Sulfoxide reduction, resulting in methionine regeneration and sulfenic acid formation in methionine sulfoxide reductase, which is reduced back to its sulfhydryl from by thioredoxin (reviewed by Weissbach et al., 2002). Abbreviations: lg = leaving group; n = nucleophilic agent.

potential. In contrast, protein disulfide isomerases (PDI) and DbsAs (bacterial PDI counterparts) possess much lower negative potentials (Table 1). Therefore reduction potential of the best oxidant (DsbA) is 146 mV higher than the best reductant (thioredoxin), corresponding to a ratio of 105 in thermodynamic stability of the dithiol/disulfide equilibrium (Xiao et al., 2005). This diversity in potentials reflects the biological roles of these thiol proteins. Thioredoxins and glutaredoxins preferentially reduce disulfide bridges, whereas protein disulfide isomerase and DbsAs preferentially generate disulfide bonds in proteins (Jacob et al., 2003).

It is interestingly to observe that in spite of these great differences in redox properties all these oxido-reductases share several similarities: (1) Sγ atom is mostly deprotonated in N-terminal cysteine residue of the CXXC motif at physiological conditions. Therefore, the most N-terminal cysteine is more

nucleophilic and more exposed than the second cysteine. The most C-terminal cysteine is usually protonated and more buried in the polypeptide chain; (2) global fold of five stranded β-sheet flanked by four helices, the so-called thioredoxin fold (Fig. 2A); (3) the active site that contains the CXXC motif is located on a surface loop at the end of strand β2 and followed by a long α-helix (Fig. 2A).

Several reasons have been raised to explain this variation of the reducing capabilities, such as the composition of the amino acids in the CXXC motif (Table 1), network of charged amino acids and structural factors, such as the dipole property of the α-helix where the buried cysteine is located (reviewed by Carvalho et al., 2006). These different redox properties among thiol/disulfide oxido-reductases appear not to be related with the stability of the disulfide bonds, since their lengths are very similar among these proteins (reviewed by Carvalho et al., 2006). In any case, for all of these enzymes, the pK_a of the reactive cysteine is considerably lower than the pK_a of free cysteine (Table 1), but the mechanism by which the thiolate is stabilized varies.

The stabilization of the thiolate anion in thioredoxin is relatively well characterized and was taken as an example for thiol/disulfide oxido-reductases. It depends on: (i) a network of charged residues, especially on specific aspartate and lysine residues (Fig. 2B); (ii) dipole character of the α-helix where the C-terminal cysteine is located and (iii) hydrogen bonding between the reactive and the C-terminal cysteine residues (reviewed by Carvalho et al., 2006).

Interestingly, mutations of Asp26 and Lys57 of thioredoxin affect only the pK_a of the active site thiol, but not the structure of the protein (Dyson et al., 1997). For the other oxido-reductases the network of charged residues is different and involves Glu 30 for PDI (PDB ID=1MEK), Glu 24 for DsbA (PDB ID=1A23) and Glu30, Asg26 and Lys27 for glutaredoxin (PDB ID=1KTE).

Table 1
Properties of Thiol/disulfide oxido-reductases

Oxido-reductase	Motif in active site	Redox Potential (E°, mV)	pK _a
Thioredoxin	Cys–Gly–Pro–Cys	−270 ^a	6.3–7.5 ^f
Glutaredoxin	Cys–Pro–Tyr–Cys	−198 to −233 ^b	3.5–3.8 ^g
Tryparedoxin	Cys–Pro–Pro–Cys	−249 ^c	7.2 ^h
Protein Disulfide Isomerase (PDI)	Cys–Gly–His–Cys	−127 ^d	3.5–6.7 ⁱ
DbsA	Cys–Pro–His–Cys	−125 ^e	3.5 ^j

^a — Miranda-Vizuete et al. (1997), Nishinaka et al. (2001). ^b — Aslund et al. (1997). ^c — Reckenfelderbaumer et al. (2002). ^d — Lundstrom and Holmgren (1993). ^e — Collet and Bardwell (2002). ^f — Holmgren (1972), Kallis and Holmgren (1980), Reutimann et al. (1981), Dyson et al. (1997), Li et al. (1993), Chivers et al. (1997), Dillet et al. (1998), Vohnik et al. (1998). ^g — Gan et al. (1990), Yang and Wells (1991), Mieyal et al. (1991), Jao et al. (2006). ^h — Reckenfelderbaumer and Krauth-Siegel (2002); ⁱ — Darby and Creighton (1995), Hawkins and Freedman (1991); ^j — Nelson and Creighton (1994), Grauschopf et al. (1995).

Fig. 2. Structural characteristics of thiol/disulfide oxidoreductases. Thioredoxin from *Escherichia coli* (PDB ID = 1XOB) was chosen as a model to describe several features common to thiol/disulfide oxidoreductases. (A) General view of thioredoxin fold: β -sheet composed of five strands (yellow) flanked by four α -helices (red). Both main and side chains of the two cysteine residues belonging to the CXXC motif are showed (gray). The reactive cysteine (Cys 32) is the most exposed one. (B) View of the active site, showing the network of amino acids involved in the stabilization of reactive cysteine in the thiolate form. Residues involved in the network of charged amino acids are represented with colors and with dots representing their electronic densities (Asp 26 — magenta, Cys 32 — green, Cys 35 — cyan, Lys 57 — magenta). Pro76 (yellow) is not involved in the network of charged residues that stabilize the thiolate form of reactive cysteine, but its main and side chains are shown here because this residue plays a central role in the recognition of thioredoxin substrates. Figures were generated by the Pymol software (www.pymol.org). (For interpretation of the reference to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

We are interested in the functional and structural characterization of proteins belonging to thioredoxin and glutathione systems from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In this regard, we solved the structure of thioredoxin reductase I (Oliveira et al., 2005) and preliminary data indicated that the two thioredoxin systems are not completely redundant.

2.2. Formation of disulfide bonds

The formation of disulfide bonds stabilizes the most active conformation of proteins that will be secreted. One would

expect that PDI and DsbA would be more suitable to catalyze the formation of disulfide bond given their reduction potential (Table 1). In fact, the search for the enzymatic catalyst of oxidative folding led to isolation of PDI (Goldberger et al., 1963). PDI can catalyze the formation, reduction or isomerization of disulfide bonds depending on the redox conditions of the assay and on the nature of the substrate protein. However, the environment in which PDI is found (endoplasmic reticulum), favors only the formation and isomerization of disulfide bonds. Both, the formation of disulfide bond and isomerase activities occur by thiol/disulfide exchange reactions (Fig. 1A). Like thioredoxins and glutaredoxins, the ability of PDI to catalyze thiol/disulfide exchange reactions is given by a CXXC motif (typically CGHC) among other factors (Aslund et al., 1997). When the cysteines in the active site are present in the disulfide form, PDI can directly oxidize thiol groups of target proteins into disulfide bridges (dithiol oxidase activity). In contrast, the isomerase activity of PDI relies on the dithiol (reduced) configuration state of the active site cysteines, suitable for disulfide reshuffling (reviewed by Frand et al., 2000).

In spite of the different redox properties among all these oxido-reductases, they can catalyze both reduction and formation of disulfide bonds *in vitro*, depending on the experimental conditions. In fact, Grx1 from *E. coli* is even more efficient than PDI to catalyze disulfide bond formation (Xiao et al., 2005), indicating that kinetic parameters should also to be taken into account. Therefore, it is important to consider the environment in which the thiol oxido-reductase is located to analyze its function. In eukaryotic cells, protein disulfide bond formation takes place within the lumen of the endoplasmic reticulum. Proteins that will be secreted to the extracellular space are processed inside this organelle. The redox state of the endoplasmic reticulum is more oxidizing than that of cytosol, a difference that favors the formation of disulfide bonds, which is important to maintain the structure of the exported protein in the harsh extracellular environment. The major redox buffer in the cytosol as well as in the lumen of ER is the couple GSH/GSSG. However, GSH/GSSG ratios are quite different: 1:1 to 3:1 for the lumen of endoplasmic reticulum and 30:1 to 100:1 for the cytosol and mitochondrial matrix. Therefore, the ability of thioredoxin and glutaredoxin to catalyze reduction of disulfide bond in protein and of PDI to catalyze the reverse process is consequence of several factors such as redox potentials of vicinal sulphhydryl groups in these proteins and redox balance of the environment.

2.3. Protein S-glutathionylation

Another thiol/disulfide exchange process that deserves special consideration here is S-glutathionylation of cysteine residues in proteins. In resting state, levels of S-glutathionylated proteins in cells are around 1%, but upon oxidative stress a significant increase is observed. Therefore, initially, the meaning of the S-glutathionylation was thought to be the protection of cysteine residues against overoxidation to sulfinic (RSO_2H) or sulfonic (RSO_3H) acids, which can lead to protein inactivation

(Thomas et al., 1995). Later, it was shown that for some enzymes, protein *S*-glutathionylation affects enzyme activities, suggesting a regulatory role for this process (Chrestensen et al., 2000; Davis et al., 1997; Demasi et al., 2003). If *S*-glutathionylation is in fact a regulatory event, it is expected the occurrence of proteins capable to catalyze the addition and removal of glutathione from target proteins. Glutaredoxins, especially those containing only one cysteine in their active site, have been most frequently implied as dethiolases (Molina et al., 2004). The yeast *S. cerevisiae* has five glutaredoxins, three monothiolic and two dithiolic, distributed in different compartments and performing similar, but not completely redundant roles (Wheeler and Grant, 2004). We have recently solved the crystal structure of glutaredoxin 2 (Discola et al., 2005) and unpublished results have demonstrated its role on the removal of GSH from *S*-glutathionylated 20S proteasome extracted from yeast cells. We hope that with the elucidation of glutaredoxin 2 structure it will be possible to obtain insights into the mechanisms by which this thiol/disulfide oxido-reductase act as a dethiolase in the yeast *S. cerevisiae*.

2.4. Antioxidant defense

Proteins with reactive cysteine considered so far, catalyze thiol/disulfide exchange reactions. In contrast, thiol-dependent peroxidases have evolved the ability to cleave a peroxide bond that is a more difficult process than the reduction of a disulfide bond (Fig. 1B). Copley et al. (2004) elegantly hypothesized that peroxiredoxins, a class of thiol-dependent peroxidases, present

Fig. 3. Structure of peroxiredoxin active site. Reactive cysteine in peroxiredoxins corresponds to the C-terminal cysteine of CXXC motifs in thioredoxins (Copley et al., 2004). Therefore, they are located in an α -helix as the C-terminal cysteine of thioredoxin is. Structure of human peroxiredoxin 5 (PDB ID = 1HD2) is shown as an example. Electronic density of arginine residue (Arg127) involved in the stabilization of the thiolate is represented with dots, as well as reactive cysteine (Cys47). Thiolate function (RS^-) of Cys 47 is brown. Main and side chains of a threonine residue (Thr44 that corresponds to the N-terminal cysteine in thioredoxin) that plays a role in stabilization of thiolate is shown in green, as well as the chains of Pro 40 (yellow) that is involved in protection of peroxiredoxin from overoxidation. Finally, main and side chains of histidine 51 (purple), forming a salt bridge with Arg 127 (cyan) is also shown here. Figure was generated by the Pymol software (www.pymol.org). (For interpretation of the reference to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

several amino acids substitutions from the more ancient thiol/disulfide oxido-reductases, which make them capable to reduce OO bonds through a reactive cysteine.

Both hydrogen and organic hydroperoxides can be decomposed by peroxiredoxins and in most of cases they utilize reductive equivalents from thioredoxins (Netto et al., 1996). Therefore, the majority of peroxiredoxins are also called thioredoxin peroxidases. Recently, it was shown that some peroxiredoxins can also decompose peroxynitrite (Bryk et al., 2000; Dubuisson et al., 2004; Trujillo et al., 2004; Wong et al., 2002). These reactions catalyzed by peroxiredoxins have been implied in both peroxide detoxification and cellular signaling as will be discussed below. Like other thiol/disulfide oxido-reductases, peroxiredoxins are widespread in nature and are found in several cell compartments such as cytosol, mitochondria, nucleus and chloroplast (Rhee et al., 2005a).

As described for the thiol/disulfide oxido-reductases, the high reactivity of the active site cysteine in peroxiredoxins is related to the fact that the thiol group of this residue possesses very low pK_a . In the case of peroxiredoxins, the presence of a guanidine group from a fully conserved arginine residue (Wood et al., 2003b) is a key factor for the stabilization of the thiolate. Interestingly, the reactive cysteine from peroxiredoxins is homologous to the C-terminal cysteine of the CXXC motif in oxido-reductases, which is not the most nucleophilic. The reactive cysteine (the most N-terminal and most solvent exposed seen in Fig. 2) in oxido-reductases was replaced by a threonine residue in peroxiredoxins and the other cysteine acquired high nucleophilicity due to several structural features and amino acids interactions, such as the hydrogen bonding with an arginine residue mentioned above (Fig. 3).

Other peroxide-removing enzymes evolved other strategies to decompose peroxides. Catalase and mammalian glutathione peroxidase utilize heme or seleno-cysteine to decompose peroxides, whereas peroxiredoxins have a very reactive cysteine in their active site. Initially, these differences in the active sites was thought to reflect the fact that peroxiredoxins would have moderate catalytic efficiency ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), (Hofmann et al., 2002) when compared with catalases ($\sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Hillar et al., 2000) and glutathione peroxidases ($\sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Hofmann et al., 2002). Recently, however, some reports have described higher rate constants (10^6 – $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) for the reaction of reduced peroxiredoxins with different kinds of peroxides (Akerman and Muller, 2005; Baker and Poole, 2003; Dubuisson et al., 2004; Parsonage et al., 2005). In any case, it is important to emphasize that peroxiredoxins are abundant in aerobic cells. For example: (i) peroxiredoxins are among the ten most abundant proteins in *E. coli* (Link et al., 1997); (ii) peroxiredoxins are the second or third most abundant protein in erythrocytes (Moore et al., 1991) and (iii) compose 0.1–0.8% of the soluble proteins in other mammalian cells (Chae et al., 1999). Furthermore, it was demonstrated that peroxiredoxin, but not catalase, was responsible for protection of bacteria against endogenously generated hydrogen peroxide (Costa Seaver and Imlay, 2001).

There are several kinds of peroxiredoxins and several classifications were proposed based on different criteria.

Generally, every aerobic cell possesses several different kinds of peroxidoredoxins. The most frequently used criteria for classification is the presence or absence of additional conserved cysteines (Wood et al., 2003b). Peroxidoredoxins that contain two conserved cysteines are called 2-Cys Prx, whereas those that possess only one conserved cysteine are referred as 1-Cys Prx. In both cases, the reactive cysteine attacks the hydroperoxide and is oxidized to sulfenic acid (Cys-SOH), while the corresponding alcohol is released (Fig. 4). Because the reactive cysteine is the one that directly interact with peroxides it is called peroxidatic cysteine and is located at the N-terminal part of the protein. Three peroxidoredoxin classes can be recognized based on the next step of the catalytic cycle (1-Cys Prx; typical 2-Cys Prx and atypical 2-Cys Prx). The 1-Cys Prx presents the simplest mechanism: they are oxidized to a stable sulfenic acid and then reduced back by a reductant. The biological electron donors of most 1-Cys Prx are still unknown. One exception is the 1-Cys Prx from yeast, whose electron donor is mitochondrial thioredoxin (Pedrajas et al., 2000). Furthermore, mammalian 1-Cys Prx can form heterodimer complexes with

Glutathione *S*-transferase π , being capable to accept electrons from glutathione (Ralat et al., 2006).

The enzymatic mechanism of 2-Cys Prx differs from the 1-Cys Prx's mechanism because these proteins have a second conserved cysteine, also called resolving cysteine, which is also involved in the catalytic cycle. The sulfenic acid formed in the peroxidatic cysteine reacts with the resolving cysteine of other protein, generating an intermolecular disulfide bridge. In the case of atypical 2-Cys Prx, the resolving cysteine belongs to the same polypeptide backbone of the peroxidatic cysteine, therefore an intramolecular disulfide bond is generated. For the majority of the typical and atypical 2-Cys Prx proteins, disulfide bonds are reduced by thioredoxins (Fig. 4).

Alternatively, peroxidoredoxins can be classified according to their amino acid sequence, which is very variable among five different groups (Trivelli et al., 2003). In spite of the fact that peroxidoredoxins groups share very low amino acid sequence similarity, they have residues that are very conserved among all members (Wood et al., 2003b): (1) A proline that limits solvent and peroxide access in the active site and therefore probably

Fig. 4. Catalytic mechanism of Prxs. As described in Fig. 1B reduction of peroxides by reactive cysteines generated a sulfenic acid derivative in all kinds of peroxidoredoxins. (A) In 1-Cys peroxidoredoxins the sulfenic acid derivative is stabilized by the polypeptide backbone and is directly reduced by a thiol reductant. (B) In typical 2-Cys peroxidoredoxins, the sulfenic acid interacts with another thiol group from other subunit, generating an intermolecular disulfide bond, which is then reduced by a biological substrate, in most cases thioredoxin. (C) In atypical 2-Cys peroxidoredoxins, the catalytic mechanism is very similar to 2-Cys typical, with the exception that an intramolecular disulfide bond is formed.

shields the cysteine sulfenic acid from overoxidation; (2) an arginine residue that is involved in the stabilization of peroxidatic cysteine in the thiolate form and (3) an threonine residue that also interacts with the sulfur atom of peroxidatic cysteine (Fig. 3). Besides these similarities, all peroxiredoxins possess a common structural feature: the thioredoxin fold, which was described before. Interestingly, all other thiol/disulfide oxido-reductases presented here (thioredoxin, glutaredoxin and protein disulfide isomerase) also possess the thioredoxin fold (Fig. 2A). Differently than the thiol/disulfide oxido-reductases, peroxiredoxins contain central insertions, N-terminal and C-terminal expansions to the thioredoxin fold that are different for different groups of these thiol dependent peroxidases. Due to these structural similarities and through a motif analysis, it was proposed that all these thiol proteins might have a common ancestor (Copley et al., 2004).

The yeast *S. cerevisiae*, which has been used as model for higher eukaryotes, possesses five peroxiredoxins belonging to four different sub-groups (Park et al., 2000). Our studies have demonstrated that although all five yeast peroxiredoxins have the same biochemical activity (thioredoxin dependent peroxidase); their cellular functions are not completely redundant. For example, cytosolic thioredoxin peroxidase I (Tsa1/YML028W) is specifically important for the defense of yeast with dysfunctional mitochondria (Demasi et al., 2001; Demasi et al., 2006), whereas mitochondrial thioredoxin peroxidase I (PrxI/YBL064C) is more important in conditions where yeast obtain ATP preferentially by respiration (Monteiro et al., 2002; Monteiro and Netto, 2004). Finally, cytosolic thioredoxin peroxidase II (cTPxII/Tsa2/YDR453C) appears to be an important backup for cTPxI for the defense against organic peroxides, independently of the functional state of mitochondria (Munhoz and Netto, 2004). Interestingly, mitochondria are protected not only by the mitochondrial isoform (PrxI/YBL064C) but also by cytosolic isoforms and in cooperation with mitochondrial pool of glutathione against Ca^{2+} induced stress (Monteiro et al., 2004). This partial redundancy observed among yeast peroxiredoxins probably parallels the roles that these peroxidases play in mammalian cells.

Recently, a new kind of peroxidase that also operates through a reactive cysteine was described (Lesniak et al., 2002; Cussiol et al., 2003). Initially, it was demonstrated that the deletion of genes encoding these peroxidases rendered *Xanthomonas campestris* specifically sensitive to organic peroxides, but not to hydrogen peroxide (Mongkolsuk et al., 1998). Therefore, this gene was named organic hydroperoxide resistance (Ohr) and was later shown to be exclusively present in bacteria, most of them pathogenic. Interestingly, only dithiols support the peroxidase activity of Ohr and it is considerably more efficient in the removal of organic peroxides than in the decomposition of hydrogen peroxide (Cussiol et al., 2003). It was noteworthy to observe that differently than other thiol-dependent peroxidases (glutathione peroxidases and peroxiredoxins), Ohr does not possess the thioredoxin fold. Instead, Ohr is a dimer composed of two six-strand β -sheet and two central α -helices (Lesniak et al., 2002; Meunier-Jamin et al., 2004; Oliveira et al., 2006). Contrary to the other thiol/disulfide oxido-reductases

Fig. 5. Ohr structure with hidden cysteines residues. Overall view of *Xylella fastidiosa* quaternary structure (PDB = 1ZB9). Contrary to peroxiredoxins and thiol/disulfide oxido-reductases, reactive cysteine (Cys61 in pink) is buried in the polypeptide backbone (two β -sheet composed of six strands). The side chain of Arg 19 (magenta) that is involved in the stabilization of thiolate form of Cys 61 and Glu51 (red) that forms a salt bridge with Arg19 are also shown in dark color. Cys 125 (in yellow), involved in the formation of an intramolecular disulfide bond, is also represented with black color. Figure was generated by the Pymol software (www.pymol.org). (For interpretation of the reference to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

and peroxidases described so far, the reactive cysteine is located in a very hydrophobic environment (Fig. 5). Due to these differences and because Ohr are exclusively present in bacteria, these peroxidases might represent interesting targets for drug design.

Finally, antioxidant proteins also make use of reactive cysteine to repair oxidative damage. Methionine sulfoxide reductase has a reactive cysteine capable to cleave an $\text{S}=\text{O}$ bond, also by a nucleophilic substitution mechanism (Weissbach et al., 2002), (Fig. 1C).

2.5. Redox signalling

Since reactive cysteines can decompose peroxides yielding products that can be reduced back to the sulphydryl form, several proteins containing this kind of residues are in principle adapted to participate in redox signaling mediated by hydrogen peroxide. Although hydrogen peroxide has been classically associated with oxidative stress, there is a growing amount of evidences about the role of this mild oxidant as a cell messenger (Rhee et al., 2005b). Hydrogen peroxide can cross membranes and is relatively stable, two features suitable for a cell messenger in analogy to nitric oxide (Stone, 2004). This idea was strengthened by the discovery that non-phagocytic cells also possess NADPH oxidase, a source for hydrogen peroxide (Bokoch and Knaus, 2003). In fact, there are numerous reports about the effect of hydrogen peroxide in terms of both cellular responses and signaling pathways activated (reviewed by Stone, 2004).

The best characterized mediator of peroxide induced stress is OxyR, a transcription activator found only in bacteria. Genes regulated by OxyR includes enzymes involved in peroxide

decomposition (catalase, peroxiredoxin, thioredoxin, glutathione reductase and glutaredoxin) and cell signaling (small RNA molecule). The mechanism by which OxyR senses H_2O_2 involves a reactive cysteine that once again is stabilized in the thiolate form by a conserved arginine among other amino acids (Choi et al., 2001). The oxidation of this cysteine generates a disulfide bond that causes a conformational change in the protein. Both the oxidized and reduced forms of OxyR can bind DNA, but only the oxidized form is capable to recognize specific elements in the promoters of target genes and activate their transcription (Fig. 6A). The reactive cysteine of OxyR possesses a relatively high rate constant ($2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, see Aslund et al., 1999) and can activate transcription when intracellular concentrations of hydrogen peroxide are as little as 100 nM (Costa Seaver and Imlay, 2001). The activation of OxyR is reversed by reduction of reactive cysteine by GSH and glutaredoxin 1 (Fig. 6).

Response of bacteria to oxidative stress is mediated by other transcriptional regulators besides OxyR. OhrR is a transcriptional repressor that is also capable to sense peroxides through a reactive cysteine (Mongkolsuk and Helmann, 2002). The only one known target of OhrR so far described is Ohr that is specifically induced by organic peroxides, the preferable substrate of this dithiol-dependent peroxidase. Therefore, Ohr/OhrR is a pathway specifically involved in the oxidative stress response to organic, but not to hydrogen peroxide (Klomsiri et al., 2005). In vitro, reduced OhrR binds tightly to its target DNA and therefore blocks the transcription of *ohr* (Fuangthong et al., 2001). Oxidation of a conserved and reactive cysteine in OhrR by peroxides leads to derepression of *ohr* transcription, which is reversed by a reducing agent such as DTT. Differently than OxyR, OhrR is oxidized to a sulfenic acid (CysSOH) instead of a disulfide (Fuangthong and Helmann, 2002).

Another transcriptional repressor of bacteria that was implied in peroxide sensing in bacteria through reactive cysteines is PerR (Mongkolsuk and Helmann, 2002). PerR belongs to a family of transcriptional regulators that are dimeric proteins and

that contain two metal sites per monomer. One binds zinc and appears to play mainly structural roles, whereas the second site can bind both iron and manganese and has a regulatory role. PerR complexed with either Mn^{+2} or Fe^{+2} can bind DNA and repress transcription of its target genes such as catalase and peroxiredoxin. However, only when PerR is complexed with Fe^{+2} there is derepression of gene expression and lack of DNA binding ability (Herbig and Helmann, 2001). Because DNA binding of PerR is restored by thiol reductants and because PerR has a CXXC motif, it was proposed that peroxide sensing might involve a reactive cysteine being oxidized to a disulfide bond. Very recently, however, the same group has shown that PerR senses hydrogen peroxide by a Fenton-like reaction mediated by Fe^{+2} complexed with histidines. This process provokes oxidation of histidine residues (His37 and His91) to 2-oxo-histidines. This is the first description of a metal catalyzed protein oxidation process involved with redox signaling (Lee and Helmann, 2006).

Besides transcriptional regulators, bacteria also possess a chaperone (Hsp33), whose activity is redox regulated through reduction/oxidation cycles that involve a reactive cysteine (Janda et al., 2004). In this case, cysteines residues in the reduced state can bind zinc but after oxidation to disulfide bonds, Hsp33 loses this ability but acquires high affinity for unfolded proteins (chaperone holdase activity). Thioredoxin (or glutaredoxin) can then reduce the reactive cysteine of Hsp33, restoring its ability to bind zinc. This ensures that proteins with transient exposed hydrophobic surfaces do not form insoluble aggregates. Upon return to non stress conditions other chaperone systems are available to interact with the partially unfolded proteins released by Hsp33 (reviewed by Winter and Jakob, 2004). Interestingly, Hsp33 appears to be active in severe oxidative stress, condition in which other chaperones are inactive (Winter et al., 2005).

Another level of regulation was possible in eukaryotes with the appearance of cellular compartments. In fact, the control of a transcriptional regulator's activity by regulated nuclear

Fig. 6. Redox regulation by OxyR. Each OxyR subunit is represented here by an elliptical symbol. The darker symbols represent the reduced tetramer and the lighter the oxidized (disulfide) tetramer that assumes different conformations. Only the oxidized form is capable to recognize specific sequences (elements) repeated four times in the promoters of target genes and as a consequence stimulate their transcription.

accumulation is a common theme in biology. Therefore, the higher the amount of a transcriptional regulator in the nucleus, the higher is its activity (repression or induction of gene expression). The best characterized mechanism of a redox signaling process in an eukaryotic cell through a reactive cysteine is that mediated by Yap1 (reviewed by Paget and Buttner, 2003). Yap1 belongs to the AP-1 family of proteins that includes the proto-oncogenes Jun and Fos, all of them possessing a Leu zipper involved in the dimerization of these proteins (Fig. 7A). Yap1 also possesses a nuclear export signal (NES) that in basal conditions is recognized by Crm1 that then transport this transcriptional activator from the nucleus to the cytosol (Fig. 7B i). Therefore, in basal conditions Yap1 is preferentially located in the cytosol, does not interact with target promoters and consequently does not induce gene expression. Upon oxidation, Yap1 cysteine residues are oxidized and NES adopt a different conformation, not recognizable by Crm1. Therefore, Yap1 accumulates in the nucleus, being capable to physically interact with target promoters.

Yap1 can be oxidized into two products: (1) a disulfide between cysteines residues of the C-terminal cysteine rich domain (Fig. 7B ii) or (2) a disulfide between one cysteine

of the N-terminal and the other of the C-terminal rich domain (Fig. 7B v). Mode (1) of Yap1 oxidation is the simplest and is mediated by thiol oxidizing agents such as diamide (Fig. 7B ii). The mode (2) is a pathway that involves other proteins besides Yap1. In this case, the oxidant is a peroxide molecule that is sensed by a protein, homologous to the selenium-dependent glutathione peroxidase (Gpx3/Orp1) from mammalian cells (Delaunay et al., 2002). Gpx3/Orp1 is oxidized to a sulfenic acid derivative (Fig. 7B iii), which condenses with a reactive cysteine of Yap1, generating a mixed disulfide bond (Fig. 7B iv). Finally a thiolate group from the N-terminal cysteine rich domain attacks the mixed disulfide, generating an intra-molecular disulfide bond in Yap1, which is not recognized by Crm1 and accumulates in the nucleus (Fig. 7B v). Besides Yap1, other transcriptional regulators are involved in the response of yeast to oxidative stress which is a very complex phenomenon. As an example, the regulation of mitochondrial thioredoxin peroxidase I involves Hap1 (YLR256W), Msn2/4 (YMR037C/YKL062W) and Yap1 among other regulators (Monteiro et al., 2002; Monteiro and Netto, 2004).

The mechanisms by which hydrogen peroxide is sensed in mammalian cells are much more controversial. Much attention

Fig. 7. Yap1 activation by nuclear accumulation dependent on oxidation. (A) Yap1 domains. Leu-ZIP = leucine rich domain; N-CRD = N-terminal cysteine rich domain; C-CRD = C-terminal cysteine rich domain. NES= Nuclear Export Signal. (B) The names of cellular compartments with capital letters indicate the location where Yap1 accumulates. The arrow represents exportation of Yap1 out of the nucleus and the symbols of arrows with an axis represent inhibition of this process by oxidation of Yap1 cysteines. (i) Yap1 in the ground state is reduced and, therefore, its NES is recognized by Crm1, leading to its exportation out of the nucleus. (ii) Thiols oxidizing agents, such as diamide, oxidize thiolate groups of the C-CRD, provoking inhibition of its exportation. After consumption of the oxidant, thioredoxin can reduce Yap1 back to the reduced state (i). (iii) Gpx3/Orp1 is oxidized by peroxide, generating a sulfenic acid derivative. (iv) Sulfenic acid form of Gpx3/Orp1 condenses with a thiolate group from C-CRD generating a mixed disulfide bridge, which is attacked by a thiolate from N-CRD, generating an intra-molecular disulfide bridge between cysteines of different domains (v). After consumption of the peroxide this disulfide can be reduced back to the ground state (i).

Fig. 8. Nrf2 activation by nuclear accumulation dependent on oxidation of Keap1. (A) Under basal conditions, Keap1 is in the reduced state and sequester Nrf2 in the cytoplasm. Keap1 is also connected to the cell cytoskeleton. In this condition, Keap1 also induces ubiquitination of Nrf2 that is then degraded by proteasome. (B) Under oxidative stress, thiolate groups of keap1 are oxidized, leading to Nrf2 release that can then accumulate in the nucleus and activate transcription in the target genes.

is given to protein tyrosine phosphatases (PTP) as biological sensors of hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide can react with cysteines from the active site of PTP, generating sulfenic acids, which was proposed to be a redox regulatory event (Lee et al., 1998). Later, two groups have shown independently that sulfenic acids in PTP are converted to sulfenyl-amide by reaction of sulfenic acids with backbone amide of a serine residue (Salmeen et al., 2003; Van Montfort et al., 2003). The sulfenyl-amide form of PTP is inactive; therefore this process should provoke an increase in the levels of tyrosine phosphorylation. As a consequence, PTP targets such as MAP kinases should be phosphorylated in higher levels. Besides sulfenyl-amides, reactive cysteines were also found in the sulfinate (RSO_2^-) and sulfonate (RSO_3^-) forms in the crystal structure of PTP, when these proteins were treated with large excess of hydrogen peroxide (Van Montfort et al., 2003). Contrary to the sulfinate and sulfonate forms, sulfenyl-amides can be reduced back by classical reductants such as DTT and thioredoxin (Salmeen et al., 2003; Van Montfort et al., 2003). Therefore, because their formation is reversible, sulfenyl-amides were proposed as an important step in the redox signaling by PTPs.

However, redox regulation by PTP is controversial, mainly because the reaction of these phosphatases with hydrogen peroxide is slow (reaction constant is around $10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), (Stone, 2004). Considering that intracellular concentration of hydrogen peroxide is in between 1 to 700 nM and that the levels of glutathione are around 1–10 mM, a target for redox regulation should react faster with this mild oxidant than PTP does. In fact, as mentioned before, one biological sensor of hydrogen peroxide in bacteria, the transcriptional factor OxyR

possesses a reaction constant of $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Aslund et al., 1999). OxyR, like other thiol proteins mentioned here, possesses a very reactive cysteine, which is deprotonated at physiological pH. Therefore, the hydrogen peroxide sensor in mammalian cells should be in principle a protein that possesses a reaction constant with hydrogen peroxide in this range.

Peroxiredoxins are good candidates as biological redox sensors in mammalian cell, since their reaction constants with hydrogen peroxide are around $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ or even higher (Akerman and Muller, 2005; Baker and Poole, 2003; Parsonage et al., 2005). In fact, there are many suggestions that peroxiredoxins could be the biological sensors of hydrogen peroxide (Wood et al., 2003a,b). In this regard, it was shown that bacterial 2-Cys Prx are one hundred times more resistant to hydrogen peroxide inactivation than some of their counterparts in eukaryotic cells (Wood et al., 2003a). In both cases, the inactivation by hydrogen peroxide occurs due to oxidation of sulfenic acid (Cys-SOH) in the reactive cysteine to sulfinic acid (Cys-SO₂H). Interestingly, the all 2-Cys Prx that are sensitive to inactivation possess two common motifs: GGLG and YF (Wood et al., 2003a). Therefore, it seems very probable that the high sensitivity of these peroxiredoxins to peroxide inactivation it is not a limitation in the mechanism of catalysis, but instead a property that was selected during evolution of eukaryotes (Wood et al., 2003a).

In support to this hypothesis, it was shown that sulfinic acids in 2-Cys Prx are reduced *in vivo* in sensitive 2-Cys Prx (Woo et al., 2003). This was a quite surprising result, since it is well established that sulfinic acids in peroxiredoxins and in any other protein are not reducible *in vitro* by classical reducing agents, such as DTT and thioredoxin. The enzymatic system responsible to regenerate sulfhydryl groups from sulfinic acids in 2-Cys Prx was first identified in the yeast *S. cerevisiae* and was named sulfiredoxin (Biteau et al., 2003). Sulfiredoxin is a low molecular weight protein (13 kDa) that possesses homologues in higher eukaryotes including human, but its physiological role was unknown. The proposed mechanism of catalysis involves phosphotransferase and thiol transferase activities through a reactive cysteine and it is dependent on ATP. The basis of this mechanism was confirmed by biochemical and crystallographic studies (Jonsson et al., 2005). Biteau et al. (2003) suggested that sulfinic acid formation in 2-Cys Prx could represent an additional level of redox regulation for peroxiredoxins. The sulfiredoxin homologue in mammalian cells was also identified and in this case it was shown that sulfinic acid regeneration is exclusive for 2-Cys Prx (Chang et al., 2004; Woo et al., 2005). Recently, Budanov et al. (2004) have shown that another class of proteins can also reduce sulfinic acids specifically of mammalian peroxiredoxins. Like sulfiredoxins, sestrin possesses a conserved cysteine that is responsible for the catalytic mechanism. Moreover, the reduction is also dependent on ATP. However, sestrins do not share homology with sulfiredoxins. Sestrin expression is regulated by p53 indicating that this process possesses high physiological relevance.

The importance of sulfinic acids generated in the peroxidatic cysteines of 2-Cys Prx was further strengthened by the observation that peroxiredoxins from yeast also possess

chaperone activity. Interestingly, the chaperone activity is independent of peroxidatic and resolving cysteines. Both peroxides and high temperatures induce chaperone activity, which is dependent on the oligomerization of peroxiredoxin polypeptides. Remarkably, under oxidative and thermal stresses these protein form very high molecular weight complexes that can be visualized by electron microscopy. Therefore, peroxidatic cysteines of these yeast peroxiredoxins are important not only for the decomposition of peroxides but also to induce protein oligomerization and consequently chaperone activity. In fact, sulfinic acid formation was suggested as a trigger event for the formation of a superchaperone that possesses a molecular weight of more than 1000 kDa (Jang et al., 2004). This dual chaperone/peroxidase activities of yeast 2-Cys Prx was implied with the observation that it specifically protects cells with dysfunctional mitochondria from peroxide insult (Demasi et al., 2006). Recently, the chaperone activity was also described for peroxiredoxins from mammals and bacteria (Moon et al., 2005; Chuang et al., 2006).

The versatility of peroxiredoxin function can be further demonstrated by the observation that addition of single amino acid (Phe) close to the reactive cysteine converts a bacterial peroxiredoxin into a disulfide reductase (Ritz et al., 2001). This appears to be a relevant phenomenon, since bacteria lacking both thioredoxin reductase and glutathione reductase are viable only if cells possess peroxiredoxin with disulfide reductase activity (Ritz et al., 2001).

Recently, a novel redox mechanism for regulation of gene expression was demonstrated in mammals (Venugopal and Jaiswal, 1996; Itoh et al., 1997). As the redox regulation of Yap1 activity, the regulation of Nrf2, also a leucine zipper transcriptional activator, involves control of its nuclear localization. However, differently than Yap1, Nrf2 is not directly redox regulated, but instead reactive cysteines of a cytoplasmatic anchor (Keap1) are susceptible to oxidation by peroxides and electrophiles. Under basal conditions, Nrf2 is sequestered from the nuclei by Keap1 through non-covalent interactions (Itoh et al., 1999). Because Keap1 is bound to actin, Nrf2 is also connected to the cell cytoskeleton (reviewed by Motohashi and Yamamoto, 2004). These protein–protein interactions also induced ubiquitination of Nrf2 and consequently proteolytic digestion by proteasome (Fig. 8A). When mammalian cells are exposed to peroxides and electrophiles, reactive cysteines of Keap1 are oxidized to disulfide bonds, it suffers a conformational change and consequently Nrf2 is released and accumulates in the nucleus, being capable to recognize its target promoters (Fig. 8B).

3. Conclusions

The majority of the cysteine residues in proteins play no role in electron transfer reaction, because their pK_a make them appear mainly in the protonated form in physiological conditions. In contrast, some protein foldings create environments in which the deprotonated form of cysteine (RS^- = thiolate) is stabilized, being susceptible to oxidation. Thiol/disulfide reactions are the most frequently considered, but thiol/

sulfenic acid reactions have also been implicated in some biological processes a long time ago. Recently, thiol/sulfinic redox chemistry has received attention in terms of redox signaling. Therefore, the versatile redox chemistry of thiolate in proteins has served to various biological roles as described in this review and should be a promising research field.

Acknowledgements

This work is supported by grants from *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP); *Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia* (CNPq), as part of the *Instituto do Milênio Redoxoma* and by the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) under proposals D03B-1689 and MAS-3149.

References

- Akerman, S.E., Muller, S., 2005. Peroxiredoxin-linked detoxification of hydroperoxides in *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 280, 564–570.
- Aslund, F., Berndt, K.D., Holmgren, A., 1997. Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein–protein redox equilibria. *J. Biol. Chem.* 272, 30780–30786.
- Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., Storz, G., 1999. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 6161–6165.
- Baker, L.M., Poole, L.B., 2003. Catalytic mechanism of thiol peroxidase from *Escherichia coli*. Sulfenic acid formation and overoxidation of essential Cys61. *J. Biol. Chem.* 278, 9203–9211.
- Benesch, R.E., Benesch, R., 1955. The acid strength of the -SH group in cysteine and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 5877–5881.
- Biteau, B., Labarre, J., Toledano, M.B., 2003. ATP-dependent reduction of cysteine–sulphinic acid by *Saccharomyces cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425, 980–984.
- Bokoch, G.M., Knaus, U.G., 2003. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem. Sci.* 28, 502–508.
- Bryk, R., Griffin, P., Nathan, C., 2000. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* 407, 211–215.
- Budanov, A.V., Sablina, A.A., Feinstein, E., Koonin, E.V., Chumakov, P.M., 2004. Regeneration of peroxiredoxins by p53 — regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science* 304, 596–600.
- Carvalho, A.P., Fernandes, P.A., Ramos, M.J., 2006. Similarities and differences in the thioredoxin superfamily. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 91, 229–248.
- Chae, H.Z., Kim, H.J., Kang, S.W., Rhee, S.G., 1999. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 45, 101–112.
- Chang, T.-S., Jeong, W., Woo, H.A., Lee, S.M., Park, S., Rhee, S.G., 2004. Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site cysteine. *J. Biol. Chem.* 279, 50994–51001.
- Chivers, P.T., Prehoda, K.E., Volkman, B.F., Kim, B.M., Markley, J.L., Raines, R.T., 1997. Microscopic pK_a values of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* 36, 14985–14991.
- Chrestensen, C.A., Starke, D.W., Mיעל, J.J., 2000. Acute Cadmium exposure inactivate thioltransferase (glutaredoxin), inhibits intracellular reduction of protein–glutathionyl-mixed disulfides, and initiates apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275, 26556–26565.
- Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G., Ryu, S., 2001. Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* 105, 103–113.
- Chuang, M.H., Wu, M.S., Lo, W.L., Lin, J.T., Wong, C.H., Chiou, S.H., 2006. The antioxidant protein alkylhydroperoxide reductase of *Helicobacter pylori* switches from a peroxide reductase to a molecular chaperone function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2552–2557.

- Collet, J.F., Bardwell, J.C., 2002. Oxidative protein folding in bacteria. *Mol. Microbiol.* 44, 1–8.
- Copley, S.D., Novak, W.R.P., Babbitt, P.C., 2004. Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry* 43, 13981–13995.
- Costa Seaver, L., Imlay, J.A., 2001. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 7173–7181.
- Cussiol, J.R., Alves, S.V., Oliveira, M.A., Netto, L.E.S., 2003. Organic hydroperoxide resistance gene encodes a thiol-dependent peroxidase. *J. Biol. Chem.* 278, 2636–2643.
- Darby, N.J., Creighton, T.E., 1995. Characterization of the active site cysteine residues of the thioredoxin-like domains of protein disulfide isomerase. *Biochemistry* 34, 16770–16780.
- Davis, D.A., Newcomb, F.M., Strke, D.W., Ott, D.E., Mieyal, J.J., Yarchoan, R., 1997. Thioltransferase (glutaredoxin) is detected within HIV-1 and can regulate the activity of glutathionylated HIV-1 protease in vitro. *J. Biol. Chem.* 272, 25935–25940.
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.B., Vinh, J., Toledano, M.B., 2002. A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111, 471–481.
- Demasi, A.P.D., Pereira, G.A.G., Netto, L.E.S., 2001. Cytosolic thioredoxin peroxidase I is essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria. *FEBS Lett.* 509, 430–434.
- Demasi, M., Silva, G.M., Netto, L.E.S., 2003. 20S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is S-glutathionylated. *J. Biol. Chem.* 278, 679–685.
- Demasi, A.P.D., Pereira, G.A.G., Netto, L.E.S., 2006. Yeast oxidative stress response: influences of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial functional state. *FEBS J.* 273, 805–816.
- Dillet, V., Dyson, H.J., Bashford, D., 1998. Calculations of electrostatic interactions and pK_as in the active site of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* 37, 10298–10306.
- Discola, K.F., Oliveira, M.A., Silva, G.M., Barcena, J.A., Porras, P., Padilla, A., Netto, L.E.S., Guimarães, B.G., 2005. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of glutaredoxin 2 from *Saccharomyces cerevisiae* in different oxidation states. *Acta Crystallogr., F* 61, 445–447.
- Dubuisson, M., Vander-Stricht, D., Clippe, A., Etienne, F., Nauser, T., Kissner, R., Koppenol, W.H., Rees, J.F., Knoops, B., 2004. Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase. *FEBS Lett.* 571, 161–165.
- Dyson, H.J., Jeng, M.F., Tennant, L.L., Slaby, I., Lindell, M., Cui, D.S., Kuprin, S., Holmgren, A., 1997. Effects of buried charged groups on cysteine thiol ionization and reactivity in *Escherichia coli* thioredoxin: structural and functional characterization of mutants of Asp 26 and Lys 57. *Biochemistry* 36, 2622–2636.
- Fernandes, A.P., Holmgren, A., 2004. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid. Redox Signal.* 6, 63–74.
- Frand, A.R., Cuozzo, J.W., Kaiser, C.A., 2000. Pathways for protein disulfide bond formation. *Trends Cell Biol.* 10, 203–210.
- Fuangthong, M., Helmann, J.D., 2002. The OhrR repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine–sulfenic acid derivative. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6690–6695.
- Fuangthong, M., Atichartpongkul, S., Mongkolsuk, S., Helmann, J.D., 2001. OhrR is a repressor of ohrA, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183, 4134–4141.
- Gan, Z.R., Sadana, M.K., Jacobs, J.W., Polokoff, M.A., 1990. Yeast thioltransferase — the active site cysteines display differential reactivity. *Arch. Biochem. Biophys.* 282, 110–115.
- Goldberger, R.F., Epstein, C.J., Anfinsen, C.B., 1963. Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *J. Biol. Chem.* 238, 628–635.
- Grauschopf, U., Winther, J.R., Korber, P., Zander, T., Dallinger, P., Bardwell, J.C.A., 1995. Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst? *Cell* 83, 947–955.
- Hawkins, H.C., Freedman, R.B., 1991. The reactivities and ionization properties of the active-site dithiol groups of mammalian protein disulfide–isomerase. *Biochem. J.* 275 (Pt 2), 335–339.
- Herbig, A.F., Helmann, J.D., 2001. Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol. Microbiol.* 41, 849–859.
- Hillar, A., Peters, B., Pauls, R., Loboda, A., Zhang, H., Mauk, A.G., Loewen, P.C., 2000. Modulation of the activities of catalase–peroxidase HPI of *Escherichia coli* by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 39, 5868–5875.
- Hofmann, B., Hecht, H.J., Flohe, L., 2002. Peroxiredoxins. *Biol. Chem.* 383, 347–364.
- Holmgren, A., 1972. Tryptophan fluorescence study of conformational transitions of the oxidized and reduced form of thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 247, 1992–1998.
- Holmgren, A., 1976. Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside–diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 2275–2279.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., Nabeshima, Y., 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 313–322.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., Yamamoto, M., 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13, 76–86.
- Jacob, C., Giles, G.I., Giles, N.M., Sies, H., 2003. Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. *Angew. Chem., Int. Ed.* 42, 4742–4758.
- Janda, I., Devedjiev, Y., Derewenda, U., Dauter, Z., Bielnicki, J., Cooper, D.R., Graf, P.C., Joachimiak, A., Jakob, U., Derewenda, Z.S., 2004. The crystal structure of the reduced, Zn²⁺-bound form of the *B. subtilis* Hsp33 chaperone and its implications for the activation mechanism. *Structure* 12, 1901–1907.
- Jang, H.H., Lee, K.O., Chi, Y.H., Jung, B.G., Park, S.W., Park, J.H., Lee, J.R., Lee, S.S., Moon, J.C., Yun, J.W., Choi, Y.K., Kim, W.Y., Kang, J.S., Cheong, G.-W., Yun, D.-J., Rhee, S.G., Cho, M.J., Lee, S.Y., 2004. Two enzymes in one: two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone. *Cell* 117, 625–635.
- Jao, S.C., English Ospina, S.M., Berdis, A.J., Starke, D.W., Post, C.B., Mieyal, J.J., 2006. Computational and mutational analysis of human glutaredoxin (thioltransferase): probing the molecular basis of the low pK_a of cysteine 22 and its role in catalysis. *Biochemistry* 45, 4785–4796.
- Jonsson, T.J., Murray, M.S., Johnson, L.C., Poole, L.B., Lowther, W.T., 2005. Structural basis for the retroreduction of inactivated peroxiredoxins by human sulfiredoxin. *Biochemistry* 44, 8634–8642.
- Jung, G., Breitmaier, E., Voelter, W., 1972. Dissociation equilibrium of glutathione. A Fourier transform-13C-NMR spectroscopic study of pH-dependence and of charge densities. *Eur. J. Biochem.* 24, 438–445.
- Kallis, G.B., Holmgren, A., 1980. Differential reactivity of the functional sulphydryl groups of cysteine-32 and cysteine-35 present in the reduced form of thioredoxin from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 255, 10261–10265.
- Klomsiri, C., Panmanee, W., Dharmthiti, S., Vattanaviboon, P., Mongkolsuk, S., 2005. Novel roles of ohrR–ohr in *Xanthomonas* sensing, metabolism, and physiological adaptive response to lipid hydroperoxide. *J. Bacteriol.* 187, 3277–3281.
- Lee, J.W., Helmann, J.D., 2006. The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* 440, 363–367.
- Lee, S.R., Kwon, K.S., Kim, S.R., Rhee, S.G., 1998. Reversible inactivation of protein tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 273, 15366–15372.
- Lesniak, J., Barton, W.A., Nikolov, D.B., 2002. Structural and functional characterization of the *Pseudomonas* hydroperoxide resistance protein Ohr. *EMBO J.* 21, 6649–6659.
- Li, H., Hanson, C., Fuchs, J.A., Woodward, C., Thomas Jr., G.J., 1993. Determination of the pK_a values of active-center cysteines, cysteines-32 and -35, in *Escherichia coli* thioredoxin by Raman spectroscopy. *Biochemistry* 32, 5800–5808.
- Link, A.J., Robison, K., Church, G.M., 1997. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis* 18, 1259–1313.

- Lundstrom, J., Holmgren, A., 1993. Determination of the reduction-oxidation potential of the thioredoxin-like domains of protein disulfide-isomerase from the equilibrium with glutathione and thioredoxin. *Biochemistry* 32, 6649–6655.
- Meunier-Jamin, C., Kapp, U., Leonard, G.A., McSweeney, S., 2004. The structure of organic hydroperoxide resistance protein from *Deinococcus radiodurans*: do conformational changes facilitate recycling of the redox disulphide? *J. Biol. Chem.* 279, 25830–25837.
- Mieyal, J.J., Starke, D.W., Gravina, S.A., Hocevar, B.A., 1991. Thioltransferase in human red blood cells: kinetics and equilibrium. *Biochemistry* 30, 8883–8891.
- Miranda-Vizuete, A., Damdimopoulos, A.E., Gustafsson, J., Spyrou, G., 1997. Cloning, expression, and characterization of a novel *Escherichia coli* thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 272, 30841–30847.
- Molina, M.M., Belli, G., Torre, M.A., Rodriguez-Manzanique, M.T., Herrero, E., 2004. Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins. *J. Biol. Chem.* 279, 51923–51930.
- Mongkolsuk, S., Helmann, J.D., 2002. Regulation of inducible peroxide stress responses. *Mol. Microbiol.* 45, 9–15.
- Mongkolsuk, S., Praituan, W., Loprasert, S., Fuangthong, M., Chamnongpol, S., 1998. Identification and characterization of a new organic hydroperoxide resistance (ohr) gene with a novel pattern of oxidative stress regulation from *Xanthomonas campestris* pv. phaseoli. *J. Bacteriol.* 180, 2636–2643.
- Monteiro, G., Netto, L.E.S., 2004. Glucose repression of PRX1 expression is mediated by Tor1p and Ras2p through inhibition of Msn2/4p in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 241, 221–228.
- Monteiro, G., Pereira, G.A.G., Netto, L.E.S., 2002. Regulation of mitochondrial thioredoxin peroxidase I expression by two different pathways: one dependent on cAMP and the other on heme. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 278–288.
- Monteiro, G., Kowaltowski, A.J., Barros, M.H., Netto, L.E.S., 2004. Glutathione and thioredoxin peroxidases mediate susceptibility of yeast mitochondria to Ca(2+)-induced damage. *Arch. Biochem. Biophys.* 425, 14–24.
- Moon, J.C., Hah, Y.S., Kim, W.Y., Jung, B.G., Jang, H.H., Lee, J.R., Kim, S.Y., Lee, Y.M., Jeon, M.G., Kim, C.W., Cho, M.J., Lee, S.Y., 2005. Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H₂O₂-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 280, 28775–28784.
- Moore, R.B., Mankad, M.V., Shriver, S.K., Mankad, V.N., Plishker, G.A., 1991. Reconstitution of Ca(2+)-dependent K⁺ transport in erythrocyte membrane vesicles requires a cytoplasmic protein. *J. Biol. Chem.* 266, 18964–18968.
- Motohashi, H., Yamamoto, M., 2004. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol. Med.* 10, 549–557.
- Munhoz, D.C., Netto, L.E.S., 2004. 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. *J. Biol. Chem.* 279, 35219–35227.
- Nelson, J.W., Creighton, T.E., 1994. Reactivity and ionization of the active site cysteine residues of DsbA, a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Biochemistry* 33, 5974–5983.
- Netto, L.E.S., Chae, H.Z., Kang, S.W., Rhee, S.G., Stadtman, E.R., 1996. Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* 271, 15315–15321.
- Nishinaka, Y., Masutani, H., Nakamura, H., Yodoi, J., 2001. Regulatory roles of thioredoxin in oxidative stress-induced cellular responses. *Redox Rep.* 6, 289–295.
- Oliveira, M.A., Discola, K.F., Alves, S.V., Barbosa, J.A.R.G., Medrano, F.J., Netto, L.E.S., Guimarães, B.G., 2005. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of NADPH-dependent thioredoxin reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 61, 387–390.
- Oliveira, M.A., Guimarães, B.G., Cussiol, J.R.R., Medrano, F.J., Gozzo, F.C., Netto, L.E.S., 2006. Structural insights into enzyme-substrate interaction and characterization of enzymatic intermediates of organic hydroperoxide resistance protein from *Xylella fastidiosa*. *J. Mol. Biol.* 359, 433–445.
- Paget, M.S., Buttner, M.J., 2003. Thiol-based regulatory switches. *Annu. Rev. Genet.* 37, 91–121.
- Park, S.G., Cha, M.K., Jeong, W., Kim, I.H., 2000. Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275, 5723–5732.
- Parsonage, D., Youngblood, D.S., Sarma, G.N., Wood, Z.A., Karplus, P.A., Poole, L.B., 2005. Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Biochemistry* 44, 10583–10592.
- Pedrajas, J.R., Miranda-Vizuete, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J.A., Spyrou, G., 2000. Mitochondrial of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* 275, 16296–16301.
- Powis, G., Montfort, W.R., 2001. Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30, 421–455.
- Ralat, L.A., Manevich, Y., Fisher, A.B., Colman, R.F., 2006. 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, 360–372.
- Reckenfelderbaumer, N., Krauth-Siegel, R.L., 2002. Catalytic properties, thiol pK value, and redox potential of *Trypanosoma brucei* tryparedoxin. *J. Biol. Chem.* 277, 17548–17555.
- Reutimann, H., Straub, B., Luisi, P.L., Holmgren, A., 1981. A conformational study of thioredoxin and its tryptic fragments. *J. Biol. Chem.* 256, 6796–6803.
- Rhee, S.G., Chae, H.Z., Kim, K., 2005a. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 1543–1552.
- Rhee, S.G., Kang, S.W., Jeong, W., Chang, T.S., Yang, K.S., Woo, H.A., 2005b. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 183–189.
- Ritz, D., Lim, J., Reynolds, C.M., Poole, L.B., Beckwith, J., 2001. Conversion of a peroxiredoxin into a disulfide reductase by a triplet repeat expansion. *Science* 294, 158–160.
- Salmeen, A., Andersen, J.N., Myers, M.P., Meng, T.C., Hinks, J.A., Tonks, N.K., Barford, D., 2003. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* 423, 769–773.
- Stone, J.R., 2004. An assessment of proposed mechanisms for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 422, 119–124.
- Sun, Q.A., Kirmarsky, L., Sherman, S., Gladyshev, V.N., 2001. Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3673–3678.
- Thomas, J.A., Poland, B., Honzatko, R., 1995. Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch. Biochem. Biophys.* 319, 1–9.
- Trivelli, X., Krimm, I., Ebel, C., Verdoucq, L., Prouzet-Mauleon, V., Chartier, Y., Tsan, P., Lauquin, G., Meyer, Y., Lancelin, J.M., 2003. Characterization of yeast peroxiredoxin ahp1 in its reduced and overoxidized inactive forms using NMR. *Biochemistry* 42, 14139–14149.
- Trujillo, M., Budde, H., Pineyro, M.D., Stehr, M., Robello, C., Flohe, L., Radi, R., 2004. *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. *J. Biol. Chem.* 279, 34175–34182.
- Van Montfort, R.L., Congreve, M., Tisi, D., Carr, R., Jhoti, H., 2003. Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature* 423, 773–777.
- Venugopal, R., Jaiswal, A.K., 1996. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14960–14965.
- Vohnik, S., Hanson, C., Tuma, R., Fuchs, J.A., Woodward, C., Thomas Jr., G.J., 1998. Conformation, stability, and active-site cysteine titrations of *Escherichia coli* D26A thioredoxin probed by Raman spectroscopy. *Protein Sci.* 7, 193–200.
- Weissbach, H., Etienne, F., Hoshi, T., Heinemann, S.H., Lowther, W.T., Matthews, B., St John, G., Nathan, C., Brot, N., 2002. Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 172–178.
- Wheeler, G.L., Grant, C.M., 2004. Regulation of redox homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiol. Plant.* 120, 12–20.

- Winter, J., Jakob, U., 2004. Beyond transcription—new mechanisms for the regulation of molecular chaperones. *Crit. Rev. Biochem Mol Biol.* 39, 297–317.
- Winter, J., Linke, K., Jatzek, A., Jakob, U., 2005. Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33. *Mol. Cell* 17, 381–392.
- Wong, C.M., Zhou, Y., Ng, R.W., Kung, H.F., Jin, D.Y., 2002. Cooperation of yeast peroxiredoxins Tsa1p and Tsa2p in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J. Biol. Chem.* 277, 5385–5394.
- Woo, H.A., Chae, H.Z., Hwang, S.C., Yang, K.S., Kang, S.W., Kim, K., Rhee, S.G., 2003. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science* 300, 653–656.
- Woo, H.A., Jeong, W., Chang, T.-S., Park, K.J., Park, S.J., Yang, J.S., Rhee, S.G., 2005. Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-Cys peroxiredoxins. *J. Biol. Chem.* 280, 325–328.
- Wood, Z.A., Poole, L.B., Karplus, P.A., 2003a. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300, 650–653.
- Wood, Z.A., Schroder, E., Harris, J.R., Poole, L.B., 2003b. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 32–40.
- Xiao, R., Lundstrom-Ljung, J., Holmgren, A., Gilbert, H.F., 2005. Catalysis of thiol/disulfide exchange. Glutaredoxin 1 and protein-disulfide isomerase use different mechanisms to enhance oxidase and reductase activities. *J. Biol. Chem.* 280, 21099–21106.
- Yang, Y.F., Wells, W.W., 1991. Identification and characterization of the functional amino acids at the active center of pig liver thioltransferase by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 266, 12759–12765.

Anexo IV

Honda, R.T.; Araújo, R.M.; Horta, B.B.; Val, A.L.; e Demasi, M. (2005) "One-step purification of metallothionein extracted from two different sources", *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **820**: 205-10.

One-step purification of metallothionein extracted from two different sources

Rubens T. Honda^a, Roziete Mendes Araújo^a, Bruno Brasil Horta^b,
Adalberto L. Val^a, Marilene Demasi^{a,*}

^a Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA, Manaus, AM, Brazil

^b Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Received 1 October 2004; accepted 14 March 2005

Available online 25 April 2005

Abstract

We describe a one-step purification of hepatic metallothionein from the Amazon fish *Colossoma macropomum* injected with cadmium and from the copper-loaded metallothionein from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, performed by affinity chromatography through metal-chelating columns. Yeast metallothionein was purified from Cu²⁺-loaded resin and eluted by a continuous EDTA gradient whereas hepatic metallothionein extracted from fishes was purified by Ni²⁺-loaded resin and eluted by a continuous imidazol gradient. Purified metallothioneins were evaluated by SDS-PAGE and characterized by UV spectra of the apo- and Cd²⁺-loaded protein. This method allowed high purity and yield as well as rapid one-step extraction of both metal-loaded and apoprotein.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Metallothionein; Environmental sciences; Ni and Cd binding; Metal-chelating affinity chromatography

1. Introduction

Metallothioneins (MT) are a superfamily of low molecular weight cysteine-rich proteins firstly described in equine kidney by Margoshes and Vallee [1]. They have a widespread expression throughout all eukaryotes as well as in some prokaryotic species. All vertebrates contain two or more MT isoforms [2]. Their function is associated to the high d¹⁰ metal ions binding capacity though a primary role has not been identified. The two most widely expressed isoforms in vertebrates, MT-1 and MT-2, are rapidly induced in the liver by a wide range of metals, drugs and inflammatory mediators. The thiolate cluster structure of these proteins is involved in the metabolic regulation via Zn²⁺ donation, protection against oxidative damage, and sequestration and/or redox control [3].

An important property assigned for MTs refers to their role in transition metal detoxification (especially Cd²⁺). It may be noted that in higher organisms, MTs are the sole proteins in which cadmium accumulates naturally. On that regarding MTs have been proposed as biomarkers for environmental control and occupational diseases [4].

It is noteworthy by literature that methods for metallothionein purification described thus far generally include several combined chromatographic steps, such as: gel filtration, ion exchange and HPLC [5–7]. Those methods take time for purification besides the high loss of protein mass along the entire procedure when compared to most procedures by affinity chromatography. Indeed, the extraction and purification of native proteins usually involve several steps unless the protein possesses some peculiar structural characteristic or physical-chemical property that allows a special procedure for purification. In that regard, metallothioneins present a cysteine-rich primary structure. As well known, cysteine is prone to chelate transition metals. Based on that property, in the present work, we describe a simple method for pu-

* Corresponding author. Present address: Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500 São Paulo, SP 05503-900, Brazil. Tel.: +55 11 3726 7222; fax: +55 11 3726 1505.

E-mail address: marimasi@butantan.gov.br (M. Demasi).

rification of metallothioneins from two different sources by affinity chromatography through metal-chelating columns.

Our goal to conduct the experiments described in the present report was to develop a simple method to isolate metallothionein from tissues of fishes since our major interest will be the study upon the role of metallothionein from some Amazon fish species as biomarkers of metal-polluted waters, as already described for other species from different environments [12–15].

2. Conditions

2.1. Reagents

Bovine Serum Albumin, Bradford Reagent and cadmium, nickel or copper salts were purchased from Sigma (Saint Louis, LO, USA). The 1-mL HiTrapTM Chelating HP column and protein molecular mass markers, RainbowTM and Broad Range PMWSTM, were purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). All other reagents utilized were of analytical grade and the water was purified with the Milli-Q system from Millipore.

2.2. Animals and cadmium treatment

Specimens of tambaqui (*Colossoma macropomum*) were collected from floodplains in Marchantaria island (3°15'S 59°58'W). The animals were maintained in 2000-L tanks at 25 °C with aerated fresh water and fed ad libitum for one week. After this period, the animals ($n=6$) were weighted (319.38 ± 38.98 g), measured (21.13 ± 0.62) and injected intra-peritoneally with $\text{CdNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dissolved in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, to a final concentration of $3 \mu\text{g CdNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O/g}$ fish. Six animals were utilized for the control group injected with similar volumes of buffer solution without cadmium. The animals were maintained individually into aerated 20-L fishbowls for 48 h. Afterwards, the liver was extracted and homogenized (35% w/v) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4; containing 0.1 mM PMSF, 0.5 mM DTT and 150 mM NaCl in a Teflon homogenizer. The homogenate was centrifuged at $15,000 \times g$ for 90 min at 4 °C. The supernatant was immediately applied to a HiTrapTM Chelating HP column previously loaded with $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, as described below.

2.3. Yeast growth and metallothionein extraction

We utilized a strain of *Saccharomyces cerevisiae* belonging to the ExCloneTM collection (yeast ORF expression clones; ResGen, Invitrogen Corp., UK), transformed with a plasmid carrying an open reading frame for the yeast metallothionein CUP1A. Cells were cultured in synthetic minimum medium (2% glucose and 2% peptone, supplemented with amino acids, except leucine and uracyl base) at 30 °C with reciprocal shaking to an optical density of the culture at

600 nm of 0.8. At that point, 0.5 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ was added to the culture medium and cells were incubated for further 2 h in the same conditions described above. Afterwards, cells were harvested and pelleted by centrifugation. The pellet was washed twice with extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; containing 0.1 mM PMSF, 0.5 mM DTT and 150 mM NaCl). Yeast cells were disrupted according to the protocol described by Verma et al. [8]. After centrifuged at $15,000 \times g$ for 90 min, the cell extract was applied to a HiTrapTM Chelating HP column previously loaded with $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, as described below.

2.4. Purification of metallothionein

Affinity chromatography was performed using a 1-mL HiTrapTM Chelating HP column attached to a P1 peristaltic pump (Amersham Pharmacia Biotech). Supernatants from yeast cells and from the liver of fishes obtained as described above were applied to the column previously loaded with $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ or $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, respectively. After metal loading, the column was equilibrated with 10 volumes 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 added of 0.15 M NaCl, here called equilibrating buffer. After applying the supernatants, 10 volumes of equilibrating buffer were passed through the column. The elution was performed next, either by 5 mL of continuous gradient of EDTA (0–0.1 mM) buffered in 50 mM Tris/HCl, pH 7.4 (MT extracted from yeast homogenates) or by 10 mL of continuous gradient of imidazol (0–500 mM) for the extraction of MT from liver homogenates of fish. Imidazol was dissolved in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 added of 0.15 M NaCl. In both extractions (yeast or liver homogenates), fractions (1 mL) were collected at a flow rate of 1 mL/min through the entire procedure. The purification was performed at room temperature. Once finished the elution procedure, the column was washed with 10 volumes of 1 mM EDTA (this step is called washing-step), followed by 20 volumes of Milli-Q fresh water to recover the column, according to the protocol enclosed to the manufacturer's technical data sheet. Aliquots (20 μL) of each fraction obtained from the elution step were applied to 15% SDS-PAGE. Metallothionein-positive fractions were deduced on the gel by the molecular mass, spectral characterization and metal determination, as described below and shown in the figures. Metallothionein-positive and purest fractions were combined to prepare the apoprotein (apoMT).

2.5. Preparation and characterization of ApoMT

ApoMT was obtained by the incubation of metallothionein-positive fractions, obtained as described above and deduced from SDS-PAGE, with 50 mM DTT and 10 mM HCl solution, according to Dallinger et al. [9]. The preparation was applied to a G-25 (Sigma) column (20 cm $\times$ 1 cm) pre-equilibrated with 10 mM HCl and 10 mM NaCl. One-milliliter fractions were collected starting at sample application. The entire procedure to obtain apoMT was performed under helium atmosphere at 4 °C. Fractions obtained were applied

Fig. 1.

to 15% SDS-PAGE under reducing conditions. MT-spectra were obtained from apoMT sole or by adding CdNO₃·4H₂O at increasing concentrations (from 8 μM up to 80 μM) to the apoMT aliquots obtained from fish livers [10].

2.6. Ni²⁺ and Cd²⁺ quantification by graphite furnace atomic absorption

Nickel and cadmium quantification was performed by atomic absorption spectrometry in a Perkin-Elmer Analyst 800 equipment according to the manufacturer's technical protocol under Ar atmosphere. Samples were digested by 10% HNO₃ for 12 h at 70 °C. Twenty micro liters aliquots were taken from each sample and analyzed at 232 nm (Ni²⁺) or 228.8 nm (Cd²⁺). Standard curves of NiSO₄·6H₂O and CdNO₃·4H₂O were run in parallel. Results were expressed in μg/mL of the initial solution.

2.7. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

Protein preparations were electrophoresed by SDS/PAGE under reducing conditions by adding 10 mM DTT (final concentration) to the buffer utilized for the sample preparation for gel application [11].

2.8. Determination of protein concentration

Protein concentration was determined by the Bradford reagent method against a bovine serum albumin curve.

3. Results

We performed isolation and purification of metallothioneins from two different sources, yeast and fish, to better characterize the method of purification by metal affinity chromatography. Yeast *S. cerevisiae* MT was chosen because in contrast to MTs from vertebrate sources, in which zinc, cadmium and copper can be simultaneously bound, yeast and fungal MTs contain exclusively copper [3].

As depicted in Fig. 1, metallothionein could be purified from both yeast cell extracts (Fig. 1A) or hepatic extracts of fish (Fig. 1B) by utilizing Cu²⁺- or Ni²⁺-loaded column, respectively. Fig. 1A shows a 15% SDS-PAGE loaded with

Fig. 1. SDS-PAGE of metallothioneins extraction. (A) CUP1A metallothionein extracted from *S. cerevisiae* cells. Lanes 1–4 refer to samples obtained during the EDTA-elution step performed by applying 5 mL of continuous EDTA gradient (0–0.1 mM EDTA; 1 mL/min). Lane 5 refers to the yeast apoMT obtained as described in Section 2 from the fraction represented by lane 4. (B) Metallothionein extracted from the liver of *C. macropomum*. Lanes 1–9 refer to samples obtained from the elution step started by applying 10 mL of a continuous imidazol gradient (0–500 mM; 1 mL/min). (C) Apomethallothionein. The gel is representative of the apoprotein obtained from liver homogenates of control (C) and Cd²⁺-treated (T) animals. Both extractions were performed at identical conditions. Gels shown are 15% SDS-PAGE. MM: molecular mass marker.

samples from fractions eluted from the Cu^{2+} -loaded column during EDTA (0–0.1 mM) continuous gradient (lanes 1–4). Lane 5 represents an aliquot of the yeast apoMT eluted from the G-25 column. The apoprotein was prepared from samples, as per lane 4, as described in Section 2. As seen, MT was significantly separated from the other proteins through EDTA continuous gradient (0–0.1 mM buffered EDTA at a flow rate of 1 mL/min). The apoMT, lane 5, was evaluated by spectroscopy to confirm MT identity (result not shown).

Fig. 1B is representative of a 15% SDS-PAGE of fractions eluted from the Ni^{2+} -loaded column during an imidazol continuous gradient (fractions 1–9). At the conditions tested (0–500 mM imidazol; flow rate 1 mL/min), metallothionein from hepatic extracts started to be eluted at fraction 4 and fractions such as 6–9, considered the purest as visualized on the gel, were combined and utilized to obtain the apoprotein, as described in Section 2 and exemplified in Fig. 1C.

Gel (15% SDS-PAGE) shown in Fig. 1C refers to samples of the apometallothionein extracted from liver homogenates of control fishes (C) and fishes previously injected with cadmium (T). Samples shown were prepared from fractions obtained as described in Fig. 1B followed by the apoprotein preparation. By comparing gels shown in Fig. 1B and C, one may observe that metallothionein was completely purified from fractions obtained through Ni^{2+} -loaded column after treatment to obtain the apoMT (Fig. 1C). The simplicity of the method, one-step purification avoiding loss of mass protein in the course of protein isolation, allowed the comparison between metal-exposed and control animals. We have not tried yet other cadmium concentrations in order to test the possibility of a larger dose differentiation.

Metallothionein extracted from the liver of the fish *C. macropomum* was characterized by the UV spectra of the apoprotein and of the Cd^{2+} -protein complex, following the methodology described in the literature [10]. As depicted in Fig. 2A, there is no absorbance at 260 nm of apoMT sample whereas the absorbance at 260 nm was proportionally increased by adding Cd^{2+} to apoMT samples (Fig. 2A and B).

We estimated the apparent molecular mass in SDS-PAGE of metallothionein from the liver of the fish *C. macropomum* within 8000 and 9000 Da (Fig. 1B and C). Although estimate molecular mass of MT herein described does not belong to the range where the majority of this class of proteins is found in liver tissues (MT1 and MT2 isoforms), there are references in the literature that some MT from vertebrates are found within higher MM range [16,17].

A criticism found in the literature [18] upon the utilization of metal-chelating chromatography for the isolation of metalloproteins is the possibility of metal sequestration when those proteins pass through the column, so the protein would not bind on it. To test this possibility we measured Ni^{2+} concentration in each 1-mL fraction eluted from the column along the entire procedure. The results obtained from this set of experiments are shown in Fig. 3. As seen, no significant Ni^{2+} -leaking was observed throughout the procedure

Fig. 2. Spectra obtained from apometallothionein loaded with Cd^{2+} . (A) Spectra shown were obtained with 10 $\mu\text{g/mL}$ apoMT followed by the addition of Cd^{2+} from 8 μM up to 80 μM (final concentration). Solid line represents apoMT. Dashed lines represent Cd^{2+} -loaded samples. (B) Values of absorbance obtained as function of Cd^{2+} concentration were plotted, as shown.

of MT purification (Fig. 3A). Nickel was detected just after loading the column with $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (result not shown) as well as by passing EDTA through the column in order to wash it out (fractions 31–34; Fig. 3A). Nickel concentration was found significantly increased in those fractions where MT was eluted, as shown in the plot of Fig. 3B (fractions 26–28). Cadmium was determined in same fractions in order to further test the identity of the protein eluted from those fractions. Peak of Cd^{2+} concentration was found in the same fractions (27 and 28) referred for Ni^{2+} : 2.0 $\mu\text{g/mL}$ and 3.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively. We also controlled the possibility whether MT bound to the column would not be completely eluted by imidazol. On that, we analyzed by SDS-PAGE

Fig. 3. Evaluation of Ni^{2+} -leaking from the column. Ni^{2+} and Cd^{2+} were quantified by atomic absorption spectrometry as described in Section 2. (A) Aliquots (20 μL) for quantification were taken from 1-mL fractions (flow rate, 1 mL/min) obtained from the entire procedure, starting at column equilibration (fraction number 10) through the end of EDTA-washing step (fraction number 34). (B) Data shown refer to the quantification of Ni^{2+} and Cd^{2+} from MT-positive fractions (24–30) obtained as shown in (A) during the elution by imidazol gradient.

aliquots from the EDTA solution passed through the column during the washing procedure, performed just after imidazol gradient. No protein band from aliquots obtained of EDTA-washing step was detected on the gel (result not shown). Thus, we concluded that the method herein described allows a high pure MT isolation without significant loss of protein mass.

4. Discussion

Our goal for the purification of the MT CUP1A from the yeast *S. cerevisiae* was to test the efficiency of the metal-binding column here utilized for diverse transition metals. We selected the yeast MT because this eukaryotic MT isoform is well characterized and, as known, this isoform binds exclusively copper differently from MT isoforms from other sources [3]. We found that the column herein utilized was

able to efficiently chelate either Cu^{2+} or Ni^{2+} . The same approach was tried in order to test the possibility of purifying the fish MT by loading the column with $\text{CdNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, instead of Ni^{2+} as shown in Fig. 1B. In that case, we observed that Cd^{2+} really bound to the column resin, confirmed by Cd^{2+} determination by atomic absorption spectrometry after washing the column with EDTA (result not shown), though the protein could not be recovered during imidazol elution step. Most probably the protein passed through the column did not bind to the Cd^{2+} attached to the resin. At our understanding, MT extracted from the liver of fishes would have quite different affinity for Cd^{2+} and Ni^{2+} , which could explain why it did not bind to the Cd^{2+} attached to the column; however, it did bind to Ni^{2+} , as confirmed by Cd^{2+} and Ni^{2+} determination from MT positive fractions as shown in Fig. 3B. As reported in the literature [19], apoMTs have a non-rigid nature thus a disordered structure and two different cysteine clusters, one at the N-terminal (α -domain) and the other at the C-terminal (β -domain). Each cluster is able to bind four and three metal ions, respectively. Moreover, it was already demonstrated that Cd-MT are able to metal fluxionality provided by Cd-NMR saturation transfer experiments, which established the possibility of metal exchange within the three-metal cluster (β -domain), including inter- and/or intramolecular metal exchange, as well. Most probably due to different affinity for both metals along with those structural singularities attributed to MTs may explain why MT extracted from fishes, presumably metal-loaded in vivo, was able to bind to Ni^{2+} -loaded resin though it did not bind to Cd^{2+} -loaded resin.

In the procedure herein described, two different systems of protein elution from the column were tested: imidazol (up to 500 mM) and EDTA (up to 0.1 mM) continuous gradients. Imidazol is recommended for the elution of recombinant His tag proteins bound to Ni^{2+} -loaded columns. That system was effective toward elution of MT purified from the liver of fishes by utilizing the Ni^{2+} -loaded column. On the other hand, elution with EDTA was efficient for a highly pure separation of the CUP1A metallothionein eluted from the Cu^{2+} -loaded column (Fig. 1A). Usually, EDTA (1 mM) is recommended to remove the metal bound to the resin once protein elution is finished. Nevertheless, MT extracted from yeast cells was eluted by EDTA continuous gradient (Fig. 1A), although same approach did not work as well as imidazol continuous gradient for the purification of the MT isolated from Ni^{2+} -loaded columns. We believe that such difference was due to the kind of metal loading the column and their capability to chelate EDTA.

Affinity chromatography has been a widespread and powerful technique for purification of mainly recombinant proteins modified with specific sequences, e.g., polihistidine tails, enzymes, monoclonal antibodies, DNA-binding proteins and so on. The technique is scarcely described for the isolation of native proteins unless they have any specific structural characteristic that allows a group specific adsorption. On that, metallothioneins have a particular cysteine-rich

structure. An option for their purification is the application of covalent affinity chromatography by thiol–disulphide interchange, as already described in the literature by Kabzinski [20,21]. Although covalent chromatography by thiolated resins may be a useful technique for the isolation of metallothioneins, the entire procedure must be performed with the protein on its completely reduced form, so its application presupposes the isolation of the apoprotein only. Moreover, thiol–disulphide interchange procedure is usually time-consuming and more prone to failure and to loss of protein mass because of the particularities for sample preparation, deaeration of buffers, elution step and column regeneration as well as the fact that it is a methodology where free catalytic heavy metals must be avoided as much as possible because of the risk of oxidation of either the protein or the resin thiol-groups content.

The method herein described for the purification of metallothioneins through metal–cysteine affinity chromatography by utilizing a metal–chelating resin is as simple as well as a rapid method and, as it is a one-step procedure, the loss of protein mass is greatly reduced during the purification procedure. Another important quality of the method herein proposed is the concentrating effect, intrinsic to affinity chromatography, which enables large volumes to be processed.

An important consideration to be addressed is that the development of a method for the isolation and purification of metallothioneins from fishes or other species found in waters of the Amazon basin is a valuable tool for the study and control of the regional environment.

Acknowledgements

This work has been supported by CNPq (Brazilian National Research Council) and INPA (National Institute for Research in the Amazon). R.T.H., M.D. and A.L.V. were recipients from fellowships from CAPES (Ph.D.), PROSET-

CNPq (Regional Development), and CNPq (Research), respectively.

References

- [1] M. Margoshes, B.L. Vallee, *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957) 4813.
- [2] J. Hidalgo, M. Aschner, P. Zatta, M. Vasak, *Brain Res. Bull.* 15 (2001) 133.
- [3] P. Coyle, J.C. Philcox, L.C. Carey, A.M. Rofe, *Cell Mol. Life Sci.* 59 (2002) 627.
- [4] M. Sato, M. Kondoh, *Tohoku J. Exp. Med.* 196 (2002) 9.
- [5] K. Nostelbacher, M. Kirchgessner, G.I. Stangl, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 744 (2000) 273.
- [6] D.C. Simes, M.J. Bebianno, J.J.G. Moura, *Aquat. Toxicol.* 63 (2003) 307.
- [7] C.S. Carvalho, H.S.S. Araújo, M.N. Fernandes, *Comp. Biochem. Physiol. B* 137 (2004) 225.
- [8] R. Verma, S. Chen, R. Feldman, D. Schieltz, J. Yates, J. Dohmen, R.J. Deshaies, *Mol. Biol. Cell* 11 (2000) 3425.
- [9] R. Dallinger, Y. Wang, B. Berger, E.A. Mackay, J.H.R. Kägi, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 4126.
- [10] M.J. Stillman, W. Cai, A.J. Zelazowski, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 4538.
- [11] D.M. Bollag, S.J. Edelstein, *Protein Methods*, Wiley-Liss Inc., NY, 1996.
- [12] O. Perceval, Y. Couillard, B. Pinel-Alloul, A. Giguere, P.G. Campbell, *Aquat. Toxicol.* 69 (2004) 327.
- [13] R.J. Brown, T.S. Galloway, D. Lowe, M.A. Browne, A. Dissanayake, M.B. Jones, M.H. Depledge, *Aquat. Toxicol.* 66 (2004) 267.
- [14] T.S. Galloway, R.J. Brown, M.A. Browne, A. Dissanayake, D. Lowe, M.B. Jones, M.H. Depledge, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 1723.
- [15] B. Berthet, C. Mouneyrac, J.C. Amiard, C. Amiard-Triquet, Y. Berthelot, A. Le Hen, O. Mastain, P.S. Rainbow, B.D. Smith, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45 (2003) 468.
- [16] R.W. Olafson, J.A.J. Thompson, *Mar. Biol.* 28 (1974) 83.
- [17] H.L. Ley, M.L. Failla, D.S. Cherry, *Comp. Biochem. Physiol. B* 74 (1983) 507.
- [18] *Affinity Chromatography—Principles and Methods*, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, 1999, p. 95 (Chapter 5).
- [19] N. Romero-Isart, M. Vasak, *J. Inorg. Biochem.* 88 (2002) 388.
- [20] A.K. Kabzinski, *Biomed. Chromatogr.* 12 (1998) 281.
- [21] A.K. Kabzinski, *Biomed. Chromatogr.* 14 (2000) 160.