Eduardo Hiroshi Nakamatsu

**Caracterização funcional e estrutural do
sistema Tiorredoxina mitocondrial de
Saccharomyces cerevisiae.**

**Functional and structural characterization
of the mitochondrial thioredoxin system
from *Saccharomyces cerevisiae*.**

São Paulo

2012

Eduardo Hiroshi Nakamatsu

**Caracterização funcional e estrutural do
sistema Tiorredoxina mitocondrial de
Saccharomyces cerevisiae.**

**Functional and structural characterization
of the mitochondrial thioredoxin system
from *Saccharomyces cerevisiae*.**

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

Orientador(a): Prof. Dr. Luis Eduardo
Soares Netto

Co-orientador(a): Prof. Dra. Gisele
Monteiro

São Paulo

2012

Nakamatsu, Eduardo Hiroshi

Caracterização funcional e estrutural
do sistema Tiorredoxina mitocondrial de
Saccharomyces cerevisiae.

59 páginas.

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

1. sistema tiorredoxina 2. estrutura
3. função 4. *Saccharomyces cerevisiae* 5.
mitocôndria I. Universidade de São Paulo.
Instituto de Biociências. Departamento de
Genética e Biologia Evolutiva.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu tio, Kiyoshi Fujita (*in memoriam*) uma pessoa maravilhosa que sempre me fazer acreditar em meus sonhos.

When you walk through a storm
hold your head up high
And don't be afraid of the dark
At the end of a storm is a golden sky
And the sweet silver song of a lark

Walk on through the wind
Walk on through the rain
Tho' your dreams be tossed and blown
Walk on, walk on with hope in your heart
And you'll never walk alone
You'll never, ever walk alone

Walk on, walk on with hope in your heart
And you'll never walk alone
You'll never, ever walk alone

Shirley Jones - Carousel

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto e á Prof. Dra. Gisele Monteiro por terem me aceitado como aluno, por todo o conhecimento transmitido durante esses anos e também pela paciência e tolerância em me auxiliar á superar as dificuldades encontradas.

Á Dra. Karen Fulan Discola e ao Prof. Dr. Marcos Antônio Oliveira por me acompanhar nas viagens ao LNLS, pelas explicações e ajuda em toda a parte da análise dos dados estruturais.

Ao LNLS pelo espaço físico cedido, ás técnicas Andréia e Celisa por toda a ajuda na parte da cristalografia e em especial ao Prof. Dr. Mário Tyago Murakami por toda a ajuda no processo de resolução da estrutura.

Ás técnicas Andressa Sakugawa e Simone Vidigal por toda a ajuda e conhecimento transmitidos e aos colegas de laboratório por toda a ajuda, conselhos e momentos inesquecíveis durante todos esses anos.

A Fapesp (Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de São Paulo) e ao INCT – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de processos Redox em Biomedicina (Redoxoma) pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Luis e Satico e minha avó Kazumi por me apoiarem durante todos esses anos os meus sonhos e acreditarem na minha carreira acadêmica.

Á João e Eliane pelos incentivos, apoio e “comidinhas” que sempre me fizeram uma pessoa mais feliz.

Aos “Magic” carinhas: Diogo, Vítor, Nicolas, Rafael, William e Patrícia por me acompanharem nas incríveis jornadas por vários Magic Sundays.

Ao grande mestre ELEMENTAL, cujo o ensinamento jamais serão esquecidos.

Á João, Mauro e Fred por me deixarem “boiando” e a ver navios (literalmente!!!).

Á turma da bagunça, Inês, Júnior, Dona Lino, Diego, Brunão, Gabriela, Carol, Lú, Fábio Cintra, Mauro e Fábio Arruda pelas incontáveis risadas e situações “pitorescas”...

Ao Rodolpho por me apresentar essa loucura chamada triathlon, á Alex e Thiago por permitir ser parte da Turminha do Monstrão e por toda a motivação e amizade “estradadeira”.

Abreviaturas

NADPH - dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina

FAD - flavina adenina dinucleotídeo

ScTrxR2 – tiorredoxina redutase mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*

ScTrx3 – tiorredoxina mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*

ScTrx1 – tiorredoxina citoplasmática 1 de *Saccharomyces cerevisiae*

ScTrx2 - tiorredoxina citoplasmática 2 de *Saccharomyces cerevisiae*

ScTrxR1 - tiorredoxina redutase citoplasmática de *Saccharomyces cerevisiae*

Grx2 – glutaredoxina 2

Grx5 - glutaredoxina 5

EcTrxR - tiorredoxina redutase de *Escherichia coli*

EcTrx - tiorredoxina de *Escherichia coli*

TSNC – tiorredoxina de *Xylella fastidiosa*

Prx1 – 1-Cys peroxiredoxina mitocondrial

Gr - glutathione redutase

AhpF - alquil hidroperóxido redutase F

Lpd - lipoamida desidrogenase

HMr (high molecular weight) - Alto peso molecular

LMr (low molecular weight) - Baixo peso molecular

kDa - quilo (mil) dalton

FR - redutora de flavina

FO - flavina oxidada

PAPS - 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato

EROs - espécies reativa a oxigênio

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

Cysr – cisteína de resolução

DTT - ditioneitol

TEMED - N, N, N, N, - tetrametiletilenodiamina

SOC - meio de recuperação de células competentes

IPTG - isopropil β -D-tiogalactosídeo

DTNB - 5-5'-ditio-bis-2-nitrobenzoato

TNB - tionitrobenzoato

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

BSA - albumina de soro bovino

t-BOOH – *tert*-butil hidroperóxido

X-gal - 5-bromo-4cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

RMN – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Índice

Introdução	1
Objetivos	15
Material e métodos	16
Resultados e Discussão	22
Conclusões	43
Perspectivas	44
Abstract	45
Resumo.....	46
Bibliografia	47

Introdução

Os sistemas dependentes de Tiorredoxinas.

A tiorredoxina (Trx), tiorredoxina redutase (TrxR) e NADPH compõem o sistema Tiorredoxina que foi descoberto por Peter Reichard e colaboradores em 1964 como um sistema de redução de ribonucleotídeos para desoxirribonucleotídeos em *Escherichia coli* (Laurent *et al.*, 1964). Outras funções importantes têm sido associadas a este sistema tais como a redução de dissulfetos em proteínas envolvidas na modulação da atividade de fatores transcricionais (Schenk *et al.*, 1994; Hirota *et al.*, 1999) e proteínas envolvidas na defesa antioxidante (Jamieson, 1998; Demple, 1998; Rietsch e Beckwith, 1998; Stewart *et al.*, 1998; Netto *et al.*, 2007).

Tiorredoxinas são proteínas termoestáveis de baixo peso molecular (12-kDa) que possuem um “folding” característico, composto por uma folha- β central com 5 fitas flanqueadas por quatro α -hélices (figura 1). Catalizam reações de óxido-redução por um mecanismo de transferência de elétrons de um grupo ditiól para dissulfetos de várias proteínas alvo através de duas cisteínas ativas separadas por um par de aminoácidos que formam um motivo conservado composto pela sequência Trp-Cys-Gly-Pro-Cys (Meyer *et al.*, 2009).

Figura 1 - Tiorredoxina de *Escherichia coli* (PDB ID = 1XOB) foi escolhido como um modelo. (A) Vista geral do enovelamento tiorredoxina: folha- β composta por cinco elementos (amarelo) rodeados por quatro α -hélices (vermelho). Ambas as cadeias principais e laterais dos dois resíduos de cisteína que pertencem ao motivo CXXC são mostradas (cinza). A cisteína reativa (32 Cys) é a mais exposta ao solvente. (B) Vista do sítio ativo, mostrando a rede de interações eletrostáticas entre aminoácidos envolvidos na estabilização da cisteína reativa sob a forma tiolato (RS^-). Resíduos envolvidos na rede eletrostática estão representados com cores e com pontos que representam as suas densidades eletrônicas (Asp 26 - magenta, Cys 32 - verde, Cys 35 - ciano, Lys 57 - magenta). Pro76 (amarelo) não está envolvido na rede de resíduos carregados que estabilizam a forma tiolato da cisteína reativa, mas as suas cadeias (principal e lateral) são mostradas aqui, porque este resíduo desempenha um papel central no reconhecimento de substratos por tiorredoxina. As figuras foram gerados pelo software PyMOL (www.pymol.org).

Para reduzir dissulfetos em proteínas alvo, o tiól N-terminal do motivo CxxC da tiorredoxina ataca a ligação dissulfeto do alvo, liberando um tiól e formando uma ligação dissulfeto com a segunda cisteína do alvo. O tiól C-terminal do motivo CxxC da tiorredoxina quebra essa ligação entre a Trx e seu alvo, liberando o alvo reduzido e tiorredoxina oxidada (Meyer et al., 2009; Rietsch e Beckwith, 1998) (Figura 2).

Figura 2 - Mecanismo da redução de dissulfetos em proteínas pela tiorredoxina (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 à ligação dissulfeto mista, resultando na Trx oxidada e a proteína alvo reduzida.

Posteriormente, a tiorredoxina oxidada por sua vez será reduzida através da ação catalítica da flavoenzima TrxR com elétrons cedidos pelo NADPH (figura 3).

Figura 3 - Redução da Trx por NADPH mediada pela catálise da tiorredoxina redutase, nessa figura representada por Trr. Os elétrons passam da Trx em seu estado reduzido (-SH) promovendo a redução dos dissulfetos em proteínas. A Trx (S₂) por sua vez, será reduzida pela TrxR à custa de elétrons provenientes NADPH. A tiorredoxina redutase (Trr) tem dois centros redox, um grupo FAD e um centro ditiol/dissulfeto, este ultimo diretamente envolvido na redução de tiorredoxina.

As TrxRs são ubíquas e tipicamente subdivididas em dois principais grupos: as TrxRs de alto peso molecular (“High Molecular Weight Thioredoxin reductases” = HMr TrxRs) e as de baixo peso molecular (“Low Molecular Weight Thioredoxin reductases” LMr TrxRs) (Williams *et al.*, 2000). As HMr TrxRs são encontradas em mamíferos, insetos, *Caenorabitis elegans* e *Plasmodium falciparum*, visto que os monômeros possuem um peso molecular aproximado de 55-kDa. Os sítios de ligação ao NADPH e FAD são vicinais durante todo ciclo catalítico de forma semelhante à glutatona redutase (Buettner *et al.*, 1999; Sandalova *et al.*, 2000; Bauer *et al.*, 2003a; Bauer *et al.*, 2003b). Além do FAD e do centro ditiól/dissulfeto, algumas HMr TrxRs, como as proteínas de mamífero, têm um sítio ativo redox adicional composto por uma selenocisteína, que atua como intermediário na transferência de elétrons da parte interna para a parte externa da enzima. Compostos baseados em selênio possuem em geral alta reatividade (nucleofilicidade), entre outros motivos, por possuírem baixo pK_a (Kumar *et al.*, 1992; Björnstedt *et al.*, 1992; Tamura e Stadtman, 1996; Gladyshev *et al.*, 1996).

Em contrapartida às HMr TrxRs, as LMr TrxRs são encontradas em Archea, bactérias, plantas e eucariotos menos complexos como leveduras. Cada monômero tem aproximadamente

33-kDa e apresenta os sítios de ligação ao NADPH e ao FAD localizados em faces opostas da molécula durante parte do ciclo catalítico (Kuriyan *et al.*, 1991; Waksman *et al.*, 1994; Dai *et al.*, 1996). A estrutura de TrxR de *Escherichia coli*, elucidada por Waksman *et al.* (1994) na forma oxidada, mostra que o sítio de ligação de NADPH se localiza a uma distância de 17Å do sítio de ligação a FAD, muito afastado, portanto, para ocorrer a transferência dos hidretos. Além disso, apesar das cisteínas estarem próximas do domínio FAD, elas estão muito enterradas na estrutura da proteína para realizar a redução da Trx (Holmgren e Björnstedt, 1995; Gasdaska *et al.*, 1995). Com essa análise estrutural, um modelo foi sugerido para elucidar a questão do mecanismo de catálise nessa enzima: ocorreria uma rotação do domínio NADPH relativo ao domínio FAD que moveria o ditiól reativo para a superfície protéica onde este poderia reagir com o seu substrato; essa rotação posicionaria a nicotinamida do NADPH paralela ao anel flavina, permitindo assim transferência de elétrons do NADPH para o FAD⁺ (Waskman *et al.*, 1994; Mulrooney e Williams, 2000). Posteriormente, Lennon *et al.* (2000) confirmaram esse mecanismo, ao co-cristalizarem TrxR-Trx-AADP (3-aminopiridina adenina dinucleotídeo fosfato, um análogo de NADPH). Através de modelagem molecular e cristalografia de raios X, nosso grupo propôs que o mecanismo de catálise da tiorredoxina redutase 1 de levedura seria similar ao de *E. coli* (Oliveira *et al.*, 2010) (figura 4).

Figura 4 - Esquema das mudanças conformacionais de Tiorredoxina redutase 1 durante seu ciclo catalítico (Oliveira *et al.*, 2010). (A) ScTrxR1 de *Saccharomyces cerevisiae* na conformação FO mostrando as cisteínas catalíticas oxidadas e enterradas na estrutura proteica. (B) ScTrxR1 executando a rotação do domínio NADPH, colocando este próximo à molécula de FAD, adotando a conformação FR e permitindo a transferência do hidreto para a flavina; (C) contra-rotação para a conformação FO que aproxima o FADH₂ dos dissulfetos da ScTRxR1, permitindo que estes recebam os elétrons para (D) uma nova rotação (de volta para a conformação FR) que expõe as cisteínas reduzidas para a passagem dos elétrons e posterior redução do alvo (Trx).

Embora a estrutura da ScTrxR1 na conformação FO não tenha uma grande similaridade com as HMr TrxRs, quando a ScTrxr1 está na conformação FR, ela se alinha com outras HMr TrxRs e outras proteínas como glutathione redutase e lipoamida desidrogenase (figura 5).

Figura 5 – Comparações estruturais entre a ScTrxR1 nas conformações FO e FR.

(A) Sobreposição das TrxR de baixo peso molecular de diversos organismos: *S. cerevisiae* (conformação FO, em azul); *A. thaliana* (1VDC, em verde); *E. coli* (1TDF, em vermelho); *M. tuberculosis* (2A87, em laranja). (B) Sobreposição da ScTrxR1 em azul e na conformação FO, estrutura parcial da AhpF de *E. coli* (1FL2, em verde) e a estrutura da AhpF de *S. typhimurium*, (1HYU em amarelo). (C) Sobreposição da ScTrxR1 na conformação FR (em azul), TrxR1 citosólica de *Homo sapiens* (2CFY, em vermelho) e TGR de *Schistosoma mansoni* (3H4K em verde claro). (D) Sobreposição da ScTrxR1 na conformação FR (em azul), glutathione redutase de *E. coli* (1GET, em verde) e lipoamida desidrogenase de levedura (1V59, em amarelo). (E) Sobreposição dos dímeros da ScTrxR1 na conformação FR (azul), TrxR1 citosólica de *Homo sapiens* (2CFY, em vermelho) e TGR de *Schistosoma mansoni* (3H4K em verde claro). Figura extraído de Oliveira *et al.* (2010).

Como já dito anteriormente, as HMr TrxRs possuem um terceiro domínio, também chamado de domínio de interface ou dimerização, composto por aproximadamente 150 aminoácidos na porção C-terminal. Como pode ser observado na figura 5E, a presença deste terceiro domínio gera uma diferença em como os domínios de ligação do NADPH e FAD se organizam na estrutura e esta diferença influencia no mecanismo de transferência de elétrons durante a catálise enzimática.

Trabalhos publicados com HMr TrxRs, como por exemplo, a de fígado de rato (Luthman e Holmgren, 1982), a de placenta humana (Oblong *et al.*, 1993) e outra tiorredoxina humana

(hTrxR) (Lacey *et al.*, 2008), que possuem selenocisteína, cuja uma das possíveis funções é conferir à proteína a habilidade de funcionar em baixo pH (Lacey *et al.*, 2008), têm demonstrado que o diagnóstico para o mecanismo catalítico proposto para este sistema, independente da sua localização celular é do tipo ping-pong Bi-Bi. A figura 6 ilustra o mecanismo, onde o substrato (A) se liga á enzima (E), formando um intermediário (EA), modificando a enzima (E*) através da transferência de um grupo químico para o sítio ativo. Após esta modificação é gerado um produto (P) que é liberado e então, somente após a liberação deste produto é que um outro substrato (B) pode se ligar á enzima modificada (E*) e regenerar a enzima (E). No caso das HMr TrxRs, os dois substratos são o NADPH (A) e a tiorredoxina oxidada (B) e produz dois produtos, o NADP^+ (P) e o tiorredoxina reduzida (Q).

Figura 6 – Mecanismo Ping-Pong Bi-Bi.

Por outro lado, Williams (1995) propôs que a tiorredoxina redutase de *E. coli* (do tipo LMr), possui o mecanismo catalítico que forma um complexo ternário. Neste mecanismo, ambos os substratos se ligam a enzima formando um complexo. A reação começa com a enzima oxidada, que é uma mistura das conformações FO e FR. Na conformação rotacionada o sítio de ligação do NADPH e o FAD estão próximos, enquanto que na forma não-rotacionada, o FAD se encontra próximo do dissulfetos catalíticos (Cys138 e Cys135). O NADPH reduz a forma rotacionada e então estas formas reduzidas se equilibram com o FADH_2 e o dissulfeto Cys138 (SH) na forma não-rotacionada. Outra molécula de NADPH se liga e então ocorre uma rotação, este NADPH reduz o FAD na forma rotacionada ocorre a ligação da tiorredoxina á Cys135 (S^-) formando o dissulfeto misto. O tiolato da Cys138 então “ataca” o dissulfeto misto formado entra a Cys135 e a tiorredoxina, liberando a tiorredoxina reduzida. Com isso o NADP^+ se dissocia e uma nova rotação ocorre, retornando a tiorredoxina redutase á conformação oxidada e pronta para recomençar o ciclo. Este processo pode ser observado na figura 7.

Figura 7 - Representação esquemática do sistema tiorredoxina de *Escherichia coli* proposto por Williams C.H., (1995) com a formação do complexo ternário. A enzima oxidada é apresentada com uma mistura das conformações não-rotacionadas (*Unrotated*) e rotacionadas (*Rotated*).

Uma outra informação descrita por Williams C.H., (1995) é a existência de um catálise ácido-base presente durante a redução das cisteínas, representada pelo grupo carboxila (R-COOH), no esquema acima. Alguns aminoácidos como o Asp139 e a His245 facilitariam a redução da tiorredoxina pela tiorredoxina redutase, possivelmente protonando o tiolato da tiorredoxina, quando esta enzima está formando um dissulfeto misto com a tiorredoxina redutase.

Recentemente, Oliveira *et al.* (2010) através de análises estruturais e alinhamentos de sequências de aminoácidos propuseram um sistema de classificação mais abrangente, que ao invés da classificação baseada apenas no peso molecular, o novo sistema considera o grau de conservação do centro catalítico das TrxR. Análises mostraram que grande parte dos aminoácidos conservados se encontra no centro da enzima, mais especificamente nas regiões interiores de interação com o NADPH e FAD (figura 8).

Figura 8 - Conservação estrutural dos centros catalíticos da TRxR. A) visão da face anterior e B) posterior da TrxR mostrando a superfície e o grau de conservação. O gradiente de conservação é mostrado como mais conservado (azul) para menos conservado (cinza). Grande parte dos resíduos conservados está localizado na parte central da estrutura, enquanto os menos conservados se localizam nas extremidades. A maioria dos resíduos com maior conservação está localizada nos domínios de ligação do FAD (C) e NADPH (D). As moléculas de NADPH e FAD estão representadas por esferas, com átomos de carbono em verde.

Seriam então criadas 5 categorias, em três destas (Tipos 1, 2 e 3) as cisteínas catalíticas estariam localizadas no domínio de ligação do NADPH e nas outras duas (tipo 4 e 5), no domínio FAD (figura 9).

Figura 9 – Classificação das tiorredoxinas redutases proposta por Oliveira *et al.*, 2010. Tipo 1 (Type 1) engloba a ScTrxR1, TrxR bacteriana e de plantas; Tipo 2 (Type 2) abrange a TrxR de *Mycobacterium leprae*, cianobactérias e algumas plantas que apresentam Trx na região C-terminal; Tipo 3 (Type 3) apresenta a AhpF bacteriana com motivo Trx-like na região N-terminal; Tipo 4 (Type 4) tem a TrxR1 (isoforma 3) de mamíferos, tiorredoxina-glutationa redutase (TGR) de *S. mansoni* e *E. granulosus*, possuem alto peso molecular e podem se ligar a selênio (domínio SeCys C-terminal); Tipo 5 (Type 5): são as TrxR humanas (isoformas 1 e 2), tiorredoxinas redutases de insetos e protozoários com Trx N-terminal e domínio SeCys C-terminal. Extraído de Oliveira *et al.*, 2010.

Os sistemas tiorredoxina em *Saccharomyces cerevisiae*.

Existem dois sistemas tiorredoxina em leveduras, um localizado no citoplasma composto por ScTrxR1 e ScTrx2 ou ScTrxR1 (Gan *et al.*, 1991) e outro mitocondrial composto pela ScTrx3 e ScTrxR2 (Pedrajas *et al.*, 1999), sendo que ambas ScTrxR pertencem ao tipo 1 (figura 9).

A dupla deleção das duas Trxs citossólicas (ScTrx1 e da ScTrx2) afeta o ciclo celular, resultando em uma fase S prolongada e um intervalo G1 reduzido (Koc *et al.*, 2006). A ScTrx2 apresenta um papel predominante na proteção antioxidante, uma vez que mutantes que não expressam essa proteína se mostram sensíveis a hidroperóxidos e mutantes *SCTRX1* contendo a ScTrx2 são resistentes (Garrido e Grant, 2002). Essa necessidade de *Saccharomyces cerevisiae* por ScTrx2 é mais aparente na fase estacionária e alguns trabalhos demonstram que as Trxs têm

funções não completamente redundantes como antioxidantes (Carmel-Harel *et al.*, 2000; Arnér e Holmgren, 2000; Trotter e Grant, 2005; Carvalho *et al.*, 2006).

Após a identificação da tiorredoxina redutase citoplasmática (ScTrxR1) (Machado *et al.*, 1997; Pearson *et al.*, 1998), foi demonstrado que a mesma tem um papel central na manutenção do estado oxidativo celular, uma vez que mutantes nulos na ScTrxR1 são inviáveis ou apresentam um crescimento mais lento, provavelmente devido ao fato dos substratos do sistema tiorredoxina citossólico estarem envolvidos em diversos processos biológicos essenciais, como a redução de ribonucleotídeos a desoxirribonucleotídeos (Giaever *et al.*, 2002; Trotter e Grant, 2002). Foi demonstrado também que a ScTrxR1 tem papel importante em diversos processos celulares sob o controle dos fatores de transcrição Yap1 e Rho5 durante o estresse oxidativo e morte celular (Carmel-Harel *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2008).

Posteriormente, Pedrajas *et al.* (1999) descreveram um segundo sistema tiorredoxina em leveduras, localizado na mitocôndria. As duas isoformas de TrxR (ScTrxR1, citossólica; ScTrxR2, mitocondrial) apresentam 85% de identidade e 93% de similaridade. Por outro lado, ScTrx3 (tiorredoxina do sistema mitocondrial), assim como ScTrxR2, tem um tamanho maior quando comparado aos seus equivalentes citoplasmáticos por possuir um peptídeo sinal na região N-terminal que direciona sua translocação para a mitocôndria. Como apresentado acima, alguns alvos do sistema citossólico são conhecidos, o que sugere caminhos metabólicos que o mesmo atua. Pedrajas e colaboradores (2000) demonstraram que o único substrato até então conhecido do sistema tiorredoxina mitocondrial da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, era a proteína 1-Cys peroxirredoxina (Prx1).

Posteriormente, foi proposto que a ScTrxR2 mitocondrial junto com a glutathione (GSH) poderia também reduzir a 1-Cys Peroxirredoxina (Prx1) (Greetham e Grant, 2009). Aparentemente, nesse caso, a Prx1 seria reativada pela glutathionilação das suas cisteínas catalíticas que seriam então reduzidas pela ScTrxR2 junto com a GSH. Neste mecanismo integrado, a participação da ScTrx3 (componente do sistema tiorredoxina mitocondrial) não é necessária, embora os ensaios enzimáticos demonstrem que tanto o sistema tiorredoxina (ScTrx3/ScTrxR2) quanto a ScTrxR2 junto com GSH são capazes de reduzir Prx1 de forma muito similar (Greetham e Grant, 2009).

As estruturas cristalográficas das três tiorredoxinas, ScTrx1 (Zhang *et al.*, 2008), ScTrx2 (Bao *et al.*, 2007) e ScTrx3 (Bao *et al.*, 2006) de *Saccharomyces cerevisiae* foram descritas. Em paralelo, nosso grupo em colaboração com o grupo do Dr. Fabio Almeida (URFJ) e da Dra Ana Paula Valente (URFJ), descreveu as estruturas de ScTrx1 (Pinheiro *et al.*, 2008) e ScTrx2 (Amorim *et al.*, 2007) obtidas por RMN em solução. A ScTrx1 possui 76% de identidade e 87%

de similaridade quando comparada à ScTrx2. Se observarmos os níveis de expressão em situação de estresse oxidativo, enquanto a ScTrx2 é expressa na mesma escala de outras proteínas antioxidantes como Prx1 e Tsa2, a ScTrx1 apresenta níveis de expressão semelhantes à Vma5 e Cdc10, proteínas envolvidas em outros processos celulares (Gasch *et al.*, 2000).

Em relação às tioredoxinas redutases de levedura, nosso grupo descreveu a estrutura de ScTrxR1 (Oliveira *et al.*, 2010) quase simultaneamente a Zhang *et al.*, (2009). Estudos de nosso grupo (Oliveira *et al.*, 2010) indicaram possíveis aminoácidos envolvidos na especificidade da ligação dessa de ScTrxR1 com tioredoxinas citossólicas (Oliveira *et al.*, 2010) e contribuíram para o reconhecimento das bases das interações espécie-específico entre tioredoxinas e tioredoxinas redutases.

A estrutura cristalográfica da ScTrxR1 (PDB 3D8X) mostra que, embora seja muito semelhante quando comparada à estrutura global da tioredoxina redutase de *E. coli*, ScTrxR1 apresenta variações locais que podem representar possíveis sítios de ligação com a Trx (Zhang *et al.*, 2009), o que poderia estar relacionado com a seletividade espécie-específico dos sistemas tioredoxina redutases. Análises sobre a estrutura da ScTrxR1 demonstrando que os dois *loops* presentes na interface de reconhecimento do substrato (a ScTrx1/ScTrx2) são maiores que os da TrxR de *E. coli* e a presença de mais resíduos negativamente carregados podem ser determinantes para o reconhecimento espécie-específico (Zhang *et al.*, 2009). Oliveira *et al.*, (2010), utilizando o modelo de interação entre a tioredoxina redutase e a tioredoxina de *E. coli*, demonstraram por análises de superfície (distribuição de cargas) que existem 3 regiões (A, B e C) em ScTrxR1 que interagem com outras regiões complementares nas tioredoxinas (nomeadas de A', B' e C'). Na ScTrxR1 a região A é positivamente carregada devido em parte à presença dos aminoácidos Arg153, Lys175, Lys137 e pela hidrofobicidade da Ile139 na cadeia principal, a região B comporta as cisteínas catalíticas da ScTrxR1 e tanto a região B como C são negativamente carregadas. Nas tioredoxinas de *S. cerevisiae* as regiões A' são semelhantes entre si, mas muito distintas da região A' da tioredoxina de *E. coli* e humana.

A região B' das tioredoxinas de levedura, *E. coli* e humana é positivamente carregada e comporta as cisteínas catalíticas e a região C' tem uma carga positiva nas tioredoxinas de levedura e humana. Estas análises puderam explicar parcialmente a baixa atividade entre a ScTrxR1 e a tioredoxina de *E. coli*, mas não explicaram a ausência de atividade entre a ScTrxR1 e a tioredoxina humana (Oliveira *et al.*, 2010).

Além das análises de superfície, Oliveira *et al.*, (2010) também analisaram os *loops* que poderiam estar envolvidos no reconhecimento e interação entre ScTrxR1 e as diversas tioredoxinas. Foi mostrado que a ScTrxR1 possui 3 *loops* (chamados de X, Y e Z) que estariam

envolvidos com o reconhecimento da superfície das tiorredoxinas. Tanto o *loop* Z quanto o X não mostraram um bom encaixe nas tiorredoxinas de *E. coli* e humana e o *loop* Y comporta as cisteínas catalíticas e o Asp146 que aparentemente estaria envolvido com o reconhecimento de substratos e a catálise ácido-base. De forma semelhante, foram analisados os *loops* das tiorredoxinas e 3 *loops* flexíveis foram identificados como importantes para interação proteína-proteína (*loop* 1, 2 e 3) como visto na figura 10A. Foi observado uma alta conservação das sequências de aminoácidos do *loop* 2, que contém as cisteínas catalíticas das tiorredoxinas, e foi observado que tanto o *loop* 2 quanto o *loop* 3 estariam envolvidos no reconhecimento e interação entre as ScTrx e a ScTrxR1. Através de simulações e análises de “*docking*”, Oliveira *et al.*, (2010) mostraram que a Lys137 e o Asp146 da ScTrxR1 são dois resíduos que interagem com o Glu69 e a Ser72 da ScTrx2, como pode ser visto na figura 10B.

Figura 10 – *Loops* das tiorredoxinas envolvidos na interação com a ScTrxR1 (Oliveira *et*

al., 2010). (A) Alinhamento das sequências de aminoácidos das tiorredoxinas de *S. cerevisiae*, *E. coli* e humana onde os resíduos idênticos estão marcados em azul, as caixas coloridas mostram os *loops* de interação (*loop* 1 em amarelo, *loop* 2 em vermelho e *loop* 3 em verde). (B) Modelo de interação entre a forma FR da ScTrxR1 (em azul) e a ScTrx2 (em cinza). Nesta conformação o ditiól reativo da ScTrxR1 está exposto e reduz a tiorredoxina. O Glu69 e a Ser72 formam interações polares com a Lys137 e o Asp146 da ScTrxR1 e os os *loops* da ScTrx2 são representados nas mesmas cores do alinhamento da figura 8A. A seta vermelha mostra a posição da F27 e a seta verde mostra a posição da S72 na ScTrx2. Adaptado de Oliveira *et al.*, 2010.

Outros resíduos que também chamaram a atenção do nosso grupo foram a Tyr26 da ScTrx1 que tinha como equivalente na ScTrx2 a Phe27 na região do *loop* 2 e a Asn67 e Ala71 da ScTrx1 com equivalentes Ala68 e Ser72 na ScTrx2 no *loop* 3. Mutações sítio dirigidas foram feitos na ScTrxR1 (ScTrxR1K137A e ScTrxR1D146A), ScTrx1 (ScTrx1Y27F e ScTrx1A71S) e na ScTrx2 (ScTrx2F27Y e ScTrx2S72A) e a atividade destes mutantes foi testada. Viu-se então que a Lys137 e a Tyr26 da ScTrxR1, bem como a Ser72 de ScTrx2 foram os resíduos que afetaram a atividade e provavelmente o reconhecimento proteína-proteína entre a ScTrxR1 e a ScTrx1 e ScTrx2.

Objetivos

Este trabalho se propõe a caracterizar estrutural e funcionalmente o sistema tiorredoxina mitocondrial da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o que poderá auxiliar na compreensão da fisiologia dessa organela.

Para atingir esse objetivo realizamos ensaios enzimáticos e análises estruturais que foram viabilizadas pela elucidação da estrutura cristalográfica da proteína ScTrxR2. Com o objetivo de realizar correlações entre estrutura e função, levantamos hipóteses de aminoácidos que estariam envolvidos na especificidade das interações enzima-substrato.

Material e métodos

Materiais:

DTT e DTNB foram obtidos da Sigma Co. Peróxido de hidrogênio foi obtido da Merck Kg aminoácidos. NADPH foi obtido da USB. Todos os demais reagentes empregados eram de grau analítico. Todas as soluções aqui utilizadas foram preparadas em água tratada no sistema Millipore Milli-Q.

Purificação de proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade a metal.

Tanto a proteína ScTrx3 quanto a ScTrxR2 se mostraram pouco solúveis a princípio, e uma estratégia que ajudou a melhorar a solubilidade das proteínas foi a remoção da região N-terminal como descrito por Pedrajas *et al.*, 1999. Ambas as proteínas foram purificadas em coluna de afinidade a metal (Hi-trap - GE Healthcare). A ScTrx3 após ser extraída no tampão de equilíbrio (20mM Tris/HCl, 300mM NaCl, 20mM Imidazol, pH 7.4) foi passada na coluna já pré carregada com solução de sulfato de níquel e equilibrada no mesmo tampão. Com o auxílio da bomba peristáltica P1TM (GE Healthcare) a amostra é carregada na coluna em velocidade de 2ml/min. Após isso são passados os seguintes tampões em velocidade de 3ml/min: 30ml de 20mM Tris/HCl, 300mM NaCl, 50mM Imidazol, pH 7.4; 10ml de 20mM Tris/HCl, 300mM NaCl, 100mM Imidazol, pH 7.4; 10ml de 20mM Tris/HCl, 300mM NaCl, 120mM Imidazol, pH 7.4; 10ml de 20mM Tris/HCl, 300mM NaCl, 150mM Imidazol, pH 7.4 e 12ml de 20mM Tris/HCl, 300mM NaCl, 500mM Imidazol, pH 7.4.

Para definir um melhor gradiente de purificação da ScTrxR2, utilizamos o sistema de purificação ÄKTA FPLC com Frac-900 e coluna HiTrap de 5ml (GE Healthcare). As amostras foram purificadas utilizando os tampões: de ligação (20mM tampão citrato (citrato de sódio/ácido cítrico), 100mM NaCl, 20mM Imidazol, pH 5.1 com gradiente de eluição de imidazol de 20 mM até 500 mM). Após definido o melhor gradiente de purificação, a ScTrxR2 passou a ser purificada em bomba peristáltica P1TM da seguinte forma: após ser extraída em tampão de equilíbrio (20mM tampão citrato (citrato de sódio/ácido cítrico), 100mM NaCl, 20mM Imidazol, pH 5.1) foi passada na coluna já pré carregada com solução de sulfato de níquel e equilibrada no mesmo tampão com velocidade de 2ml/min. Após, isso são passados os seguintes tampões em velocidade de 3ml/min: 25ml de 20mM tampão citrato, 100mM NaCl, 20mM Imidazol, pH 5.1; 25ml de 20mM tampão citrato (citrato de sódio/ácido cítrico), 100mM

NaCl, 50mM Imidazol, pH 5.1; 10ml de 20mM tampão citrato (citrato de sódio/ácido cítrico), 100mM NaCl, 70mM Imidazol, pH 5.1; 10ml de 20mM tampão citrato (citrato de sódio/ácido cítrico), 100mM NaCl, 100mM Imidazol, pH 5.1 e 20ml de 20mM tampão citrato (citrato de sódio/ácido cítrico), 100mM NaCl, 160mM Imidazol, pH 5.1. Após serem purificadas na coluna de afinidade a níquel, as amostras foram concentradas em unidade filtrante Amicon Ultra (Millipore Co.) e passadas em colunas PD-10 Desalting (GE Healthcare) para a troca de tampão. Após ser colocada em tampão 20mM fosfato de sódio, 100mM NaCl, 20mM Imidazol, pH 7.4, as amostras foram purificadas em coluna de afinidade a cobalto por gravidade (Pierce) onde foram passadas em colunas de 5ml pré carregadas com cobalto e equilibradas com tampão 20mM fosfato de sódio, 100mM NaCl, 20mM Imidazol, pH 7.4. Após o término da passagem de toda a amostra, foram passados os seguintes tampões: 15ml de 20mM fosfato de sódio, 100mM NaCl, 20mM Imidazol, pH 7.4, 10 ml de 20mM fosfato de sódio, 100mM NaCl, 50mM Imidazol, pH 7.4; 5ml de 20mM fosfato de sódio, 100mM NaCl, 70mM Imidazol, pH 7.4; 1ml de 20mM fosfato de sódio, 100mM NaCl, 100mM Imidazol, pH 7.4; 1ml de 20mM fosfato de sódio, 100mM NaCl, 160mM Imidazol, pH 7.4 e 1ml de 20mM fosfato de sódio, 100mM NaCl, 200mM Imidazol, pH 7.4.

Todas as proteínas foram concentradas através de ultrafiltração por centrifugação em unidade filtrante Amicon Ultra (Millipore Co.). Para os ensaios enzimáticos e cristalográficos as frações puras foram agrupadas e o tampão foi trocado para o mais conveniente, utilizando colunas PD-10 Desalting.

Ensaios de cristalização e refinamentos.

Os ensaios iniciais de cristalização com a ScTrxR2 (sem os primeiros 23 aminoácidos da região N-terminal que sinaliza para localização mitocondrial, portanto essa ORF inicia-se no códon 69) foram realizados no Laboratório Robotizado de Cristalização de Proteínas (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron/Centro de Biologia Molecular Estrutural, Campinas - SP). As placas de cristalização foram feitas com o auxílio do sistema automatizado Honeybee, utilizando os kits de cristalização: Crystal Screen I e Crystal Screen II (Hampton Research), Wizard I e Wizard II (Emerald BioSystems), PACT (Nextal/Qiagen), JCSG+ (Nextal/Qiagen), SaltRx (Hampton Research) e Precipitant Synergy (Emerald BioSystems). Este ensaio foi realizado pelo método da gota sentada (*sitting drop*), sendo o volume final das gotas foi 1µL (0,5 µL da solução de proteína e 0,5 µL da solução de cristalização) e o volume utilizado da solução de cristalização no poço foi de 80 µL. Após os experimentos de cristalização, as placas foram observadas periodicamente com o auxílio de uma lupa.

A concentração da proteína utilizada nos ensaios de cristalização foi de 8 mg/mL para ScTrxR2 em tampão citrato de sódio 5 mmol L⁻¹, pH 5.1. Foram realizados ensaios de cristalização para proteína sem tratamento, tratada com 1 mmol L⁻¹ de H₂O₂ ou tratada com 10 mmol L⁻¹ de DTT. Exceto durante os tratamentos, as proteínas foram mantidas em banho de gelo até o término dos experimentos de cristalização. A temperatura de cristalização foi de 20°C.

Também realizamos ensaios de gota sentada e pendente no Laboratório de Cristalografia do Prof. Dr. Shaker Chuck Farah do IQ-USP. O volume final das gotas foi 4 µL (2 µL da solução de proteína e 2 µL da solução de cristalização) e o volume utilizado da solução de cristalização no poço foi de 300 µL; nos refinamentos das condições de cristalização foram feitas gotas com um volume final de até 8 µL com o intuito de obter cristais maiores.

Quando encontrados cristais em uma determinada condição de cristalização foram feitos refinamentos desta condição, variando o pH e a concentração de sal, proteína e precipitantes, seguindo o método de Reichert (Applied Biosystems) com o intuito de obter cristais adequados aos experimentos de difração.

Para tentar obter cristais melhores de ScTrxR2 também foi utilizado o kit de aditivos Additive Screen da Hampton Research. Neste caso a gota com um volume total de 5µL era composta por 2,5 µL da solução protéica, 2,0 µL da solução de cristalização (a mesma na qual haviam crescido os melhores cristais obtidos até o momento) e 0,5 µL da solução de aditivo do kit com 300 µL de solução de cristalização no poço principal caso a solução de aditivo não fosse volátil. Se o aditivo fosse volátil, as gotas seriam compostas por 2,5 µL da solução protéica e 2,5 µL da solução + aditivo e o poço principal teria 270 µL de solução de cristalização e 30 µL da solução de aditivo.

Outra técnica utilizada foi a técnica de “microseeding”, onde cristais previamente nucleados são triturados e as sementes microscópicas geradas são introduzidas em gotas novas, equilibradas até baixos níveis de supersaturação (Bergfors, 2003). Cristais da proteína foram colocados em 100 µL da solução de cristalização e vortexados por tempo suficiente para que não se observasse mais pedaços de cristais na solução (aprox. 10 minutos). Esta solução estoque com os núcleos dos cristais foi diluída 10x, 100x, 1000x e 10.000x. Gotas contendo 4,0 µL da solução de cristalização (idêntica àquela que foram retirados os cristais para fazer a solução com as sementes) e 4,0 µL da proteína foram feitas e deixadas equilibrando por 1 semana; foram feitas também gotas com concentrações menores, em relação à condição inicial, de proteína e de precipitante. Depois deste tempo, 1,0 µL das soluções com sementes, nas diferentes diluições, foi adicionado às gotas.

Processamento dos dados

Para o refinamento da estrutura utilizamos o programa Refmac 5 (Murshudov *et al.*, 1997) e o programa Coot (Emsley e Cowtan, 2004) foi utilizado para visualização, substituição de aminoácidos e ordenação da molécula no interior do mapa de densidade eletrônica. A análise estereoquímica do modelo refinado foi realizada utilizando-se o modelo PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

Análise da estrutura

As representações gráficas foram feitas com o programa PyMOL (Delano W.L., 2002) e os alinhamentos das estruturas foram feitos com a função SSM do programa Coot (Emsley e Cowtan, 2004).

Determinação da atividade dissulfeto redutase pelo ensaio do DTNB

Este ensaio mede a redução do composto DTNB (5-5'-ditio-bis-2-nitrobenzoato), um dissulfeto artificial, a TNB pelo sistema NADPH/ tiorredoxina/tiorredoxina redutase, conforme Arnér *et al.*, (1999). Em 1000 μL de reação, foram incubados DTNB (3 mmol L^{-1}), DTPA (1 mmol L^{-1}), ScTrxR2 ($0,025 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), NADPH ($200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e quantidades variáveis de ScTrx3 (sem os primeiros 21 aminoácidos da região N-terminal que sinaliza para localização mitocondrial, portanto essa ORF inicia-se no códon 63), em tampão fosfato de potássio (100 mmol L^{-1} pH 7,4). A redução de DTNB a TNB ($\epsilon_{412 \text{ nm}} = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi iniciada pela adição de ScTrxR2 e acompanhada a 30°C e com agitação no espectrofotômetro Cary 50 Bio (Varian). A velocidade inicial de formação do TNB foi determinada a partir da porção do gráfico de absorbância versus tempo que apresentava inclinação máxima e todos os ensaios foram feitos em duplicata. Os reagentes DTNB e NADPH foram todos preparados no dia do experimento, sendo o NADPH ($\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) quantificado por leitura espectrofotométrica a 340 nm.

Determinação da concentração de flavoproteínas

A concentração das flavoproteínas foi realizada de acordo com o método descrito por Chapman & Reid (1999). A proteína foi precipitada com 50 μL de TCA 20% e centrifugada por cinco minutos a 13200 rpm a 4°C , imediatamente a absorbância é lida novamente a 450nm e a concentração determinada de acordo com a constante de absorvidade do FAD livre ($\epsilon_{\text{FAD livre}} =$

11300 M⁻¹.cm⁻¹)

Mutações sítio dirigidas

Os mutantes Trx3Y24F, Trx3A74S, Trx3K90E, Trx3K90R, Trx3K46E, Trx3E100K, Trx2Q137K e Trx1K137Q para os ensaios cinéticos foram construídos utilizando o “QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit” da Stratagene. Os primers mostrados na tabela 1, e os plasmídeos pPROEX-TrxR1, pET15b-Trx3 e pET15b-TrxR2, os quais contém os genes que codificam as isoformas de ScTrxR1, ScTrx3 e ScTrxR2 de levedura. Com este kit de mutagênese os mutantes desejados podem ser obtidos em poucas etapas. Na primeira etapa o plasmídeo contendo o gene sem a mutação (molde) é desnaturado, e em seguida, os *primers* com a mutação se pareiam ao molde. A enzima *Pfu* Turbo DNA polimerase estende o plasmídeo e incorpora os *primers* com a mutação. Na segunda etapa o DNA molde metilado é digerido com a enzima *DpnI*, restando os plasmídeos que contém o gene com a mutação, os quais são usados para transformar a bactéria competente XL1-Blue. Os plasmídeos que contém o gene mutado possuem pequenos “*gaps*” nas regiões adjacentes àquelas onde os *primers* pareiam, e a bactéria XL1-Blue é capaz de reparar estes “*gaps*”.

Tabela 1- Oligonucleotídeos utilizados.

Linhagens selvagens	
Oligonucleotídeo	Sequência
ScTrx3	Fw 5' TAAGATTCCAGCATATGTACAACCAGTATTACTA 3'
	Rv 5' CATGTGCGGATCCATATAAAATTTATAGATC 3'
ScTrxR2	Fw 5' GTGCTGTACATATGATTCATCACAAGGTTAC 3'
	Rv 5' ATAAACGGATCCTTTCACGTTACTCTTG 3'
Ensaio enzimáticos	
Oligonucleotídeo	Sequência
ScTrx3Y24F	Fw 5' TTCCAGTCCTCATTACCCAGTATTACT 3'
	Rv 5' AGTAATACTGGTGAATGAGGACTGGAA 3'
ScTrx3A74S	Fw 5' TGTGAAGTGACGTCTATGCCACCTTTGTT 3'
	Rv 5' AACAAAGGTGGGCATAGACGTCACCTTCACA 3'
ScTrx3K90E	Fw 5' GGCCAACTCATCGGCGAGATCATTGGAGCTAAC 3'
	Rv 5' GTTAGCTCCAATGATCTCGCCGATGAGTTGGCC 3'
ScTrx3K90R	Fw 5' GGCCAACTCATCGGCGAGATCATTGGAGCTAAC 3'
	Rv 5' GTTAGCTCCAATGATCCTGCCGATGAGTTGGCC 3'
ScTrx3K46E	Fw 5' CAACCACACTTAACGGAATTAATTCAGGCCTTAT 3'
	Rv 5' ATAAGCCTGAATTAATTCGTTAAGTGTGGTTG 3'
ScTrx3E100K	Fw 5' CCTACTGCTTTAAAGAAGGGAATCAAAGAT 3'
	Rv 5' ATCTTTGATTCCCTTCTTTAAAGCAGTAGG 3'
ScTrxR2Q137K	Fw 5' GAAACCTACTGGCAGAGGGGAATATCT 3'
	Rv 5' AGATATTCCCTTCTGCAAGTAGGTTTC 3'
ScTrxR1K137Q	Fw 5' ACCTACTGGCAACAAGGTATTTCT 3'
	Rv 5' GGCAGAAATACCTTGTGCCAGTA 3'

Após realizar as reações descritas acima, os plasmídeos dos transformantes, obtidos por mini preparação plasmidial (mini-prep; método da hidrólise alcalina de acordo com Sambrook *et al.*, (1989), foram seqüenciados e aqueles que continham a mutação desejada foram usados para transformar a linhagem de expressão *BL21 (DE3)* de *E. coli*.

Resultados e Discussão

Expressão e purificação da ScTrxR2 e ScTrx3

Para iniciarmos nossos estudos, realizamos a clonagem dos genes envolvidos no sistema tiorredoxina mitocondrial, para posterior expressão heteróloga em *Escherichia coli*, na tentativa de obter grandes quantidades da tiorredoxina redutase (ScTrxR2) e tiorredoxina (ScTrx3) mitocondriais. Os oligonucleotídeos descritos na tabela 1 foram desenhados de forma a resultar na expressão de proteínas sem sua região N-terminal envolvida no transporte para a mitocôndria. No caso de ScTrx3, os primeiros 63 nucleotídeos foram removidos, começando a expressão do que seria o aminoácido 21; enquanto no caso de ScTrxR2, os primeiros 69 nucleotídeos foram removidos, começando a expressão heteróloga do que seria o aminoácido 23 da proteína íntegra. Essas construções estão de acordo com as construções descritas por Pedrajas et al. (1999) que caracterizou inicialmente esse sistema. Essas construções foram realizadas pela Dra. Gisele Monteiro, então pós-doutora no nosso laboratório e atualmente docente na FCF-USP. Previamente, tentamos expressar as proteínas inteiras, contudo elas se mostraram pouco expressas e/ou insolúveis o que nos levou a escolha de utilizar a forma truncada, como mencionado anteriormente a sequência N-terminal retirada de ambas corresponderia à região sinalizadora para localização mitocondrial. Vamos dar ênfase aqui na construção do vetor de expressão de ScTrxR2 (pET15b-ScTrxR2), pois dessa expressão obtivemos uma estrutura cristalográfica descrita a seguir.

O vetor de expressão pET15b-ScTrxR2 foi transformada na linhagem BL21(DE3). Seguindo o protocolo de expressão e purificação por afinidade a níquel como está descrito no “Materiais e Métodos”. Obtivemos a ScTrxR2 com alto grau de pureza (figura 11A). Conseguimos também expressar e purificar a proteína ScTrx3 (figura 11B). A figura 11 mostra o

resultado da expressão e purificação de ambas por cromatografia de afinidade ao níquel.

Figura 11 - Gel SDS-Page do sistema Trx mitocondrial expresso e purificado por afinidade ao níquel. Proteínas coradas com Comassie blue. (A) O poço 1 (em ambos os géis) corresponde ao padrão de peso molecular (Bench Mark Protein Ladder - Invitrogen), o poço 2 corresponde á ScTrxR2 purificada. (B) À direita, poço 2, 5 μ g de ScTrx3. A cauda de histidina acrescenta $\pm$ 3kDa ao tamanho normal da proteína, utilizando o vetor pET15b. As proteínas ScTrx3 e ScTrxR2 possuem nas suas extremidades N-terminais peptídeos de sinalização mitocondrial que são aproximadamente 20 aminoácidos cuja as sequências não foram incluídas no vetor de expressão.

Estudo de cristalização da proteína ScTrxR2

Os ensaios foram realizados pelos métodos da gota sentada (*Sitting drop*) e gota pendente (*Hanging drop*) com volumes finais de 6 μ L e 8 μ L (50% de solução de cristalização e 50% de proteína) e 300 μ L de solução de cristalização no poço e após três semanas, pudemos obter cristais em algumas condições diferentes das obtidas inicialmente e estes cristais se mostraram maiores, reprodutíveis e, posteriormente, mais resistentes à manipulação.

As novas condições obtidas foram:

- 100 mmol L⁻¹ bis/Tris-propano/Hcl pH 7,3 + 20% Peg 3350 + 133,333 mmol L⁻¹ KSCN
- 100 mmol L⁻¹ Tris/Hcl pH 7 + 25% Peg 3350 + 200 mmol L⁻¹ sulfato de lítio
- 100 mmol L⁻¹ Bis/Tris/Hcl pH 6.5 + 25% Peg 3350 + 200 mmol L⁻¹ sulfato de amônio

Estas novas condições foram refinadas pelo método Reichert (Applied Biosystems) e em paralelo, repetimos estas condições com o kit Additive Screen (Hampton Research) e fizemos “microseeding” com os cristais. Após aproximadamente 1 mês, várias condições do refinamento pelo método Reichert mostraram cristais maiores e melhor formados (figura 12).

(A)

(B)

Figura 12 - Cristais obtidos no refinamento nas seguintes condições: (A) 100 mmol L⁻¹ bis/Tris-propano/Hcl pH 7,5 + 20% Peg 3350 + 200 mmol L⁻¹ KSCN. (B) 100 mmol L⁻¹ Bis/Tris/Hcl pH 5.5 + 25% Peg 3350 + 200 mmol L⁻¹ sulfato de amônio.

Uma vez obtidos estes novos cristais, vários foram submetidos à exposição de raios-X na linha MX2 do LNLS. Diversas coletas de dados foram realizadas e as resoluções variaram de 2.0Å a 2.4Å, sendo que os cristais da condição 100 mmol L⁻¹ Bis/Tris/Hcl pH 7,0 + 25% Peg 3350 + 200 mmol L⁻¹ sulfato de amônio difrataram a uma resolução de 1,9 Å. Assim, procedemos com a coleta de 360 imagens com $\Delta\Phi=1^\circ$

Processamento de dados e substituição molecular da ScTrxR2

Inicialmente, escolhemos o conjunto de dados de melhor resolução (1,9Å) para ser processado com o auxílio dos programas MOSFLM (Leslie, 1992) e SCALA (Kabush, 1998; Blessing, 1995). Porém este conjunto de dados se mostrou difícil de ser trabalhado, pois uma vez que mudávamos algum parâmetro no momento da indexação (como mosaicidade, ganho ou distância do detector), vários erros surgiram e após o refinamento da cela, não era possível

integrar os dados. Apenas o fato de se pedir ao programa para deixar a mosaicidade fixa, fazia a indexação mudar totalmente o grupo espacial sugerido. Tentamos fazer a indexação e refinamento com várias variações de parâmetros e vários grupos espaciais, mas a quantidade de erros ao fim era tão grande que não era possível integrar os dados.

Como nosso grupo nunca teve problemas desse tipo nesta parte do refinamento da estrutura, decidimos recorrer ao auxílio de um especialista em cristalografia, o Prof. Dr. Mário Thyago Murakami do LNLS que sugeriu a utilização do programa HKL-2000 (Otwinowski Z., & Minor W., 1997), sendo possível detectar que o problema era um micro desvio da cela unitária, uma variação muito pequena (na ordem de 0,002) entre os valores de *a*, *b* e *c*. Este problema foi solucionado pela inserção de valores manuais no programa HKL, possibilitando assim a indexação, refinamento de cela e integração das imagens. Pudemos então determinar a quantidade de moléculas na unidade assimétrica através do cálculo do coeficiente de Matthews (Matthews, 1968) e o valor encontrado foi 2,57 Å³/Da. A porcentagem de solvente no cristal era de 52,10%, e há quatro moléculas na unidade assimétrica. As estatísticas dos dados de difração são mostradas na tabela 2.

Tabela 2 - Estatísticas dos dados de difração coletados. Os valores entre parênteses correspondem aos dados da última camada de resolução.

Grupo espacial	P1
Parâmetros de cela unitária (Å)	$a = 64.586, b = 74.312, c = 79.132,$ $\gamma = 90.031^\circ/90.260^\circ/90.012^\circ$
Resolução (Å)	1,549
Limites de resolução (Å)	50.0 – 1.88
Número de reflexões totais	924836
Número de reflexões únicas	112106
Completeza (%)	93.4 (80.6)
Multiplicidade (%)	3.9 (3.1)
Rmerge (%)	6.9 (36.5)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	20,4 (2,65)

Partimos então para a substituição molecular utilizando o programa Phaser (Read, 2001) e

utilizamos as coordenadas da proteína ScTrxR1 (resolvida e refinada a 2,4Å de resolução por Oliveira *et al.*, 2010, com coordenadas depositadas no *Protein Data Bank*, com número de acesso 3ITJ).

Refinamento da estrutura da ScTrxR2

O refinamento da estrutura da ScTrxR2 foi concluído com o programa Refmac5 (Murshudov *et al.*, 1997). A visualização, substituição de aminoácidos e a ordenação da molécula no interior do mapa de densidade eletrônica foram realizadas utilizando-se o programa Coot (Emsley e Cowtan, 2004). O primeiro ciclo de refinamento do modelo gerou $R_{\text{factor}} = 0,456$ e $R_{\text{free}} = 0,506$ e a evolução do refinamento terminou com o $R_{\text{factor}} = 0,198$ e $R_{\text{free}} = 0,249$ (tabela 3).

Tabela 3 - Estatísticas do refinamento da estrutura da ScTrxR2.

Estatísticas do refinamento	
Rfree	0,249
Rfactor	0,198
RMS ligação	0,024
RMS ângulo	1,909
Análises Ramachandran (%)	
Regiões favorecidas	86,3
Regiões adicionalmente permitidas	13,7
Regiões não permitidas	0

O diagrama de Ramachandran da estrutura de ScTrxR2 mostra que 86,3% dos resíduos estão em regiões mais favorecidas e 13,7% dos resíduos estão em regiões adicionalmente permitidas e não há resíduos de aminoácidos em regiões não permitidas (figura 13).

Figura 13 - Diagrama de Ramachandran da estrutura de ScTrxR2.

A unidade assimétrica é composta por 4 monômeros nomeados A, B C e D (figura 14) e nenhum dos monômeros está com a cadeia completa (composta por 319 aminoácidos). Entretanto os monômeros A, B e D apresentam 318 aminoácidos e o monômero C se inicia no segundo resíduo e tem 317 aminoácidos. Algumas regiões dos monômeros B, C e D não puderam ser construídas, pois em momento algum do refinamento detectamos o aparecimento de densidade eletrônica correspondente. Acreditamos que isto ocorra pelo fato de serem regiões mais expostas ao solvente e móveis. Para a análise mais detalhada, escolhemos o monômero B por estar mais bem construída.

Figura 14 – Arranjo das moléculas na unidade assimétrica da estrutura cristalográfica de ScTrxR2 composta por 4 monômeros.

O monômero da ScTrxR2 é composto por dois domínios β - α - β - α - β que formam os sítios de ligação do NADPH e FAD de forma semelhante a ScTrxR1 e outras tiorredoxina redutases do tipo 1 (figura 7) como a de *Achaea*, bactéria e plantas (Oliveira *et al.*, 2010, Waskman *et al.*, 1994; Akif *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 1996; Ruggiero *et al.*, 2009). A sobreposição das estruturas da ScTrxR1 e da ScTrxR2 na conformação FO mostra que os sítios de ligação do NADPH, FAD e vários resíduos se encontram em posições muito parecidas (figura 15). Nesta conformação, o domínio de ligação de NADPH está afastado do domínio de ligação a FAD, impedindo a transferência dos hidretos. Além disso, apesar das cisteínas estarem próximas do domínio FAD, elas estão muito enterradas no interior da estrutura da proteína para realizar a redução da ScTrx.

Figura 15 – Sobreposição dos monômeros da ScTrxR1 (verde) com a ScTrxR2 (azul).

O sítio ativo com as cisteínas 142 e 145 formando o dissulfeto intramolecular próximo ao FAD pode ser visto claramente (figura 16), assim como o Asp146, equivalente ao Asp 139 de *E. coli* (Williams C.H., 1995) que é responsável pela catálise ácido-base na redução do dissulfeto misto entre o complexo Trx-TrxR. A ScTrxR2 foi obtida na conformação FO (oxidada) de forma semelhante à ScTrxR1 (Oliveira *et al.*, 2010).

Figura 16 - Mapa de densidade eletrônica (2fo-fc, 1σ) mostrando o dissulfeto intramolecular

formado entre a Cys142 e Cys145 (enxofres em laranja) em ScTrxR2 (átomos de C em verde) e a molécula de FAD (carbonos em amarelo). Os átomos de N estão representados em azul, os átomos de O estão representados em vermelho e os átomos de P em rosa.

Análise de interações moleculares do sistema tiorredoxina mitocondrial de levedura

A obtenção do modelo da forma FR da ScTrxR2 foi feita seguindo a mesma metodologia feita por nosso grupo (Oliveira *et al.*, 2010). Inicialmente, os domínios NADPH e FAD foram separados e estes foram alinhados com o modelo da EcTrxR (PDB 1F6M). Posteriormente estes domínios foram unidos e após alguns ajustes na cadeia de aminoácidos obtivemos o modelo da forma FR como pode ser visto na figura 17. Essa modelagem contou com suporte do Dr. Marcos A. Oliveira (UNESP –São Vicente).

Figura 17 – Modelo da superfície molecular da ScTrxR2 na forma FR. Em cinza claro estão representados os resíduos que são idênticos entre ScTrxR1 e ScTrxR2, em vermelho estão os resíduos que são distintos entre as duas proteínas e em amarelo estão .

O alinhamento da sequência de aminoácidos demonstra que ScTrxR1 e ScTrxR2 compartilham grande homologia, 86% de identidade e 93% de similaridade (figura 18) e a análise das estruturas terciárias destas proteínas demonstra que dos 43 aminoácidos que são

diferentes entre estas proteínas 37 se encontram na superfície da molécula e somente 6 estão localizados no interior da molécula (figura 19A). No entanto, somente a lisina 137 de ScTrxR1 a qual é substituída por uma glutamina em ScTrxR2 difere na superfície que entra em contato com a ScTrx3 (figura 19B e 19C).

Figura 18 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da ScTrxr1 e SctrxR2. O domínio de ligação do NADPH está representado pela barra barra verde, o domínio de ligação do FAD pela barra azul e as setas pretas indicam as cisteínas catalíticas.

Figura 19 - Superfície molecular de ScTrxR2. A) Modelo estrutural da superfície molecular de ScTrxR2 no estado FR. Em cinza claro estão representados os resíduos que são idênticos entre ScTrxR1 e ScTrxR2 e em vermelho estão os resíduos que são distintos entre as duas proteínas. B) Molécula apresentada em A rotada em 180°. Em amarelo estão localizadas as cisteínas responsáveis pela transferência de equivalentes redutores para Trx. C) Interação com molécula de ScTrx3 (dourado). Para determinação do local de interação com ScTrx3 foi utilizada as coordenadas do complexo Trx-TrxR de *E. coli* determinado por Lennon e colaboradores (2000) (código de PDB: 1F6M).

Adicionalmente, a simulação de complexos ScTrx3-ScTrxR2 de levedura, utilizando as coordenadas do complexo de *E. coli* como modelo inicial, revela que o único resíduo que difere entre ScTrxR1 e ScTrxR2 (K-137-Q)¹ na região de interação entre as proteínas pode contribuir para as diferenças observadas na redução das Trx de levedura. De forma similar é possível constatar que justamente nesta região ocorrem substituições e aminoácidos que podem interagir com o resíduo de ScTrxR1/ScTrxR2 (K137 ou Q137, respectivamente).

De forma geral, enquanto que ScTrx3 e ScTrx1 apresentam um resíduo de lisina (K89 e K86, respectivamente), ScTrx2 apresenta resíduo de arginina (R87) o qual possui grupamentos guanidino adicionais pode contribuir para uma relação mais estrita com K137/Q137 de ScTrxR1/ScTrxR2 (Fig. 20).

Figura 20 - Modelos de interações moleculares entre ScTrxR2 e as tiorredoxinas de levedura. A) Superfície molecular de ScTrxR2 no estado FR mostrando o modelo de interação com ScTrx3 (representada pela cor dourada) (A), ScTrx2 (magenta) (B) e ScTrx1 (amarelo claro) (C). Nas figuras os átomos de aminoácidos idênticos entre ScTrxR1 e ScTrxR2 estão representados na cor cinza claro e em vermelho estão os resíduos que são distintos entre as duas proteínas. A posição dos aminoácidos Q137 de ScTrxR2 está assinalada na figura (vermelha) próximo aos os resíduos de K89 de ScTrx3, R86 de ScTrx2 e K87 de ScTrx1 (todos em verde claro). Para determinação do local de interação com Trx foram utilizadas as coordenadas do complexo Trx-TrxR de *E. coli* descrito por Lennon e colaboradores (2000) (código de PDB: 1F6M).

O alinhamento de estruturas primárias das Trx de leveduras e de *E. coli* e humanos, revelam somente 20 aminoácidos são idênticos entre as diferentes proteínas, incluindo o motivo WCGPCKM, o qual é estritamente conservado entre estas proteínas (Fig. 21A). O mapeamento tridimensional dos aminoácidos idênticos revela que dezesseis dos vinte aminoácidos se encontram na face de contato com ScTrxR (Fig. 21B e 21C).

¹ As proteínas ScTrx3 e ScTrxR2 possuem nas suas extremidades N-terminais peptídeos de sinalização mitocondrial (aproximadamente 20 aminoácidos) os quais sofrem proteólise após chegar na organela. A numeração dos resíduos que é seguida para as proteínas ScTrx3 e ScTrxR2 exclui os aminoácidos pertencentes ao peptídeo sinal.

Figura 21 - Alinhamento de aminoácidos das Trx de levedura, *E. coli* e humano e localização de aminoácidos idênticos na estrutura de Trx. (A) Alinhamento das seqüências de aminoácidos de ScTrx1, ScTrx2, ScTrx3 de levedura, Trx de *E. coli* e Trx de humanos,. No alinhamento das seqüências, os resíduos de aminoácidos idênticos estão realçados em azul, enquanto os resíduos diferentes não possuem realce. O motivo WCGPCKW é assinalado por uma caixa preta. As setas vermelhas indicam resíduos de aminoácidos que são idênticos ou possuem características físico químicas similares entre as Trx de leveduras mas que possuem características distintas em humano ou *E. coli*. A seta roxa indica o aminoácido que ao ser substituído em ScTrx1 ou ScTrx2 (ScTrx1^{A71S} ScTrx2^{S72A}) alterou sua redução por ScTrxR1 (Oliveira *et al.*, 2010). (B) Superfície molecular de ScTrx3 onde resíduos estritamente conservados entre as Trx de levedura, *E. coli* e humanos estão coloridos em azul, enquanto os resíduos diferentes estão representados em cinza claro. As cisteínas catalíticas estão coloridas em amarelo. (C) Rotação de 180 ° da molécula de ScTrx3, mostrando região que não interage com ScTrxR2. (D) Face de interação ScTrx3 com ScTrxR2 os aminoácidos representados em vermelho representam os locais de substituições de aminoácidos com características físico químicas distintas em Trx de humanos e bactéria. Em roxo indica a posição do aminoácido que ao ser substituído em ScTrx1 ou ScTrx2 (ScTrx1^{A71S} ScTrx2^{S72A}) alterou as taxas de redução por ScTrxR1.

Análises adicionais revelam que existem aminoácidos na face de interação que podem estar relacionados à incapacidade de redução das Trx de *E. coli* e humanos por ScTrxR1 ou ScTrxR2 de levedura. Oliveira *et al.*, 2010 já havia determinado três regiões principais nas diversas Trx que interagem com a ScTrxR1, observando que estes resíduos estão em regiões com diferentes características eletrostáticas, como visto na figura 22. Aminoácidos básicos presentes em todas as três Trx de levedura estão substituídos por aminoácidos de caráter ácido nas Trx de humanos e bactéria. Utilizando como exemplo a ScTrx3 os aminoácidos Lys45, Lys89 (Arg87 de Trx2) e Lys99 estão substituídos por aminoácidos características físico químicas diferentes em Trx de humanos (Ser44, Glu88 e Glu98, respectivamente) e em *E. coli* (Glu45, T88 e Glu101, respectivamente). Adicionalmente, um resíduo de ácido Glu também totalmente conservado nas Trx de levedura é substituído por Asp ou Gln (Humanos e *E. coli*,

respectivamente (Fig. 21C).

Figura 22 – Comparação das cargas de superfície das diversas Trx. ScTrx1 (2I9H), ScTrx2 (2FA4), ScTrx3 (2OE3), HsTrx1 (1ERU), e EcTrx (1XOA) estão coloridas de acordo com as cargas, sendo vermelho para negativo e azul para positivo. Três regiões complementares para a interação com a ScTrxR1 estão destacadas, sendo A' em verde, B' em amarelo e C' em vermelho. Estas regiões foram escolhidas apartir do modelo cristalográfico do complexo tiorredoxina redutase-tiorredoxina de *E. coli* (1F6M).

Caracterização dos parâmetros enzimáticos do sistema ScTrx3-ScTrxR2.

O mecanismo de ligação de substratos, liberação de produtos e interação entre grupos catalíticos podem ser estudados do ponto de vista cinético e complementados do ponto de vista estrutural. A obtenção de estruturas cristalográficas de enzimas em diferentes estágios do ciclo catalítico de diversas proteínas, inclusive a TrxR de *E. coli* demonstraram possuir mudanças conformacionais importantes durante a catálise que puderam ser confirmadas através da estrutura cristalográfica destas proteínas, isoladas ou complexadas com seus respectivos substratos (Lennon *et al.*, 2000).

Realizamos as análises cinéticas da ScTrxR2 frente a ScTrx1 (figura 23) utilizando a abordagem de bi-substrato a fim de obter K_M e k_{cat} “reais” pelo replote do inverso das concentrações de um substrato pelas V_{max} aparentes, mas o replote muitas vezes apresentava erros muito grandes como visto na figura 24.

Figura 23 - Análise por regressão não-linear da velocidade de formação do TNB em função da concentração de ScTrx. (A) e (B) Concentrações variáveis de 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 0,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 0,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 1,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 1,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ScTrx1 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NADPH.

Figura 24 - Replote $1/V_{\text{max_app}}$ em função de $1/[\text{NADPH}]$ para ScTrxR2. Experimentos realizados no mesmo dia com as mesmas preparações. Valores utilizados para determinação dessa reta foram obtidos dos gráficos 21A e B.

Dessa forma, como a principal função do nosso trabalho é analisar de forma comparativa as eficiências das reduções das tiorredoxinas por ScTrxR2, decidimos utilizar as constantes aparentes, partindo-se de uma concentração fixa de um dos substratos (NADPH), variando-se apenas as tiorredoxinas (figura 25), como empregado por Oliveira *et al.*, (2010). É importante salientar que o substrato NADPH foi mantido a concentrações muito superiores ao K_M aparente, indicando que o mesmo não limitava a determinação de velocidades nos nossos ensaios.

Figura 25 - Análise por regressão não-linear da velocidade de formação do TNB em função da concentração de ScTrx. Concentrações variáveis de 0,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 0,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 1,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ScTrx, 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NADPH, DTNB (3 mmol L^{-1}), DTPA (1 mmol L^{-1}), ScTrxR2 (0,025 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato de potássio 100 mmol L^{-1} pH 7,4.

Conseguimos assim determinar de forma mais reprodutiva os valores aparentes para as três tiorredoxinas como pode ser visto na tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros cinéticos aparentes determinados por regressão não linear provenientes da figura 25.

	ScTrxR1	ScTrxR2	ScTrx3
$K_M^{ap} (\mu\text{mol L}^{-1})$	$1,4 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,2$
$V_{max}^{ap} (\mu\text{mol L}^{-1}/s)$	$19,7 \pm 0,2$	$23,7 \pm 0,1$	$22 \pm 0,2$
$k_{cat} (s^{-1})$	$791,6 \pm 0,1$	$948 \pm 0,1$	$881,6 \pm 0,3$
$k_{cat}/K_M (M.s)^{-1}$	$(5,3 \pm 0,07) \times 10^8$	$(5,1 \pm 0,4) \times 10^8$	$(4,7 \pm 0,2) \times 10^8$

Observando a figura 25 e a tabela 4, vemos que as três tiorredoxinas apresentam uma eficiência catalítica (K_{cat}/K_m) semelhante. Podemos observar uma tendência da ScTrx1 em ser mais eficientemente reduzida por ScTrxR2 do que a ScTrx2 e ScTrx3, embora tanto a ScTrx2 e ScTrx3 tenham uma afinidade semelhante frente a ScTrxR2. É importante ressaltar que testamos também a tiorredoxina humana (HsTrx), mas esta não mostrou ser reduzida substancialmente

por ScTrxR2. Dessa forma, assim como ScTrxR1 (Oliveira *et al.*, 2010), ScTrxR2 apresenta atividade redutase espécie-específica, ou seja, só reduziu tiorredoxinas de levedura. Por outro lado, em relação às ScTrxs, detectamos uma diferença mais significativa de eficiência das respectivas reduções, sendo ScTrx2 a mais eficientemente reduzida e ScTrx3 a mais lentamente reduzida. Para facilitar a comparação entre ScTrxR1 e ScTrxR2, reproduzimos aqui a figura 1 de Oliveira et al. (2010), aqui como figura 26.

Figura 26 – Redução de enzimas tiorredoxina por ScTrxR1. A redução da ScTrx1 (o), ScTrx2 (▲), ScTrx3 (×), HsTrx (Δ), e EcTrx (■) por ScTrxR1. A concentração de ScTrxR1 foi fixada em 0,03 mM, e as concentrações de Trxs variaram de 0,1 a 8,0 uM. As reações foram iniciadas com a adição de 0,2 mM de NADPH. Outros reagentes utilizados no ensaio incluíram 0,1 mg / mL de BSA e 0,25 DTNB mM. As constantes cinéticas aparentes foram determinados por regressão não linear (Michaelis-Menten), utilizando o software GraphPad Prism. Nenhuma atividade de ScTrxR1 foi observada em relação á EcTrx e HsTrx, mesmo quando as concentrações mais elevadas de estas proteínas foram utilizados (10 uM).

Pelos nossos dados, ScTrxR2 apresentou eficiências catalíticas (k_{cat}/K_M) da ordem de $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, o que seria uma ordem de magnitude maior do que as respectivas reduções catalisadas por ScTrxR1 e descritas previamente (Oliveira *et al.*, 2010). Porém, quando comparamos ScTrxR1 e ScTrxR2 em um mesmo ensaio enzimático, observamos que ambas as enzimas catalisam reações com aproximadamente similar eficiência (figura 27). Provavelmente, as diferenças descritas estão relacionadas a determinação das concentrações de ScTrxR1 por Oliveira et al (2010) e de ScTrxR2 nesse trabalho. Anteriormente, determinamos a concentração

pela absorção a 280nm, assumindo que somente amino ácidos aromáticos absorviam nessa região. Agora determinamos a concentração de proteína pela quantidade de FAD liberada após tratamento com TCA.

Figura 27 - Análise por regressão não-linear da velocidade de formação do TNB em função da concentração de ScTrx2. Concentrações variáveis de 0,2 μmol L⁻¹, 0,4 μmol L⁻¹, 0,8 μmol L⁻¹, 1 μmol L⁻¹, 1,2 μmol L⁻¹, 1,5 μmol L⁻¹, 2 μmol L⁻¹, 3 μmol L⁻¹, 4 μmol L⁻¹, 6 μmol L⁻¹, 8 μmol L⁻¹ e 10 μmol L⁻¹ de ScTrx, 200 μmol L⁻¹ de NADPH, DTNB (3 mmol L⁻¹), DTPA (1 mmol L⁻¹), ScTrxR1 e ScTrxR2 (0,025 μmol L⁻¹) em tampão fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹ pH 7,4.

Oliveira *et al.*, 2010 investigaram alguns aminoácidos por mutação sítio dirigida que poderiam estar envolvidos na interação entre a ScTrxR1 e as ScTrx, e estariam envolvidos nas diferenças catalíticas observadas na figura 26. Esses mutantes tornariam ScTrx1 mais semelhante a ScTrx2 e vice versa. Realizamos alguns ensaios enzimáticos entre ScTrxR2 e esses mutantes das três ScTrxs.

Inicialmente, determinamos os parâmetros enzimáticos para os mutantes da ScTrx1 (Trx1A71S e Trx1Y27F), e posteriormente os mutantes de ScTrx2 (Trx2S72A e Trx2F27Y) como pode ser visto nas figuras 28 e 29, respectivamente. Os mutantes de ScTrx1 tornaram essa proteína melhor substrato para ScTrxR2 (figura 28), da mesma do que o observado para ScTrxR1. No caso de ScTrx2, os efeitos das mutações são mais complexos (figura 29).

Figura 28 - Análise por regressão não-linear da velocidade de formação do TNB em função da concentração de ScTrx1 e mutantes. Concentrações variáveis de $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$, $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$, $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, $1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$, $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, $2 \mu\text{mol L}^{-1}$, $3 \mu\text{mol L}^{-1}$, $4 \mu\text{mol L}^{-1}$, $6 \mu\text{mol L}^{-1}$, $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ScTrx, $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NADPH, DTNB (3 mmol L^{-1}), DTPA (1 mmol L^{-1}), ScTrxR2 ($0,025 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato de potássio 100 mmol L^{-1} pH 7,4.

Figura 29 - Análise por regressão não-linear da velocidade de formação do TNB em função da concentração de ScTrx2 e mutantes. Concentrações variáveis de 0,2 μmol L⁻¹, 0,4 μmol L⁻¹, 0,8 μmol L⁻¹, 1 μmol L⁻¹, 1,2 μmol L⁻¹, 1,5 μmol L⁻¹, 2 μmol L⁻¹, 3 μmol L⁻¹, 4 μmol L⁻¹, 6 μmol L⁻¹, 8 μmol L⁻¹ e 10 μmol L⁻¹ de ScTrx, 200 μmol L⁻¹ de NADPH, DTNB (3 mmol L⁻¹), DTPA (1 mmol L⁻¹), ScTrxR2 (0,025 μmol L⁻¹) em tampão fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹ pH 7,4.

Os alinhamentos feitos por Oliveira *et al.*, (2010) mostram diversos aminoácidos que poderiam estar envolvidos na interação entre a ScTrxR1 e as ScTrx. A substituição da Ser72 por uma Ala resultou em uma diminuição da atividade da ScTrx2 frente á ScTrxR1, enquanto a substituição da Ala71 por uma Ser em ScTrx1 fez com que esta tivesse uma maior atividade frente á ScTrxR1, evidenciando a importância deste aminoácido na interação com a ScTrxR1. Outros aminoácidos analisados foram a Phe27 de ScTrx2 e a Tyr26 de ScTrx1, onde a mudança da Tyr26 por uma Phe na ScTrx1 resultou no aumento da atividade frente á ScTrxR1 (Oliveira *et al.*, 2010). Em nossos resultados observamos que as duas mudanças na ScTrx1 (Ala por Ser e Phe por Tyr) geraram um aumento na atividade das ScTrx1 mutantes frente á ScTrxR2 e somente a troca de Phe por Tyr na ScTrx2 gerou um aumento de atividade frente á ScTrxR2. Embora este padrão seja diferente do observado na ScTrxR1 (Oliveira *et al.*, 2010), podemos inferir que a posição destes aminoácidos na estrutura e sua carga de superfície podem ser os fatores que determinam a interação proteína-proteína.

Pelas análises estruturais realizadas nessa tese e alinhando a sequência da ScTrx3 com as tiorredoxinas citossólicas, decidimos fazer mutações sítio dirigidas nos aminoácidos Tyr23 (localizada no *loop* 2) e Thr95 (localizada no *loop* 3). Vimos também que a ScTrxR2 tem uma Gln na posição 137, correspondente à Lys137 na ScTrxR1, portanto, também construímos *primers* para a ScTrxR2 (ScTrxR2Q137K) e fizemos um mutante da ScTrxR1 com a Lys137 mutada para a Gln (ScTrxR1K137Q). Iremos também testar os mutantes da ScTrx3 (Trx3Y24F, Trx3A74S, Trx3K90E, Trx3K90R, Trx3K46E, Trx3E100K). Com a obtenção dos mutantes sítio dirigidos e a posterior determinação dos parâmetros enzimáticos frente aos mutantes das tiorredoxinas de levedura poderemos observar qual ou quais resíduos estariam envolvidos com a interação da ScTrxR2 com a ScTrx3 e outras tiorredoxinas.

Os resíduos entre as cisteínas do sítio ativo e resíduos próximos ao mesmo têm grande impacto no potencial redox da proteína, efeito que pode ser atribuído à influência destes resíduos no pK_a do tiolato das formas reduzidas destas enzimas, que determina a habilidade como grupo de saída do ânion tiolato.

Conclusões

- A estrutura de ScTrxR2 é muito similar a ScTrxR1 , se apresentando na forma FO, com o grupo FAD próximo as cisteínas reativas.
- O modelo da forma FR de ScTrx2 é muito similar ao de ScTrxR1, porem apresenta diferenças que podem estar relacionadas a especificidades distintas dessas duas flavo enzimas frente a diversas Trxs.
- ScTrxR2 reduz as três ScTrx com similar eficiência, mas não reduz a Trx humana.

Perspectivas

1. Análises da redução de tiorredoxinas bacterianas por ScTrxR2 e ensaios concomitantes com ScTrxR1 e ScTrxR2 para comparar as eficiências catalíticas sob as mesmas condições experimentais.
2. Análises da redução das tiorredoxinas com mutações sítio dirigidas por ScTrxR2 e comparação destes com suas contrapartes selvagens.
3. Análises da redução das tiorredoxinas selvagens por ScTrxR2 (Q137K), o único resíduo diferente na face de interação da ScTrxR2 quando comparado com a ScTrxR1.
4. Análises de cargas da superfície da estrutura da ScTrxR2 também estão sendo realizadas e estes dados poderão nos ajudar a compreender melhor como ocorre a especificidade de interação entre a ScTrxR2 e as diversas tiorredoxinas.
5. Determinação do potencial redox.

Abstract

NADPH, thioredoxin and thioredoxin reductase, comprising the thioredoxin system, are involved in the reduction of specific disulfides linkages that play a large number of biological roles, such as: DNA synthesis, defense against oxidative stress, apoptosis and redox signaling. It has been shown that thioredoxin reductase-thioredoxin interactions are species-specific, therefore we have investigated here the substrate specificity of mitochondrial Thioredoxin reductase 2 (ScTrxR2) from *Saccharomyces cerevisiae* towards other thioredoxins. ScTrxR2 specifically reduced yeast thioredoxins (thioredoxin 1 = ScTrx1, thioredoxin 2 = ScTrx2 and thioredoxin = ScTrx3), but failed to reduce thioredoxin from *Homo sapiens* and from *Escherichia coli*. Furthermore, ScTrxR2 displayed similar catalytic efficiency towards ScTrx3, which is located in the mitochondria and ScTrx1 and ScTrx2 that are located in the cytosol. To understand the features of this phenomenon, we have solved the crystallographic structure of ScTrxR2 at 1,9Å resolution through molecular replacement using ScTrxR1 as search model (Oliveira *et al.*, 2010)¹. ScTrxR2 is a two-domain protein (NADPH and FAD binding domains). Low molecular weight thioredoxin reductases can adopt two conformations: flavin oxidized (FO) or flavin reduced (FR), the late one physically interacts with thioredoxins. Our ScTrxR2 crystal structure is in the FO conformation. Therefore, we have modeled the ScTrxR2 FR (Flavin reduced) conformation from our FO crystal structure and using the *E. coli* thioredoxin reductase crystallographic structure complexed with thioredoxin (PDB code 1F6M). Then, we have raised hypothesis that some amino acid residues that may be involved in the thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. Next, site-directed mutants of yeast Trxs and ScTrx2 were generated. Through enzymatic and biochemical assays with these mutant proteins we are testing the hypothesis generated by structural analysis.

Resumo

NADPH, tioredoxina e tioredoxina redutase compõem o sistema tioredoxina, estão envolvidos na redução de ligações específicas de dissulfetos que desempenham um grande número de funções biológicas, tais como: síntese de DNA, defesa contra o estresse oxidativo, apoptose e sinalização redox. Tem sido demonstrado que as interações tioredoxina redutase-tiorredoxina são espécies específicas, sendo assim, investigamos aqui a especificidade dos substratos da tioredoxina redutase 2 mitocondrial (ScTrxR2) de *Saccharomyces cerevisiae* frente a outras tioredoxinas. ScTrxR2 especificamente reduziu as tioredoxinas de levedura (tiorredoxina 1 = ScTrx1, tioredoxina 2 = ScTrx2 e tioredoxina = ScTrx3), mas não conseguiu reduzir a tioredoxina de *Homo sapiens* e a de *Escherichia coli*. Além disso, ScTrxR2 exibiu eficiência catalítica semelhante para ScTrx3, que está localizado na mitocôndria e ScTrx1 e ScTrx2 que estão localizadas no citosol. Para compreender as características deste fenômeno, resolvemos a estrutura cristalográfica da ScTrxR2 a 1,9 Å de resolução por meio de substituição molecular utilizando as coordenadas de ScTrxR1 (PDB Id = 3ITJ) como modelo (Oliveira et al., 2010). A ScTrxR2 é uma proteína de dois domínios (domínio de ligação do NADPH e domínio de ligação do FAD). As tioredoxinas redutases de baixo peso molecular podem adotar duas conformações: flavina oxidada (FO) e flavina reduzida (FR), estando esta última envolvida na interação física com as tioredoxinas. A estrutura cristalográfica da ScTrxR2 obtida por nós está na conformação FO. Posteriormente, modelamos a conformação FR (Flavina reduzida) da ScTrxR2, a partir da estrutura do cristal na conformação FO, e utilizando a estrutura cristalográfica da tioredoxina redutase de *E. coli* complexada com a tioredoxina (PDB 1F6M). Pela análise dessas estruturas, levantamos hipóteses de que alguns resíduos de aminoácidos podem estar envolvidos nas interações espécie-específicas entre tioredoxina redutase e tioredoxina. Com isso, geramos mutantes sítio dirigidos das Trx de levedura e da ScTrxR2 e através de ensaios enzimáticos e bioquímicos com estas proteínas mutantes estamos testando as hipóteses levantadas sobre possíveis amino ácidos envolvidos em interações entre tioredoxina e tioredoxina redutase.

Bibliografia

Akif M., Suhre K., Verma K. and Mande S.C. Conformational Flexibility of *Mycobacterium tuberculosis* thioredoxin reductase: Crystal structure and normal mode analysis. *Acta Cryst. D* 61, 1603-1601, 2005.

Amorim G.C., Pinheiro A.S., Netto L.E., Valente A.P., Almeida F.C. NMR solution structure of the reduced form of thioredoxin 2 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biomol NMR*. 38(1), 99-04, 2007.

Arnér E.S.J., Zhong L., Holmgren A. Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol.* 300, 226–239, 1999.

Arnér E.S., Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem.* 267(20), 6102-9, 2000.

Bao R., Chen Y.X., Zhang Y., Zhou C.Z. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of mitochondrial thioredoxin Trx3 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Com un.* 62 (Pt 11), 1161-3, 2006.

Bao R., Chen Y., Tang Y.J., Janin J., Zhou C.Z. Crystal structure of the yeast cytoplasmic thioredoxin Trx2. *Proteins.* 66(1), 246-9, 2007.

Bauer H., Gromer S., Urbani A., Schnölzer M., Schirmer R.H and Müller, H.M. Thioredoxin reductase from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Eur J Biochem.* 270, 4272-4281, 2003a.

Bauer H., Massey V., Arscott L.D., Schirmer R.H., Ballou D.P. and Williams Jr C.H. The Mechanism of High Mr Thioredoxin Reductase from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 278, 33020-33028, 2003b.

Björnstedt M., Kumar S. and Holmgren A. Selenodiglutathione is a highly efficient oxidant of reduced thioredoxin and a substrate for mamalian thioredoxin reductase. *J Biol Chem.* 267(12), 8030-8034, 1992.

Buettner C., Harney J.W. and Barry M.J. The *Caenorhabditis elegans* homologue of Thioredoxin Reductase contains a Selenocysteine Insertion Sequence (SECIS) Element that differs from mammalian SECIS elements but directs Selenocysteine incorporation. *J. Biol. Chem.* 274, 21598-21602, 1999.

Carmel-Harel O., Storz G. Roles of the glutathione and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu Rev Microbiol.*; 4, 439-61, 2000.

Carmel-Harel O., Stearman R., Gasch A.P., Botstein D., Brown P.O., Storz G. Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 39(3), 595-605, 2001.

Carvalho A.P., Fernandes P.A., Ramos M.J. Similarities and differences in the thioredoxin

superfamily. Prog Biophys Mol Biol. 91(3), 229-48, 2006.

Chapman S.K.; Reid G.A. "*Flavoprotein Protocols*" Methods in Molecular Biology (131) Ed: Human Press, 1999.

Dai S., Saminoácidorsinen M., Ramaswamy S., Meyer Y., Jacquot J.P. and Eklund H. Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* NADPH dependent thioredoxin reductase at 2.5 Å resolution. J. Mol. Biol. 264, 1044-1057, 1996.

Delano, W. L. "The Pymol Molecular Graphics System". (2002). Delano Scientific, San Carlos, CA., USA. (<http://www.pymol.org>).

Demple B. A bridge to control. Science. 279(5357), 1655-1656, 1998. Erratum in: Science. 280(5362), 363, 1998.

Emsley P. and Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 60(Pt12 Pt1), 2126-2132, 2004.

Gan Z.-R. Yeast thioredoxin genes. J. Biol. Chem. 266, 1692–1696, 1991.

Garrido E.O. and Grant C.M. Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. Mol. Microbiol. 43, 993–1003, 2002.

Gasch A.P., Spellman P.T., Kao C.M., Carmel-Harel O., Eisen M.B., Storz G., Botstein D., Brown P.O. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. Mol Biol Cell. 11(12), 4241-57, 2000.

Gasdaska P.Y., Gasdaska J.R., Cochran S., Powis G. Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase. FEBS Lett. 373, 5-9, 1995.

Giaever G., Chu A.M., Ni L., Connelly C., Riles L., Veronneau S., Dow S., Lucau-Danila A., Anderson K., Andre B., Arkin A.P., Astromoff A., El-Bakkoury M., Bangham R., Benito R., Brachat S., Campanaro S., Curtiss M., Davis K., Deutschbauer A., Entian K.D., Flaherty P., Foury F., Garfinkel D.J., Gerstein M., Gotte D., Guldener U., Hegemann J.H., Hempel S., Herman Z., Jaramillo D.F., Kelly D.E., Kelly S.L., Kotter P., LaBonte D., Lamb D.C., Lan N., Liang H., Liao H., Liu L., Luo C., Lussier M., Mao R., Menard P., Ooi S.L., Revuelta J.L., Roberts C.J., Rose M., Ross-Macdonald P., Scherens B., Schim mol L⁻¹ack G., Shafer B., Shoemaker D.D., Sookhai-Mahadeo S., Storms R.K., Strathern J.N., Valle G., Voet M., Volckaert G., Wang C.Y., Ward T.R., Wilhelmy J., Winzeler E.A., Yang Y., Yen G., Youngman E., Yu K., Bussey H., Boeke J.D., Snyder M., Philippsen P., Davis R.W. and Johnston M. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. Nature. 418, 387-391, 2002.

Gladyshev V.N, Jeang K.T. and Stadtman T.C. Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 93(12), 6146-6151, 1996.

Greetham D. and Grant C.M. Antioxidant activity of the yeast mitochondrial one-Cys peroxiredoxin is dependent on thioredoxin reductase and glutathione in vivo. Mol Cell Biol. 29, 3229-40, 2009.

Hirota K., Murata M., Sachi Y., Nakamura H., Takeuchi J., Mori K. and Yodoi J. Distinct

roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaß. J Biol Chem. 274(39), 27891-27897, 1999.

Holmgren A. and Björnstedt M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. Methods Enzymol. 252, 199-208, 1995.

Jamieson D.J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 14(16), 1511-527, 1998.

Koc A., Mathews C.K., Wheeler L.J., Gross M.K., Merrill G.F. Thioredoxin is required for deoxyribonucleotide pool maintenance during S phase. J Biol Chem. 281(22), 15058-63, 2006.

Kumar S., Björnstedt M. and Holmgren, A. Selenite is a substrate for calf thymus thioredoxin reductase and thioredoxin and elicits a large non-stoichiometric oxidation of NADPH in the presence of oxygen. Eur. J. Biochem. 207, 435-439, 1992.

Kuriyan J., Krishna T.S.R., Wong L., Guenther B., Pahler A., Williams-Jr H. and Model P. Convergent evolution of similar function in two structurally divergent enzymes. Nature. 352, 172-74, 1991.

Lacey B.M., Eckenroth B.E., Flemer S., Hondal R.J. Selenium in thioredoxin reductase: a mechanistic perspective. Biochemistry. 47, 12810-21, 2008.

Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M. PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. Journal of Applied Crystallography. 26, 283-291, 1993.

Laurent T.C., Moore E.C. and Reichard P. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli*. B. J. Biol. Chem. 239, 3436-3444, 1964.

Machado A.K., Morgan B.A., and Merrill G. F. Thioredoxin reductase dependent inhibition of MCB cell cycle box activity in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 272, 17045–17054, 1997.

Meyer Y., Buchanan B.B., Vignols F., Reichheld J.P. Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. Annu Rev Genet. 43, 335-67, 2009.

Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 53(Pt 3), 240-55, 1997.

Netto L.E., 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., Horta B.B. Reactive cysteine in proteins: Protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 146, 180-93, 2007.

Oliveira M.A., Discola K.F., Alves S.V., Medrano F.J. Guimarães B.G., Netto L.E.S. Insights into the Specificity of Thioredoxin Reductase – Thioredoxin interactions. A Structural and Functional Investigation of the Yeast Thioredoxin System. Biochemistry. 49(15), 3317-26, 2010.

Pearson G.D., and Merrill G. F. Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* SCTRXR1 gene encoding thioredoxin reductase inhibits p53-dependent reporter gene expression. J. Biol. Chem.

273, 5431–5434, 1998.

Pedrajas J.R., Kosmidou E., Miranda-Vizuet A., Gustafsson J.-A., Wright A.P. H., and Spyrou G. Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 274, 6366–6373, 1999.

Pedrajas J.R., Miranda-Vizuet A., Javanmardy N., Gustafsson J.A. and Spyrou G. Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. J Biol Chem. 275(21), 16296-301, 2000.

Pinheiro A.S., Amorim G.C., Netto L.E., Almeida F.C., Valente A.P. NMR solution structure of the reduced form of thioredoxin 1 from *Saccharomyces cerevisiae*. Proteins. 70(2) 584-7, 2008.

Rietsch A. and Beckwith J. The genetics of disulfide bond metabolism. Annu Rev Genet. 32, 163-184, 1998.

Ruggiero A., Masullo M., Ruocco M.R., Grimaldi P., Lanzotti M.A., Arcari P., Zagari A., and Vitagliano, L. Structure and stability of a thioredoxin reductase from *Sulfolobus solfataricus*: A thermostable protein with two functions. Biochim. Biophys. Acta. 1794, 554–562, 2009.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*”, (1989). 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Sandalova T., Zhong L., Lindqvist Y., Holmgren A. and Schneider G. Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: Implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 98, 9533-9538, 2000.

Schenk H., Klein M., Erdbrugger W., Droge W. and Schulze-Osthoff K. Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa β and AP-1. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 91, 1672–1676, 1994.

Singh K., Kang P.J., Park H.O. The Rho5 GTPase is necessary for oxidant-induced cell death in budding yeast. Proc Natl Acad Sci U S A. 105(5), 1522-7, 2008

Stewart E.J., Aslund F. and Beckwith J. Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. EMBO J. 17, 5543–5550, 1998.

Tamura T. and Stadtman T.C. A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 93(3), 1006-1011, 1996.

Trotter E.W. and Grant C.M. Thioredoxins are required for protection against a reductive stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Microbiol. 46, 869–878, 2002.

Trotter E.W., Grant C.M., Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot Cell. 4(2), 392-400, 2005.

Waksman G., Krishna T.S.R., Williams-Jr C.H. and Kuriyan J. Crystal structure of *Escherichia coli* thioredoxin reductase refined at 2 Å resolution. Implications for a large

conformational change during catalysis. J. Mol. Biol. 236, 800-816, 1994.

Williams C.H. Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. FASEB J. 9, 1267-76, 1995.

Williams C.H., Arscott L.D., Muller S., Lennon B.W., Ludwig M.L., Wang P.F., Veine D.M., Becker K. and Schirmer R.H. Thioredoxin reductase: Two modes of catalysis have evolved. Eur. J. Biochem. 267, 6110-6117, 2000.

Zhang Y., Bao R., Zhou C.Z., Chen Y. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of thioredoxin Trx1 from *Saccharomyces cerevisiae*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 64(Pt 4), 323-5, 2008.

Zhang Z., Bao R., Zhang Y., Yu J., Zhou C.Z., Chen Y. Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* cytoplasmic thioredoxin reductase Trx1 reveals the structural basis for species-specific recognition of thioredoxin. Biochim Biophys Acta. 1794(1), 124-8, 2009.