UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

VICTOR GENU FARIA

"Ahp1 e Tsa1 de Saccharomyces cerevisiae: regulação gênica, caracterização bioquímica, estrutura e função das duas peroxirredoxinas mais abundantes de leveduras"

> São Paulo 2007

VICTOR GENU FARIA

"Ahp1 e Tsa1 de Saccharomyces cerevisiae: regulação gênica, caracterização bioquímica, estrutura e função das duas peroxirredoxinas mais abundantes de leveduras"

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

Orientador: Luis Eduardo Soares Netto

São Paulo 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Faria, Victor Genu			
"Ahp1 e Tsa1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : regulação gênica, caracterização bioquímica, estrutura e função das duas peroxirredoxinas mais abundantes de leveduras" 160 páginas			
Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva			
 Peroxirredoxinas 2.Ahp1 Saccharomyces cerevisiae 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(a). Dr(a). Orientador(a)

Aos meus pais, Raul Tadeu e Maria Luíza, por me darem todo o apoio necessário em todas as etapas da minha vida. Sem eles, nada disso seria possível.

> Aos meus avós, Nady e Lourdes Genu, por todo amor, suporte e incentivo que sempre me deram. "Segura, vovô!..." (*In memoriam*)

Suavemente, pra poder rasgar olho fechado, pra te ver melhor com alegria, pra poder chorar desesperado pra ter paciência. Carinhoso pra poder ferir lentamente pra não atrasar atrás da vida pra poder morrer eu tô me despedindo pra poder voltar.

Eu tô te explicando, pra te confundir eu tô te confundindo, pra te esclarecer eu tô iluminado, pra poder cegar tô ficando cego pra poder guiar.

Tom Zé, *Tô* (do álbum *Estudando o samba*, 1976).

AGRADECIMENTOS

- Aos meus irmãos, Rafael e Isabella, por tudo;
- Aos meus tios e tias, primos e primas em Brasília e no Rio, aos meus padrinhos e aos tios César e Bete, Zé Roberto e Cirlei (tios de verdade!), por todo o apoio e por estarem sempre dispostos a me ajudar;
- A Luis Netto, por ter-me aberto as portas de seu laboratório há quatro anos, por estar sempre disposto a me ajudar e interessado em realmente me orientar, por sua competência, amizade e disponibilidade, só tenho a agradecer;
- À Gisele Monteiro, pelo tanto que me ajudou no laboratório desde o início do doutorado, por seu bom-humor e competência e por ser uma grande amiga desde os tempos da Unicamp;
- Ao grande amigo Marcos Oliveira, por todas as conversas, discussões, ajudas, turnos de coletas de dados compartilhados no LNLS e por sempre me receber muito bem em sua casa quando eu estava em Campinas (muito obrigado à Carla também!);
- A Bruno Horta, Gustavo Monteiro, Zé Renato Cussiol, Karen Discola, Carol Cogueto, Dani Munhoz, Marilene Demasi, Simone Alves, Míriam, Andressa, Rafael e Suzy, pelo convívio diário no laboratório, discussões, colaborações, ajudas e amizade;
- Aos Drs. Javier Medrano, Beatriz Guimarães e Fábio Gozzo e aos colegas Andréia Navarro, Mario Sanches, Luciana Camilo, Amadeu Iglesias, Jane Finzi, Fábio Rinaldi, Alexandre Quaresma e Lucas Sanfelici, por todo o auxílio prestado ao longo do tempo passado no LNLS;
- Aos Drs. Mario Barros, Carlos Menck, Alicia Kowaltowski, Silvia Gatti, Maria Cristina Arias, Paolo Di Mascio, Shaker Chuck Farah, Francisco Nóbrega, Sérgio Matioli e Eduardo Gorab, pelas ajudas em experimentos e pela cessão de equipamentos, materiais e espaço para realizá-los;
- Ao grande amigo Rodrigo Travitzki, por nossa casa, conversas, redondas, feijoadas, viagens, músicas e todo tempo que passamos juntos ao longo desses anos: unabelessa!;
- Aos amigos de todas as horas, Allan e Alex Monteiro, Renata Nitta, Paula Felício, Michele Dechoum, Ana Junqueira, Carla Judice, Patrick Litjens, Rachel Pinheiro, Pedro Silveira, Ana Deckmann, Rafael Raimundo, Sílvia Futada, Carla Dias, Shaula Maíra, Alik Wunder, Horácio Montenegro, Coraci Ruiz, Rodrigo e Tatiana Pinto, Rodrigo e Lara Caruso, Patrícia Duarte, Rodrigo Ferreira, Gustavo Seabra, Rogério Maradona, Alexandre Devecchio e muitos outros, pela amizade há muito iniciada, conversas, incentivo e por tudo que fizemos e vivemos juntos;
- À Miriam, Mariana e Pablo Ibanez, pela amizade, por me acolherem tão bem e me darem todo o apoio necessário quando cheguei a São Paulo;
- Aos grandes amigos do laboratório de outrora, Gonçalo Pereira, Anderson Cunha, Ana Paula Demasi, Fernanda Piza, Odalys Cabrera e Eliane Dias, pelas conversas, discussões e por sempre me ajudarem em tudo que precisei;
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro fornecido para a realização desse trabalho (processo 02/13125-1).

ABREVIATURAS

Ahp1 – alquil hidroperóxido redutase 1 de Saccharomyces cerevisiae

Ahp1 Se-Met – Ahp1 com incorporação de seleno-metionina

AhpC – componente C (peroxidase) de alquil hidroperóxido redutase de Salmonella typhimurium

ATZ – 3-amino 1,2,4-triazol

CCP4 – Collaborative Computational Project, number 4

Ctal – isoforma peroxissomal de catalase de S. cerevisiae

Ctt1 – isoforma citosólica de catalase de *S. cerevisiae*

Cu-OOH - hidroperóxido de cumeno

Cys-S_p**H** – cisteína peroxidásica

 $Cys-S_rH$ – cisteína de resolução

DTT – 1,4-dithiothreitol

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

ESI-Q-Tof – electrospray ionization quadrupole Time-of-flight

FOX – ferrous oxidation xylenol orange

GFP – green fluorescent protein

GPx – glutationa peroxidase

GSH – glutationa reduzida

GSSG – glutationa oxidada

 H_2O_2 – peróxido de hidrogênio

HRP – horseradish peroxidase

IPTG - *isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside*

LB – Luria-Bertani

LNLS – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

Loa-OOH – hidroperóxido de ácido linoléico

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NMR – ressonância magnética nuclear

NO[•] – radical óxido nítrico

 $\mathbf{O_2}^{\bullet}$ – radical ânion superóxido

OD₆₀₀ – densidade óptica em 600nm

OH[•] – radical hidroxila

Ohr – organic hydroperoxide resistance

PBS – phosphate-buffered saline

PCR – *polymerase chain reaction*

PDB – protein data bank

PEG – polietileno glicol

PhGPx – glutationa peroxidase de hidroperóxidos de fosfolipídios

Prx – peroxirredoxina

Prx1 ou mTPx – isoforma mitocondrial de peroxirredoxina de *S. cerevisiae*

SDS-PAGE – gel de eletroforese de poliacrilamida/SDS

Sod – superóxido dismutase

Srx – sulfirredoxina

t-BOOH – hidroperóxido de *tert*-butila

T-PBS – PBS com a adição de TWEEN20

TPx – tiorredoxina peroxidase

Trr - tiorredoxina redutase

Trx – tiorredoxina

Tsa1 – *thiol specific antioxidant* 1 de *S. cerevisiae*

Tsa1 C47S – Tsa1 com a substituição da Cisteína 47 por Serina

Tsa2 – *thiol specific antioxidant* 2 de *S. cerevisiae*

X-Gal – 5-bromo 4-chloro 3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

YBL064c - gene que codifica Prx1

YPD – Yeast extract-Peptone-Dextrose

I – Introdução	9
I.1 – A vida em ambientes aeróbicos	9
I.2 – Estresse oxidativo e defesas anti-oxidantes	
I.3 – Peroxirredoxinas e Tiorredoxina Peroxidases	
II – Objetivos	
III - Materiais e Metodologia	41
IV – Resultados	
IV.1 – Caracterização bioquímica de Ahp1	
IV.2 – Caracterização estrutural de Ahp1 e Tsa1	71
IV.3 – Regulação Gênica	
V – Discussão	
V.1 – Caracterização bioquímica de Ahp1	
V.2 – Biologia molecular estrutural	
V.3 – AHP1: Regulação gênica e relações com catalase	
VI – Conclusões	
VII – Resumo	
VIII - Abstract	
IX – Anexos	
X – Referências Bibliográficas	

I – INTRODUÇÃO

I.1 – A vida em ambientes aeróbicos

A maioria dos organismos existentes no planeta vive em um ambiente com alta tensão de oxigênio (cerca de 20% na atmosfera) e utiliza este elemento químico como aceptor de elétrons em uma série de reações oxidativas celulares. O oxigênio recebe elétrons de várias reações químicas que envolvem a oxidação de biomoléculas, como carboidratos, aminoácidos e lipídios. Seu papel é destacado como aceptor final dos elétrons transportados pela cadeia respiratória mitocondrial, onde cada molécula recebe um total de quatro elétrons e se converte em água. Sua participação também é relevante no processo de β -oxidação de ácidos graxos e em reações oxidativas peroxissomais.

A produção de ATP nas mitocôndrias através do processo de fosforilação oxidativa tem relação íntima com o fluxo de elétrons via cadeia transportadora, pois depende do bombeamento de prótons para o espaço intermembranas, o que é realizado ao longo da cadeia. Devido ao alto ganho energético atingido por meio da fosforilação oxidativa, em comparação com a fermentação (36 contra duas moléculas de ATP formadas, a partir de uma molécula de glicose oxidada), ao longo da evolução houve uma pressão seletiva favorável a organismos com o metabolismo aeróbico, ainda que, em decorrência disso, estes corram o risco de um desbalanço *redox*, conforme se verá a seguir.

A cadeia de transporte de elétrons, ou cadeia respiratória, localizada, em sua maior parte, na membrana interna da mitocôndria, consiste em uma série de moléculas espacialmente arranjadas de acordo com o seu potencial redutor. Assim, quanto mais afastados do início da cadeia, os compostos apresentam maior eletronegatividade, ou seja, um maior potencial de receber elétrons, sendo, consequentemente, reduzidos. O oxigênio recebe quatro elétrons provenientes principalmente dos complexos I-IV e se reduz gerando água (Faxén *et al.*, 2005) (Fig. 1).



Figura 1. Esquema da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Elétrons provenientes da rede de reações oxidativas celulares entram na cadeia em diferentes pontos: via complexo I (ou complexo NADH desidrogenase) e complexo II (ou complexo succinato desidrogenase), além daqueles oriundos do catabolismo de ácidos graxos e de glicerol 3-fosfato são transferidos para ubiquinona (Q); a ubiquinona, por ser bastante hidrofóbica, desloca-se na membrana interna da mitocôndria e "entrega" os elétrons para o complexo III (ou complexo citocromo c (C) é uma proteína solúvel no espaço intermembranas e carrega os elétrons para o complexo IV (ou complexo citocromo oxidase), onde ocorre a transferência para o aceptor final, o oxigênio, com a geração de água.

Entretanto, cerca de 0.1% a 4% do total de oxigênio consumido por uma mitocôndria ativa não chega a ser completamente reduzido até água. Quando isto acontece, são geradas as chamadas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), que nada mais são, portanto, que moléculas intermediárias, ou subprodutos, do processo de redução completa do oxigênio (Winyard *et al.*, 2005) (Fig. 2).

Na cadeia respiratória existem algumas etapas de possíveis vazamentos de elétrons, os quais interagem com o oxigênio formando EROs. Por exemplo, o fluxo de elétrons do complexo I para ubiquinona (através do intermediário semiquinona) e a passagem de elétrons de ubiquinol (QH₂) para o citocromo b_L , através do complexo III, são sítios potenciais de formação de radical ânion superóxido (Valko *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2004; Turrens, 2003).



Figura 2. Intermediários da redução incompleta de oxigênio. O oxigênio molecular pode receber espontaneamente um elétron (por exemplo, do radical semiquinona – QH[•]), gerando o radical ânion superóxido $(O_2^{-\bullet})$. Por sua vez, o radical ânion superóxido pode receber, por diferentes meios (ver texto), mais um elétron, convertendo-se em peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Este, embora não muito reativo, também pode ser reduzido em radical hidroxila (OH[•]), ao receber mais um elétron. O radical hidroxila, altamente reativo, é finalmente reduzido a água quando recebe o quarto elétron.

EROs consiste em uma denominação genérica para substâncias derivadas do oxigênio e que possuem alta toxicidade, por poderem ser convertidas ao radical hidroxila (OH[•]), uma das espécies químicas com maior reatividade. Conforme dito, EROs são geradas a partir do escape de elétrons da cadeia respiratória, além de também serem formadas como subprodutos de diversas reações oxidativas celulares. Muitas EROs são radicais livres, ou seja, compostos caracterizados por possuírem elétrons desemparelhados em alguns de seus orbitais moleculares, o que os torna quimicamente instáveis. Alguns radicais livres, no entanto, não são muito reativos [como óxido nítrico (NO[•]) e radical ânion superóxido (O₂[•])] (Hallywell e Gutteridge, 1989). Outras EROs estão substâncias não-radicalares, como H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) e ${}^{1}O_{2}$ (oxigênio singlete), os quais apresentam a potencialidade de gerarem radicais livres de alta reatividade (OH[•]) quando interagem com outros compostos, ou pela ação direta de luz UV. Como exemplos de reações químicas envolvendo EROs, o radical ânion superóxido $(O_2^{-\bullet})$, naturalmente gerado pelo metabolismo aeróbico, sofre uma reação de dismutação, espontaneamente ou por meio de catálise enzimática (via superóxido dismutase – Sod):

$$O_2^{-\bullet} + O_2^{-\bullet} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$
 (Reação de dismutação de $O_2^{-\bullet}$)

O radical ânion superóxido pode também reagir com uma molécula de H_2O_2 , em uma reação catalisada por metais e que gera o radical hidroxila (reação de Haber-Weiss):

 $O_2^{-\bullet} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{\bullet} + OH^{-}$ (Reação de Haber-Weiss)

O radical hidroxila, uma vez formado, pode oxidar virtualmente todos os tipos de biomoléculas, incluindo proteínas, DNA e lipídios, dependendo bastante do sítio original onde elas foram formadas. Por exemplo, se um radical hidroxila for formado na membrana celular, seus danos diretos ao DNA serão nulos, uma vez que ele reagirá quase que instantaneamente com algum outro composto nas adjacências (Hallywell e Gutteridge, 1989).

Uma outra forma de geração de radical OH^{\bullet} é a reação de Fenton, que envolve H_2O_2 (um composto não-radicalar), metais de transição (como Fe⁺² ou Cu⁺²) e oxigênio:

 $H_2O_2 + Fe^{+2}$ → complexos intermediários → $Fe^{+3} + OH^- + OH^-$ (Reação de Fenton).

A reação de Fenton é importante fisiologicamente, pois envolve ferro, um átomo presente como co-fator em uma série de proteínas celulares e ao qual os organismos são constantemente expostos a partir de diferentes fontes, como a poluição atmosférica.

Um outro exemplo possível de geração de EROs, que envolve H_2O_2 , é a fissão homolítica de uma molécula deste composto, o que, na presença de luz UV, pode gerar radical hidroxila (Hallywell e Gutteridge, 1989):

 $H_2O_2 + (luz UV) \rightarrow 2OH^{\bullet}$ (Reação de fissão homolítica de H_2O_2)

Óxido nítrico (NO[•]), uma molécula radicalar gasosa, normalmente produzida por células de organismos procariotos e eucariotos, e que está presente no ar e no solo, pode originar uma série de compostos reativos, chamados de Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs), através de uma química complexa. Por exemplo, a reação de NO[•] com o radical ânion superóxido, gera peroxinitrito (ONOO[•]), um composto bastante instável e prontamente reativo:

$$NO^{\bullet} + O_2^{-\bullet} \rightarrow ONOO^{-\bullet}$$

Peroxinitrito é capaz de causar danos diretos a biomoléculas, como a iniciação de peroxidação lipídica, a oxidação de bases do DNA como a guanina (8-oxoguanina), ou ainda ocasionando nitrações em resíduos de tirosina em proteínas, e no DNA, através de subprodutos de sua decomposição, os radicais dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet}), carbonato (CO_3^{\bullet}) e OH[•] (Augusto *et al.*, 2002; Radi, 2004; Niles *et al.*, 2006).

I.2 – Estresse oxidativo e defesas anti-oxidantes

Um eventual acúmulo anormal de EROs perturba o estado *redox* no meio intracelular, gerando um quadro de estresse oxidativo. Tal situação pode ser decorrente, por exemplo, de exposição à luz UV, compostos oxidantes e a altas tensões de oxigênio, e estão relacionadas com quedas nos níveis do arsenal de defesas anti-oxidantes que as células dispõem para lidar com esses problemas. Diversos processos celulares estão relacionados com o desbalanço *redox* causado por EROs, entre eles diferenciação, regulação gênica, envelhecimento e apoptose. Em humanos, diversas doenças neuro-degenerativas, diabetes, distrofia muscular, processos inflamatórios e câncer já foram relacionados com a ação de EROs (Stadtman, 1990 e 1992; Melov *et al.*, 2000; Toren e Holbrook, 2000).

Ao longo da evolução, as células aeróbicas desenvolveram uma grande variedade de mecanismos anti-oxidantes envolvidas com a manutenção da homeostase de seu estado *redox*, que são preferencialmente utilizados em resposta a estímulos distintos. O sistema de defesa anti-oxidante pode ser dividido em três categorias:

 Quelantes de metais de transição como ferro e cobre, que previnem a formação de EROs ao impedir a participação desses metais em reações oxidativas (como a de Fenton). Neste grupo estão metalotioneína, ceruloplasmina, ferritina, transferrina e deferoxiamina;

- 2) Compostos de baixo peso molecular e enzimas anti-oxidantes, que reagem com EROs diretamente após sua formação, antes que haja danos a biomoléculas. Nesta classe destacam-se a glutationa; o ascorbato (vitamina C) e o α-tocoferol (vitamina E), cujas ausências na dieta são bastante sentidas e nocivas para seres humanos; a superóxido dismutase (Sod), já mencionada; as catalases, quase sempre restritas ao ambiente peroxissomal, onde ocorrem diversas reações oxidativas; as glutationa peroxidases (GPx) e as peroxirredoxinas (Prx), objeto desse estudo;
- Sistemas de reparo a biomoléculas, como DNA (cujos sistemas de reparo são mais bem conhecidos), lipídios (glutationa peroxidase de hidroperóxidos de fosfolipídios – PhGPx) e também proteínas (metionina sulfóxido redutase) (Sies, 1993; Netto, 2001).

Uma característica importante dos sistemas de defesa, em especial no que diz respeito às enzimas anti-oxidantes, é a aparente redundância de funções entre os componentes. Por exemplo, há mais de uma enzima capaz de remover H_2O_2 , como catalases, glutationa peroxidases e Prxs. A expressão dos genes que as codificam é, muitas vezes, ativada em resposta aos mesmos estímulos, o que equivale a dizer que, quando na presença de níveis elevados de H_2O_2 , as células aumentam a produção de diferentes enzimas envolvidas com a remoção deste composto. Ainda que em muitas situações fisiológicas as funções destas proteínas possam ser efetivamente sobrepostas, a discriminação de eventuais papéis específicos de cada uma delas é questão desafiadora, embora de difícil execução.

Não obstante sua toxicidade, EROs como H_2O_2 também são produzidas e utilizadas por células de mamíferos como molécula mediadora de respostas diversas, como diferenciação e proliferação. A atividade de uma série de enzimas pode ser regulada de maneira dependente do estado *redox* de resíduos de cisteína específicos, como será abordado oportunamente. Esses aspectos da ação de EROs vêm sendo consolidados nos últimos anos e geraram o paradigma da sinalização *redox* de processos celulares normais e de progressão de doenças, como angiogênese, envelhecimento e câncer (Rhee, 2006).

I.2.1 – Glutationa

A glutationa, conhecida como GSH (em sua forma reduzida), é um tripeptídeo (γ glutamil cisteinil glicina), amplamente reconhecido como um dos mais relevantes compostos tiólicos presentes nos sistemas biológicos. A glutationa está presente em todas as células, onde é mantida em concentrações extraordinárias da ordem de milimolar (10⁻³ M) e constitui o principal tampão *redox* existente nas células. Suas funções biológicas estão centradas no grupamento tiól (-SH) presente na cadeia lateral da cisteína, o qual passa por repetidos ciclos de oxidação e redução. Dessa forma, a glutationa alterna-se entre estado reduzido (GSH), em que o tiól se encontra na forma de sulfidrila livre (SH), e o estado oxidado (GSSG), em que os tióis de duas moléculas de glutationa condensam-se na forma de uma ligação dissulfeto (S-S).

Em razão dos altos níveis presentes nas células, mudanças nas concentrações do par GSH/GSSG em geral refletem alterações relevantes no ambiente *redox* intracelular. Normalmente, os níveis de GSH são de 10 a 100 vezes superiores aos de GSSG (Filomeni *et al.*, 2002), o que está de acordo com o fato de o ambiente intracelular ser redutor. Quando os níveis de GSSG aumentam em relação aos de GSH, acredita-se que as células se encontrem em um estado de desbalanço *redox*, ou estresse oxidativo. Diferentes estudos mostraram que alterações na razão GSH/GSSG estão relacionadas com processos celulares diversos, como a transdução de sinais, regulação da transcrição, regulação do ciclo celular e apoptose (Filomeni *et al.*, 2002). Além disso, condições ambientais específicas, como a presença de metais pesados (Woods e Ellis, 1995), altas concentrações de glicose no meio (Urata *et al.*, 1996) ou choque térmico (Kondo *et al.*, 1993), são conhecidas por alterarem os níveis intracelulares de

GSH, assim como a presença de EROs, como H_2O_2 ou NO[•], que induzem a síntese *de novo* de GSH (Rahman *et al.*, 1996; Moellering *et al.*, 1999).

Apesar de a maior parte de glutationa presente nas células estar na forma reduzida, uma fração dela se encontra ligada em ligações dissulfeto com tióis de diferentes compostos, como coenzima A, cisteína e resíduos de cisteína de proteínas, em um processo conhecido por glutationilação (Klatt e Lamas, 2000). As funções de muitas proteínas cujas atividades dependem de resíduos de cisteína podem ser moduladas dessa forma (Demasi *et al.*, 2003). A glutationilação muitas vezes causa inativação de enzimas, podendo alterar suas estruturas tridimensionais e perda de função. Tal ligação é reversível e pode ter um papel importante por prevenir a super-oxidação de resíduos de cisteína em situações de estresse oxidativo.

Um outro aspecto das funções desempenhadas pela glutationa nas células é a sua participação, por exemplo, dos ciclos catalíticos das reações catalisadas pelas glutationa peroxidases, que estão envolvidas com a remoção de hidroperóxidos:

$$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GS-SG + 2H_2O$$

GPx

Glutarredoxinas (Grx), que são oxido-redutases mono ou ditiólicas de baixo peso molecular, também dependem de glutationa para manutenção de seus ciclos catalíticos, pois, ao longo deles, são oxidadas (Fernandes e Holmgren, 2004). Grx catalisam a redução de ligações dissulfeto e a deglutatiolação (redução de dissulfetos mistos) de uma série de proteínas, como RNase e Prxs (Rouhier *et al.*, 2001), de maneira dependente de glutationa:

$$\begin{array}{c} \text{RS-SG} + \text{GSH} \xrightarrow{\rightarrow} \text{GS-SG} + \text{RSH} \\ \text{Grx} \end{array}$$

O papel de glutationa nessas reações é o de doador de elétrons para a redução do hidroperóxido (reação de GPx) ou do dissulfeto misto com glutationa (reação de Grx). Ao fazer isso, a glutationa é oxidada na forma GS-SG e pode ser reduzida novamente por ação da

enzima glutationa redutase (Grr), às custas de NADPH. Essa reação é importante por estar envolvida com a manutenção da razão GSH/GSSG em níveis controlados, embora a síntese *de novo* de GSH seja predominante em muitos casos:

$$GS-SG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$$

Grr

Finalmente, a glutationa também reage diretamente com EROs, como OH[•] e peroxinitrito, cooperando com enzimas anti-oxidantes na remoção de compostos danosos (Hallywell e Gutteridge, 1989). Além disso, GSH participa de processos de detoxificação de pesticidas, drogas e compostos xenobióticos, em conjunto com a enzima glutationa transferase. Essas enzimas catalisam a conjugação de compostos não-polares que contêm átomos eletrofílicos de carbono, nitrogênio ou enxofre, à glutationa reduzida:

$RX + GSH \rightarrow X-SG + RH$, onde RX representa o composto xenobiótico. Gst

Em conjunto, esses exemplos ilustram a variedade dos processos celulares e reações bioquímicas nos quais a glutationa participa. Como o tiól não-protéico mais abundante das células, possui uma ação versátil em conjunto com outras defesas anti-oxidantes na manutenção da homeostase *redox* celular.

I.2.2 – O sistema Tiorredoxina

Tiorredoxina (Trx) é uma pequena proteína (~ 11kDa) termo-estável amplamente distribuída entre procariotos e eucariotos, e que, assim como a glutationa, desempenha variadas funções celulares. A levedura *S. cerevisiae* possui duas isoformas citosólicas (Trx1 e Trx2) e uma isoforma exclusivamente mitocondrial (Trx3). Trxs caracterizam-se por possuírem dois resíduos vicinais de cisteína, cujos grupos tiólicos se alternam entre as formas reduzida (SH) e oxidada (S-S), e possuem um papel determinante na manutenção do estado *redox* de tióis de diversas proteínas. Enquanto a glutationa está presente em concentrações milimolares nas células, Trxs são encontradas em concentrações cerca de mil vezes menores. Elas são enzimas que catalisam reações de oxido-redução de ditióis-dissulfetos, protegendo proteínas contra a formação de pontes dissulfeto intra ou intermoleculares não-desejadas, que podem gerar inativação ou agregação protéica. Assim, um aspecto da ação de Trx nas células é semelhante ao de uma chaperona (Powis *et al.*, 1997):

 $Prot_1 S-S Prot_2 + Trx (SH)_2 \rightarrow Prot_1 SH + Prot_2 SH + Trx S-S$

Prot S-S + Trx (SH)₂ \rightarrow Prot (SH)₂ + Trx S-S

Em ambos os exemplos, Trx reduz pontes dissulfeto em substratos, tendo, porém, seus próprios grupos tióis oxidados na forma de dissulfeto. Para poder doar elétrons a um novo substrato, a forma reduzida de Trx, i.e., com as sulfidrilas livres, precisa ser regenerada, o que é catalisado pela enzima Tiorredoxina Redutase (Trr), uma flavo-enzima, às custas de elétrons doados por NADPH. Em conjunto, Trx, Trr e NADPH compõem o que se chama de sistema Tiorredoxina (sistema Trx):

Trx S-S + NADPH + $H^+ \rightarrow Trx (SH)_2 + NADP^+$ Trr

A importância do sistema Trx para as células é enfatizada por sua participação em processos diversos. Por exemplo, Trx funciona como doador de elétrons para a enzima ribonucleotídeo redutase, responsável por converter ribonucleotídeos em desoxiribonucleotídeos, tendo, assim, importância fundamental no processo de síntese de DNA (Holmgren, 1989). Trx também é doadora de elétrons da enzima metionina sulfóxido redutase, que é responsável por reduzir sulfóxidos em resíduos oxidados de metionina, sendo portanto relevante no processo de reparo de proteínas. Em outro aspecto, Trx participa da regulação da expressão gênica, por modular a atividade e localização intracelular de fatores de transcrição sensíveis ao estado *redox* de cisteínas, como os conhecidos NF- *k*B , p53 e AP-1 de células de mamíferos (revisão em Arner e Holmgren, 2000). O sistema Trx também tem um papel de relevância ao participar do ciclo catalítico de peroxidases da família das Prx, conforme se verá a seguir.

Todas as Trxs conhecidas possuem uma organização espacial semelhante, uma estrutura tridimensional que se convencionou chamar de enovelamento Trx (do inglês, Trx *fold*). Esse enovelamento característico consiste em uma seqüência de folhas β flanqueadas por α -hélices espacialmente arranjadas (Fig. 3):



Figura 3. Modelos estruturais do enovelamento Trx e de Tiorredoxina. Em primeiro plano é apresentada a representação do arranjo de folhas β (amarelo) e α -hélices (azul) que constitui o enovelamento Trx mínimo. Abaixo, é mostrado um modelo tridimensional de Trx de humanos. Em vermelho (à esquerda) são destacados os resíduos de cisteína componentes do sítio ativo (C32 e C35). Figura extraída de Qi e Grishin (2005).

O enovelamento Trx está presente em uma série de proteínas com funções bioquímicas diversificadas (Martin, 1995; Copley *et al.*, 2004). Tal grupo de proteínas, que contêm um ou mais enovelamentos Trx por molécula, constitui a superfamília Trx. Esta inclui as próprias Trxs, PDI (proteína dissulfeto isomerase), DsbA (proteínas tipo PDI de bactérias) e glutarredoxinas, todas enzimas envolvidas com reações de troca tiól-dissulfeto; glutationa transferases; calsequestrinas, que são proteínas ligantes de cálcio; glutationa peroxidases e Prxs, que removem hidroperóxidos. Trx, Grx, PDI e DsbA possuem um motivo CxxC conservado em seus sítios ativos, e dependem dos resíduos de cisteína para suas atividades bioquímicas. Curiosamente, não obstante tal semelhança, em geral não se observa grande

similaridade quando se compara as seqüências de aminoácidos das proteínas da superfamília Trx (Martin, 1995; Copley *et al.*, 2004).

I.3 – Peroxirredoxinas e Tiorredoxina Peroxidases

A família das Peroxirredoxinas (Prx) constitui um dos componentes do sistema de defesas anti-oxidantes descritas, sendo amplamente distribuídas entre procariotos e eucariotos. Prx são peroxidases dependentes de tióis envolvidas com a remoção de diferentes tipos de hidroperóxidos presentes nas células. Recentemente foi demonstrado que algumas Prxs têm atividade de peroxinitrito redutase (Bryk *et al.*, 2000; Dubuisson *et al.*, 2004), estando também envolvidas, assim, com a remoção deste composto. Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, existem cinco isoformas de Prx, distribuídas em diferentes compartimentos celulares: Tsa1 (ou cTPxI), Tsa2 (ou cTPxII) e Ahp1 (ou cTPxIII) (citosol); Prx1 (ou mTPx) (mitocôndria) e nTPx (núcleo) (Park *et al.*, 2000). Em mamíferos, são conhecidas seis isoformas de TPx, também localizadas em diferentes organelas (PrxI - VI) (Wood *et al.*, 2003a). Exemplos de moléculas que são alvos da ação de Prx são apresentados na Figura 4:



Peróxido de hidrogênio



tert-butil hidroperóxido

C - of

Cumeno hidroperóxido



 $0 = N - 0 - 0^{-1}$



Hidroperóxido de lipídio

Figura 4. Exemplos de substratos de Prx *in vivo* e *in vitro*. H_2O_2 e peroxinitrito são substratos inorgânicos; cumeno hidroperóxido (Cu-OOH) e *t*-butil hidroperóxido (*t*-BOOH) são hidroperóxidos orgânicos comumente utilizados em ensaios enzimáticos *in vitro*; um hidroperóxido de lipídio genérico é mostrado como exemplo de substrato orgânico existente *in vivo*.

A primeira proteína dessa família a ser identificada foi inicialmente chamada de "proteína protetora", por apresentar a capacidade de proteger a enzima glutamina sintetase (GS) de inativação causada por sistemas de oxidação catalisada por metais (sistema tiol/Fe⁺³/O₂ ou MFO), na presença de tióis, mas não na de doadores de elétrons não-tiólicos, como ascorbato (Kim *et al.*, 1988). Por essa razão, a proteína protetora isolada de extratos protéicos de leveduras, que não apresentava atividade de superóxido dismutase nem de catalase, foi nomeada Tsa1 (*Thiol-Specific Antioxidant*), também chamada de cTPxI. O sequenciamento do gene que codifica Tsa1 mostrou ausência de similaridade com outros genes anti-oxidantes conhecidos na época (Chae *et al.*, 1993), enquanto que a seqüência de aminoácidos (195 resíduos) revelou a presença de duas cisteínas (Cys47 e Cys170). Quando estas cisteínas foram mutadas independentemente por serinas, verificou-se que apenas a mutação C47S abolia completamente a atividade peroxidásica dessa enzima (Chae *et al.*, 1994b). Todas as Prx identificadas até hoje possuem pelo menos um resíduo de cisteína diretamente envolvido com a redução do substrato, o qual está sempre localizado na porção N-terminal de suas cadeias, chamado de cisteína peroxidásica (Cys-S_pH).

Sabe-se hoje que as Prx previnem também danos a outras biomoléculas (além de glutamina sintetase), degradando hidroperóxidos quase sempre à custa de um agente redutor que contenha tióis. A reação genérica a seguir exemplifica a atividade peroxidásica mediada pelas Prx:

$$2R_1SH + R_2OOH \rightarrow R_1S-SR_1 + R_2OH + H_2O,$$

Prx

onde R₁SH representa o agente redutor que contém tióis (SH) (por exemplo, DTT), enquanto que R₂OOH representa o hidroperóxido. A reação gera a forma oxidada do agente redutor (R₁S-SR₁), o álcool correspondente a R₂ (R₂OH) e H₂O. No caso de R₂OOH ser H₂O₂, ocorre formação de duas moléculas de água (Netto *et al.*, 1996).

A especificidade das Prx para com tióis se deve ao fato de que os grupamentos tióis dos resíduos de cisteína presentes no sítio ativo se oxidam (S-S ou SOH – ácido sulfênico) quando do ataque ao hidroperóxido, não podendo entrar em um segundo ciclo catalítico. O retorno ao estado de sulfidrilas livres é fundamental para um segundo ciclo catalítico, e apenas agentes redutores que contêm tióis (como DTT ou β -mercaptoetanol) são capazes de regenerá-las (Netto *et al.*, 1996). Como exceção à exclusividade por agentes redutores tiólicos, recentemente foi demonstrado que proteínas do grupo de Prx conhecido como 1-Cys Prx (ver adiante) também podem utilizar ascorbato como doador de elétrons para o retorno ao estado ativo (Monteiro *et al.*, 2007). Essa observação, de certa forma, modificou o paradigma que cunhou o nome TSA, uma vez que o uso de ascorbato como agente redutor é conservado de bactérias a mamíferos. No entanto, conforme dito, isso é válido apenas para um conjunto restrito de Prx e não de modo geral para a família Prx. As Prx fazem parte, portanto, do grupo de proteínas cujas atividades enzimáticas dependem do estado *redox* dos tióis de resíduos de cisteínas presentes na região dos sítios ativos.

Estudos pioneiros realizados com Tsa1 de leveduras mostraram que, na presença de Trx, são necessárias menores concentrações de Tsa1 para atingir o mesmo efeito protetor da atividade de glutamina sintetase observado na presença de DTT, ou outro agente redutor (Kwon *et al.*, 1994; Chae *et al.*, 1994a). Nesses ensaios, também foram utilizados NADPH e Trr no sistema protetor. Esses trabalhos indicaram que Trx é o doador de elétrons fisiológico de Tsa1, sendo responsável pela regeneração de suas sulfidrilas livres. Por isso, as Prx que apresentam essa mesma característica (utilizar Trx como doador de elétrons) constituem uma subfamília, sendo também chamadas de Tiorredoxina Peroxidases (TPx). A substituição da cisteína 170 de Tsa1 por serina inibe o efeito estimulatório de Trx, mas não a atividade enzimática na presença de DTT, o que sugere que Cys170 seja responsável pela interação de Tsa1 com Trx (Netto *et al.*, 1996). Fig. 5 apresenta um modelo do ciclo catalítico das TPx aceito atualmente, enfatizando o papel fundamental de Trx para regeneração de Trx reduzida.



Figura 5: Modelo do ciclo catalítico das TPx - Sistema Tiorredoxina/Tiorredoxina Redutase. 1) Reação peroxidásica de TPx, gerando o álcool correspondente ao radical do hidroperóxido (R) e água. Nessa etapa, as sulfidrilas de TPx são oxidadas formando dissulfetos [forma TPx (S-S)]. 2) Regeneração das sulfidrilas livres de TPx através da oxidação de Trx (SH)₂ (tiorredoxina reduzida), gerando Trx (S-S). TPx retorna à forma TPx (SH)₂, que pode retornar à etapa 1. **3-** Regeneração enzimática das sulfidrilas de Trx, retornando esta à forma reduzida, através da enzima TRR (tiorredoxina redutase) e à custa de elétrons cedidos por NADPH. Trx (SH)₂ pode então retornar à etapa 2.

As reações enzimáticas de todas as Prx conhecidas envolvem a oxidação por peróxidos do resíduo Cys-S_pH, localizado nas regiões N-terminais das proteínas (revisão em Wood *et al.*, 2003a). As formas de sulfidrilas livres dos grupamentos tióis de cisteínas livres não são reativas, pois, devido ao seu pK_a ser de cerca de 8.5, em pH fisiológico elas se encontram normalmente protonadas (Cys-SH). No entanto, as Prx apresentam características estruturais que geram, nas regiões de seus sítios ativos, micro-ambientes peculiares em que a forma reativa de tiolato (S⁻) é estabilizada, estando, assim, disponível para o ataque ao hidroperóxido (Wood *et al.*, 2003b; Netto *et al.*, 2006 – Anexo I). Entre tais características, é digno de nota o fato de que todas as Prx possuem um resíduo de arginina e outro de treonina (em alguns casos de serina) conservado no sítio ativo, formando uma tríade (Thr-Cys-Arg) que estabiliza a forma tiolato da Cys-S_pH (Flohé *et al.*, 2002).

Após o primeiro ataque à Cys-S_pH por hidroperóxidos, esta se torna oxidada na forma de ácido sulfênico (Cys-S_pOH). A segunda etapa das reações consiste na redução do ácido sulfênico formado e distingue os membros da família em pelo menos três subclasses. O mecanismo de resolução utilizado pela subclasse à que pertence Tsa1, as 2-Cys típicas (ver Tabela 1), envolve o segundo resíduo de cisteína presente em sua cadeia, localizado na região C-terminal. Esse resíduo é chamado de cisteína de resolução (Cys-S_rH) e reage com Cys-S_pOH de uma molécula adjacente, formando uma ponte dissulfeto intermolecular estável. Tsa1 é, portanto, um homodímero obrigatório, com dois sítios ativos idênticos. Logo, a Cys-S_pH de uma molécula reage com a Cys-S_rH de outra e vice-versa. As pontes dissulfeto formadas são então reduzidas por ação da Trx (no caso das TPx), reciclando a Prx para um novo ciclo catalítico (Wood *et al.*, 2003a).

A segunda subclasse de Prx é a das 2-Cys atípicas, que apresentam um mecanismo de reação parecido com o apresentado acima, com a exceção de que não formam pontes dissulfeto intermoleculares, mas sim intramoleculares. Nessas enzimas, tanto a Cys-S_pH como a Cys-S_rH pertencem à mesma cadeia de polipeptídeos.

A terceira subclasse de Prx constitui as 1-Cys, que possuem apenas o resíduo de Cys-S_pH. O ácido sulfênico formado pelo ataque ao peróxido, como já mencionado, pode ser reduzido por ascorbato (Monteiro *et al.*, 2007) e também por agentes redutores que contenham tióis. No entanto, apenas no caso da Prx de mitocôndrias de *S. cerevisiae* (Prx1) tal redutor fisiológico foi identificado como sendo uma isoforma exclusivamente mitocondrial de tiorredoxina (Trx3) (Pedrajas *et al.*, 1999). Mais recentemente, foi sugerido que PrxVI de humanos forme um heterodímero *in vivo* com GST, e que tal dímero seja capaz de reduzir peróxidos utilizando glutationa como agente redutor (Manevich e Fisher, 2005). Um esquema dos ciclos catalíticos de Prxs das três subclasses descritas acima é apresentado na Fig. 6.



Figura 6. Esquema dos ciclos catalíticos de Prxs 2-Cys típicas, 2-Cys atípicas e 1-Cys. Após o ataque da cisteína peroxidásica (S_pH) ao hidroperóxido (ROOH), o ácido sulfênico (S_pOH) formado neste resíduo é resolvido com a formação de uma ligação dissulfeto intermolecular com o resíduo da cisteína de resolução (S_rH) de uma molécula adjacente. O dissulfeto é posteriormente reduzido por ação de uma dissulfeto redutase, representada aqui como Trx (tiorredoxina). No caso das Prxs do tipo 2-Cys atípicas (como PrxV de humanos), antes do ataque ao hidroperóxido os dois resíduos de cisteína são potencialmente capazes de funcionar como cisteínas peroxidásicas. O ácido sulfênico gerado em um deles é resolvido com a formação de uma ligação dissulfeto intramolecular com o outro resíduo de cisteína da mesma molécula. No caso das Prxs do tipo 1-Cys, o ácido sulfênico gerado no resíduo de cisteína após o ataque ao hidroperóxido diretamente por intermédio do agente redutor, representado aqui como Trx (caso de leveduras).

Uma outra forma de classificar Prxs é pela similaridade de suas seqüências, conforme proposto por Trivelli e col. (2003). Resíduos conservados nas regiões dos sítios ativos das proteínas permitem classificá-las em cinco subclasses (A-E) (Tabela 1). As Prx do tipo A apresentam um segundo resíduo de cisteína conservado nos últimos 30 aminoácidos Cterminais, sempre em um motivo do tipo VCP. Todas as Prx dessa subclasse são do tipo 2-Cys típicas. As Prx do tipo B são as 1-Cys, que não possuem esse segundo resíduo de cisteína. Prx do tipo C incluem as BCP (Bacterioferritin Comigratory Proteins) e as PrxQ (como nTPx de leveduras) (Kong et al., 2000). Essas proteínas formam pontes dissulfeto intramoleculares dentro do motivo N-terminal degenerado CxxxxC. As Prx do tipo D apresentam uma grande heterogeneidade e constituem cerca de 60 proteínas homólogas a cTPxIII ou Ahp1 de leveduras. As Prx do tipo E contêm um segundo resíduo conservado de cisteína, localizado cerca de 40 resíduos após a Cys- S_pH . Essas proteínas são do tipo 2-Cys atípicas, formando um dissulfeto intramolecular para resolução do ácido sulfênico. As Prx do tipo D diferem das outras subclasses por apresentarem grandes diferenças funcionais entre as proteínas. Por exemplo, elas podem reduzir o ácido sulfênico da mesma forma que as 2-Cys atípicas (como PrxV de mamíferos), as 1-Cys (como Prx de bactérias ou plantas) ou como as 2-Cys típicas (como Ahp1 ou cTPxIII de leveduras). Assim, a classificação das Prx por meio de similaridade de seqüência primária parece mais completa do que por meio de características funcionais.

Subclasse	Resolução do ácido sulfênico	Exemplos	Forma Oxidada
Tipo A	2-Cys típicas	Tsa1, Tsa2 (leveduras)	S-S (intermolecular)
		Prx I-IV (humanos)	
Tipo B	1-Cys	mTPx (leveduras)	SOH
		PrxVI (humanos)	
Tipo C	2-Cys atípicas	nTPx (leveduras)	S-S (intramolecular)
		PrxQ (plantas)	
		BCP (bactérias)	
Tipo D	2-Cys típicas	Ahp1 (leveduras)	S-S (intermolecular)
	2-Cys atípicas	PrxV (humanos)	S-S (intramolecular)
	1-Cys	Prx (plantas)	SOH
Tipo E	2-Cys atípicas	TPx (bactérias)	S-S (intramolecular)

Tabela 1: Subclasses de Prxs (adaptado de Trivelli et al., 2003)

I.3.1 – Características estruturais de Prxs

Prxs das diferentes subclasses descritas acima tiveram suas estruturas tridimensionais resolvidas nos últimos anos. Uma característica estrutural comum a todas as Prxs é a presença do enovelamento Trx. Conforme já mencionado, tal motivo não é exclusivo das Prx, sendo também encontrado em uma série de proteínas com funções bioquímicas diversificadas.

Todas as Prxs que tiveram suas estruturas tridimensionais resolvidas foram caracterizadas como homodímeros. No caso de Prxs da subclasse A, também foram descritos complexos oligoméricos de maior peso molecular (decâmeros, por exemplo) (Wood *et al.*, 2002). No entanto, Prxs da subclasse C, como as BCPs (ver Tabela 1) aparentam se organizar como monômeros, conforme sugerido por ensaios bioquímicos *in vitro* (Jeong *et al.*, 2000). Até o momento, não há estruturas tridimensionais disponíveis de Prxs dessa subclasse.

Baseados em comparações de estruturas quaternárias, resíduos dos sítios ativos e motivos estruturais, Copley e col. (2004) propuseram um novo sistema de classificação das Prxs (Copley *et al.*, 2004). Esse sistema é basicamente norteado pela forma através da qual

são organizados espacialmente os dímeros, isto é, como se dão as interações físicas entre os monômeros, além de características específicas dos sítios ativos. Quatro subclasses (Prx 1-4) foram discriminadas (Copley *et al.*, 2004), conforme será exposto a seguir.

As Prxs da subclasse 1 apresentam um motivo conservado em seus sítios ativos e são caracterizadas por serem monômeros em solução (Jeong et al., 2000). Grande parte das proteínas dessa subclasse foram originalmente classificadas como BCPs e, relacionando com a classificação apresentada na Tab. 1, constituem a subclasse de Prxs do tipo C (Trivelli et al., 2003). A subclasse Prx2 é constituída por uma série de proteínas relacionadas às da subclasse 1, com duas diferenças: (1) apresentam um resíduo de serina (S) ou glutamina (Q) ao invés de um resíduo de glutamato (E) no sítio ativo; (2) formam dímeros através de interações chamadas de face-to-edge, ou, traduzindo livremente, interações do tipo face-extremidade. Membros dessa subclasse são, por exemplo, Prxs de E. coli e de Streptococcus pneumoniae. Proteínas da subclasse Prx3 também não apresentam o resíduo de glutamato (E) nos sítios ativos, mas possuem um resíduo de histidina (H) conservado downstream a eles. Prxs 3 também formam dímeros por interações "face-extremidade" entre os monômeros, porém essas diferem daquelas das Prxs 2 tanto estruturalmente quanto em relação aos resíduos envolvidos com a interface dimérica. PrxV de Homo sapiens e Ahp1 de S. cerevisiae são Prxs da subclasse 3 (ver adiante). Finalmente, Prxs da subclasse 4 formam dímeros através de interações denominadas edge-to-edge, ou "extremidade-extremidade", que se dão entre folhas β presentes no Trx *fold* e resultam em uma estrutura de 12 a 14 folhas β em seqüência. Algumas proteínas dessa subclasse formam grandes complexos decaméricos quando oxidadas, como é o caso de AhpC de Salmonella typhimurium (Wood et al., 2002). Além disso, Prxs 4 se caracterizam por possuírem uma grande extensão C-terminal que se projeta em direção do sitio ativo do outro monômero (Copley et al., 2004). Exemplos de Prxs de diferentes subclasses e suas estruturas diméricas são apresentados na Figura 7.



Figura 7. Estruturas quaternárias de três Prxs. a) Prx da subclasse 2 – tiól peroxidase de *S. pneumoniae*; b) Prx da subclasse 3 – Prx V de *H. sapiens*; c) Prx da subclasse 4 – tiorredoxina peroxidase de eritrócitos de *H. sapiens*. Estruturas em azul e vermelho representam cada um dos monômeros. Figura extraída de Copley *et al.*, 2004.

Recentemente foi resolvida por meios cristalográficos a estrutura tridimensional de uma Prx do tipo D (ou da subclasse Prx3 – ver acima) da planta *Populus trichocarpa*, que apresenta uma identidade de 38% na estrutura primária com Ahp1 de *S. cerevisiae* (Echalier *et al.*, 2005). Ahp1, por sua vez, foi objeto de estudos de ressonância magnética nuclear (NMR), que originaram um modelo preliminar de sua estrutura tridimensional em solução (Trivelli *et al.*, 2003). Conforme mencionado anteriormente, Prx de *P. trichocarpa*, assim como PrxV de *H. sapiens*, formam dímeros através de interações do tipo *face-to-edge*, perpendiculares ao plano das folhas β centrais. No caso de Prx de *P. trichocarpa*, os resíduos de aminoácidos que participam da interface dimérica e do sítio ativo, que são bastante conservados entre as Prxs de classe D, foram discriminados e suas topologias determinadas. Esses dados estruturais são importantes, uma vez que, apesar de ter sido determinada a condição dimérica de Ahp1 de modo independente do estado *redox*, não foi obtida a resolução da interface dimérica de Ahp1 (Trivelli *et al.*, 2003).

I.3.2 - Inativação das Prx - superoxidação de Cys-S_pH

É sabido que as Prxs são parcialmente inativadas *in vitro* na presença de em altas concentrações de substrato (Chae *et al.*, 1994a; Netto *et al.*, 1996; Prouzet-Mauléon *et al.*, 2002). Acredita-se que tal inativação se deva à super-oxidação da Cys-S_pH. Após o ataque ao substrato, o ácido sulfênico formado nesse resíduo seria prontamente atacado por outra molécula de peróxido, e não pela Cys-S_rH, levando à formação de ácido sulfínico (Cys-S_pO₂H) ou ácido sulfônico (Cys-S_pO₃H). A formação de um desses dois ácidos poderia impedir a atividade enzimática, uma vez que essas espécies não são reduzidas por DTT ou Trx (Figura 8).



Figura 8. Modelo de inativação de Prxs do tipo 2-Cys típicas por altas doses de peróxido. A cisteína peroxidásica (S_pH) de Prx ataca o hidroperóxido (ROOH) e é oxidada a ácido sulfênico (S_pOH). S_pOH é então atacado pela cisteína de resolução (S_rH), formando um dissulfeto intermolecular. Por meio do sistema Tiorredoxina, o dissulfeto é reduzido, regenerando as sulfidrilas livres (SH) (lado esquerdo do esquema). Se a S_pOH for atacada por outra molécula de hidroperóxido antes de sua resolução por S_rH , seriam formados os ácidos sulfínico (S_pO_2H) ou sulfônico (S_pO_3H) e a enzima seria inativada (lado direito do esquema). Nesse esquema, está representada a formação de apenas uma ponte dissulfeto intermolecular.

Wood e col. (2003b) sugeriram uma distinção funcional entre as Prxs do tipo A (segundo classificação de Trivelli e col. – ver tabela I): as sensíveis à inativação por hidroperóxidos e as robustas ou resistentes (Wood *et al.*, 2003b). Essa dicotomia se deve à observação que algumas Prx são particularmente sensíveis à inativação por doses moderadas de hidroperóxidos (como Tsa1 de leveduras), enquanto que outras, principalmente aquelas presentes em bactérias [como AhpC de *Salmonella typhimurium* (Wood *et al.*, 2003b)], são bastante resistentes, requerendo altas doses de hidroperóxidos para serem inativadas *in vitro*. De acordo com Wood e col., as Prxs sensíveis à inativação possuem características estruturais/catalíticas comuns, que envolvem a organização da extensão C-terminal e de dois motivos conservados, chamados de motivos GGLG e YF (Figura 9). Em contrapartida, as Prxs robustas não apresentam essas características (Wood *et al.*, 2003b; Jönsson *et al.*, 2005).



Figura 9. Modelo tridimensional da região do sítio ativo de Prx2 de *H. sapiens***.** Os motivos GGLG e YF e a proximidade espacial destes para com as cisteínas peroxidásica (Cys51) e de resolução (Cys172) são destacados. Também é destacado o resíduo de Arg127, cujo grupo guanidina interage com Cys51-SO₂H. Figura extraída de Jönsson *et al.*, 2005.

Até pouco tempo atrás, acreditava-se que, uma vez superoxidadas, as Prx tornariam-se irreversivelmente inativas. Entretanto, trabalhos recentes demonstraram que isso não é de todo correto, ao menos não para todas as Prx. Woo e col. (2003) e Chevallet e col. (2003) mostraram por meio de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas que as cisteínas

peroxidásicas superoxidadas a ácido sulfínico de algumas Prx de mamíferos podem ser regeneradas à forma cataliticamente ativa de sulfidrila livre. Posteriormente, foi determinado que, em mamíferos, apenas Prx do tipo 2-Cys típicas (PrxI-IV) podem ser regeneradas da superoxidação (Woo *et al.*, 2005). Curiosamente, essas quatro enzimas apresentam em suas estruturas primárias os motivos GGLG e YF, característicos de Prx sensíveis à inativação por hidroperóxidos (Wood *et al.*, 2003b).

Biteau e col. (2003) identificaram uma nova proteína de *S. cerevisiae* envolvida com a regeneração de Tsa1 e Tsa2 (2-Cys típicas), mas não de Ahp1 (2-Cys atípica), de maneira dependente de ATP. Essa proteína, chamada de sulfirredoxina (Srx), é conservada entre eucariotos e parece se ligar a duas moléculas de Tsa1 superoxidadas, reduzindo o ácido sulfínico formado. A presença de cicloheximida torna esse processo mais lento, indicando que é necessária síntese protéica *de novo* para a sua realização. Nesse trabalho, foi mostrado que após 2 minutos de exposição a H₂O₂, cerca de 90% de Tsa1 se encontra na forma superoxidada; após 30 minutos, ocorre a reversão desse processo, de maneira dependente de Srx, ATP, um cátion bivalente (Mg⁺² ou Mn⁺²) e um ditiol (DTT), de modo que Tsa1 retorna a níveis normais de proteína não-tratada (Biteau *et al.*, 2003). Em células mutantes para o gene *SRX1*, Tsa1 se encontra majoritariamente superoxidada após 90min de tratamento com 0.5mM H₂O₂ (Biteau *et al.*, 2003).

Esse trabalho alterou a forma como se pensava a dinâmica catalítica das Prxs. O fato de que Prxs podem ser reversivelmente inativadas acrescentou um novo nível de regulação de suas atividades, por meio da modificação pós-traducional de seus resíduos de cisteína. Rapidamente, também foi relatada a possibilidade de regeneração de cisteínas oxidadas a ácido sulfínico de proteínas de mamíferos. Proteínas da família das sestrinas (de *H. sapiens*), que são reguladas por p53 e possuem um domínio conservado similar ao encontrado em AhpD da bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, são também capazes de reverter a oxidação em sulfinato (Budanov *et al.*, 2004). Em seguida, foi descoberta uma proteína homóloga a Srx

em humanos, também capaz de reverter a superoxidação de resíduos de cisteína oxidados em ácido sulfínico (Chang *et al.*, 2004).

Conforme já mencionado, apenas Prx do tipo 2-Cys típicas são alvo de ação das Srxs, podendo retornar à forma cataliticamente ativa após serem superoxidadas (Woo et al., 2005). Dois trabalhos com as enzimas PrxI e PrxII de humanos forneceram explicações para essa distinção, apresentando bases bioquímicas e estruturais para tal especificidade (Jönsson et al., 2005; Jeong et al., 2006). Os dois domínios conservados nas proteínas sensíveis à inativação, GGLG e YF, parecem se organizar espacialmente de modo a afastar o resíduo de Cys-SrH do resíduo de Cys-SpH, em uma distância maior que 13Å em hPrxII (Schröder et al., 2000) (ver Fig. 9). A separação espacial entre os dois resíduos de cisteína de hPrxII torna mais provável que o ácido sulfênico formado na Cys-S_pH após o ataque ao substrato reaja com outra molécula de hidroperóxido (gerando ácido sulfínico) antes de ser contactada pela Cys-SrH. O resíduo conservado de Arg127 de hPrxII interage com a Cys51 (Cys-S_pH), de modo a estabilizar o estado oxidado em ácido sulfínico (Jönsson et al., 2005). A ausência dos motivos GGLG e YF nas Prxs resistentes à inativação por hidroperóxidos e a conseqüente maior proximidade entre os dois resíduos de cisteína dessas proteínas faz com que seja mais difícil o ataque repetido de hidroperóxidos à Cys-SpH, e essa é uma explicação provável sobre a resistência de Prx 2-Cys atípicas e 1-Cys à inativação.

I.3.3 – Sinalização celular e atividade de chaperona de Prxs

Apesar de Prxs como Tsa1 de leveduras e PrxI e II de mamíferos serem abundantes no citoplasma das células, podendo constituir até 1% do total de proteínas solúveis, seu papel como peroxidases no ambiente celular é controverso em virtude de duas observações: (1) algumas Prxs são facilmente inativadas por hidroperóxidos ao longo dos ciclos catalíticos (Chae *et al.*, 1994a; Netto *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2002); e (2) Prxs pareciam apresentar eficiências catalíticas para hidroperóxidos relativamente baixas, quando comparadas com

catalases e glutationa peroxidases – cerca de 10 a 1000 vezes menores (Rhee *et al.*, 2005a). Essa segunda observação foi recentemente revisada, quando se mostrou por meio de ensaios de cinética competitiva que as eficiências catalíticas (K_{cat}/K_m) de Tsa1 e Tsa2 de *S. cerevisiae* são da ordem de 10⁷ M⁻¹.s⁻¹, ou seja, equivalentes às de catalases e GPxs (Ogusucu *et al.*, 2007). Outros estudos realizados independentemente por diferentes grupos também mostraram que a reatividade de Prxs com peróxidos é similar a de catalase e glutationa peroxidase (Akerman e Müller, 2005; Parsonage *et al.*, 2005).

Nos últimos anos vem sendo dada atenção especial a um possível papel das Prxs como sensores dos níveis intracelulares de H₂O₂. Esse composto funciona como um sinal que afeta diversas vias de sinalização celular. Por exemplo, proteínas da família das fosfatases de tirosina (PTPs), que estão envolvidas com a transdução de sinais a partir de diferentes moléculas (como insulina), têm suas atividades reguladas por H₂O₂ (Meng *et al.*, 2004; Rhee *et al.*, 2005b). Foi sugerido que as Prxs poderiam funcionar como uma espécie de tampão para a manutenção de níveis de H₂O₂ produzidos pelas células em situações específicas, onde tal condição seria relevante. Isso seria possível em razão da suposta moderada eficiência catalítica das Prxs, aliada com a sua inativação por H₂O₂, a qual é reversível tanto por Srxs, como por sestrinas (revisão em Rhee *et al.*, 2005a).

Recentemente, alguns trabalhos revelaram características novas das Prxs. Em leveduras, foi relatado que Tsa1 e Tsa2 se organizam em grandes complexos oligoméricos de até 1000 kDa, mediante estresse térmico ou quando tratadas *in vitro* com H₂O₂ na presença do sistema Trx, ou quando extraídas de células tratadas com H₂O₂ (Jang *et al.*, 2004). Tais complexos foram elegantemente observados por meio de cromatografia de exclusão molecular, eletroforese em géis nativos e microscopia eletrônica. A formação de estruturas oligoméricas de Tsa1 está diretamente relacionada com a oxidação da Cys-S_pH (Cys47) em ácido sulfínico ou após exposição a choque térmico. Esse processo é reversível e dependente de Srx. Dessa forma, Tsa1 se alterna entre estruturas de baixos e altos pesos moleculares de maneira dependente do estado *redox* de sua Cys-S_pH (Jang *et al.*, 2004). Analogamente, foi demonstrado que PrxI e PrxII de células de mamíferos também se organizam em grandes complexos oligoméricos em células tratadas com H₂O₂ (Moon *et al.*, 2005) ou quando são fosforiladas por quinases dependentes de ciclinas (Chang *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2006), o que indica que tal característica tenha sido especificamente selecionada ao longo da evolução. No último caso, entretanto, aparentemente não há relação entre a oligomerização e a oxidação do resíduo de Cys-S_pH de PrxI humana.

De maneira surpreendente, quando as Prxs se organizam em na forma de complexos oligoméricos de alto peso molecular, elas adquirem uma nova função bioquímica, a de chaperonas moleculares. Por meio desta atividade, Tsa1, Tsa2, PrxI e PrxII são capazes de prevenir com alta eficiência a agregação das enzimas citrato sintase ou malato desidrogenase, que são comumente utilizadas em ensaios de atividade de chaperonas in vitro (Jang et al., 2004 e 2006). No caso de Tsa1 e Tsa2, a aquisição dessa atividade é dependente do estado redox das cisteínas peroxidásicas e está diretamente relacionada com a organização dos complexos de alto peso molecular. Em outras palavras, quando Tsa1 ou Tsa2 se organizam em grandes oligômeros, elas apresentam apenas atividade de chaperonas moleculares, e não mais de tiól peroxidases (Jang et al., 2004). Assim, a dupla função dessas proteínas está ligada com suas habilidades de formar diferentes estruturas quaternárias. Os oligômeros de Tsa1 e Tsa2 são arranjados e desarranjados dependendo da condição fisiológica em que as células se encontram, de maneira dependente de Srx e do sistema Trx. Em suma, essas proteínas desempenham papéis de peroxidases, chaperonas e também de sensores de níveis intracelulares de H₂O₂. Pelo menos nos casos supracitados, a superoxidação de Cys-S_pH parece trazer benefícios para as células, constituindo um exemplo importante de regulação da atividade enzimática por EROs.

I.4 - Ahp1 de S. cerevisiae - Características genéticas e bioquímicas

Ahp1 (ou cTPxIII) de *S. cerevisiae* foi inicialmente identificada em géis bidimensionais como uma proteína cuja expressão foi aumentada em cerca de três vezes quando leveduras foram expostas a 0.4mM de H₂O₂ por 15min (Godon *et al.*, 1998). Em seguida, Ahp1 foi caracterizada independentemente por três grupos (Verdoucq *et al.*, 1999; Jeong *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999b), como uma tiorredoxina peroxidase que não apresenta similaridade significativa com Tsa1. As seqüências de aminoácidos de Ahp1 e Tsa1 são apresentadas na Figura 10.



Figura 10. Alinhamento das seqüências de aminoácidos de Ahp1 e Tsa1. Em realce verde estão representados aminoácidos idênticos; em roxo, substituições de aminoácidos conservativas; em vermelho estão representados os resíduos de cisteína de cada proteína (3 em Ahp1 e 2 em Tsa1); e em amarelo estão representados os domínios GGLG e YF, que serão mencionados no decorrer do texto. Cys62 e Cys47 são as Cys-S_pH de Ahp1 e Tsa1, respectivamente; Cys120 e Cys170 são as Cys-S_rH de Ahp1 e Tsa1, respectivamente. O alinhamento foi feito com o programa *ClustalW*. O alinhamento com o programa *Blast2Seq* indicou ausência de similaridade significativa entre as proteínas.

Ahp1 é codificada pelo *locus* YLR109W e o gene foi nomeado de *AHP1*, para <u>a</u>lquil <u>h</u>idroperóxido redutase (Lee *et al.*, 1999b). Sua deleção acarreta às leveduras maior sensibilidade a diferentes compostos, como *t*-BOOH, diamida (um agente oxidante específico para tióis), metais pesados (como mercúrio) e, em menor nível, H₂O₂ (Lee *et al.*, 1999b; Farcanasu *et al.*, 1999; Nguyên-nhu e Knoops, 2002). Células Δ -ahp1 apresentam defeitos na regulação dos níveis citosólicos de Mn⁺² e no transporte intracelular desse íon (Farcanasu *et*
al., 1999). Uma outra observação importante é que mutantes Δ -ahp1 apresentam níveis maiores de peroxidação lipídica após tratamento com *t*-BOOH e H₂O₂, em comparação com o tipo selvagem (Nguyên-nhu e Knoops, 2002). Além disso, células mutadas para *AHP1* apresentam maior sensibilidade a dietil maleato, um composto oxidante que gera depleção dos níveis de glutationa reduzida (GSH), sugerindo que Ahp1 contribua na defesa celular em situações de desbalanço *redox*.

Ahp1 apresenta três resíduos de cisteínas (Cys31, Cys62 e Cys120), sendo que a mutação C31S (Cys \rightarrow Ser) não causa problemas na atividade de tiorredoxina peroxidase de Ahp1, enquanto que as mutações C62S e C120S a inibem completamente (Jeong *et al.*, 1999). No entanto, a versão mutante C120S é capaz de proteger glutamina sintetase contra a inativação em sistemas de oxidação por metais (DTT/ Fe⁺³/O₂), enquanto que a versão C62S não o é. Dessa forma, definiu-se que a Cys62 é a Cys-S_pH de Ahp1, enquanto que a Cys120 é a Cys-S_rH, envolvida com a interação com Trx. Também foi demonstrado que Ahp1 utiliza de modo similar as duas isoformas citosólicas de Trxs presentes em leveduras (Trx1 e Trx2). Conforme já mencionado, Ahp1 apresenta mecanismo catalítico do tipo das 2-Cys típicas, ou seja, que envolve a formação de uma ponte dissulfeto intermolecular entre Cys62 e Cys120, a qual é reduzida preferencialmente por Trx (Jeong *et al.*, 1999).

Diferentes estudos bioquímicos mostraram *in vitro* que Ahp1 apresenta uma maior especificidade por substratos orgânicos, como *t*-BOOH e Cu-OOH, em comparação com H₂O₂ (Jeong *et al.*, 1999; Prouzet-Mauléon *et al.*, 2002). Entretanto, Park e col. (2000) mostraram que Ahp1 apresenta atividades similares para com esses três peróxidos, embora a atividade enzimática tenha sido determinada em único ponto de concentração dos hidroperóxidos (1mM) (Park *et al.*, 2000). De maneira similar, foi relatada a mesma situação com a TPx nuclear de *S. cerevisiae* (nTPx), isto é, uma "preferência" dessa enzima por substratos orgânicos (Cha *et al.*, 2003). A expressão do gene *AHP1* é fortemente induzida por diferentes hidroperóxidos, tanto orgânicos como inorgânicos (Lee *et al.*, 1999b; Park *et al.*, 2000). Assim como *TSA1*, *AHP1* também é induzido em situação de aerobiose e não é reprimido por glicose (Park *et al.*, 2000). Além disso, a expressão de *AHP1* é elevada em células que se encontram em fase estacionária, condição em que há uma diminuição do pH celular, aumento de peroxidação lipídica e um acúmulo de EROs intracelular (Park *et al.*, 2000). A mesma situação foi novamente observada com o gene que codifica nTPx (Cha *et al.*, 2003). Um outro ponto interessante é que as expressões de *AHP1* e Ahp1 são aumentadas quando o gene *TSA1* é mutado, mesmo sem estímulo com hidroperóxidos (Park *et al.*, 2000; Demasi *et al.*, 2006).

No que diz respeito a proteínas envolvidas com a regulação da expressão de *AHP1*, foi sugerido que os fatores de transcrição Yap1 e Skn7 desempenhem papéis importantes nesse aspecto (Lee *et al.*, 1999 a,b), uma vez que linhagens de *S. cerevisiae* mutantes Δ -yap1 e Δ -skn7 apresentam níveis de expressão de *AHP1* reduzidos após tratamento com H₂O₂ e *t*-BOOH em comparação com a respectiva linhagem selvagem (Lee *et al.*, 1999b). Além disso, mutações no promotor *AHP1* em regiões envolvidas com a ligação desses fatores de transcrição acarretaram em menores níveis de indução da transcrição do gene repórter utilizado (β -galactosidase), o que sugere que essas proteínas estejam de fato envolvidas com a regulação normal de *AHP1*, ainda que de maneira não exclusiva (He e Fassler, 2005).

Yap1 e Skn7 são dois fatores de transcrição normalmente relacionados com a resposta de leveduras ao estresse oxidativo (Jamieson, 1998; Lee *et al.*, 1999a; Netto, 2001). A deleção independente dos genes que codificam essas proteínas torna *S. cerevisiae* hipersensível a H_2O_2 (Kuge e Jones, 1994; Krems *et al.*, 1996). Yap1 pertence à família de proteínas *c-jun*, que é parte da classe AP-1 de fatores de transcrição de eucariotos superiores. É uma proteína que possui um domínio de zíper de leucina (bZIP) adjacente ao seu domínio de ligação ao DNA. Esse fator de transcrição liga-se a regiões promotoras em *cis*-elementos chamados de YREs (Yap1 *Response Elements*), compostos da seguinte seqüência de nucleotídeos:

T(T/G)ACTAA (Kuge e Jones, 1994). Um conjunto de genes antioxidantes é regulado por Yap1, entre eles *GSH1* (γ -glutamilcisteína sintetase) (Wu e Moye-Rowley, 1994), *GLR1* (glutationa redutase) (Kuge e Jones, 1994), *TRX2* (Grant *et al.*, 1996) e *TRR1* (Morgan *et al.*, 1997). A atividade de Yap1 como ativador depende do estado *redox* de duas cisteínas presentes em sua estrutura (Coleman *et al.*, 1999; Delaunay *et al.*, 2000), o que determina se sua localização celular é citosólica ou nuclear (Kuge *et al.*, 1997; Wood *et al.*, 2004). No entanto, Yap1 não está envolvido com a resposta a todos os estímulos oxidativos, isto é, estímulos distintos podem desencadear respostas de outros fatores de transcrição. Por exemplo, o gene *YBL064C* de leveduras, que codifica mTPx, tem sua expressão regulada pelos fatores Msn2/4 e Hap1 (Monteiro *et al.*, 2002).

Snk7 também possui habilidade para se ligar ao DNA, embora sua seqüência alvo não seja evidente como a de Yap1. Morgan e col. (1997) demonstraram a ligação de Skn7 a uma região do promotor do gene *TRX2*, que foi delimitada entre as posições -142 e -164 (23bp) (Morgan *et al.*, 1997). Lee e col. (1999a) demonstraram a ligação de Skn7 a uma região proximal do promotor de *TSA1*, comprovando a participação direta desse fator na regulação desse gene (Lee *et al.*, 1999a). Mais recentemente, também foi mostrada a ligação de Skn7 ao promotor do gene *GPX2*, que codifica uma glutationa peroxidase de fosfolipídios de *S. cerevisiae* (Tsuzi *et al.*, 2004). Nesse trabalho foi definida a seqüência alvo de Skn7 nos promotor de *TRX2*, e foi chamada de GCRE (*GC-rich element*). Análises proteômicas de genes induzidos por H₂O₂ mostraram que grande parte dos genes regulados por Skn7 também o são por Yap1 (Godon *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999a). Não obstante as evidências já apresentadas sobre a participação de Yap1 e Skn7 na regulação do gene *AHP1*, até o momento não foi demonstrada a ligação direta de nenhum desses fatores ao promotor *AHP1*.

II – Objetivos

O objetivo principal desse estudo era identificar papéis desempenhados por Ahp1 no sistema de defesa anti-oxidante da levedura *S. cerevisiae*. Nesse sentido, três objetivos específicos foram perseguidos:

- Caracterização bioquímica da peroxirredoxina Alquil Hidroperóxido Redutase (Ahp1) de Saccharomyces cerevisiae, no que diz respeito principalmente à utilização de diferentes substratos e sensibilidade à inativação por hidroperóxidos;
- Caracterização estrutural de Ahp1 e Tsa1, as duas peroxirredoxinas mais abundantes de leveduras, com o intuito de relacionar suas propriedades bioquímicas (i.e., as funções das proteínas) com suas estruturas tridimensionais, de modo comparativo;
- Estudo das relações de Ahp1 com outras proteínas do sistema de defesas antioxidantes de leveduras, com o intuito de definir condições fisiológicas que efetivamente demandem a presença desta proteína nas células.

III - MATERIAIS E METODOLOGIA

III.1 - Material Biológico

III.1.1 - Linhagens de S. cerevisiae

- BY4741 (WT): (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15ΔO ura3ΔO*) (esta e as derivadas foram adquiridas do projeto EUROSCARF (http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf)
- Δ-tsa1: (BY4741 *YML028W* :: *kanMX4*)
- Δ-ahp1: (BY4741 *YLR109W* :: *kanMX4*)
- Δ-tsa2: (BY4741 *YDR453C* :: *kanMX4*)
- Δ-mTPx1: (BY4741 *YBL064C :: kanMX4*)
- YPH250 (WT): (MATa trp-Δ1 his3-Δ200 lys2-801 leu2-Δ1 ade2-101 ura3-52) (esta e as derivadas foram obtidas de Izawa e col. 1996)
- YIT2 (Δ-cta1): (YPH250 *cta1* :: *trp1*)
- YTT7 (Δ-ctt1): (YPH250 *ctt1* :: *ura3*)
- YWT1 (Δ-cta1/ctt1): (YPH250 *cta1* :: *trp1 ctt1* :: *ura3*)

III.1.2 - Linhagens de E. coli

- DH5 α : [endA1, hsdR17 (r_k^- , m_k^+), supE44, thi-1, recA1, gyrA (Na 1^r), relA1, Δ (lacZYAargF)_{U169} (m80lacZ Δ M15)] (Novagen)
- BL21 (DE3): [F, amp T, hsdS_b (r_B , m_b ⁻), gal, dcm] (Novagen)

III.2 - Meios de cultura

III.2.1 - Leveduras

- YPD: 1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% glicose
- YPYE: 1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% etanol; 2% glicerol
- YNB (meio mínimo): 0,67% YNB-AA (Yeast Nitrogen Base without aminoacids) (Difco); 0.12% drop-out (Ausubel et al., 1998); aminoácidos específicos de seleção de

cada linhagem; fonte de carbono [2% glicose; 2% glicerol + 2% etanol; 0.1% ácido oléico (Sigma) + 0.1% TWEEN 40 (Sigma)].

• Meios sólidos: preparados com a adição de 2% de ágar.

III.2.2 - Bactérias

 LB: 1% triptona; 1% NaCl; 0.5% extrato de levedura. Meios sólidos foram preparados com a adição de 2% de ágar e 100µg/mL de ampicilina.

III.3 - Plasmídios

- pET15b vetor de expressão comercial (Novagen), utilizado para a expressão de Ahp1 e de outras proteínas heterólogas em *E. coli*.
- pGEM-T (Promega) e Topo (Invitrogen) vetores comerciais usados para a manipulação de fragmentos de DNA provenientes de PCRs.

III.4 - Construção do vetor de expressão de Ahp1

III.4.1 - Amplificação do gene AHP1 e clonagem no vetor pET15b

O gene *AHP1* foi amplificado por PCR a partir de DNA genômico da linhagem BY4741, preparado usando bolinhas de vidro (*glass beads*) (Sigma) de acordo com Ausubel e col., 1998. Os oligonucleotídeos utilizados, com temperatura de anelamento de 55°C, foram:

Ahp1R - 5'CGCGGATCCCTACAAATGAGCCAAGACAC3';

Ahp1F - 5' CGATCCATATGTCTGACTTAGTTAGTTAACAAG 3'.

O fragmento resultante de 550bp correspondente ao gene *AHP1* inteiro foi reamplificado por PCR utilizando os mesmos oligonucleotídeos. Após purificação em gel de agarose 0.7% usando o kit *Concert* (Life Technologies), o fragmento de DNA obtido foi digerido simultaneamente com as enzimas *Nde*I (30U) e *Bam*HI (20U) (New England Biolabs) por 2h a 37°C, utilizando o tampão sugerido para *Bam*HI com a adição de 100µg/mL [final] de BSA. A reação foi paralisada por temperatura (80°C por 20min) e imediatamente aplicada em novo gel de agarose para purificação. O produto de digestão purificado foi então utilizado para ligação no vetor pET15b (com T4 DNA ligase - Promega), previamente digerido simultaneamente com *Nde*I e *Bam*HI. Todos os géis de agarose foram corados com solução 50µg/mL de brometo de etídeo após o término da eletroforese.

III.4.2 - Transformação de E. coli e análise dos transformantes por PCR

Os produtos das reações de ligação descritos acima foram utilizados para transformação da linhagem DH5 α de *E. coli* por eletroporação em aparelho *Gene Pulser II* (BioRad), seguindo instruções do fabricante. Dez transformantes crescidos em meio LB contendo X-GAL (Fermentas) (0.05µg/mL) foram selecionados para *minipreps* (com o *kit Perfect Prep* - Eppendorf) e posteriores amplificações por PCR (com os oligonucleotídeos específicos) para triagem quanto à presença do inserto.

Os plasmídios obtidos contendo o gene *AHP1* foram utilizados para transformação da linhagem BL21 de *E. coli* por choque térmico (Ausubel *et al.*, 1998). Três transformantes foram selecionados para expressão de Ahp1. Os plasmídios contidos nesses transformantes foram isolados e utilizados para novas amplificações por PCRs de triagem e para sequenciamento para confirmação das construções. As reações de sequenciamento foram realizadas com o *kit Big Dye Terminator II* (Applied Biosystems) usando os oligonucleotídeos M13 *Universal* e M13 *Reverse*, e analisadas em seqüenciador capilar *ABI Prism 3500* (Applied Biosystems) (Departamento de Genética e Biologia Evolutiva - IB/USP). As seqüências obtidas confirmaram o quadro de leitura correto das construções (orientado pelo sítio de restrição de *Nde*I) e a integridade da seqüência de *AHP1* nos três vetores. A partir desses resultados, partiu-se para a expressão de Ahp1 em bactéria.

III.5 - Expressão e purificação de proteínas recombinantes

<u>III.5.1 – Ahp1</u>

Os três transformantes isolados foram crescidos em meio LB ao longo da noite. Pela manhã, as culturas foram diluídas para $OD_{600} = 0.2$ e, ao atingirem novamente $OD_{600} = 0.8$, foi adicionado o açúcar IPTG (Fermentas) (concentração final de 1.0mM) para indução do promotor viral T7, que ativa a expressão gênica no vetor construído. Após três horas nessa

condição, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas 1 vez com água gelada e os *pellets* foram congelados a -20°C até o momento de purificação das proteínas.

Os protocolos de purificação de proteínas variam de proteína para proteína, dependendo principalmente de sua composição de aminoácidos e de sua estabilidade em soluções (forças iônicas dos tampões utilizados). Partiu-se inicialmente de um protocolo padrão empregado no laboratório. Os *pellets* de células induzidas foram ressuspendidos em 25mL de tampão A [20mM tampão fosfato de sódio (USB) + 500mM NaCl + 50mM imidazol (Sigma)], ao que se seguiu a quebra das células por sonicação a potência 25% (3X 20s intercalados com 3 descansos de 20s cada + 1X 10s com a macroponta). Após isso, o lisado foi incubado em gelo com 2.5mL de estreptomicina 10% por 20min (com agitação), para degradação de DNA presente nas amostras. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (40min - 15000rpm - 4°C) e os sobrenadantes resultantes foram filtrados em membrana de 0.45µm (Millipore).

Para purificação de Ahp1 por cromatografia de afinidade com níquel, utilizou-se o seguinte procedimento para carregar a coluna de 5mL (*HiTrap Chelating* – Amersham Pharmacia), em bomba peristáltica (Amersham Pharmacia): passou-se 50mL H₂O Milli-Q + 2.5mL NiSO₄ (0.1M) + 50mL H₂O Milli-Q + 50mL tampão A + 25mL amostra + 5mL tampão B (idem ao tampão A, mas com 100mM imidazol) + 5mL tampão C (idem ao tampão A, mas com 150mM imidazol) + 5mL tampão D (idem ao tampão A, mas com 200mM imidazol) + 15mL tampão E (igual ao idem ao tampão A, mas com 500mM imidazol). As amostras eluídas foram avaliadas quanto à presença de proteínas com o reagente de Bradford preparado no laboratório (Bollag *et al.*, 1996). No eluído do tampão D não foram encontrados vestígios protéicos.

As alíquotas de Ahp1 purificadas foram então passadas em coluna de exclusão molecular (PD10 – Amersham Pharmacia) para retirada de sal e imidazol, e, quando oportuno, troca do tampão fosfato para Tris-HCl (USB) 5mM pH 7.5. As amostras nessas

condições mantiveram-se estáveis a 4°C por até dois meses. A partir de um volume de 500mL de cultura, foi possível obter até 70mg de proteína pura.

A homogeneidade das amostras de Ahp1 foi confirmada por SDS-PAGE (Seção III.8). Além disso, também foi feita uma medida de espectrometria de massas (ESI-QTof) com uma amostra intacta, isto é, sem digestão prévia com tripsina (Seção III.14). Além de comprovar a homogeneidade das amostras, tal análise também foi útil para a confirmação precisa do peso molecular da proteína como 21.14 kDa. Medidas adicionais de espalhamento dinâmico de luz (DLS – *Dynamic Light Scattering*) realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) também confirmaram a homogeneidade das amostras purificadas de Ahp1.

III.5.2 - Tsa1

O vetor de expressão de Tsa1 foi construído e inserido em células da linhagem BL21 de *E. coli* de modo similar ao apresentado na seção III.4 (procedimentos realizados anteriormente em nosso laboratório por Camila O. dos Santos). Tsa1 foi purificada por meio do procedimento de cromatografia de afinidade com cobalto, de modo semelhante ao empregado para Ahp1 (resina cromatográfica: *Talon Cobalt Affinity Resin* – BD Biosciences), porém sem o uso de bomba peristáltica, i.e., por gravidade. Todos os tampões continham 100mM de NaCl. A eluição foi realizada com o tampão D (os tampões C e E não foram utilizados). As alíquotas obtidas foram passadas em coluna de exclusão molecular (PD10 – Amersham Pharmacia) para retirada de sal e imidazol e, quando oportuno, troca do tampão fosfato para Tris-HCl 5mM pH7.5. As amostras nessas condições mantiveram-se estáveis a 4°C por até duas semanas.

$\underline{III.5.3 - Trr1}$

O vetor de expressão de Trr1 foi construído e inserido em células da linhagem BL21 de *E. coli* de modo similar ao apresentado na seção III.4 (procedimentos realizados anteriormente em nosso laboratório pela técnica Simone V. Alves). Trr1 foi purificada por meio de cromatografia de afinidade com níquel, de modo semelhante ao empregado para

Ahp1. A solução A continha, ao invés de 50mM, 30mM de imidazol. As lavagens foram feitas com os tampões B, C e D, e a eluição com o tampão E. As alíquotas obtidas foram passadas em coluna de exclusão molecular (PD10 – Amersham Pharmacia) para retirada de sal e imidazol. As amostras nessas condições mantiveram-se estáveis a 4°C por até um mês.

III.5.4 - Trx1 e Trx2

Os respectivos vetores de expressão (pET17b) foram gentilmente cedidos ao laboratório pelo Dr. S.G. Rhee (NIH – EUA). A purificação de ambas as proteínas aproveita o fato de estas serem termo-estáveis: os extratos protéicos foram fervidos por 15min na presença de DTT (USB – 100mM), ao que se seguiu a centrifugação (15min - 15000rpm - 4°C) e coleta dos sobrenadantes (Chae *et al.*, 1994a). As amostras nessas condições mantiveram-se estáveis a 4°C por até dois meses.

III.6 - Parâmetros protéicos preditos in silico

Diversos parâmetros protéicos podem ser estimados por meio de ferramentas computacionais a partir da seqüência de aminoácidos das proteínas (http://ca.expasy.org/tools/protparam.html). Foram adotados os seguintes parâmetros para os cálculos de concentração de proteínas:

- Ahp1 peso molecular (MW) = 21.14kDa; coeficiente de extinção molar a 280nm
 (ε₂₈₀) = 30440 M⁻¹ cm⁻¹;
- Tsa1 MW = 23.62kDa; ε_{280} = 23590 M⁻¹ cm⁻¹;
- Trr1 MW = 36.98kDa ; ε_{280} = 25700 M⁻¹ cm⁻¹.

III.7 - Determinação de concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada espectrofotometricamente com leituras a 280nm, de acordo com as fórmulas:

C (mg/mL) = A x Dil (50X) x 10^3 x M.W. / ε_{280} ou

C (μ M) = A x Dil (50X) x 10⁶ / ϵ_{280}

Alternativamente, a concentração de proteínas (Trx1, Trx2, extratos protéicos) foi determinada pelo método clássico (reagente de Bradford: BioRad) (Bradford, 1976), com leituras a 595nm.

III.8 - SDS-PAGE

Proteínas purificadas foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12% e corridas em sistema BioRad (*Mini Protean II*). O tampão de corrida foi MES-SDS [MES 50mM (USB) + SDS 3.5mM (USB) + 2-(*N-morpholino*) ethane sulphonic acid Tris Base 50mM (USB) + EDTA 1mM (USB), pH7.3]. Adicionou-se ou não DTT (USB) (10mM concentração final – condição redutora) às alíquotas protéicas. Os géis foram corados depois da eletroforese com 0.1% de *Coomassie Blue* (Ausubel *et al.*, 1998) por 5 minutos a temperatura ambiente. Os métodos de análise de proteínas foram derivados de Bollag e col. (1996).

III.9 - Determinação de atividade enzimática de Ahp1

III.9.1 - Ensaio DTT

Para determinar se as proteínas purificadas apresentam atividade peroxidásica, foi empregado um ensaio rápido que utiliza DTT como agente redutor da enzima. O método é baseado no fato de que DTT oxidado absorve mais a 310nm do que proteínas. O tampão de reação utilizado foi Hepes (Sigma) (10mM - pH 7.4) + azida (1mM) + DTPA (0.1mM). São preparadas 4 reações separadamente:

Controle

- 1- pré-mix (tampão) + 10mM DTT + H₂O (para 1mL)
- 2- pré-mix (tampão) + 10mM DTT + H_2O (para 1mL)

Zera-se o espectrofotômetro e deixa-se correr até estabilização (oxidação espontânea de DTT). Após isso, adiciona-se 1mM H_2O_2 (final) no tubo 2 e realiza-se o *time scan* de 15min a 30°C a 310nm.

Enzima

3- pré-mix (tampão) + 10mM DTT + 10 μ M Ahp1 + H₂O (para 1mL)

4- pré-mix (tampão) + 10mM DTT + 10μ M Ahp1 + H₂O (para 1mL)

Zera-se o espectrofotômetro e deixa-se correr até estabilização (oxidação espontânea de DTT). Após isso, adiciona-se 1mM H_2O_2 (final) no tubo 4 e realiza-se o *time scan* de 15min a 30°C a 310nm.

A atividade enzimática pode ser então determinada através da subtração da curva obtida em **Enzima** pela curva obtida em **Controle**, em termos de μ M de DTT por unidade de tempo.

III.9.2 - Ensaio enzimático com o sistema tiorredoxina

Para determinação de parâmetros enzimáticos, foi empregado um ensaio que utiliza o sistema redutor completo, isto é, incluindo as proteínas Trr1 (tiorredoxina redutase 1) e Trx1 ou Trx2 (tiorredoxina) e o agente redutor fisiológico, NADPH, de acordo com Jeong e col. (1999). O tampão de reação foi Hepes (10mM - pH 7.4) + azida (1mM) + DTPA (0.1mM) e são preparadas 2 reações, que são corridas simultaneamente, com duração de 5min a 30°C (leitura a 340nm):

Controle - pré-mix (tampão) + 0.45μ M TRX + 0.18μ M TRR1 + 2.1μ M Ahp1 + H₂O (para 1mL)

Reação - pré-mix (tampão) + 0.45μ M TRX + 0.18μ M TRR1 + 2.1μ M Ahp1 + 0.25mM NADPH + peróxido + H₂O (para 1mL).

As reações são iniciadas com a adição de peróxido. A velocidade da reação é determinada pelo decréscimo na absorbância de NADPH a 340nm, cujo coeficiente de extinção molar nesse comprimento de onda de 6290 M^{-1} cm⁻¹. Nesse ensaio, a atividade enzimática é expressa em termos de μ M de NADPH oxidado por unidade de tempo.

Para determinação de parâmetros enzimáticos foram produzidas curvas de V x [S] (peróxido) com pelo menos três preparações de Ahp1 diferentes.

III.9.3 – Ensaio de Xylenol Orange (FOX)

Um outro tipo de ensaio enzimático utilizado foi o de xylenol orange, ou FOX, para Ferrous Oxidation Xylenol Orange. Embora este ensaio seja menos preciso do que aquele com o sistema Trx, uma vez que as medidas de atividade enzimática são pontuais e muitos controles são requeridos, em muitos casos ele foi empregado por razões específicas. Basicamente, os volumes das reações são menores (100µL), o que implica em menos enzima e menos substrato em cada reação. Além disso, não é necessário que sistema Trx (Trr1, Trx1-2, NADPH) seja adicionado. O sistema é composto por um mix de Hepes, DTPA, enzima e peróxido, ao qual é adicionado DTT para iniciar a reação. DTT promove a reciclagem da Prx, através da regeneração de suas sulfidrilas livres, o que permite a continuidade das reações. As reações são paralisadas com HCl em diferentes tempos e misturadas com 900µL de uma solução contendo xylenol orange (Sigma) e FeSO₄. Peróxidos presentes nessa mistura reagem com os íons Fe^{+2} gerando Fe^{+3} . Esses íons, por sua vez, se complexam com o corante xylenol orange, que muda de cor (de laranja para púrpura) (Jiang et al. 1992). Assim, pode-se medir a atividade enzimática: quanto mais ativa a enzima, menos peróxido haverá na mistura final e menos púrpura ficará a solução final. A determinação da concentração de alguns hidroperóxidos de ácidos graxos também foi realizada com o uso deste corante. As leituras espectrofotométricas foram feitas a 560nm.

III.10 - Produção de anticorpo policional contra Ahp1

Essa etapa do trabalho foi realizada no biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Unicamp, em colaboração com a doutoranda Odalys Cabrera (IB/Unicamp). Foram comprados dois coelhos da raça Nova Zelândia (Granja Grota Azul - Paulínia - SP) para produção de anticorpo policlonal contra Ahp1. Preparou-se 1mL de uma solução 0.7mg/mL de Ahp1 com o tampão PBS1X (137mM NaCl + 2.7mM KCl + 10mM tampão fosfato pH 7.3) (Ausubel *et al.*, 1998), à qual foi adicionado um igual volume de Adjuvante de Freund completo (Sigma). Essa mistura foi homogeneizada manualmente em seringa conjugada por 45min e inoculada em ambos os coelhos (1mL por coelho). Repetiu-se esse procedimento por quatro vezes (1 vez por semana: portanto, ao todo foram feitas cinco imunizações), com a diferença que o Adjuvante de Freund utilizado nessas oportunidades foi incompleto (Sigma). Após a segunda imunização um dos coelhos morreu. Na quinta imunização, foi coletada uma alíquota de sangue para teste imunológico. O coelho foi sacrificado ao término da quinta semana.

As amostras de sangue coletadas foram incubadas a 37°C por 1h com posterior incubação a 4°C por 2h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000rpm (4°C) por 10min para separação de restos celulares. O sobrenadante (soro) contendo os anticorpos foi transferido para novo frasco e armazenado a -20 ou 4°C.

III.11 - Western Blot

Os procedimentos adotados foram descritos por Bollag e col. (1996). Amostras protéicas corridas em gel de poliacrilamida foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Invitrogen) de acordo com orientação do fabricante das cubas de eletroforese (BioRad). As transferências foram confirmadas corando as membranas com o corante *Poinceau Red* (Sigma). As membranas foram então lavadas com água para retirada do corante e incubadas ao longo da noite, a 4°C, com leite em pó Molico (Nestlè), diluído na proporção de 5% em tampão PBS1X (137mM NaCl + 2.7mM KCl + 10mM tampão fosfato pH 7.3) com 0.5 a 1% de TWEEN 20 (Sigma) (tampão T-PBS). Após isso, as membranas foram incubadas (com agitação) na mesma solução por 1h a temperatura ambiente. Em seguida, prosseguiu-se com as lavagens das membranas: 2 vezes com T-PBS e mais 2 vezes com T-PBS por 15min com agitação. A incubação com o anticorpo primário (contra Ahp1) se deu na proporção de 1:1000 em tampão T-PBS, a temperatura ambiente, por 1h com agitação. As membranas

foram então lavadas novamente, ao que se seguiu com a incubação com o anticorpo secundário.

Foram utilizados anticorpos secundários conjugados com duas diferentes enzimas: fosfatase alcalina (AP) (Kirkegaard & Perry) e HRP (*horseradish peroxidase*) (Amersham Pharmacia), que empregam métodos de revelação diferentes. No caso do anticorpo conjugado com AP, a revelação se dá na própria membrana, após incubação com os reagentes NBT e BCIP. Com o anticorpo conjugado com HRP, utilizou-se o *kit* ECL (Amersham Pharmacia), que necessita de revelação por autoradiografia.

Extratos protéicos de *S. cerevisiae* foram preparados de acordo com Ausubel *et al.*, 1998.

III.12 – Sub-fracionamento celular de S. cerevisiae

Essa etapa do trabalho foi desenvolvida em colaboração com o Prof. Dr. Mario H. Barros, do Departamento de Microbiologia, ICB/USP. Células da linhagem selvagem BY4741 de *S. cerevisiae* foram crescidas em diferentes meios para determinação da localização intracelular de Ahp1 em situações fisiológicas distintas. Após crescimento em condições apropriadas, as células foram lavadas 1 vez com 1.2M sorbitol e prosseguiu-se com a preparação de esferoblastos, isto é, a digestão das paredes celulares, de acordo com Ausubel *et al.*, 1998. Para cada 10g de células (peso líquido), foram usados 30mL de tampão de digestão para ressuspensão, contendo 2mg de zimoliase 100T (ICN Imunochemicals) para cada grama de células {tampão: 1.2M sorbitol + 50mM tampão fosfato de potássio, pH 7.5 + 1mM EDTA + 1% [v/v] β -mercaptoetanol (Sigma)}. A suspensão de células foi incubada a 37°C, com leve agitação, por 2h, ao final das quais se completou o volume da digestão para 40mL, com 1.2M sorbitol gelado. Os esferoblastos foram coletados por centrifugação a 6000rpm, por 10min a 4°C e lavados novamente com 1.2M sorbitol gelado. Posteriormente, os *pellets* de esferoblastos foram ressuspendidos em tampão de lise [0.6M sorbitol + 10mM MES – K⁺, pH 6.0 + 1mM EDTA + inibidores de protease (PMSF: 0.5mM; leupeptina: 2µg/mL; pepstatina: 0.4µg/mL)] e homogeneizados por meio de 10 strokes em um homogeneizador (potter) automático (Prof. Dra. Alicia Kowaltowski, IQ/USP). Os homogenatos foram então centrifugados a 2000g por 10min a 4°C, para retirada de núcleos e debris celulares, e geração do Sobrenadante Pós-Nuclear (PNS). Os sobrenadantes obtidos dessa forma foram re-centrifugados, ainda para a retirada de restos celulares remanescentes, e posteriormente submetidos à centrifugação a 20000g por 30min a 4°C, o que gerou duas frações: o chamado 20kgS (sobrenadante), basicamente citosólico, e o 20kgP (pellet organelar), que contém basicamente mitocôndrias e peroxissomos. A amostra 20kgS foi estocada a -80°C para posterior análise de Western Blot; a amostra 20kgP foi ressuspendida em 200µL de tampão de lise e a concentração de proteínas foi estimada pelo método de Bradford. Um volume contendo aproximadamente 2mg de proteína foi adicionado ao topo de um gradiente descontínuo de sacarose (USB), gerado com uma bomba peristáltica adicionando-se seguidamente: 0.88mL de 60% sacarose, 2.31mL de 50% sacarose, 2.31mL de 46% sacarose, 2.31mL de 43% sacarose, 2.31mL de 40% sacarose e 0.88mL de 35% sacarose. Os tubos contendo as amostras sobre os gradientes foram centrifugados a 100000g por 90min a 4°C, em uma ultra-centrífuga Sorvall (Prof. Dr. Carlos F. Menck, ICB/USP), e as diferentes frações de 500µL foram coletadas a partir das partes inferiores dos frascos e rapidamente congeladas a -80°C para as análises de Western Blot. Os procedimentos adotados foram baseados em Vizeacoumar e col. (2003) e em Smith e col. (2002).

III.13 - Cristalografia

III.13.1 – Cristalização de Ahp1

Essa etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Cristalografia de Proteínas do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - LNLS (Campinas - SP), em colaboração com o pósdoutorando Marcos Oliveira (LNLS) e com a doutoranda Karen Discola (IB/USP e LNLS). Amostras de Ahp1 ativas foram diluídas em tampão tris-HCl 5mM pH7.5 em uma concentração de 10mg/mL. Quando necessário, as amostras foram concentradas em concentrador Centripep 10 (Centricon) ou MWCO 10 (Amicon/Millipore), de acordo com as orientações do fabricante. As tentativas de cristalização foram feitas através do método de difusão de vapor efetuado por *hanging drop* (gota pendurada), em sala com temperatura constante de 20°C.

Foram realizadas triagens com os *kits* de cristalização *Crystal Screen* 1 e 2 (Hampton Research), Jena 1-10 (Jena Biosciences) e *Wizard* 1 e 2 (Jena Biosciences), cada um deles contendo 24 soluções diferentes. O volume de cada poço (*well*) foi fixado em 300 μ L. O volume de cada gota consistia em 1 a 1.5 μ L da solução de cristalização + 1 a 1.5 μ L de proteína (sempre 1:1), sem tratamento algum, ou com 10mM DTT, 1 ou 10mM *t*-BOOH (Sigma), ou 1mM H₂O₂ (Sigma), ou diamida (Sigma) 4:1 proteína. Esses tratamentos foram realizados por 1h a temperatura ambiente, após os quais as alíquotas de proteína foram armazenadas em gelo até o término dos experimentos.

Após o aparecimento de cristais protéicos, foram feitos refinamentos das condições de cristalização a partir dos resultados das placas de triagem (ver *Resultados*). Nesses casos, até 5µL de Ahp1 foram utilizados nas gotas.

III.13.2 – Cristalização de Tsa1

Essa etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Cristalografia de Proteínas do LNLS (Campinas - SP), em colaboração com o pós-doutorando Marcos Oliveira (LNLS) e com a doutoranda Karen Discola (IB/USP e LNLS).

Amostras de Tsa1 ativas foram diluídas em tampão tris-HCl 5mM pH7.5 em uma concentração de 10mg/mL. Quando necessário, as amostras foram concentradas em concentrador Centripep 10 (Centricon) ou MWCO 10 (Amicon/Millipore), de acordo com as orientações do fabricante. As tentativas de cristalização foram feitas através do método de

53

difusão de vapor efetuado por *hanging drop* (gota pendurada), em sala com temperatura constante de 20°C.

Foram realizadas triagens com os *kits* de cristalização *Crystal Screen* 1 e 2 (Hampton Research) e *Wizard* 1 e 2 (Jena Biosciences), cada um deles contendo 24 soluções diferentes. O volume de cada poço (*well*) foi fixado em 300 μ L. O volume de cada gota consistia em 1 a 1.5 μ L da solução de cristalização + 1 a 1.5 μ L de proteína (sempre 1:1), sem tratamento algum, ou com 10mM DTT, 1mM *t*-BOOH ou 1mM H₂O₂, ou diamida 4:1 proteína. Esses tratamentos foram realizados por 1h a temperatura ambiente, após os quais as alíquotas de proteína foram armazenadas em gelo até o término dos experimentos.

Em razão da dificuldade de obtermos cristais nativos passíveis de experimentos de difração de raios X, iniciamos os testes de cristalização com a versão mutante de Tsa1 C47S, a qual é insensível à oligomerização dependente do estado *redox*, mas sensível à oligomerização por choque térmico (Jang *et al.*, 2004). Após o aparecimento de cristais protéicos, foram feitos refinamentos das condições de cristalização a partir dos resultados das placas de triagem (ver *Resultados*). Nesses casos, até 5µL de Tsa1 C47S foram utilizados nas gotas.

III.13.3 – Coleta de dados de difração

Essa etapa do trabalho foi realizada em colaboração com o pós-doutorando Marcos Oliveira (LNLS), sob supervisão da Dra. Beatriz Gomes Guimarães (LNLS). Os experimentos de difração de raios X foram realizados na linha MX-1 do LNLS, que é uma linha monocromática com fluxo máximo de fótons de 30Å. Todas as medidas foram feitas em temperatura criogênica (110 K), através de fluxo de gás nitrogênio sobre a amostra. As amostras foram sempre crio-protegidas com soluções idênticas às presentes nos poços, porém suplementadas com 25% glicerol. O comprimento de onda dos raios X incidentes foi de 1.421Å e os dados de difração de raios X foram coletados em um detector MARCCD com oscilação de $\Delta \phi$ = 1.0°, perfazendo intervalos de rotação de 240 a 360°. O conjunto desses

dados foi processado usando os programas MOSFLM (Leslie, 1992) e SCALA (Kabsch, 1988; Evans, 1993) (*Collaborative Computational Project* – CCP4, *Number* 4, 1994).

III.14 – Espectrometria de Massas (MS)

Essa etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Espectrometria de Massas, também instalado no LNLS (Campinas), sob supervisão do Prof. Dr. Fábio Gozzo. Amostras de proteína foram preparadas de acordo com a seção III.5.1, previamente reduzidas com DTT e então tratadas com diferentes compostos por 48h. Após diálise para retirada do excesso desses compostos, as amostras (0.4mg) foram denaturadas (60°C por 40 minutos) e então digeridas ou não com tripsina (1:50) (Promega) a 37°C ao longo da noite. Alíquotas comerciais liofilizadas de tripsina foram ressuspendidas em tampão bicarbonato de amônio 25mM, pH 8.0.

O espectrômetro utilizado foi um *Electrospray Quadrupole* (ESI-QTof) (*Micromass*). A este aparelho está associado um cromatógrafo capilar (CapLC), através do qual as amostras chegam à fonte de ionização após as corridas cromatográficas adequadas (eluição com um gradiente de acetonitrila). Os espectros gerados foram processados com o programa *Protein Lynx* e analisados com os programas *Mascot* e *Mass Lynx*.

III.15 - Ensaios de viabilidade

Células de diferentes linhagens foram pré-inoculadas em meio rico (YPD) e crescidas ao longo da noite. Após isso, as culturas foram diluídas em meio mínimo (YNB) contendo diferentes fontes de carbono em $OD_{600} = 0.2$. Ao atingirem $OD_{600} = 0.6$, as células foram rediluídas para $OD_{600} = 0.2$ em meio YNB sem fonte de carbono. A partir desse ponto, foram feitas quatro diluições seriais (20%) de cada cultura no mesmo meio (YNB sem fonte de carbono): de N ($OD_{600} = 0.2$) a N/625. 12µl de cada diluição foram pingados em placas contendo os meios de cultura pertinentes. As placas foram incubadas por até 5 dias e fotografadas.

Um outro procedimento adotado foi acompanhar espectrofotometricamente o crescimento de culturas celulares em meios e condições desejadas. Para tal, os crescimentos de células das linhagens selvagem e Δ -ahp1 em meios líquidos foram monitorados por até quatro dias. As células foram inicialmente inoculadas em meio YPD, onde cresceram ao longo de uma noite. Em seguida, elas foram transferidas para meio contendo ácido oléico como fonte de carbono, onde passaram por adaptação de 6h, antes de serem tratadas ou não com diferentes peróxidos.

III.16 - Extração e eletroforese de RNA; Northern Blot; marcação de sondas radioativas

Células de diferentes linhagens foram crescidas para extração de RNA e avaliação de níveis de expressão gênica. Para análises em meio de cultura contendo glicose como fonte de carbono, células foram pré-inoculadas em meio YPD e diluídas para $OD_{600} = 0.2$ em meio YNB + glicose. Ao atingirem $OD_{600} = 0.8$, foram feitos os tratamentos com hidroperóxidos (ver *Resultados*), sempre com a duração de 30min. Para as análises em meios de cultura contendo glicerol - etanol ou ácido oléico, foram realizados os mesmos procedimentos, em seguida dos quais as células foram incubadas por 6h nos meios de cultura correspondentes para adaptação (YNB + ácido oléico ou YNB + glicerol - etanol). Após 6h, foram feitos os tratamentos com os hidroperóxidos.

Amostras de RNA provenientes de células submetidas a diferentes tratamentos foram extraídas pelo método de fenol ácido (Ausubel *et al.*, 1998). As amostras foram quantificadas por medição de A₂₆₀ em espectrofotômetro. Quantidades equivalentes foram então aplicadas em gel de agarose 1.2% contendo formaldeído (1.12%) em tampão MOPS [200mM MOPS (Sigma) + 80mM acetato de sódio + 10mM EDTA, pH 7.0]. Formamida (Sigma) foi adicionada às amostras (50%) para prevenir ação de RNase. As amostras foram transferidas

para membrana de *nylon* (Hybond-N⁺ - Amersham Pharmacia) ao longo de uma noite, onde foram fixadas por incubação a 80°C por 2h. As membranas foram pré-hibridadas por 6h na presença de DNA de esperma de salmão (1mg) e hibridadas com sondas radioativas por 12h a 42°C. Posteriormente, as membranas foram lavadas e autoradiografadas.

As sondas específicas para cada gene estudado foram resultados de PCRs utilizando DNA genômico de leveduras como molde, e oligonucleotídeos específicos, desenhados a partir das seqüências de nucleotídeos conhecidas dos genes. No caso da sonda para o gene *TSA2*, foi realizada uma digestão do plasmídio pProEX1-*TSA2* (Munhoz e Netto, 2004) com as enzimas *Nde*I e *Bam*HI (37°C por 2h) para liberação do inserto. Todas as sondas foram marcadas por *random primer extension* (utilizando oligonucleotídeos ramdômicos de seis bases como iniciadores) a 37°C por 30min, utilizando o fragmento *Klenow polymerase* (Invitrogen) e α -dATP³².

Muitos experimentos que empregaram os métodos descritos nesta seção e na anterior foram realizados pela graduanda Caroline V. Cogueto (IB/USP), em cujo treinamento eu participei, como parte de seu projeto de Iniciação Científica financiado pela Pró-Reitoria de Graduação da USP.

IV – RESULTADOS

IV.1 – Caracterização bioquímica de Ahp1

IV.1.1 – Atividade peroxidásica de Ahp1 recombinante

Após estabelecermos as condições ideais para a obtenção de Ahp1 pura e em grandes quantidades (~70mg de proteína por 0.5L de cultura de bactérias), e verificarmos, por diferentes abordagens experimentais, que a proteína obtida estava íntegra (seção III.5.1), passamos a analisá-la funcionalmente.

A atividade peroxidásica de Ahp1 recombinante foi inicialmente confirmada através do ensaio de DTT oxidado. Neste sistema, DTT é utilizado como agente redutor de Ahp1, isto é, após um primeiro ciclo catalítico, DTT regenera as formas reduzidas das cisteínas, as quais podem então encontrar uma nova molécula de peróxido e serem oxidadas, gerando um novo dissulfeto intermolecular. Nesse ensaio, utiliza-se DTT em excesso para manutenção do ciclo catalítico pelo intervalo de tempo desejado (Figura 11). Este teste confirmou a atividade peroxidásica da proteína purificada.



Figura 11. Teste de atividade de Ahp1 usando 2mM de t-BOOH como substrato. Ahp1 estava diluída em 20mM de tampão fosfato de sódio pH 7.5. Foram utilizados 10mM DTT e 10μM Ahp1 na reação (30°C). A velocidade da reação foi obtida pela inclinação máxima. A subtração da velocidade de reação referente ao sistema completo, pela velocidade referente ao controle, sem Ahp1 (não apresentada), elimina a oxidação direta de DTT pelo peróxido. A velocidade da reação com 2mM de *t*-BOOH foi de aproximadamente 0.6μM DTT oxidado por segundo. A leitura foi realizada em 310nm.

Em seguida, buscou-se verificar se a enzima purificada possuía atividade de tiorredoxina peroxidase, isto é, se era capaz de degradar peróxidos utilizando o sistema Trx para manutenção do ciclo catalítico. Para isso, as reações continham, além de Ahp1 e peróxido: (1) tiorredoxina (Trx1 ou Trx2), como agente redutor de Ahp1; (2) tiorredoxina redutase (Trr1), como enzima regeneradora de Trx reduzida; (3) NADPH, como doador de elétrons para Trx oxidada (ver Fig. 5). Nesses ensaios, as velocidades das reações são expressas em termos do consumo de NADPH por unidade de tempo.

Foram feitos diversos ensaios com este sistema redutor. Fig. 11A mostra uma reação controle com 200µM *t*-BOOH, à qual não foi adicionada Ahp1. Conforme esperado, não é observado um consumo de NADPH, uma vez que não há Trx oxidada disponível. Reações controle similares sem Trr1, Trx1 ou Trx2 (separadamente) também originaram o mesmo resultado.



Figura 11. Ensaios de atividade de Ahp1 com o sistema Tiorredoxina. A) Oxidação espontânea de NADPH na reação em que não foi adicionada Ahp1 (340nm); **B)** Comparação da atividade de Ahp1 com as diferentes isoformas de Trx (1 e 2). Em cada uma, foram adicionados 200µM *t*-BOOH. As velocidades das reações nesse ponto foram equivalentes 1µM NADPH/s, assim como com 100 e 300µM *t*-BOOH. Em todas as reações (30°C), as proteínas foram utilizadas nas seguintes concentrações: 0.45µM de Trx1 ou 2; 0.18µM de Trr1 e 2.1µM de Ahp1 (Jeong *et al.*, 1999).

Quanto à utilização de Trx1 ou Trx2, foi feita uma comparação da velocidade da reação catalisada por Ahp1, variando-se apenas a isoforma de Trx. Em três pontos de concentração de substrato (100, 200, 300µM *t*-BOOH), as velocidades das reações foram bastante semelhantes (por volta de 1µM NADPH/s), indicando que não há preferência de Ahp1 por tipo de isoforma de Trx, conforme observado por Jeong e col. (1999). Fig. 11B mostra a comparação descrita acima, no ponto de 200µM *t*-BOOH.

No intuito de caracterizar a atividade peroxidásica de Ahp1 e sua eficiência catalítica para diferentes substratos, foram feitas reações com diversas concentrações de hidroperóxidos e o sistema Trx. Dez pontos de concentração de substratos foram empregados (10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 500 e 1000 μ M) para determinar parâmetros enzimáticos de Ahp1 e compará-los com os dados da literatura. Os parâmetros para *t*-BOOH e H₂O₂ foram calculados por meio do gráfico do duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) e são apresentados na Tabela 2. Os resultados são a média de três experimentos independentes e os números entre parênteses correspondem aos valores de desvio-padrão.

Hidroperóxido	$K_{\rm m}$ ($\mu { m M}$)	$k_{\rm cat}$ (s ⁻¹)	$k_{\rm cat}/K_{\rm m}~({\rm M}^{-1}~{\rm s}^{-1})$
t-BOOH	14 (3.8)	0.39 (0.03)	3.0x10 ⁴ (0.9x10 ⁴)
H_2O_2	25.5 (3.0)	0.45 (0.01)	$1.8 \text{x} 10^4 \ (0.7 \text{x} 10^4)$

Tabela 2. Parâmetros enzimáticos de Ahp1 para t-BOOH e H₂O₂.

Concentrações utilizadas: 0.45µM de Trx1, 0.18µM de Trr1, 2.1µM de Ahp1 e 0.25mM NADPH Reações realizadas a 30°C

É importante salientar que tais medições foram feitas com o sistema Trx, que envolve, além de Ahp1, outras duas enzimas (Trx e Trr). As concentrações utilizadas de cada enzima foram idênticas àquelas apresentadas na Fig. 11 e que foram adaptadas de Jeong e col. (1999) e Chae e col. (1994b). Esses resultados confirmaram que Ahp1 é capaz de degradar *t*-BOOH, um hidroperóxido orgânico, com eficiência cerca de duas vezes superior a H_2O_2 , de acordo com a literatura (Jeong *et al.*, 1999) e com o fenótipo de hipersensibilidade a *t*-BOOH de mutantes Δ -ahp1 (Lee *et al.*, 1999b).

Baseado na maior eficiência catalítica de Ahp1 para hidroperóxidos orgânicos sintéticos, como *t*-BOOH, sua habilidade para degradar hidroperóxidos derivados de ácidos graxos, presentes naturalmente em células de leveduras, também foi analisada. As amostras de hidroperóxidos derivados de ácido linoléico, oléico e colesterol, sintetizadas por métodos químicos, foram obtidas em colaboração com o grupo dos Drs. Paolo Di Mascio e Sayuri Miyamoto do Departamento de Bioquímica, IQ/USP. O principio dessa síntese envolve a reação de oxigênio singlete com ácidos graxos insaturados (Hillas *et al.*, 2000). As amostras de hidroperóxidos de ácidos graxos, devido à alta hidrofobicidade, são armazenadas em solventes orgânicos, como metanol, etanol ou clorofórmio. Para utilização nos ensaios enzimáticos, alíquotas foram secas em corrente de gás nitrogênio e ressuspendidas em tampão fosfato de potássio 100mM pH 7.4, com a adição de 0.12% de Triton X-100 para auxiliar na solubilização. Além da dificuldade de solubilização das alíquotas, sua turbidez também comprometeu a qualidade das leituras espectrofotométricas e, em conjunto com suas concentrações de estoque originais (solúveis em tampão), determinou o tipo de ensaio enzimático empregado (sistema Trx ou FOX).

Inicialmente foi testada uma amostra pura de hidroperóxido de ácido linoléico (Loa-OOH), o qual possui 18 átomos de carbono e duas insaturações (18:2). Esse hidroperóxido (Loa-OOH) é extremamente tóxico em leveduras (concentrações da ordem de 0.2mM geram 90% de letalidade) e foi observado que sua presença acarreta uma diminuição nos níveis totais de glutationa (Evans *et al.*, 1998). Assim como apresentado na Tabela 2, foi feita uma curva de velocidade da reação por concentração de hidroperóxido, a qual foi comparada com uma curva de *t*-BOOH (Fig. 12).

61

Curvas de atividade com Loa-OOH e t-BOOH



Figura 12. Curvas de atividade de Ahp1 tendo como substratos Loa-OOH ou *t***-BOOH.** As reações foram realizadas com o sistema Trx de acordo com a Fig. 11 e iniciadas com a adição de diferentes concentrações dos hidroperóxidos. Apenas uma curva V x [s] foi feita com Loa-OOH. As amostras de Loa-OOH foram diluídas em tampão fosfato de potássio 100mM pH 7.4, contendo 0.12% Triton X-100.

Os dados obtidos mostraram que Ahp1 é capaz de remover hidroperóxido de ácido linoléico de maneira tão ou mais eficiente que *t*-BOOH. Embora bastante promissores, esses resultados se mostraram de difícil reprodução. Isto se deveu, provavelmente, a problemas na manipulação das amostras de hidroperóxidos. Desse modo, não houve confirmação e aprofundamento da atividade de Ahp1 sobre esse peróxido.

Um outro possível substrato de Ahp1 estudado foi o hidroperóxido derivado de ácido oléico (18:1). Nesse caso, foram realizados alguns ensaios de *Xylenol Orange* (FOX), que emprega volumes menores, devido à baixa concentração estoque de hidroperóxido. Essas amostras eram, na verdade, misturas de hidroperóxidos derivados de ácido oléico, isto é, a posição da ligação OOH era variável dentro da mesma alíquota. O objetivo básico era determinar se Ahp1 era capaz de remover esses hidroperóxidos de modo mais eficiente que H_2O_2 ou peróxidos orgânicos sintéticos (como *t*-BOOH ou Cu-OOH) (Figura 13).



Figura 13. Comparação da atividade de Ahp1 sobre 200µM de diferentes hidroperóxidos. Os ensaios realizados foram de *Xylenol Orange* (FOX). As reações foram feitas a 37°C, e duraram 0, 1, 2 ou 5 min. Todas foram iniciadas com a adição de DTT e paralisadas com a adição de HCl. Os diferentes substratos são indicados no gráfico. As amostras de hidroperóxidos de ácido oléico foram diluídas em tampão fosfato de potássio 100mM pH 7.4, contendo 0.12% Triton X-100.

Ao contrário dos experimentos realizados com amostras de Loa-OOH, os resultados obtidos com hidroperóxidos derivados de ácido oléico foram reprodutíveis e mostraram que Ahp1 apresenta de fato atividade sobre a amostra bruta de hidroperóxidos de ácido oléico. Entretanto, não foi observada uma maior eficiência na atividade de Ahp1 sobre esse hidroperóxido, quando a comparamos com outros substratos (*t*-BOOH, Cu-OOH, H₂O₂), na mesma concentração de 200µM (Fig. 13). Este resultado também foi obtido quando outras concentrações de hidroperóxidos foram utilizadas. Não obstante, estes dados constituem a primeira observação da remoção de hidroperóxidos de ácidos graxos por Ahp1, uma característica que pode ter relevância fisiológica em leveduras.

IV.1.2 – Dinâmica de inativação de Ahp1 por hidroperóxidos

Conforme exposto na seção I.3.2, Prx são enzimas sujeitas, de maneira variável, à inativação por seus substratos. Entretanto, pouco se sabe sobre a inativação de Prxs do tipo D (Tabela 1), embora alguns trabalhos tenham sugerido a formação de ácido sulfônico na Cys- S_pH de Ahp1, quando a enzima foi submetida a um tratamento com altas doses de peróxidos

(Trivelli *et al.*, 2003), ou quando Ahp1 foi purificada de células submetidas a estresse oxidativo (Prouzet-Mauléon *et al.*, 2002).

Para abordar esse tema, inicialmente foram feitos dois ensaios preliminares de inativação de Ahp1. O primeiro consistiu na verificação da inibição da atividade enzimática por altas concentrações de peróxidos, o que provoca a inativação de Prxs do tipo A (Chae *et al.*, 1994a). Foi realizada uma série de reações enzimáticas com o sistema Trx, utilizando concentrações crescentes de *t*-BOOH como substrato. A atividade peroxidásica de Ahp1 não foi alterada até o ponto de 10mM de *t*-BOOH (Fig. 14A). Em doses muito menores, Prxs do tipo A sensível são inativadas por peróxidos (Wood *et al.*, 2003b). Após esse ponto, em concentrações de 20, 35 e 50mM houve inibição crescente da atividade enzimática (em 20mM, a enzima perde cerca de 20% de atividade). Fig. 14B mostra a reação com 35mM de *t*-BOOH.



Figura 14. Efeito de doses altas de *t***-BOOH sobre a atividade de Ahp1. A**) Foram adicionados à reação (30°C) 0.25mM NADPH, 10mM *t*-BOOH e 2.1μM Ahp1. A velocidade da reação foi bastante elevada (~1.2μM NADPH/s) e Ahp1 não foi inibida pelo substrato. **B**) Foram adicionados 0.25mM NADPH, 35mM *t*-BOOH e 2.1μM Ahp1 à reação (30°C). Ahp1 perdeu a atividade de maneira dependente da concentração do substrato.

No segundo ensaio, Ahp1 foi previamente incubada com 10 ou 20mM de *t*-BOOH, na presença apenas de tampão, ao longo de uma noite. O objetivo era verificar se esses tratamentos levavam à perda de atividade enzimática. Após os tratamentos, todas as soluções (proteína + peróxido) foram passadas em coluna de exclusão molecular para retirada de excesso de *t*-BOOH e, em seguida, as alíquotas de proteína foram empregadas em ensaios

enzimáticos com o sistema Trx. Os resultados mostraram que Ahp1 previamente tratada com 20mM de *t*-BOOH apresenta uma atividade reduzida em cerca de 20% em comparação com amostras que não sofreram tratamento prévio (Figura 15). Esse resultado está de acordo com aquele apresentado na Fig. 14 e, ao contrário do que foi observado por Prouzet-Mauléon e col. (2002), mostra que Ahp1 pode ser parcialmente inativada após incubação com peróxidos, sem a presença do sistema Trx. Coerentemente, Trivelli e col. (2003) obtiveram amostras de Ahp1 super-oxidada (que não podem ser reduzidas por DTT ou Trx) mediante tratamento com 37mM *t*-BOOH por 48h, na presença apenas de tampão fosfato (Trivelli *et al.*, 2003).



Figura 15. Ensaio de inativação de Ahp1 *in vitro*. As amostras foram tratadas por 1h (temperatura ambiente) com as concentrações indicadas no eixo y. Após lavagem em coluna de exclusão molecular, as amostras foram utilizadas em ensaios enzimáticos com o sistema Trx conforme Fig. 11. A velocidade da reação com a proteína que não sofreu tratamento (0mM) foi considerada como 100%. As reações foram iniciadas com a adição de 500µM de *t*-BOOH.

Em conjunto, os dois ensaios preliminares comprovaram que Ahp1 pode realmente ser inativada *in vitro* por *t*-BOOH, ainda que com doses elevadas do mesmo e por períodos prolongados de exposição. Com a finalidade de aprofundar essas observações e comparar os efeitos de *t*-BOOH e de H_2O_2 sobre a atividade de Ahp1, foi realizado um novo ensaio enzimático, simulando as mesmas condições empregadas por Trivelli e col. (2003), isto é, o pré-tratamento com peróxidos da enzima apenas em tampão.

Alíquotas recém-purificadas de Ahp1 foram inicialmente reduzidas com um excesso de DTT (100X) por 3 horas a 37°C. Após lavagem em coluna de exclusão molecular e diálise,

as amostras de Ahp1 (0.6mM) foram tratadas com: 1X *t*-BOOH (0.6mM), 60X *t*-BOOH (36mM) ou 60X H_2O_2 (36mM) por 48h a 4°C. Em seguida, as amostras foram dialisadas em tampão Tris 5mM pH 7.5, para retirada de hidroperóxidos remanescentes nas alíquotas. Essas amostras foram então empregadas em experimentos de atividade enzimática, utilizando o sistema de *Xylenol Orange* para acompanhar o consumo de *t*-BOOH ao longo do tempo. Os resultados são apresentados na Figura 16.



Figura 16. Inativação de Ahp1 por hidroperóxidos. Os ensaios foram de *Xylenol Orange* e o consumo de *t*-BOOH foi monitorado espectrofotometricamente a 560nm. Todas as reações foram iniciadas com a adição de DTT (10mM) e paralisadas com a adição de HCl (166 mM). As reações foram realizadas a 37°C e duraram 0, 2, 3, 4 ou 5 minutos. Ahp1 foi adicionada às misturas de reação em uma concentração final de 5μM. Os diferentes pré-tratamentos de Ahp1 são indicados no gráfico. Os resultados são a média de dois experimentos independentes.

Esses dados confirmam que Ahp1 é, de fato, parcialmente inativada na presença de *t*-BOOH. Observamos que, mesmo após tratamento com 60X de H_2O_2 , Ahp1 é capaz de consumir totalmente o substrato, *t*-BOOH, ainda que de maneira mais lenta do que a amostra tratada apenas com DTT (amostra *Sem tratamento* indicada na Figura 16). Já as duas amostras tratadas com *t*-BOOH não foram capazes de consumir totalmente o substrato em cinco minutos de incubação, apresentando velocidades de reação menores do que aquelas tratadas apenas com DTT ou com H_2O_2 (amostras tratadas com *t*-BOOH apresentaram velocidades

cerca de 70% menores do que o controle, nos dois primeiros minutos de reação). Por outro lado, testes realizados com Tsa1 mostraram que a enzima é consideravelmente mais sensível à inativação (tratamentos com 1X H_2O_2 inativaram completamente Tsa1 – dados não apresentados), o que está de pleno acordo com a literatura (Biteau *et al.*, 2003).

Com o intuito de relacionar a perda de atividade enzimática observada *in vitro* com a formação de espécies superoxidadas no resíduo de Cys-S_pH de Ahp1, foram realizados experimentos de espectrometria de massas com amostras submetidas aos mesmos tratamentos apresentados na Figura 16. Após denaturação térmica e digestão com tripsina, as amostras foram injetadas em um equipamento de HPLC capilar acoplado ao espectrômetro ESI-Quadrupolo, onde passaram por uma coluna C18 para dessalinização e foram eluídas por meio de um gradiente de 0-60% de acetonitrila em 70 minutos. Os espectros para os experimentos de MS/MS foram adquiridos por análise direta dos peptídeos dupla ou triplamente carregados mais intensos no analisador de m/z (massa sobre carga) do aparelho, o quadrupolo.

Após o processamento dos dados, foram iniciadas as buscas pelos peptídeos de interesse através do programa *Mascot*. Esse programa procura encontrar os valores de m/z detectados no experimento em bancos de dados teóricos de valores de m/z. Nas buscas, foram incluídas as seguintes modificações que poderiam ter ocorrido nos resíduos de aminoácidos em razão dos tratamentos realizados com as proteínas: Cys-SOH (ácido sulfênico nas cisteínas), Cys-SO₂ (ácido sulfínico), Cys-SO₃ (ácido sulfônico), Met-SO (sulfóxido de metionina) ou Met-SO₂ (sulfona de metionina). O valor máximo de erro de massa (Δ *mass*) tolerado nas buscas foi de 1.0 Da.

Não foi possível a detecção de peptídeos contendo a Cys- S_pH na amostra de Ahp1 tratada apenas com DTT, que teve uma cobertura de seqüência de 51%. Apenas a Cys- S_rH (Cys120) foi detectada, na forma reduzida. No caso da amostra tratada com 60X de H_2O_2 ,

foram encontrados peptídeos contendo a Cys120 e também outros contendo a Cys- S_pH Cys62, em uma cobertura de 81% da seqüência (Figura 17).



Figura 17. Resultado de busca no programa *Mascot* para Ahp1 tratada com 60X de H_2O_2 . A parte superior da figura mostra a seqüência de Ahp1 e, em vermelho, os aminoácidos que foram encontrados em peptídeos detectados por MS/MS. Os destaques em verde indicam os resíduos de interesse para o experimento: Cys62, Cys120 e Met144. Abaixo são apresentados os detalhes dos peptídeos que contêm esses resíduos e as modificações variáveis detectadas (no caso, oxidação da Met144). Os valores indicados correspondem a: *Observed* – valor de m/z detectado; *Mr (expt)* – massa monoisotópica teórica; *Mr (calc)* – massa monoisotópica detectada; *Delta* – diferença entre *Mr (expt)* e *Mr (calc)*; *Miss* - n° de sítios de clivagem de tripsina não digeridos; *Sequence* – seqüência do peptídeo. À direita está apresentado o espectro de massa do peptídeo triplamente carregado que contém a cisteína peroxidásica (Cys62), que se encontra reduzida após o tratamento com 60X de H₂O₂.

Os resultados mostram que o tratamento com 60X de H_2O_2 não leva à formação de espécies superoxidadas no resíduo de Cys-S_pH de Ahp1, indicando pouca acessibilidade desse composto à região do sítio ativo da enzima. Por outro lado, o mesmo tratamento acarretou oxidação no resíduo Met144 (sulfóxido de metionina), o que sugere que esse aminoácido esteja localizado em uma região mais exposta ao solvente.

Em contraste, foram detectadas espécies superoxidadas nos resíduos de Cys-S_pH nas amostras tratadas com 1X ou 60X de *t*-BOOH (Figuras 18 e 19, respectivamente). No tratamento com 1X de *t*-BOOH, foi detectada a formação de ácido sulfínico (Cys₆₂-SO₂), mas não foi possível detectar oxidações em resíduos de metionina (cobertura de 82% da seqüência). A fragmentação do peptídeo que contém o resíduo da Cys62 por MS/MS (Fig. 18C), confirma a sua seqüência e a modificação de ácido sulfínico no resíduo de cisteína. Esses dados correspondem às séries de íons b e y características de fragmentação das ligações peptídicas: pode-se determinar a seqüência de um peptídeo analisando as diferenças de massa de um íon da série para o próximo, deduzindo-se qual aminoácido possui a massa que corresponde a essa diferença. As duas séries são formadas a partir da primeira fragmentação do peptídeo, e podem ser medidos no espectrômetro os íons derivados do lado (N – terminal – série b, ou C – terminal - série y) onde ficaram as cargas após a fragmentação. Dessa forma, realiza-se o sequenciamento a partir das duas extremidades dos peptídeos.



Figura 18. Resultado de busca no programa *Mascot* **para Ahp1 tratada com 1X de** *t***-BOOH. A** – Seqüência de Ahp1 mostrando, em vermelho, os aminoácidos que foram encontrados em peptídeos detectados por MS/MS. Os destaques em verde indicam os resíduos de interesse para o experimento: Cys62, Met33 e Met144. Abaixo são apresentados os detalhes dos peptídeos que contêm esses resíduos e as modificações variáveis detectadas (ver também legenda da Fig. 17). B – Espectro de massa do peptídeo que triplamente carregado que contém a cisteína peroxidásica Cys62, que se encontra oxidada em ácido sulfínico (Cys-SO₂) após tratamento com 1X *t*-BOOH. **C** – Espectro de MS/MS mostrando as séries de íons *b* e *y* de fragmentação de ligações peptídicas do peptídeo mostrado em B.

A amostra tratada com 60X de *t*-BOOH apresentou quatro modificações oxidativas (cobertura de 75% da seqüência da proteína): ácidos sulfínico e sulfônico na Cys62, e sulfóxidos nos resíduos Met33 e Met 144 (Figura 19). A presença de mais resíduos oxidados nesse tratamento reflete a pertinência do método para esse tipo de análise de modificações em proteínas. Esse resultado está de acordo com o modelo de inativação proposto para Ahp1 e com os dados da Fig. 16. No entanto, esse processo oxidativo deve ocorrer em apenas uma fração do total de proteína, uma vez que a enzima ainda retém atividade após esses tratamentos.



Figura 19. Resultado de busca no programa Mascot para Ahp1 tratada com 60X de *t*-BOOH. A parte superior da figura mostra a seqüência de Ahp1 e, em vermelho, os aminoácidos que foram encontrados em peptídeos detectados por MS/MS. Os destaques em verde indicam os resíduos de interesse para o experimento: Cys62, Met33 e Met144. Sob a seqüência são apresentados os detalhes dos peptídeos que contêm esses resíduos e as modificações variáveis detectadas (ver também legenda da Fig. 17). Indicados por setas, os espectros de massa dos peptídeos triplamente carregados que contêm a cisteína peroxidásica (Cys62) são apresentados abaixo. O resíduo Cys62 foi detectado oxidado em ácido sulfínico (Cys- SO2; peptídeo à esquerda - m/z = 1107.7518) ou ácido sulfônico – cysteic acid (Cys-SO3; peptídeo à direita - m/z = 1113.0471).

IV.2 - Caracterização estrutural de Ahp1 e Tsa1

IV.2.1 – Ahp1

Uma das metas propostas do presente estudo era a resolução da estrutura tridimensional de Ahp1, dentro do programa *Smolbnet (Structural Molecular Biology Network)* da Fapesp, em colaboração com o grupo da Dra. Beatriz Guimarães do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Os resultados provenientes dessa linha de trabalho seriam potencialmente valiosos para o entendimento de mecanismos de ação e inativação desta enzima, de características estruturais e bioquímicas de seus substratos preferenciais, bem como para comparações estruturais com outras Prxs, particularmente com Tsa1.

Todos os estudos de cristalografia de raios X envolvem cinco etapas muito bem definidas: 1 – Cristalização; 2 – Difração de raios X; 3 – Processamento e Redução dos dados de difração de raios X; 4 – Resolução do problema das fases; 5 – Definição da estrutura tridimensional da proteína. Cada passo depende do sucesso da etapa anterior, não sendo possível chegar ao final do processo sem passar por todas elas.

Dessa forma, os primeiros testes de cristalização foram realizados com *kits* comerciais, como *Crystal Screen* (Hampton Research) e *Wizard* (Jena Biosciences), conforme descrito na seção III.13.1. A solução 18 do *kit Wizard* 2 (20% PEG 3000; 0.2M Ca(OAc)₂; 0.1M Tris pH 7.0) apresentou os melhores resultados preliminares.

Foram feitos refinamentos desta condição inicial, variando-se as concentrações de sal $Ca(OAc)_2$ ou precipitante (PEG 3000), o tampão (Tris) e o pH (7.0). Em diversas condições houve crescimento de cristais. Os melhores resultados de cristalização foram obtidos com a solução: 20% PEG 3000; 0.2M $Ca(OAc)_2$; 0.1M Bis-Tris Propano, pH 6.5 e atingiram dimensões máximas de 0.7 x 0.4 x 0.05mm após seis semanas (Fig. 20A).



Figura 20: Cristal de Ahp1 e padrão de difração obtido. A) Cristal de Ahp1 obtido após seis semanas de crescimento. A solução de cristalização utilizada foi: 20% PEG 3000; 0.2M Ca(OAc)₂; 0.1M Bis-Tris Propano, pH 6.5. **B)** Imagem de um intervalo de 1° da difração de um cristal semelhante ao apresentado em **A**: o padrão de difração se estendeu até 2.2 Å.

Provenientes desta condição de cristalização, apenas cristais de Ahp1 tratada com *t*-BOOH obtiveram difração bem-sucedida. Cristais semelhantes ao apresentado na Fig. 20A foram crio-protegidos utilizando a mesma solução presente no poço suplementada com 25% glicerol, resfriados a 110K em um fluxo de gás nitrogênio, e submetidos à difração. Os melhores dados de difração foram coletados em uma resolução de 2.2Å (Fig. 20B).

O conjunto de 240 imagens de difração, perfazendo 121512 reflexões, foi processado e reduzido utilizando os programas *MOSFLM* e *SCALA* do pacote do CCP4 (*Collaborative Computational Project 4*, 1994). Com isso, foram detectadas 32233 reflexões únicas, com um R_{sym} de 6.9%, e foi possível a indexação dos dados, i.e., a determinação do grupo espacial do cristal e dos parâmetros de sua célula unitária. Por meio dos parâmetros da célula unitária e do peso molecular de Ahp1, é possível estimar a porcentagem de solvente e o número de moléculas que compõem a unidade assimétrica do cristal. O cristal de Ahp1 apresentou um coeficiente de Matthews (V_M) (Matthews, 1968) de 1.9 Å³ Da⁻¹, sendo possível que quatro moléculas compusessem a unidade assimétrica. O sumário das estatísticas dos dados coletados é apresentado na Tabela 3.
Tabela 3. Parâmetros de coleta e estatísticas dos dados cristalográficos.

Temperatura (K)	110						
Comprimento de onda (Å)	1.421						
Grupo espacial	P2 ₁						
Parâmetros da célula unitária	a = 39.13Å, $b = 127.80$ Å, $c = 66.42$ Å $\beta = 103.24$ °						
N° total de reflexões	121512 (17465)						
N° de reflexões únicas	32233 (4704)						
Completeza (%)	100 (100)						
Multiplicidade	3.8 (3.7)						
${}^{a}R_{sym}(\%)$	6.9 (41.6)						
Média I/&I)	14.1 (2.9)						

Valores em parênteses são relativos à camada de maior resolução

 ${}^{a}R_{sym} = \Sigma_{hkl} \Sigma_{i} \mid I_{hkl, i} - \langle I \rangle_{hkl} \mid / \Sigma \mid \langle I \rangle_{hkl} \mid$

Para resolução do problema das fases, inicialmente foi adotado o procedimento de substituição molecular. O procedimento de resolução de estrutura tridimensional de uma proteína por substituição molecular pressupõe a existência de proteínas homólogas cujas coordenadas atômicas já tenham sido determinadas e depositadas no Banco de Dados de Proteínas (*Protein Data Bank* - PDB). Basicamente, são fornecidos aos programas computacionais: (1) os dados experimentais de difração obtidos, com os parâmetros de célula unitária (arquivo .mtz), e (2) os arquivos de coordenadas atômicas de proteínas homólogas conhecidas (arquivo .pdb). Dessa forma, a partir das coordenadas atômicas de uma proteína homóloga, os programas procuram orientar e posicionar as moléculas usadas para a busca nos dados experimentais coletados, de modo a permitir a resolução do problema das fases. Quanto maior a identidade da proteína que se deseja determinar a estrutura com as proteínas usadas como busca, maior a facilidade em se conseguir uma solução coerente com os dados de difração e maior a rapidez do posterior refinamento desse modelo.

Nesse contexto, as proteínas com estruturas definidas que apresentam maior identidade com Ahp1 são: Prx do tipo II de *P. trichocarpa* – 38% de identidade (PDB: 1TP9; Echalier *et al.*, 2005); o domínio de Prx da proteína híbrida PrxV de *H. influenzae* - 34% de identidade (PDB: 1NM3; Kim *et al.*, 2003); e PrxV de humanos – 29% de identidade (PDB: 1OC3; Evrard *et al.*, 2004). As coordenadas de cada uma dessas proteínas foram inicialmente utilizadas nos programas *AMoRe* (Navazza, 1994) e *MOLREP*, do pacote do CCP4. Também foram feitas algumas modificações nesses modelos, como a retirada de regiões de *loops* móveis, o que poderia auxiliar na obtenção de um modelo inicial de substituição molecular. Todavia, todas as soluções geradas por esses programas foram insatisfatórias, seja pelo alto número de contatos entre as moléculas da unidade assimétrica, pela baixa qualidade do empacotamento obtido por meio de simetria cristalográfica (do grupo espacial P2₁), ou pela má qualidade dos mapas de densidade eletrônica.

Em razão dessas dificuldades, foram iniciadas as tentativas de resolução das fases através do programa *Phaser* (Read, 2001; Storoni *et al.*, 2004). Diversas estratégias de busca foram adotadas, isto é, para cada proteína homóloga fornecida ao programa, foram procurados três monômeros, quatro monômeros, um dímero e dois monômeros, um dímero e um monômero ou dois dímeros, de acordo com a estimativa do número de moléculas na unidade assimétrica pelo coeficiente de Matthews. A melhor solução foi encontrada utilizando o modelo de PrxV de humanos (PDB: 10C3), com truncagens em dois pequenos *loops* e procurando-se por quatro moléculas na unidade assimétrica. Esse modelo não apresenta contatos entre as moléculas e o empacotamento gerado por simetria cristalográfica é bastante satisfatório, assim como a qualidade dos mapas de densidade eletrônica gerados com ele. Uma representação das quatro moléculas desse modelo e da célula unitária do cristal é apresentada na Figura 21.



Figura 21. Modelo inicial de substituição molecular de Ahp1 em sua célula unitária. O modelo foi gerado através do programa *Phaser*, usando as coordenadas de PrxV (PDB: 1OC3) de *H. sapiens* como modelo de busca. As quatro moléculas da unidade assimétrica estão representadas com cores diferenciadas. O conteúdo de solvente do cristal é de 35.2%, estimado por meio do coeficiente de Matthews.

A comparação do modelo inicial de substituição molecular com outras proteínas homólogas a Ahp1 mostra a presença do enovelamento Trx central, típico das proteínas da família das Prxs, além de outras características de estruturas secundárias similares, indicando a pertinência do modelo para os estudos subseqüentes (Figura 22). Conforme mencionado anteriormente, Ahp1 foi objeto de um estudo de ressonância magnética nuclear que propôs um primeiro modelo não refinado de sua estrutura em solução (Trivelli *et al.*, 2003). Assim, uma outra comparação interessante é a do modelo inicial de substituição molecular com esse modelo preliminar obtido por NMR, o que também revela que a disposição e o número de folhas β e de α -hélices são bastante similares entre eles. No modelo gerado por NMR são observadas duas folhas β a mais em relação ao modelo de substituição molecular, o que possivelmente se dá em razão das truncagens do modelo de PrxV utilizado inicialmente.

Enovelamento Trx



Figura 22. Sobreposição do modelo de substituição molecular com proteínas homólogas. Em vermelho está representado o modelo de substituição molecular gerado pelo programa *Phaser* (Fig. 21); em azul, o modelo 1OC3 (PrxV de *H. sapiens*), usado como busca na substituição molecular; e em verde, o modelo 1TP9 (Prx do tipo II, de *P. trichocarpa*). A seta indica o enovelamento Trx central, composto por um conjunto de cinco folhas β antiparalelas e quatro α -hélices.

Para iniciar o processo de construção e refinamento do modelo estrutural de Ahp1, todos os resíduos do modelo de substituição molecular apresentado na Fig. 21 foram mutados para alanina (com exceção dos resíduos de glicina), o aminoácido que possui a menor cadeia lateral e representa estereoquimicamente todos os outros, salvo glicina e prolina. Posteriormente, este modelo de polialanina, em conjunto com o arquivo de coordenadas atômicas gerado pelo programa *Phaser* (e derivado daquele gerado pelo *SCALA*) foram utilizados como *inputs* para o programa *Resolve* (Terwilliger, 1999, 2000 & 2003). Este programa utiliza um algoritmo de máxima probabilidade (*maximum likelihood*) na determinação acurada dos valores dos vetores de fator de estrutura (F_h), utilizados nos cálculos de geração dos mapas de densidade eletrônica. Com isso, foi gerado um novo modelo de polialanina, com novos mapas de densidade, os quais foram analisados em sobreposição com o modelo original de substituição molecular gerado pelo programa *Phaser*. As melhores regiões das quatro cadeias desse novo modelo, i.e., regiões mais coerentes com o modelo original e com boa continuidade nos mapas de densidade, foram selecionadas, iniciando assim o processo final de construção e refinamento do modelo estrutural de Ahp1. Um exemplo de continuidade do mapa de densidade eletrônica 2Fo – Fc é mostrado na Figura 23.



Figura 23. Seção do mapa de densidade eletrônica de Ahp1 de leveduras. O mapa apresenta boa continuidade e adequação ao modelo. Na figura estão representados os resíduos 6-10 de um dos monômeros (Fig. 21). O mapa diferença 2Fo-Fc foi contornado a 1.5σ.

Não obstante os esforços que foram feitos na tentativa de resolução da estrutura tridimensional da proteína, encontrou-se muita dificuldade para avançar no processo de construção e refinamento, isto é, em baixar os valores de erros (R_{free} e R_{factor}) inerentes ao modelo inicial. Provavelmente isso se deveu à identidade relativamente baixa de Ahp1 com a proteína utilizada para a busca, PrxV de *H. sapiens* (PDB: 10C3), que é de 29%.

Para modificações e construções nas cadeias do modelo, utilizou-se inicialmente o programa *O* (Jones *et al.*, 1991) e, posteriormente, o programa *Coot* (Emsley e Cowtan, 2004), que apresenta uma interface mais amigável para realização das tarefas. Já para refinamento do modelo, foi utilizado basicamente o programa *RefMac5* (Murshudov *et al.*, 1997), do pacote do CCP4. Além deste, também foi bastante utilizado, em paralelo, o conjunto de programas do CNS (*Crystallography & NMR System*) (Brunger *et al.*, 1998), que, ao contrário do *RefMac*, realiza os procedimentos chamados de anelamento simulado

(*simulated annealing*) e minimização de energia. Esses algoritmos simulam um superaquecimento das moléculas do modelo (a 5000K) e um posterior resfriamento gradativo (de 50 em 50K), onde são corrigidos erros de posicionamento de rotâmeros de cadeias laterais de aminoácidos, adequação de resíduos adicionados às cadeias principais, torsões de ângulos, além de outros parâmetros, os quais aprimoram a estereoquímica dos modelos e podem levar a uma melhoria nos seus mapas de densidade eletrônica.

Ao longo dos procedimentos de construção e refinamento, nos quais resíduos de alanina eram adicionados às cadeias onde havia densidade eletrônica não-preenchida, as posições individuais de cada átomo, as distâncias e os ângulos de ligação entre eles eram aprimorados manualmente, e eram feitas mutações em resíduos que apresentavam "espaços" evidentes para cadeias laterais maiores que a de alanina (e.g. serina) nos mapas de densidade, os valores de erro foram vagarosamente reduzidos a cada ciclo. No entanto, os decréscimos nesses valores não foram suficientes para uma efetiva melhoria geral na qualidade dos mapas de densidade eletrônica. Um valor de R_{free} de 0.5 significa que há uma chance de 50% de a posição conferida a um átomo ser equivocada. Com o passar dos ciclos de refinamento, foram conseguidos decréscimos discretos nos valores de R_{free}, sendo que o valor total nunca chegou a ser inferior a 0.5. O valor de R_{factor}, por outro lado, era notadamente mais reduzido (chegando à ordem de 0.4), o que é explicado em razão das modificações que eram realizadas nas cadeias, como os ajustes nas distâncias entre os átomos. Porém, como a diminuição desse valor não era acompanhada por uma redução no R_{free} (que contém 5% das reflexões totais não-refinadas e serve como uma validação para os valores de R_{factor}), conclui-se que o processo de refinamento não estava caminhando para o resultado esperado. Infelizmente, todo o trabalho computacional que vinha sendo feito com o modelo de Ahp1 foi deixado de lado. Essa decisão foi tomada após várias discussões com Dra. Beatriz Guimarães (Centro de Biologia Molecular Estrutural - LNLS) e o trabalho de cristalografia de Ahp1 foi redirecionado.

Dessa forma, houve o retorno à sala de cristalização e à linha de luz do LNLS, na tentativa de se obter novos cristais. Foi feita uma nova triagem de condições de cristalização, a partir daquelas obtidas anteriormente, buscando-se acelerar o crescimento dos cristais. Uma das primeiras modificações foi a adoção de PEG2000 MME (Mono-Metil Éster) como agente precipitante, o que proporcionou bons resultados. A triagem foi realizada partindo da seguinte condição: 20% PEG2000 MME + 0.1M Bis-Tris Propano, pH 6.5 + 0.2M Ca(OAc)₂, que foi utilizada anteriormente (com a modificação do PEG3000 para PEG2000 MME), porém adicionando-se diferentes soluções como aditivos. Entre essas, utilizou-se os três *kits* de *Additive Screen* (Hampton Research) e os dois *kits Crystal Screen* (96 soluções), como aditivos à condição inicial de cristalização.

Foram obtidos resultados promissores e duas novas perspectivas de condições de cristalização: (1) percebeu-se que, quando foram adicionados à condição inicial, diferentes álcoois, como n-propanol, isopropanol, metanol ou 1,6 hexanodiol, houve rápido aparecimento de cristais, de melhor formação e tamanho que aqueles precedentes; (2) uma solução do *kit Crystal Screen 2*, contendo 0.2M fosfato de amônia, 0.1M Tris pH 8.5 e 50% MPD – solução A, quando foi usada como aditivo (a 10% da concentração original) causou a precipitação da solução de cristalização, tendo, entretanto, levado à formação de bons cristais para experimentos de difração de raios X e de forma bem reprodutível. Outros aditivos que forneceram bons resultados foram MgCl₂ ou CaCl₂, porém de modos não tão reprodutíveis quanto, principalmente, isopropanol e n-propanol. As novas condições obtidas (20% PEG2000 MME + 0.1M Bis-Tris Propano, pH 6.5 + 0.2M Ca(OAc)₂, com a adição de 1-8% de isopropanol ou n-propanol, ou ainda 10% da solução A, descrita acima, permitiram o crescimento de cristais em cerca de 5-7 dias, que foram então levados para os experimentos de difração de raios X.

Como melhor resultado, um excelente conjunto de dados de Ahp1 tratada com 10mM *t*-BOOH a 1.8Å de resolução foi coletado. Este conjunto foi processado com o programa *MOSFLM* (Leslie, 1992), o que revelou um alto isomorfismo para com o cristal nativo que vinha sendo trabalhado. No entanto, novamente esbarrou-se com as mesmas adversidades descritas anteriormente para a resolução do problema das fases por substituição molecular.

Assim, além de repetir exaustivamente os ensaios de cristalização com as novas condições, também foram realizados testes para obtenção de cristais derivados, isto é, com átomos pesados incorporados às estruturas cristalinas. A nova perspectiva foi então a resolução do problema das fases através dos métodos de difração anômala de átomos pesados, como SIRAS-MIRAS (*Single/Multiple Isomorphous Replacement Anomalous Scattering*) e SAD (*Single-wavelength Anomalous Dispersion*).

Para tal, foram adotadas três estratégias: (1) *fast-soaking*, (2) *slow-soaking* e (3) cocristalização. Primeiramente, foram feitos testes de *fast-soaking*, que consiste em adicionar soluções de átomos pesados em altas concentrações (0.25 - 1.0M), por um curto tempo (10 - 60s), às soluções de crio-proteção contendo cristais nativos recentes. Ao longo desse tempo, os cristais eram observados em lupa para checar suas integridades, para então proceder-se com a difração. Foram feitos testes com diferentes soluções de sais de átomos pesados, como cloreto de gadolínio III (Gd_2Cl_3), acetato de samário [$Sm(C_2H_3O_2)_3$], cloreto de césio ($CsCl_2$) e iodeto de sódio (NaI). De maneira geral, os cristais de Ahp1 mostraram-se resistentes aos tratamentos com esses compostos, embora fossem de difícil manipulação e rachassem com certa freqüência ao serem manuseados. Em paralelo, também foi realizada a adição dessas mesmas soluções (em concentrações menores, de 10 a 50mM) a gotas já contendo cristais nativos crescidos nas condições padrão, uma noite antes do dia de coleta de dados de difração (*slow-soaking*). Apesar disso, ainda assim foi realizado *fast-soaking* nesses cristais e não foi observado prejuízos em suas difrações.

Além desses dois procedimentos, foram feitos ensaios de co-cristalização de Ahp1 com as diferentes soluções de sais de átomos pesados. As gotas eram compostas da solução de cristalização usada para o crescimento dos cristais nativos, com a adição das soluções de átomos pesados em concentrações variando de 0.5 – 50mM. Obteve-se sucesso na cocristalização com césio, iodo e samário, em concentrações de 1.0 a 25mM. Entretanto, um problema desta estratégia é o risco de se obter cristais derivados anisomórficos, isto é, com diferentes parâmetros de célula unitária, em relação aos cristais nativos. Nesse caso, o problema das fases deveria ser resolvido através do método de SAD.

Cristal Derivado	Fast-soaking	Slow-soaking	Co-cristalização		
Samário	X	X	-		
Gadolínio	Χ	-	-		
Iodo	X	-	X		
Césio	X	X	X		
Ouro	-	-	n.r.		
Platina	-	-	n.r.		
Mercúrio	-	-	n.r.		

Tabela 4. Estratégias de cristalografia de Ahp1 com átomos pesados.

X Conjuntos de dados coletado; - Conjunto de dados não coletado; n.r. ensaio não realizado.

Todos os conjuntos de dados foram coletados na linha de luz MX-01 do LNLS. Um cristal derivado com gadolínio foi congelado em nitrogênio líquido após a coleta, e levado à *National Synchrotron Light Source* do *Brookhaven National Laboratory* (Nova York, EUA) para coleta em linha de luz com feixe de maior intensidade (realizada pelo doutorando Fábio Rinaldi, do grupo da Prof. Dra. Beatriz Guimarães). Para redução e processamento dos dados, foram utilizados os programas *MOSFLM*, *XDS* (Kabsch, 1993) e *SCALA*.

A informação mais importante a ser obtida a essa altura era acerca da incorporação ou não de átomos pesados à rede cristalina. Caso ocorra incorporação, esses átomos exibem o que se chama de sinal anômalo, que é uma pequena diferença nos valores de sua difração (i.e. fatores de estrutura), em relação aos átomos leves. Através dessas pequenas diferenças é que pode ser resolvido o problema das fases, uma vez que o sinal anômalo serve como uma referência para os outros átomos. Além disso, um outro ponto importante era o grau de isomorfismo em relação aos cristais nativos com dados já coletados. Essa informação definiria a estratégia posterior do trabalho de resolução da estrutura de Ahp1. Os parâmetros de célula unitária foram obtidos após escalonamento com o programa *SCALA*, assim como a informação inicial acerca da incorporação dos átomos pesados aos cristais protéicos.

Apesar das diferentes estratégias abordadas para a produção dos cristais derivados, não foi possível a obtenção de dados de difração anômala adequados. Em alguns casos, simplesmente não foi observado sinal anômalo, não obstante os pré-tratamentos realizados. Esses resultados foram bastante frustrantes, pois só se tomava conhecimento deles após as demoradas coletas (para a qualidade de sinal anômalo, quanto maior a multiplicidade do conjunto de dados, melhor a medida do sinal, o que implica em uma coleta de dados extensa), ou durante elas, quando se iniciava o processamento dos dados na estação de trabalho da própria linha de luz. Por diversas vezes as coletas foram interrompidas antes do fim por essa razão.

Em outros casos, os processamentos com o programa *SCALA* apontavam para a incorporação de átomos pesados, por meio de parâmetros estatísticos que indicam a presença de sinal anômalo (*Rmeas* O e *Rmeas*). Os melhores conjuntos de dados foram obtidos com acetato de samário, cloreto de gadolínio e iodeto de sódio, todos com boa resolução (de 2.5 a 2.8Å). Esses dados foram exaustivamente processados, inclusive com cortes de resolução, para se obter a melhor redução e escalonamento dos dados possível. Os arquivos .mtz gerados nos processamentos foram então usados como *inputs* para outros programas, como o *auto-SHARP*, do pacote do CCP4, que realiza operações matemáticas sofisticadas na tentativa de se encontrar os sítios de incorporação dos átomos, e dessa forma chegar à resolução das fases. No entanto, infelizmente não se chegou a resultados satisfatórios com nenhum conjunto de dados, isto é, não foi possível a detecção de sinais anômalos de nenhum átomo pesado.

Cristais de Ahp1 com seleno-metionina incorporada - MAD

Ao longo do tempo de realização dos experimentos descritos acima, foram também iniciados os testes para obtenção de cristais de Ahp1 com seleno-metioninas incorporadas em lugar das três metioninas presentes em cada molécula. Esse procedimento visava a produção de cristais protéicos para testes da nova linha de luz do LNLS, a linha MX-02, que é uma linha que apresenta feixes de raios X com diferentes comprimentos de ondas. A produção de apenas um cristal bom (i.e. que cristaliza e difrate bem) desta versão da proteína, ao menos teoricamente, seria suficiente para resolução do problema das fases e da estrutura de Ahp1, uma vez que não haveria a preocupação com isomorfismo com cristais nativos, nem tampouco com a incorporação ou não dos átomos pesados. Coletas de dados de um único cristal, em diferentes comprimentos de ondas, o que se chama *MAD (Multi-wavelength Anomalous Dispersion)*, forneceriam sinais anômalos detectáveis dos átomos de selênio presentes *a priori* em cada molécula. A proteína Ahp1 – SeMet produzida e purificada no laboratório (Figura 24) e a incorporação de SeMet à proteína foi confirmada através de espectrometria de massas, da mesma forma que foi feito para a caracterização da proteína nativa.

No entanto, por ser uma versão diferente de Ahp1, era esperado que as condições de cristalização não fossem exatamente iguais àquelas utilizadas anteriormente. De fato, a obtenção de cristais se mostrou de difícil execução, o que só foi resolvido após a adição de aditivos às gotas de cristalização. Após diversas tentativas de cristalização, foram obtidos os primeiros cristais da versão "pesada" de Ahp1, com a seguinte condição de cristalização: 18 - 23% PEG2000 MME + 0.1M Bis-Tris, pH 5.6 - 6.6 + 0.2M Ca(OAc)₂ + 2 – 6% isopropanol (mas não n-propanol) <u>ou</u> 5 – 10% de 0.2M fosfato de amônia + 0.1M Tris pH 8.5. Os cristais de Ahp1 – SeMet foram levados para experimentos de difração, durante períodos de testes da nova linha de luz MX-02. Infelizmente, porém, não foram conseguidos resultados

satisfatórios de difração de raios X até o término do projeto, o que foi bastante frustrante, tendo em vista todos os esforços despendidos nessa parte do trabalho.



Figura 24. SDS-PAGE de Ahp1 – SeMet em condições não-redutoras. Uma alíquota contendo cerca de 5µg de proteína purificada no laboratório foi aplicada em gel de poliacrilamida 12%. No lado esquerdo do gel foi aplicado o padrão de peso molecular *Protein Ladder* (Invitrogen).

IV.2.2 – Tsa1

Tsa1 de *S. cerevisiae* foi a primeira peroxirredoxina a ser caracterizada (Kim *et al.*, 1988) e é uma das proteínas mais estudadas dessa família. Trata-se de uma proteína de 25kDa bastante abundante em leveduras, podendo representar até 1% do total de proteínas solúveis das células. Embora existam diversos estudos funcionais recentes sobre Tsa1, incluindo aqui a dinâmica de oxidação/redução de sua Cys-S_pH (Cys47) (Biteau *et al.*, 2003), a sua dupla atividade bioquímica transiente de peroxidase e chaperona, e as grandes modificações que ocorrem em sua estrutura quaternária ao longo desse processo (Jang *et al.*, 2004), não há informações estruturais a nível atômico dessa proteína na literatura.

Nesse sentido, um dos objetivos deste trabalho era a resolução da estrutura tridimensional de Tsa1, o que foi feito em colaboração com o pós-doutorando Marcos Oliveira (IB/USP). Essas informações seriam importantes para um melhor entendimento do processo de oligomerização dessa enzima e, conseqüentemente da troca de sua atividade bioquímica de peroxidase e chaperona. Além disso, os dados permitiriam uma comparação interessante com Ahp1, por exemplo, a respeito das diferenças na dinâmica de inativação enzimática e da habilidade dessas proteínas serem reduzidas ou não por Srx.

Experimentos de cristalização realizados anteriormente por nosso grupo com a versão nativa de Tsa1 produziram cristais bem formados e de boas dimensões (Figura 25). No entanto, mesmo após refinamentos de condições de cristalização, não foi possível obter cristais que difratassem apropriadamente os raios X, tendo sido apenas alcançadas difrações com resoluções entre 7 e 8Å. É possível que tais resultados se devam a uma desorganização interna do cristal, ocasionada por uma mistura de proteínas com diferentes graus de oligomerização, conforme descrito por Jang e col., 2004. Nesse trabalho, foi possível a detecção de dímeros, tetrâmeros e até complexos maiores que 1000 kDa, em uma mesma amostra de Tsa1 (Jang *et al.*, 2004).



Figura 25. Cristal de Tsa1 nativa. A solução de cristalização continha: 0.1M tampão citrato, pH 4.5; 4% PEG8000 e 8% etileno glicol. Apesar de aparentemente bem formado e alcançar até 1mm, só foram obtidos resultados de difração em baixa resolução (>5Å).

Duas versões de Tsa1 com substituições simples de aminoácidos (C170S – Cys-S_rH e C47S – Cys-S_pH) (produzidas no laboratório conforme descrito por Cussiol e col. (2003) para a enzima Ohr de *Xyllela fastidiosa*), foram então empregadas em ensaios de cristalização na tentativa de solucionar esse problema. Triagens cristalográficas com Tsa1 – C170S (10mg/mL) utilizando os *kits Crystal Screen* 1 e 2 (Hampton Research) produziram cristais promissores em algumas condições. No entanto, assim como a proteína nativa, não foi possível obter cristais que difratassem apropriadamente.

Em contraste com os dados obtidos para a proteína nativa e para a versão mutante Tsa1 – C170S, os cristais obtidos com a versão C47S portaram-se bem nos experimentos de difração de raios X. As condições de cristalização foram derivadas daquelas obtidas com as outras duas versões da proteína, conforme exemplificado na Fig. 25. Inicialmente, foi possível obter resultados de difração desses cristais em boa resolução (2.5Å), porém, devido às altas mosaicidades dos conjuntos de dados, não foram possíveis as suas indexações e a definição de seus grupos espaciais. Por essa razão, foram feitos novos refinamentos das condições de cristalização.

A solução de cristalização inicial continha 0.1M tampão citrato, pH 4.2; 0.2M NaCl e 10% PEG 3000. Variando-se o pH do tampão, a concentração de sal ou a concentração do precipitante, e realizando também triagens com os *kits Additive Screen* (Hampton Research), chegamos à melhor condição de cristalização. Ela contém 0.1M tampão citrato, pH 4.2; 10% PEG 3000 e 0.1M NaF (aditivo). Os cristais atingiram dimensões máximas de 0.5 x 0.3 x 0.05 mm após três dias de crescimento (Figura 26).



Figura 26. Cristal de Tsa1 – C47S utilizado em experimento de difração. A solução de cristalização continha 0.1M tampão citrato, pH 4.2; 10% PEG 3000; 0.1M NaF. A proteína foi previamente tratada com 10mM DTT por 1h a temperatura ambiente.

Foi obtido um bom conjunto de dados de difração de raios X, com resolução máxima de 3.0Å, oriundo de um cristal de Tsa1 – C47S previamente tratada com 10mM DTT (Fig. 26). O cristal pertence ao grupo espacial monoclínico C2, com parâmetros de célula unitária de $a = 239.98 \ b = 51.96$, $c = 192.35 \ \text{Å}$, $\beta = 92.33^{\circ}$. Para estimativa do número de moléculas na unidade assimétrica e porcentagem de solvente do cristal, o coeficiente de Matthews foi

calculado e seu valor foi de 2.5 Å³ Da⁻¹. Com isso, é esperado um total de 10 monômeros na unidade assimétrica e um teor de solvente de 51.2% no cristal. Através do re-processamento do mesmo conjunto de dados, foi possível aumentar a faixa de resolução do cristal para 2.8Å, perdendo-se um pouco em completeza. O resumo das estatísticas do conjunto de dados obtido é apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros de coleta e estatísticas dos dados cristalográficos.

 7 1	1		^ .	~	1 .		<u>۰</u>	1	1	•		1	~
1/0	oroc c	m	norontococ	000 1	ralati	ITTOC .	0	anmode	n d	0 m 0 1	Or.	racal	11000
v a i			DALENDESES	SAU			4	Camada	1 (1		()		incao
, u			purcheoso	buo i	l'ului		u	cumuu	u u	c mai	.01.	10001	luçuo
			1										

Temperatura (K)	110						
Comprimento de onda (Å)	1.431						
Grupo espacial	C2						
Parâmetros da célula unitária	a = 239.98Å $b = 51.96$ Å $c = 192.35$ Å $\beta = 92.33^{\circ}$						
Faixa de resolução (Å)	42.60 - 2.8 (3.2 - 2.8)						
N° total de reflexões	230659						
N° de reflexões únicas	58102						
Completeza (%)	97.7 (97.7)						
Multiplicidade	4.0 (3.8)						
${}^{a}R_{sym}(\%)$	10.5 (42.4)						
Média I/&(I)	13.7 (3.2)						

 ${}^{a}R_{sym} = \Sigma_{hkl} \Sigma_{i} \mid I_{hkl, i} - \langle I \rangle_{hkl} \mid / \Sigma \mid \langle I \rangle_{hkl} \mid$

Assim como foi feito com Ahp1, o procedimento de substituição molecular foi inicialmente adotado na tentativa de resolução do problema das fases. Para tal, as coordenadas atômicas da proteína decamérica PrxII ou TPxB de humanos (Schröder *et al.*, 2000) foi utilizada como modelo de busca em protocolos de substituição molecular (66% de identidade com Tsa1; PDB: 1QMV) no programa *MOLREP*, do pacote do CCP4 (Vagin e Teplyakov, 1997). Uma solução inicial de substituição molecular foi encontrada rapidamente e apresentou 10 monômeros na unidade assimétrica, conforme predito pelo coeficiente de Matthews.

Modificações (i.e., adições de resíduos e ajustes finos nas posições e distâncias dos átomos) neste modelo inicial vêm sendo feitas por meio do programa *Coot*, e os modelos resultantes são refinados com o programa *RefMac5*. Em virtude da alta identidade entre as proteínas de levedura e humanos, os mapas de densidade eletrônica gerados apresentam uma excelente adequação ao modelo decamérico, o que facilita o processo de refinamento da estrutura. Por meio desses procedimentos, os valores de R_{free} e R_{factor} sofreram quedas acentuadas desde o modelo inicial de substituição molecular, de acordo com o esperado para uma solução correta. No momento da redação deste texto, os valores eram da ordem de 39% e 29%, respectivamente.



Figura 27. Modelo da estrutura decamérica de Tsa1 - C47S. O modelo foi gerado por substituição molecular (coordenadas de Prx2 de humanos) através do programa *MOLREP*. **A -** Visão geral do decâmero de Tsa1 - C47S (pentâmero de dímeros). Cada monômero é representado com uma tonalidade diferente. **B -** Detalhamento da região do sítio ativo de um dos dímeros (cadeia A, cor amarela; cadeia B, cor azul). Alguns resíduos que compõem o sítio ativo estão representados: Ala170-A (correspondente à Cys170 – Cys-S_rH, ainda não adicionado ao modelo); Ser47-B (correspondente à Cys47 – Cys-S_pH mutada para Ser); e os motivos GGLG do monômero B e YF do monômero A (o resíduo de tirosina ainda não foi adicionado ao modelo).

A organização da estrutura quaternária de Tsa1 – C47S mostrou-se bastante similar à de outras proteínas decaméricas cujas estruturas já haviam sido solucionadas, isto é, um pentâmero de dímeros com uma forma circular (*doughnut-like*) (Figura 27). Quanto à região do sítio ativo, apresentada na Fig. 27B, três comentários devem ser feitos: (1) como os aminoácidos que compõem o motivo GGLG são pequenos, suas posições, embora pareçam corretamente posicionadas, poderão ainda variar ao longo do processo de refinamento da estrutura; (2) a região C- terminal ainda apresenta mapas de densidade eletrônica fragmentados, necessitando ainda de construção para adição de alguns resíduos. Por isso, os resíduos de tirosina (do motivo YF) e da Cys-S_rH ainda não foram "encontrados" no modelo de substituição molecular; (3) na versão da proteína contendo a mutação da Cys-S_pH (Cys47) em serina, a conformação do sítio ativo corresponde provavelmente à sua forma reduzida (quando o tiól da Cys47 estaria na forma de tiolato S⁻), ao contrário do que acontece no modelo de hPrx2 usado para substituição molecular, no qual a Cys-S_pH encontra-se oxidada em ácido sulfínico (Schröder *et al.*, 2000).

Foi elaborado um manuscrito que reúne os dados de cristalografia de Tsa1 – C47S apresentados acima. Este manuscrito foi publicado em agosto de 2007 no periódico *Acta Crystallographica Section F*. A versão final é apresentada no Anexo II.

IV.3 – Regulação Gênica

IV.3.1 – Relações de Ahp1 com catalases e outras Prxs

Em uma outra frente do presente trabalho, buscou-se elucidar alguns mecanismos que regulam a expressão do gene *AHP1* em diferentes condições fisiológicas, no intuito de relacionar possíveis funções de Ahp1 com outras proteínas do sistema de defesas antioxidantes. Uma das condições mais estudadas foi o crescimento das leveduras em ácido oléico.

O crescimento de células em meio contendo oleato como fonte de carbono busca aprofundar uma observação muito interessante descrita na literatura, que não foi aprofundada em estudos posteriores. Farcanasu e col. (1999) e Park e col. (2000) demonstraram que a localização de Ahp1 em células crescidas em glicose é citosólica. No entanto, no primeiro trabalho foi sugerido que a localização da proteína de fusão Ahp1-GFP seja mitocondrial quando as células crescem em oleato. Por outro lado, quando as células foram crescidas em meios de cultura contendo outras fontes de carbono não-fermentativas (como glicerol, etanol ou acetato), Ahp1-GFP se localizou principalmente no citosol. Todavia, em glicerol ou etanol, Ahp1-GFP também se localiza na mitocôndria e em nível mais elevado do que o que ocorre em células crescidas em glicose (Farcanasu *et al.*, 1999).

A presença de ácido oléico no meio de cultura estimula drasticamente a proliferação e o aumento de tamanho de peroxissomos em *S. cerevisiae* (Veenhuis *et al.*, 1987). A metabolização desse composto envolve a β -oxidação aeróbica de ácidos graxos, que ocorre exclusivamente nos peroxissomos de leveduras (revisão em Hiltunen *et al.*, 2003). Posteriormente, acetil-CoA produzida nesse processo é oxidada na mitocôndria, sendo substrato do Ciclo de Krebs. Dessa forma, em células crescidas em oleato a atividade mitocondrial é elevada, uma vez que a metabolização desse composto é exclusivamente respiratória. Nessa condição, a presença de Ahp1 em mitocôndrias foi relacionada com a alta produção de EROs nessas organelas (Farcanasu *et al.*, 1999). É importante destacar que peroxissomos e mitocôndrias estão muito associados é que não é trivial distinguir proteínas localizadas na mitocôndria das proteínas localizadas em peroxissomos (Vizeacoumar *et al.*, 2003).

Tendo em vista o aumento da produção de EROs em células crescidas em meio não fermentativo, é esperada em resposta uma indução da expressão de genes e enzimas antioxidantes nessas condições. Uma observação interessante foi feita através de experimentos de viabilidade com células mutantes Δ -cta1, que não possuem a isoforma peroxissomal de catalase, em meio contendo ácido oléico como fonte de carbono. Os autores mostraram que essa enzima não é essencial para a defesa celular nessa condição, uma vez que os mutantes foram capazes de crescer normalmente (Hiltunen *et al.*, 2003). Como Ahp1 possui na região C-terminal uma seqüência que tem a possibilidade de atuar como sinalizadora para transporte ao peroxissomo (Fig. 10), decidimos investigar a possibilidade de esta proteína atuar em conjunto com catalase na proteção antioxidante em situações nas quais o peroxissomo é ativo.

Dessa forma, a expressão de *AHP1* em células Δ -cta1 crescidas em glicose ou oleato foi analisada e comparada com células selvagens, com objetivo de verificar se ela é induzida quando o gene *CTA1* não está presente em alguma dessas condições (Figura 28).

Em primeiro lugar, é importante destacar que os níveis de expressão mostrados nas figuras 28A e 28B não são diretamente comparáveis, uma vez que a as fotografias tiveram diferentes tempos de revelação e as quantidades de RNA aplicadas em cada canaleta foram diferentes. Células Δ -cta1 crescidas em glicose apresentaram níveis de expressão de *AHP1* reduzidos, em comparação com células selvagens (Fig. 28A). Estes resultados devem estar relacionados com o fato de que a expressão de catalase é fortemente reprimida por glicose (Hortner *et al.*, 1982). Quando tratadas com *t*-BOOH, verificamos indução de *AHP1*, de maneira mais intensa do que quando tratadas com H₂O₂ (Fig. 28A, canaletas 7-9). Os resultados em células crescidas em oleato foram distintos. Comparativamente a células selvagens, células Δ -cta1 mostraram maior indução de *AHP1* quando tratadas com H₂O₂ ou *t*-BOOH (Fig. 28B). Esse resultado sugere que, na ausência de catalase peroxissomal, ocorra uma compensação com os níveis de Ahp1 em células crescidas em oleato e tratadas com peróxidos, uma vez que a expressão de *AHP1* nessa condição é induzida em relação à linhagem selvagem.



Figura 28. Expressão de *AHP1* em condições fermentativa ou respiratória em células selvagens ou Δ-cta1. A) Células das linhagens WT (YPH250) e Δ-cta1 (YIT2) foram crescidas em meios contendo 2% glicose como fonte de carbono, e as amostras de RNA foram hibridadas com sonda específica para o gene *AHP1*. B) Células das linhagens WT (YPH250) e Δ-cta1 (YIT2) foram crescidas em meios contendo 0.1% ácido oléico como fonte de carbono, e as amostras de RNA foram hibridadas com sonda específica para o gene *AHP1*. B) Células das linhagens WT (YPH250) e Δ-cta1 (YIT2) foram crescidas em meios contendo 0.1% ácido oléico como fonte de carbono, e as amostras de RNA foram hibridadas com sonda específica para o gene *AHP1*. Os tratamentos das amostras de cada canaleta foram os mesmos de A. Todos os tratamentos foram de 30 min e estão explicitados na figura. Amostras de rRNA em gel de agarose/formaldeído antes da transferência são apresentadas como controle de carregamento. Para verificar se a maior indução de *AHP1* em oleato é uma característica específica do genótipo Δ -cta1, células mutantes para outras Prx de *S. cerevisiae* (Δ -tsa1, Δ -tsa2 e Δ ybl064c – prx1) também foram testadas (Fig. 29).



Figura 29. Expressão de *AHP1* **em mutantes** Δ **-prx de** *S. cerevisiae***. A**) Células de linhagens isogênicas (BY4741) mutantes para as diferentes Prx foram crescidas em meios contendo 2% glicose, e as amostras de RNA foram hibridadas com sonda específica para o gene *AHP1***. B**) Células de linhagens isogênicas (BY4741) mutantes para as diferentes Prx foram crescidas em meios contendo 0.1% ácido oléico, e as amostras de RNA foram hibridadas com sonda específica para o gene *AHP1***. B**) Células de linhagens isogênicas (BY4741) mutantes para as diferentes Prx foram crescidas em meios contendo 0.1% ácido oléico, e as amostras de RNA foram hibridadas com sonda específica para o gene *AHP1***.** Todos os tratamentos foram de 30 min e estão explicitados na figura. Amostras de rRNA em gel de agarose/formaldeído antes da transferência são apresentadas como controle de carregamento.

É importante salientar que as linhagens desse experimento são do *background* genético BY4741, enquanto que as do experimento mostrado na Fig. 28 são do *background* YPH250. Testes com mutantes Δ -cta1 oriundos do *background* BY4741 não revelaram diferenças em relação a células derivadas de YPH250 (dados não apresentados). Verificou-se que a expressão de *AHP1* é consideravelmente induzida nas linhagens Δ -tsa2 e Δ -yblc064c crescidas em oleato, em comparação com a linhagem selvagem (Fig. 29A, canaletas 1, 4, 7 e

10), e também em todas as linhagens tratadas com peróxidos (canaletas 2-3, 5-6, 8-9, 11-12). Essa situação não ocorreu em células crescidas em glicose, onde os níveis de expressão de *AHP1*, tanto na linhagem selvagem como nas mutantes, são semelhantes (Fig. 29B). Esses resultados mostram que o gene *AHP1* é especificamente induzido na ausência dos genes que codificam Tsa2 e PrxI (mTPx) e, em menor intensidade em mutantes para Tsa1, em células crescidas em ácido oléico.

Foram realizados outros experimentos de *Northern Blot*, com o objetivo de responder à questão: outros genes de Prxs também têm sua expressão induzida em células mutantes Δ cta1 crescidas em oleato e submetidas a estresse oxidativo? As mesmas amostras de RNA apresentadas na Fig. 28 foram hibridadas com sondas dos genes *TSA1*, *TSA2* e *YBL064C*, que codifica mTPx. Os resultados são apresentados nas Figuras 30 (para *YBL064C*), 31 (para *TSA2*) e 32 (para *TSA1*).

Células Δ -cta1 crescidas em glicose apresentaram níveis menores de expressão de *YBL064C*, em relação à linhagem selvagem (Fig. 30A), assim como ocorre com *AHP1*. Quando crescidas em oleato e tratadas com peróxidos, a expressão de *YBL064C* é induzida (Fig. 30B, canaletas 7-9). Em todos os tratamentos os níveis de *YBL064C* foram maiores em células Δ -cta1.

Analogamente, o padrão de expressão do gene *TSA2* (Fig. 31) em células crescidas em meio contendo oleato como fonte de carbono é bastante similar àquele observado para os genes *AHP1* e *YBL064C* (Figs. 28 e 30). Isso já era esperado, em razão de: (1) células Δ -tsa2 apresentarem expressão de *AHP1* elevada, quando crescidas em oleato e tratadas com H₂O₂ (da mesma forma que células Δ -ybl064c), e (2) na grande maioria das condições já analisadas em nosso laboratório, o padrão de expressão de *TSA2* acompanhar aquele observado para com *YBL064C*.



Figura 30. Expressão de *YBL064C* em condições fermentativa ou respiratória em células selvagens ou Δ cta1. A) Células das linhagens WT (YPH250) e Δ -cta1 (YIT2) foram crescidas em meios contendo 2% glicose como fonte de carbono, e as amostras de RNA foram hibridadas com sonda específica para o gene *YBL064C*. B) Células das linhagens WT (YPH250) e Δ -cta1 (YIT2) foram crescidas em meios contendo 0.1% ácido oléico como fonte de carbono, e as amostras de RNA foram hibridadas com sonda específica para o gene *YBL064C*. B) Células os tratamentos foram de 30 min e estão explicitados na figura. Amostras de rRNA em gel de agarose/formaldeído antes da transferência são apresentadas como controle de carregamento.



Figura 31. Expressão do gene *TSA2* em células WT e Δ -cta1 crescidas em meio contendo ácido oléico como fonte de carbono Células das linhagens WT (YPH250) e Δ -cta1 (YIT2) foram crescidas em meios contendo 0.1% ácido oléico como fonte de carbono, e as amostras de RNA foram hibridadas com sonda específica para o gene *TSA2*. Todos os tratamentos foram de 30 minutos e estão explicitados na figura. Amostras de rRNA em gel de agarose/formaldeído antes da transferência são apresentadas como controle interno do experimento.

Em contrapartida, a expressão de *TSA1* não sofre grandes alterações em células Δ -cta1 crescidas em oleato e tratadas com H₂O₂ ou *t*-BOOH ou Cu-OOH, em relação à linhagem selvagem (Fig. 32B). Em glicose, novamente foi observado que os níveis de expressão gênica foram diminuídos em células Δ -cta1 em relação a células selvagens (Fig. 32A).

Os dados apresentados nas Figs. 28-32 em conjunto mostram que: (1) células Δ -cta1 crescidas em oleato têm expressão de *AHP1*, *YBL064C* e *TSA2* aumentadas, mas não de *TSA1*; (2) células Δ -ybl064c e Δ -tsa2, mas não Δ -tsa1, têm maior expressão basal de *AHP1* do que células selvagens quando crescidas em oleato.



Figura 32. Expressão de *TSA1* em condições fermentativa ou respiratória em células selvagens ou Δ-cta1. A) Células das linhagens WT (YPH250) e Δ-cta1 (YIT2) foram crescidas em meios contendo 2% glicose como fonte de carbono, e as amostras de RNA foram hibridadas com sonda específica para o gene *TSA1*. Canaletas 1 e 6: células sem tratamento; 2 e 7: células tratadas com 1.0mM H₂O₂; 3 e 8: células tratadas com 0.5mM *t*-BOOH; 4 e 9: células tratadas com 0.75mM *t*-BOOH; 5 e 10: células tratadas com 0.5mM Cu-OOH. B) Células das linhagens WT (YPH250) e Δ-cta1 (YIT2) foram crescidas em meios contendo 0.1% ácido oléico como fonte de carbono, e as amostras de RNA foram hibridadas com sonda específica para o gene *TSA1*. Os tratamentos das amostras de cada canaleta foram os mesmos descritos em A. Todos os tratamentos foram de 30 min. Amostras de rRNA em gel de agarose/formaldeído antes da transferência são apresentadas como controle de carregamento.

Para determinar se esse efeito é comum em outra fonte de carbono respiratória, a expressão de *AHP1* e *YBL064C* em células selvagens e Δ -cta1 crescidas em glicerol e tratadas com hidroperóxidos foi avaliada. Os resultados são apresentados na Figura 33. Assim como quando crescidas em oleato, células Δ -cta1 apresentaram uma grande indução do gene *AHP1* quando tratadas com peróxidos em meio contendo glicerol (Fig. 33A).



Figura 33. Expressão de *AHP1* e *YBL064C* em meio contendo glicerol em células selvagens ou Δ -cta1. A) Células das linhagens WT (YPH250) e Δ -cta1 (YIT2) foram crescidas em meios contendo 2% glicose como fonte de carbono até OD₆₀₀ = 0.8, depois transferidas para meio contendo 2% glicerol por 6h. As amostras de RNA foram hibridadas com sonda específica para o gene *AHP1*. Canaletas 1 e 5: células sem tratamento; 2 e 6: células tratadas com 1.0mM H₂O₂; 3 e 7: células tratadas com 0.5mM *t*-BOOH; 4 e 8: células tratadas com 0.5mM Cu-OOH. B) Mesmas amostras aplicadas em A, porém a hibridação foi feita com sonda específica para o gene *YBL064C*. Todos os tratamentos foram de 30 min. Amostras de rRNA em gel de agarose/formaldeído antes da transferência são apresentadas como controle de carregamento.

É importante comparar esse resultado com aquele obtido em glicose, onde a expressão de *AHP1* é pouco induzida por H_2O_2 , e, em relação a células selvagens, ocorre uma diminuição geral de sua expressão em todos os tratamentos. Isso está de acordo com a idéia de uma participação de Ahp1 na defesa celular em condição de metabolismo respiratório, na ausência de catalase peroxissomal. A expressão de *YBL064C* também seguiu o padrão descrito em oleato (Figura 33B), isto é, foi especificamente induzida em função da fonte de carbono (respiratória), uma vez que em glicose são observados níveis menores de expressão, em comparação com células selvagens. Em conjunto, esses dados sugerem que, quando células Δ -cta1 crescem em glicose, Ahp1 e Prx1 não possuem um papel destacado na proteção celular, já que não observamos maior expressão dos genes em relação ao tipo selvagem. Ao contrário, quando as células Δ -cta1 crescem em oleato ou glicerol, os papéis de Ahp1 e Prx1 parecem adquirir uma maior importância, pois foram observados níveis bem maiores de expressão gênica em relação às células selvagens.

Para avaliar se essa situação decorre especificamente da ausência do gene que codifica a catalase peroxissomal, também foram crescidas células Δ -ctt1 (mutante para o gene da catalase citosólica) e Δ -cta1/ctt1 (duplo mutante) em meio contendo oleato como fonte de carbono, e a expressão de *AHP1* foi avaliada com ou sem estímulo de hidroperóxidos (Fig. 34).





Verificou-se que o tratamento com H_2O_2 também levou a um aumento da expressão de *AHP1* em células Δ -ctt1, porém em menor intensidade que em células Δ -cta1. O efeito da dupla mutação Δ -cta1/ctt1 pode ser comparado com o efeito da mutação simples Δ -cta1, o que, em conjunto, indica que a expressão do gene *AHP1* em fontes respiratórias sob o estímulo de peróxidos está relacionada com a presença ou não da isoforma peroxissomal de catalase nas células. Esse resultado é bastante interessante, pois reflete uma relação entre Ahp1 e processos oxidativos que ocorrem na mitocôndria e no peroxissomo de leveduras.

Ensaios de crescimento celular

É sabido que efeitos indiretos na regulação gênica detectados por *Northern Blot* (e.g., indução do gene *AHP1* em células Δ -cta1) nem sempre correspondem a fenótipos que podem ser observados *in vivo*, isto é, nem sempre são relacionados diretamente a um efeito protetor (no caso de genes antioxidantes) para as células. Por esta razão, foram realizados experimentos de crescimento e viabilidade celular, com o objetivo de identificar situações fisiológicas que comprovem a existência de relações entre Ahp1, Prx1 e/ou Tsa2, e a isoforma peroxissomal de catalase – Cta1, codificada pelo gene *CTA1*.

Uma perspectiva levantada, originada dos resultados de expressão gênica expostos acima, é que Ahp1 possa de certa forma compensar a ausência da catalase peroxissomal em condições em que as células crescem em meio contendo ácido oléico, na presença de H₂O₂. Para testar essa hipótese, os crescimentos de células das linhagens selvagem e Δ -ahp1 em meios líquidos foram monitorados por até quatro dias. O composto aminotriazol (ATZ), um inibidor da atividade de catalase, foi utilizado em algumas culturas para simular artificialmente o fenótipo decorrente da mutação Δ -cta1. As células foram inicialmente inoculadas em meio YPD, nos quais cresceram ao longo de uma noite. Em seguida, elas foram transferidas para meio contendo oleato como fonte de carbono, onde passaram por adaptação de 6h, antes de serem tratadas ou não com diferentes compostos. Os resultados são apresentados na Figura 35.



Figura 35. Curvas de crescimento de células selvagens BY4741 (A) ou Δ -ahp1 (B) em diferentes condições. Após 6h de adaptação ao meio mínimo contendo oleato como fonte de carbono, as células foram diluídas em uma densidade óptica inicial de 0.2, sendo esse ponto considerado o tempo zero. Foi adicionado 5mM de aminotriazol (ATZ) às culturas acima identificadas desde o pré-inóculo em YPD. As concentrações de hidroperóxidos utilizadas foram de 0.75mM H₂O₂ ou *t*-BOOH.

Comparando os efeitos dos diversos tratamentos na linhagem selvagem e na linhagem Δ -ahp, os resultados sugerem um papel de Ahp1 na proteção de leveduras a *t*-BOOH (Fig. 35, linhas roxas). O papel de Ahp1 na proteção de leveduras contra peróxidos orgânicos já tinha sido mostrado anteriormente, quando este microorganismo tinha sido cultivado em condições fermentativas (Lee *et al.*, 1999b). Tanto células selvagens, quanto Δ -ahp1, mostraram crescimento normal quando tratadas com H₂O₂ (comparável às culturas não-tratadas); e o

tratamento apenas com ATZ (linhas azul-claras) causou efeitos semelhantes no crescimento de ambas as linhagens. Por outro lado, o tratamento combinado de ATZ e H₂O₂ (Fig. 35, linhas verdes) que simula a ausência de catalase nas células, levou a um crescimento levemente prejudicado de células Δ -ahp1, em comparação com células selvagens. Embora não seja um efeito drástico, como ocorre com a hiper-sensibilidade de células Δ -ahp1 a *t*-BOOH, foi possível detectar *in vivo* a situação proposta pelos resultados de expressão gênica, isto é, a idéia de que, quando células crescem em oleato na presença de H₂O₂, a ausência de catalase (simulada pela adição de ATZ às culturas) seja parcialmente compensada pela ação antioxidante de Ahp1. A participação de Prx1 nesse processo cooperativo também foi analisada, através de experimentos de crescimento celular similares, com a linhagem Δ -ybl064c. No entanto, nas condições de crescimento estudadas (oleato + H₂O₂, na ausência de catalase) não foi observado um efeito deletério ao crescimento de células provenientes dessa linhagem (Fig. 36). Esses resultados mostraram que o estudo da relação de compensação de funções entre proteínas anti-oxidantes de fato não é trivial.



Figura 36. Curvas de crescimento de células selvagens BY4741 ou Δ -mtpx em diferentes condições. Após 6h de adaptação ao meio mínimo contendo oleato como fonte de carbono, as células foram diluídas em uma densidade óptica inicial de 0.2, sendo esse ponto considerado o tempo zero. Foi adicionado 5mM de aminotriazol (ATZ) às culturas acima identificadas desde o pré-inóculo em YPD. As concentrações de hidroperóxidos utilizadas foram de 0.75mM H₂O₂ ou *t*-BOOH.

V – DISCUSSÃO

Ao iniciar este trabalho, o principal objetivo era estudar pelo menos três diferentes aspectos da proteína Ahp1 de *S. cerevisiae*. Em primeiro lugar, a regulação do gene *AHP1* (ou YLR109W) em diferentes condições fisiológicas, os efeitos de sua deleção para as células, e as relações de Ahp1 com outros componentes do sistema de defesa anti-oxidante celular. Em segundo lugar, a caracterização de propriedades bioquímicas de Ahp1, como preferências por substratos e susceptibilidade à inativação por hidroperóxidos. Finalmente, o estudo de sua organização tridimensional, com o intuito de relacionar os dados de ensaios genéticos e enzimáticos, isto é, a função celular desempenhada por Ahp1, com a sua estrutura espacial. Também era objetivada uma comparação da relação estrutura/função de Ahp1 com Tsa1, por serem as Prxs mais abundantes em leveduras e por não compartilharem algumas características bioquímicas conhecidas (como a sensibilidade à inativação por hidroperóxidos e as preferências por substratos, por exemplo). A discussão que se segue reunirá os dados obtidos neste trabalho, os quais buscarão contribuir para a caracterização das propriedades bioquímicas de Ahp1 e fornecer hipóteses acerca de possíveis papéis biológicos específicos desta proteína.

V.1 – Caracterização bioquímica de Ahp1

V.1.1 – Substratos e ciclo catalítico

Dentre as cinco Prxs existentes em *S. cerevisiae*, Ahp1 e nTPx (ou Dot5) foram caracterizadas por apresentarem maiores eficiências catalíticas sobre hidroperóxidos orgânicos, como *t*-BOOH e Cu-OOH (Jeong *et al.*, 1999; Cha *et al.*, 2003). Tsa1 e Prx1, por outro lado, degradam H₂O₂ com maior eficiência que hidroperóxidos orgânicos (Chae *et al.*,

1994a; Pedrajas *et al.*, 1995), enquanto que Tsa2 não apresenta grandes distinções entre os dois tipos de substratos (Munhoz e Netto, 2004).

Em relação ao seu ciclo catalítico, diferentes trabalhos mostraram que Ahp1 funciona basicamente como uma Prx dimérica do tipo 2-Cys, isto é, o resíduo de Cys-S_pH de uma molécula se oxida em ácido sulfênico após a reação com o hidroperóxido, ao que se segue o ataque desta espécie pelo resíduo da Cys-S_rH de uma molécula adjacente, gerando assim uma ligação dissulfeto intermolecular entre eles (ver seção I.3, Figura 6 e Tabela 1). Posteriormente, este dissulfeto é reduzido por ação de Trx ou outro agente redutor que contenha tióis, como DTT (Jeong *et al.*, 1999; Trivelli *et al.*, 2003).

Os primeiros experimentos realizados a partir do sucesso na expressão e purificação de Ahp1 recombinante foram feitos com o intuito de caracterizar suas propriedades bioquímicas, como a eficiência na degradação de diferentes substratos e a sensibilidade à inativação por hidroperóxidos. De acordo com os dados existentes na literatura, Ahp1 foi capaz de receber elétrons de forma equivalente das duas isoformas de Trxs citosólicas existentes em leveduras, Trx1 e Trx2 (Fig. 11). Além disso, Ahp1 também utiliza eficientemente a isoforma mitocondrial Trx3 como doadora de elétrons *in vitro* (dados não apresentados).

Os parâmetros enzimáticos determinados para *t*-BOOH e H₂O₂ permitem afirmar que Ahp1 de fato exibe certa preferência por hidroperóxidos orgânicos (Tabela 2). Também realizamos ensaios com hidroperóxido de cumeno, cujos resultados também mostraram uma eficiência superior de Ahp1, em relação a H₂O₂ (dados não apresentados). No entanto, duas linhas de comentários mostram-se pertinentes a respeito desses resultados: (1) Jeong e col. (1999) determinaram valores de K_m para *t*-BOOH e H₂O₂ para Ahp1, sendo estes de 45 e 150µM, respectivamente, uma diferença de cerca de três vezes. Em nossos experimentos, esta diferença foi de aproximadamente duas vezes (13.9 e 25.5µM, respectivamente), o que é uma margem aceitável em termos comparativos. O emprego do sistema Trx para a determinação dos parâmetros enzimáticos envolve três diferentes enzimas (Prx, Trx e Trr) responsáveis pela manutenção do ciclo catalítico completo, o que aumenta a possibilidade de diferenças nas preparações de cada uma delas serem responsáveis pelas diferenças nos resultados obtidos; (2) no que tange as eficiências catalíticas pelos diferentes hidroperóxidos, nossos dados (representados como os valores de k_{cal}/K_m) apontaram que Ahp1 apresenta um desempenho cerca de 1.6 vezes superior com *t*-BOOH do que com H₂O₂ (3.0 x 10⁴ e 1.8 x 10⁴ M⁻¹.s⁻¹, respectivamente). Jeong e col. (1999) determinaram uma diferença de cerca de três vezes entre ambas as eficiências catalíticas, representadas, neste caso, como o valor de V_{max}/K_m . No entanto, nesse trabalho não foi especificada a concentração de enzima utilizada para obter os parâmetros enzimáticos e, como V_{max} depende de tal quantidade, os valores absolutos de cada parâmetro não podem ser diretamente comparados com os nossos resultados. Independentemente disto, nossos dados foram coerentes com aquilo que era esperado para Ahp1, ou seja, uma maior eficiência na degradação de hidroperóxidos orgânicos em comparação com H₂O₂ (Jeong *et al.*, 1999).

Os valores de eficiências catalíticas das Prxs há muito tempo constituem um assunto controverso. Até recentemente, todos os valores determinados *in vitro* para Prxs de diferentes tipos e organismos foram da ordem de 10^4 a 10^5 M⁻¹.s⁻¹ (Hofmann *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2003b; Jang *et al.*, 2004; Rhee *et al.*, 2005). Por outro lado, catalases e glutationa peroxidases apresentam valores da ordem de 10^{7-8} M⁻¹.s⁻¹, isto é, são capazes de remover cerca de 10^2 a 10^4 vezes mais moléculas de H₂O₂ do que as Prx em um mesma unidade de tempo (Stone, 2004; Jang *et al.*, 2004).

Em relação aos valores de k_{cat}/K_m determinados para Ahp1 neste trabalho, suas diferenças em relação aos de outras enzimas anti-oxidantes poderia ser explicada pelo fato de as outras enzimas do sistema redutor (Trx e Trr) não estarem presentes em excesso nos ensaios enzimáticos realizados. As concentrações utilizadas de Trx1 e Trr1 utilizadas nos ensaios foram respectivamente de 0.45 e 0.18µM, enquanto que a de Ahp1 foi de 2.1µM. Tais quantidades foram estabelecidas a partir de dados da literatura (Chae *et al.*, 1994a; Jeong *et*

al., 1999), cujos resultados de eficiência catalítica foram similares aos obtidos neste trabalho. Dessa forma, é possível especular que o processo de redução da ligação dissulfeto intermolecular e conseqüente retorno do grupamento tiól da Cys-S_pH à forma reduzida (e disponível para interação com o substrato) constitui a etapa lenta do ciclo catalítico de Ahp1. Se não há Trx e Trr suficientes na mistura de reação, após a rápida oxidação de Ahp1 por peróxido, levaria mais tempo do que aquele efetivamente necessário para o retorno à sua forma reduzida, ocasionando um artefato na determinação de parâmetros enzimáticos por não considerar diferenças nas constantes de segunda ordem de cada etapa do ciclo catalítico

De fato, estudos independentes utilizando abordagens experimentais distintas têm mostrado que Prxs são mais reativas do que previamente antecipado (Akerman e Muller, 2005; Ogusucu *et al.*, 2007; Parsonage *et al.*, 2005). Como exemplo, o grupo da Dra. Ohara Augusto (IQ/USP), em colaboração com o nosso grupo (Ogusucu *et al.*, 2007), elaborou um procedimento de cinética competitiva para determinar as constantes de segunda ordem dessas enzimas para com H₂O₂. Este experimento é baseado no fato de que a oxidação de HRP (*horseradish peroxidase*) compete com Prx por H₂O₂. Como HRP é uma heme-proteína que absorve radiações no espectro de luz visível, é possível determinar sua reação com H₂O₂ por decaimento de A_{403nm}. Dessa forma, Ogusucu e col. (2007) determinaram que as eficiências de Tsa1 e Tsa2 para com H₂O₂ são da ordem de 10⁷ M⁻¹.s⁻¹. Acreditamos, assim, que a realização de ensaios desta natureza com Ahp1 forneceriam dados mais precisos (e elevados) sobre sua eficiência na remoção de peróxidos.

Hidroperóxidos de ácidos graxos

Hidroperóxidos de ácidos graxos são formados basicamente por ataques de EROs a grupos metileno (-CH₂-) das cadeias carbônicas destas moléculas, especialmente quando esses grupos estão na adjacência de carbonos insaturados. Portanto, quanto maior o grau de

insaturação de um ácido graxo, maior a possibilidade de ele ser atacado e gerar espécies tóxicas. A reação de grupos metileno com EROs gera radicais centrados no carbono (-C[•]H-), os quais podem vir a gerar radicais peroxil ao reagirem com O_2 . Estes radicais, por sua vez, podem atacar outros átomos de carbono, propagando o processo de peroxidação lipídica. O ataque a lipídios constituintes de membranas biológicas acarreta alterações em sua fluidez e permeabilidade a diferentes substâncias, podendo ocasionar, dependendo do alcance dos danos, perda de funcionalidade (Hallywell e Gutteridge, 1989).

Leveduras possuem principalmente ácidos graxos mono-insaturados (30-50% do total são de ácido palmitoléico, que possui apenas uma insaturação), que também podem formar hidroperóxidos quando atacados por EROs. Além disso, ácidos graxos poli-insaturados presentes no meio de cultura podem ser absorvidos e incorporados às membranas celulares (Calderbank *et al.*, 1985).

Recentemente, foi demonstrado que leveduras são capazes de se adaptar ao tratamento com hidroperóxido de ácido linoléico (que possui duas insaturações - 18:2), de maneira dependente de síntese protéica (Evans *et al.*, 1998). Esse hidroperóxido (Loa-OOH) é extremamente tóxico em leveduras (concentrações da ordem de 0.2mM geram 90% de letalidade) e foi observado que sua presença acarreta uma diminuição nos níveis totais de glutationa. No mesmo trabalho, foi sugerido que as células possuam mecanismos indutíveis de proteção a esse hidroperóxido.

Estas informações levaram-nos a testar a hipótese de que Ahp1 seja capaz de remover hidroperóxidos de ácidos graxos, como sugerido na literatura (Jeong *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999b; Prouzet-Mauléon *et al.*, 2002). Nossos ensaios enzimáticos iniciais com uma amostra purificada de ácido linoléico indicaram que Ahp1 possuía uma eficiência catalítica com Loa-OOH igual ou superior a de *t*-BOOH (Fig. 12), o que foi um resultado bastante promissor, tendo em vista os dados obtidos por Evans e col. (1998), citados acima. Entretanto, não foi possível reproduzir esses resultados.

Em função da baixa solubilidade das amostras de hidroperóxidos de ácidos graxos, seu armazenamento depende do uso de solventes orgânicos, como metanol, clorofórmio ou etanol. Para utilização nos ensaios enzimáticos, as alíquotas eram secas em corrente de gás nitrogênio e ressuspensas em tampão Tris-HCl, com a adição de Triton X-100, um detergente, para auxiliar na solubilização. A hipótese de que tal detergente pudesse influenciar na atividade enzimática foi descartada por ensaios controle, onde não se verificou inibição de Ahp1 por concentrações de Triton X-100 até 10 vezes maiores do que aquelas utilizadas nos testes enzimáticos. Tentou-se assim usar as amostras de Loa-OOH sem submetê-las ao procedimento de secagem em gás nitrogênio e solubilização, adicionando-as diretamente às misturas de reações. Apesar de termos determinado que concentrações de até 7.5% de metanol ou etanol não inibiam a atividade de Ahp1 sobre t-BOOH, não foi possível a detecção de atividade enzimática sobre as amostras de Loa-OOH dissolvidas em metanol. Uma possibilidade é que na ausência de Triton X-100 as moléculas de Loa-OOH possam formar micelas, ficando pouco acessíveis ao contato com Ahp1. Estes contratempos exemplificam as dificuldades encontradas para a realização de experimentos envolvendo amostras de hidroperóxido de Loa-OOH.

As amostras de Loa-OOH inicialmente empregadas em nossos ensaios foram purificadas até a homogeneização diretamente após o procedimento de síntese, de forma semelhante à descrita por Hillas e col. (2000), pelo grupo do Dr. Paolo Di Mascio e da Dra. Sayuri Miyamoto (IQ/USP). Outros experimentos foram feitos posteriormente com amostras brutas de hidroperóxidos de ácido oléico, isto é, não-purificadas após a síntese. Estas amostras são, portanto, heterogêneas: contêm ao menos dois hidroperóxidos de ácido oléico, os hidroperóxidos do ácido *trans*-9-octodecenóico-10 (i.e., insaturação entre os carbonos 10 e 11 e ligação OOH na posição 9) e do ácido *trans*-10-octodecenóico-8 (i.e., insaturação entre os carbonos 8 e 9 e ligação OOH na posição 10) (Hillas *et al.*, 2000), além de poderem conter isômeros não-lineares (*cis*) destas moléculas.
Ahp1 foi capaz de remover esta amostra bruta de hidroperóxidos, embora de modo pouco eficiente, inferior a *t*-BOOH ou Cu-OOH (Fig. 13). Esse resultado foi reprodutível e reforçou a possibilidade de hidroperóxidos de lipídios serem substratos fisiológicos de Ahp1, uma vez que o ácido oléico, por exemplo, constitui cerca de 30% do total de radicais acila de ácidos graxos de membranas plasmáticas de *S. cerevisiae* (van der Rest *et al.*, 1995). No entanto, consiste também em uma informação preliminar que não foi muito explorada posteriormente ao longo do trabalho. O desenvolvimento de outros métodos de manipulação das amostras de hidroperóxidos de ácidos graxos (*e.g.* uso de combinações de outros solventes ou detergentes para solubilização das amostras) e o aperfeiçoamento dos procedimentos de análise da atividade enzimática poderão permitir a análise acurada da eficiência de Ahp1 na remoção de diferentes hidroperóxidos.

V.1.2 – Oxidação e inativação de Ahp1

A presença de altas concentrações de hidroperóxidos causa inativação de algumas Prxs. Os experimentos descritos por Chae e col. (1994a) e Netto e col. (1996) foram realizados com Tsa1, uma Prx do tipo 2-Cys típica, que é reconhecidamente sensível à inativação por hidroperóxidos (Hofmann *et al.*, 2002; Biteau *et al.*, 2003). Prouzet-Mauléon e col. (2002) detectaram uma perda parcial da atividade de Ahp1 quando esta proteína foi purificada de células selvagens em estresse oxidativo por 1mM de *t*-BOOH (25% de perda) – mas não por H₂O₂, ou de células com o genótipo Δ -lys7 (gene codificador de uma chaperona essencial para o funcionamento da superóxido dismutase dependente de cobre e zinco em leveduras - Sod1), que acarreta maior produção de EROs *in vivo* (20% de perda) (Prouzet-Mauléon *et al.*, 2002). Nesses casos, Ahp1 se apresentava em duas formas distintas, discriminadas por possuírem diferentes pontos isoelétricos (4.44 vs 4.56). A forma que possuía pI mais ácido foi detectada como cataliticamente inativa e sugeriu-se que tal distinção fosse decorrente da super-oxidação do grupo tiól da Cys-S_pH em ácido sulfínico ou sulfônico.

Corroborando estas observações, Trivelli e col. (2003) realizaram um estudo de NMR com Ahp1 tratada com 60 equivalentes de *t*-BOOH (i.e., 60 vezes mais peróxido do que proteína) por 48 horas, através do qual detectaram a formação de ácido sulfônico na Cys-S_pH desta proteína (Trivelli *et al.*, 2003).

Por meio de comparações entre as seqüências de diferentes Prxs [todas do tipo A, segundo a classificação proposta por Trivelli e col. (2003), ver Tabela 1] e com os dados enzimáticos disponíveis, Wood e col. sugeriram uma distinção entre as Prxs no que tange a sensibilidade à inativação por hidroperóxidos (Wood *et al.*, 2003b). No entanto, pouco se sabe sobre os processos de inativação por peróxidos de Prxs do tipo D (ver Tabela I) e, dessa forma, decidimos investigar a susceptibilidade de Ahp1 à inativação por diferentes hidroperóxidos.

Os resultados apresentados nas Figs. 14-16 confirmaram algumas observações feitas por Prouzet-Mauléon e col. (2002), isto é, que Ahp1 de fato pode ser parcialmente inativada por *t*-BOOH, mas não por H₂O₂. Este processo de inativação envolve efetivamente a formação de espécies super-oxidadas no resíduo de Cys-S_pH de Ahp1, como foi demonstrado pelos experimentos de espectrometria de massas apresentados nas Figs. 17-19. Estes resultados estão de acordo com a hipótese levantada na literatura acerca da formação dos ácidos sulfínico e sulfônico na Cys-S_pH (Prouzet-Mauléon *et al.*, 2002). No entanto, parece claro que apenas uma fração de Ahp1 torna-se super-oxidada ao longo desse processo, uma vez que é ainda possível detectar considerável atividade enzimática após o tratamento com 60 equivalentes de *t*-BOOH por 48 horas (Fig. 16).

Os ensaios de inativação mostraram que, embora a Cys-S_pH de Ahp1 chegue a ser super-oxidada por altas concentrações de *t*-BOOH, ainda assim ela é extremamente resistente à perda de atividade enzimática. Prxs de bactérias, como AhpC de *S. typhimurium* (2-cys típica), são as mais resistentes à inativação conhecidas. O processo de inativação dessa enzima requer cerca de 100 vezes mais peróxido do que PrxI de humanos: com cerca de 0.3mM de H_2O_2 , a atividade de PrxI pode ser totalmente inibida, enquanto que com 30mM de H_2O_2 , AhpC ainda exibe considerável atividade enzimática (Wood *et al.*, 2003b). De modo similar, Ahp1 também apresentou considerável atividade enzimática quando reagiu com 20mM de *t*-BOOH (cerca de 80% do valor observado em amostras não-tratadas), e não perdeu completamente sua atividade mesmo quando reagiu com 35mM desse composto (Figs. 14 e 15).

Uma outra proteína de bactérias envolvida com a defesa anti-oxidante e caracterizada como sendo resistente à inativação por *t*-BOOH é Ohr (*Organic Hydroperoxide Resistance*) de *Xylella fastidiosa*, estudada em nosso laboratório (Cussiol *et al.*, 2003). Através de diferentes análises, mostrou-se que (1) Ohr não apresenta perda considerável de atividade, mesmo quando reage com 10mM de *t*-BOOH; (2) o pré-tratamento de Ohr com 17 equivalentes de t-BOOH por 3 horas torna esta enzima menos eficiente na remoção de *t*-BOOH, em comparação com amostras pré-tratadas com 1 equivalente deste composto; e (3) o tratamento de Ohr com 17 equivalentes de *t*-BOOH por sete dias acarreta uma considerável perda de atividade enzimática – que envolve a formação de ácido sulfônico no resíduo de Cys-S_pH, enquanto que o mesmo tratamento com H₂O₂ não ocasiona nenhuma inativação (Oliveira *et al.*, 2006).

Estes dados permitem uma comparação direta entre uma tiól peroxidase de bactérias (Ohr), resistente à inativação por hidroperóxidos, e Ahp1 de *S. cerevisiae*. Nossos resultados mostraram que Ahp1 é extremamente resistente à inativação por *t*-BOOH, pois amostras tratadas com um excesso de 60 vezes desse composto por 48 horas ainda retêm considerável atividade enzimática, e amostras tratadas com um excesso de uma vez de *t*-BOOH apresentam atividade apenas ligeiramente inferior em comparação com amostras não-tratadas. Portanto, concluímos que Ahp1 é mais resistente que Ohr à inativação por *t*-BOOH, também o sendo, possivelmente, em comparação com AhpC de *S. typhimurium* ou outras Prxs de bactérias.

Tal situação é bastante distinta daquelas observadas com Tsa1 e com as PrxI-IV de humanos, cujos resíduos de Cys-S_pH são bastante suscetíveis à super-oxidação (Yang *et al.*, 2003; Rabilloud *et al.*, 2003; Biteau *et al.*, 2003). Essas observações vão de encontro com a distinção proposta por Wood e col. (2003b): Tsa1-2 e PrxI-IV, todas Prxs do tipo A (2-Cys típicas) de eucariotos, estão no grupo das Prxs sensíveis à inativação, enquanto que AhpC encontra-se no grupo das Prxs robustas. Neste trabalho, propomos que Ahp1 (e possivelmente outras Prxs do tipo D, como PrxV de humanos - Tabela 1) também pertence ao grupo das Prxs robustas.

De fato, os dois domínios conservados entre as proteínas do grupo das Prxs sensíveis identificados por Wood e col., os domínios GGLG e YF (Fig. 9; Fig. 27), estão presentes em Tsa1 e Tsa2, mas ausentes em AhpC (Wood *et al.*, 2003b) e Ahp1 (Fig. 10). Tais domínios estão relacionados com conformações espaciais específicas dos sítios ativos das proteínas que os contêm, uma propriedade que será descrita a seguir.

V.1.3 – Comparação entre Ahp1 e Tsa1

Substratos

Os resultados obtidos neste trabalho forneceram diversas informações que permitem uma comparação entre as duas Prxs mais abundantes de *S. cerevisiae*, Tsa1 e Ahp1. Em primeiro lugar, Ahp1 apresenta uma maior eficiência catalítica sobre hidroperóxidos orgânicos, enquanto que Tsa1 degrada H_2O_2 de maneira mais eficiente que substratos orgânicos (Jeong *et al.*, 1999). Esta característica parece estar diretamente relacionada com o fato de que Ahp1 é parcialmente inativada por *t*-BOOH, mas não por H_2O_2 (Figs. 16 e 17), ao passo que Tsa1 é inativada por H_2O_2 , e ainda não foi demonstrado que ela possa ser inativada por *t*-BOOH. Estes dados sugerem que o acesso de moléculas de H_2O_2 ao sítio ativo de Ahp1 seja mais restrito em relação ao de *t*-BOOH, ao contrário do que ocorre com Tsa1. De acordo com essa idéia, dados estruturais obtidos com Ohr de *X. fastidiosa* (que degrada hidroperóxidos orgânicos mais eficientemente que H_2O_2), mostraram que a organização de seu sítio ativo, por envolver resíduos de aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas, restringe o acesso de moléculas de H_2O_2 , mas permite, por outro lado, o acesso de *t*-BOOH e de hidroperóxidos de ácidos graxos (o que foi inferido através de modelagem molecular) (Oliveira *et al.*, 2006). Uma situação semelhante parece ocorrer no sítio ativo de Ahp1.

Inativação por hidroperóxidos e regeneração

A descoberta de que as espécies super-oxidadas de Prxs sensíveis à inativação podem ser regeneradas às formas cataliticamente ativas por meio das Srxs e das sestrinas (Biteau *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2005; Budanov *et al.*, 2004) acrescentou um novo nível regulatório às suas atividades enzimáticas. Com isso, foi mostrado que as atividades (peroxidásica e de chaperona) de uma série de Prxs podem ser moduladas de modo dependente do estado *redox* de suas cisteínas (Georgiou e Masip, 2003; Rhee *et al.*, 2005).

O processo de inativação enzimática por hidroperóxidos constitui, portanto, um evento reversível e controlado, e foi sugerido que tal característica tenha sido selecionada ao longo da evolução das Prxs (Wood *et al.*, 2003b). Os domínios GGLG e YF são encontrados em todas as Prxs sensíveis e parecem estar envolvidos, como já foi dito, com a estabilização do ácido sulfínico formado no resíduo de Cys-S_pH. Esses domínios promovem certo afastamento entre os resíduos da Cys-S_pH e da Cys-S_rH de uma molécula adjacente, dificultando a interação entre eles após a geração de ácido sulfênico, ao mesmo tempo em que permitem a interação do ácido sulfínico em Cys-S_pH com um resíduo conservado de arginina, que o estabiliza (Fig. 9) (Jönsson *et al.*, 2005). Este tipo de organização espacial parece ser reconhecido por Srx, em um evento altamente específico. Em conjunto, essas informações sugerem que as Prxs sensíveis possam funcionar efetivamente como sensores dos níveis de H₂O₂ presentes no meio intracelular. Ao serem oxidadas e perderem suas atividades peroxidásicas, essas proteínas participam de cascatas de sinalização mediadas pela diminuição

das concentrações de H_2O_2 nas células (Rhee *et al.*, 2005 a,b; Kang *et al.*, 1998; Veal *et al.*, 2004).

Biteau e col. (2003) e Jang e col. (2004) demonstraram que a formação de ácido sulfínico na Cys-S_pH de Tsa1 e Tsa2 é efetivamente revertida por Srx. Segundo Biteau e col. (2003), Ahp1 não é reduzida por Srx, embora os autores não tenham de fato utilizado amostras de Ahp1 super-oxidada nos ensaios, uma vez que as mesmas eram oriundas do tratamento desta enzima com H_2O_2 , que provavelmente não gerou ácido sulfínico em Ahp1 (Fig. 17). Independentemente disso, o fato de Ahp1 não possuir os domínios GGLG e YF, assim como AhpC e outras Prxs robustas de bactérias, sugere que ela não possa ser reduzida por Srx (Jönsson *et al.*, 2005). Coerentemente com essa idéia, hSrx apresentou atividade de redutase de ácido sulfínico apenas em testes realizados com Prxs do tipo A, mas não com Prxs do tipo D (hPrxV) ou B (hPrxVI), as quais também não possuem os domínios supracitados (Woo *et al.*, 2005).

Organização oligomérica e estrutural

Um outro ponto interessante para comparação entre Ahp1 e Tsa1 diz respeito às suas organizações oligoméricas em solução. Todas as Prxs que tiveram suas estruturas tridimensionais resolvidas foram caracterizadas como homodímeros (Wood *et al.*, 2003a; Trivelli *et al.*, 2003). Além disso, foi demonstrado que algumas Prxs do tipo A (Tabela 1) de bactérias e eucariotos sofrem um processo de oligomerização dependente do estado *redox* de seus resíduos de cisteína: TPxB ou PrxII de humanos (Schröder *al.*, 2000) e AhpC de *S. typhimurium* (Wood *et al.*, 2002) alternam-se entre uma forma decamérica (α_2)₅ (i.e., um pentâmero de dímeros), na qual os resíduos de cisteína estão reduzidos, e uma mistura de formas oligoméricas menores (de dímeros a decâmeros), onde os resíduos de cisteína estão oxidados na forma de ligações dissulfeto (Wood *et al.*, 2002 e 2003a). Segundo esses trabalhos, a formação de ligações dissulfeto entre os tióis dos resíduos de cisteína tende a desestabilizar a estrutura do decâmero.

Em solução, Tsa1 também foi caracterizada como uma proteína homodimérica (Chae *et al.*, 1994a). Em nossos estudos cristalográficos com Tsa1-C47S, detectamos a sua forma decamérica quando a proteína foi reduzida previamente com DTT (Fig. 27). Por outro lado, Jang e col. (2004) demonstraram que Tsa1 organiza-se de diferentes formas *in vivo*: em condições normais de crescimento, Tsa1 se apresenta como uma mistura de dímeros, tetrâmeros e complexos de baixo peso molecular; mediante a ação de EROs em altas concentrações, grandes mudanças na estrutura quaternária são observadas, com Tsa1 gerando complexos de alto peso molecular (de até 1.0MDa). Tal mudança na organização oligomérica está relacionada com a formação de ácido sulfínico no resíduo de Cys-S_pH (Cys47), sendo, portanto, dependente do seu estado *redox* (Jang *et al.*, 2004). Além disso, quando o grupo tiól de Cys47 está oxidado em ácido sulfínico (e os complexos de alto peso molecular são formados) observou-se que Tsa1 adquire a função de chaperona molecular.

Em todas as amostras de Ahp1 estudadas neste trabalho, ou seja, tratadas com diferentes hidroperóxidos, DTT ou diamida, a proteína apresentou-se unicamente na forma dimérica, conforme observado por meio de testes de espalhamento dinâmico de luz e SAXS (espalhamento de raios X a baixo ângulo) (dados não apresentados). Coerentemente, os dados de NMR obtidos por Trivelli e col. (2003) também mostraram que Ahp1 organiza-se basicamente como uma proteína dimérica. Da mesma forma, PrxV de humanos e Prx do tipo II de *P. trichocarpa*, as Prxs mais semelhantes a Ahp1 que já tiveram suas estruturas tridimensionais resolvidas, apresentam-se unicamente na forma de dímeros, de modo independente do estado *redox* das cisteínas (Evrard *et al.*, 2004; Echalier *et al.*, 2005).

Prouzet-Mauléon e col. (2002) sugeriram que a formação de espécies super-oxidadas de Ahp1 levasse a uma perda de sua capacidade de dimerização em géis SDS-PAGE, por impedir a ligação dissulfeto entre as cisteínas peroxidásica e de resolução. No entanto, nossas análises não detectaram tal perda, mesmo quando as amostras comprovadamente continham espécies super-oxidadas da proteína (Fig. 19). Como as análises de espectrometria de massas

não são quantitativas, sugerimos que apenas uma pequena parcela das Cys- S_pH tenham sido superoxidadas.

As diferenças entre Ahp1 e Tsa1 abordadas neste trabalho são resumidas na Tabela 6. Esses resultados sugerem uma diversificação funcional entre Ahp1 e Tsa1. Tsa1 teria evoluído para ser uma enzima bifuncional (peroxidase/chaperona), capaz de "sentir" a presença de hidroperóxidos e modular sua atividade, enquanto Ahp1 atuaria como uma "faxineira" de peróxidos mesmo quando exposta a altas doses desses compostos.

Substratos Domínios Sensibilidade Regeneração Organização Atividade preferenciais GGLG e à inativação por Srx estrutural de YF chaperona Ahp1 Orgânicos Ausentes Resistente Não Dímeros Não Tsa1 Sensível H_2O_2 Presentes Sim Dímeros, Sim tetrâmeros, decâmeros complexos de baixo e alto pesos moleculares

Tabela 6. Resumo das características de Ahp1 e Tsa1 comparadas.

V.2 – Biologia molecular estrutural

A biologia molecular estrutural é uma área ainda emergente do conhecimento biológico que vem se desenvolvendo bastante nos últimos anos, particularmente no que diz respeito ao entendimento de como diferentes proteínas funcionam. Ela é pautada pelo princípio de que a função biológica que uma proteína desempenha é determinada pela organização tridimensional que ela apresenta. As estruturas tridimensionais assumidas pelas proteínas são uma conseqüência direta de suas seqüências de aminoácidos, que, geralmente, contêm toda a informação necessária para que uma proteína adquira sua conformação correta no espaço.

A atividade biológica de uma proteína, suas interações com outras proteínas, substratos, co-fatores ou ligantes têm dependência direta de sua conformação estrutural. São conhecidos casos em que eventos de fosforilação ou oxidação de resíduos específicos causam alterações na estrutura tridimensional de uma proteína, acarretando mudanças em suas atividades bioquímicas. Tendo em vista sua importância, a caracterização estrutural de uma proteína consiste em uma etapa bastante relevante dos estudos que envolvem a elucidação de suas propriedades biológicas e mecanismos de catálise ou transdução de sinais.

Nesse sentido, nosso laboratório incorporou-se à rede de Biologia Molecular Estrutural (*Smolbnet*) da Fapesp, com o intuito de obter informações estruturais de proteínas envolvidas com a defesa anti-oxidante estudadas por nosso grupo, e utilizá-las para elucidação de algumas de suas propriedades bioquímicas que não podem ser abordadas por outros métodos. Este projeto almejava a resolução da estrutura tridimensional de Ahp1, em primeiro lugar, e de Tsa1, em colaboração com o pós-doutorando Marcos Oliveira.

Como já foi dito anteriormente, Ahp1 foi objeto de um estudo de ressonância magnética nuclear que apresentou um modelo inicial de sua estrutura em solução (Trivelli *et al.*, 2003). Entretanto, até o presente as coordenadas atômicas obtidas neste trabalho não foram disponibilizadas à comunidade científica. Os resíduos que participam do sítio ativo

foram apontados no modelo, mas não houve informações suficientes para fazer inferências sobre a superfície da molécula, o que seria importante para o entendimento da acessibilidade do sítio ativo de Ahp1 a diferentes substratos, como foi feito com Ohr de *X. fastidiosa* (Oliveira *et al.*, 2006). Uma outra informação relevante, que não foi disponibilizada pelo estudo de Trivelli e col. (2003) e poderia ser útil para um melhor entendimento do ciclo catalítico de Ahp1, diz respeito aos resíduos envolvidos com a interface dimérica desta proteína, que, como exposto acima, organiza-se nessa forma de modo independente do estado *redox* de suas cisteínas (Trivelli *et al.*, 2003). Todos esses dados poderiam ser comparados com aqueles obtidos para PrxV de humanos (Declercq *et al.*, 2001; Evrard *et al.*, 2004), a Prx de mamíferos mais semelhante a Ahp1, mas que, no entanto, apresenta grandes diferenças bioquímicas e organizacionais. Por exemplo, a resolução do ácido sulfênico formado na Cys-S_pH durante a catálise se dá por meio da formação de uma ponte dissulfeto intramolecular, ao contrário de Ahp1, que forma dissulfetos intermoleculares (Jeong *et al.*, 1999; Verdoucq *et al.*, 1999).

Porém, infelizmente não foi possível a resolução da estrutura tridimensional de Ahp1. Praticamente todas as etapas necessárias para obtenção da estrutura foram realizadas nesta tese, desde a expressão e purificação da proteína, passando pelas triagens de cristalização, difração de raios X, processamento e redução dos dados e tentativas de resolução do problema das fases. O resultado final, isto é, a resolução da estrutura, depende do sucesso de todas as etapas anteriores, o que é uma característica inerente à biologia molecular estrutural.

No intuito de resolvermos o problema das fases, que foi o "gargalo" encontrado neste trabalho, as quais são perdidas nos experimentos de difração e constituem uma informação *sine qua non* para a obtenção de mapas de densidade eletrônica de alta qualidade, diversas abordagens foram empregadas. Devido à impossibilidade de resolvermos a estrutura por substituição molecular - provavelmente em razão da baixa identidade de Ahp1 com as proteínas utilizadas para a busca (Figs. 21-23), a estratégia de difração de cristais com átomos

pesados incorporados também foi empregada. Nesse contexto, diversos conjuntos de dados de difração de cristais teoricamente contendo átomos pesados incorporados por diferentes métodos (Tabela 4) foram coletados e processados, mas também não apresentaram resultados satisfatórios. Nossa última estratégia, o uso de uma versão "pesada" de Ahp1, i.e. contendo a incorporação de Se-Met nos resíduos de metionina, para experimentos de MAD (*Multiwavelength Anomalous Dispersion*) na nova linha de luz do LNLS (MX-02), também não forneceu dados satisfatórios.

Independentemente dos resultados negativos obtidos com Ahp1, consideramos satisfatório o desenvolvimento desta linha do trabalho, pois ela permitiu o aprendizado de diversas metodologias da área de cristalografia de proteínas, com as quais não éramos familiarizados. Nosso laboratório vem trabalhado na caracterização de várias proteínas de leveduras e bactérias envolvidas com a defesa anti-oxidante, e o contato com técnicas e informações estruturais tem sido muito útil para as linhas de pesquisa do grupo. Infelizmente, as comparações almejadas entre Ahp1 e Tsa1, que seriam bastante aprofundadas com a obtenção da estrutura de Ahp1, não foram possíveis.

Em relação a Tsa1, não há informações estruturais disponíveis sobre essa proteína na literatura. A proteína mais próxima de Tsa1 que já teve sua estrutura resolvida é PrxII de humanos (Schröder *et al.*, 2000), que foi exatamente a proteína utilizada como modelo de busca para substituição molecular (66% de identidade com Tsa1). Ao contrário do que ocorreu com Ahp1, a estrutura de Tsa1 contendo a substituição Cys47→Ser foi resolvida através deste procedimento (Fig. 27; Anexo II).

Muito se questiona a respeito das razões para se estudar estruturas de proteínas que apresentam identidade tão alta com outras cujas estruturas já são conhecidas. Nesse contexto, algumas diferenças conhecidas entre Tsa1 e Tsa2 devem ser ressaltadas. Embora estas duas proteínas apresentem 86% de identidade (96% de similaridade) e muitas semelhanças funcionais, elas não possuem funções completamente redundantes, suas expressões não são

reguladas da mesma forma, além de que elas apresentam diferenças significativas no que tange ao micro-ambiente do sítio ativo, especialmente ao valor de pK_a dos resíduos de Cys-S_pH (Wong *et al.*, 2002; Munhoz e Netto, 2004; Ogusucu *et al.*, 2007). Ogusucu e col. (2007) demonstraram que os valores de pK_a das Cys-S_pH são diferentes entre as duas proteínas: 5.4 para Tsa1 e 6.3 para Tsa2, o que é uma informação surpreendente dada a alta identidade entre elas, particularmente nos resíduos que compõem os sítios ativos (ver Fig. 2 do Anexo II). A estrutura obtida de Tsa1, além de ser útil para esclarecer alguns aspectos de suas funções biológicas, poderá também ser utilizada no futuro como modelo de busca de substituição molecular para Tsa2. Tal comparação permitirá determinar em definitivo as diferenças entre as duas proteínas.

PrxI e PrxII de mamíferos também fornecem exemplos importantes de como proteínas com alta identidade, podem ter funções distintas. PrxI e PrxII apresentam identidade de 78% (91% de similaridade); o alinhamento de suas seqüências mostram a presença de um resíduo de cisteína em PrxI (Cys83) que não é encontrado em PrxII (ver Fig. 2 do Anexo II). Recentemente, Lee e col. (2007) apresentaram dados estruturais e bioquímicos que demonstraram que de fato estas duas proteínas não são completamente redundantes: enquanto PrxI apresenta melhor atividade de chaperona, PrxII funciona como uma melhor peroxidase (Lee *et al.*, 2007). Quando o resíduo Cys83 de PrxI foi mutado para serina, a versão mutante assemelhou-se a PrxII, adquirindo uma maior eficiência catalítica enquanto peroxidase, em comparação com a versão selvagem. Em conjunto, essas observações confirmam a importância de se ter informações estruturais para caracterização bioquímica de proteínas. Mesmo proteínas que apresentam altas identidades e similaridades possuem propriedades distintas, que são muitas vezes de difícil identificação por outros métodos.

V.3 – AHP1: Regulação gênica e relações com catalase

Diferentes estudos forneceram informações sobre a resposta de leveduras a situações de estresse oxidativo (revisão em Jamieson, 1998; estudos proteômicos em Godon *et al.*, 1998; Vido *et al.*, 2001; Le Moan *et al.*, 2006). De modo geral, observa-se uma aparente redundância entre as proteínas envolvidas com a resposta anti-oxidante de leveduras. Como exemplo, são conhecidas diferentes proteínas citosólicas com a habilidade de remover H₂O₂, como catalase (Ctt1), as glutationa peroxidases e Prxs, como Tsa1, Tsa2 e Ahp1, e a expressão dos genes que as codificam são induzidas na presença deste composto. Considerando a complexidade do ambiente intracelular, especialmente de células eucarióticas, um passo importante do entendimento de como as células respondem a estímulos específicos, e.g. a presença de compostos oxidantes, consiste na discriminação de possíveis papéis específicos desempenhados por diferentes proteínas anti-oxidantes.

Nesse contexto, as funções fisiológicas de Ahp1 foram pouco exploradas desde os relatos iniciais que mostraram, entre outras coisas, a indução da expressão gênica e protéica por hidroperóxidos, e os fenótipos de hipersensibilidade de células Δ -ahp1 a *t*-BOOH, diamida e sulfato de cádmio (Godon *et al.*, 1998; Jeong *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999 a e b). Assim, um dos objetivos iniciais do trabalho era definir uma ou mais condições fisiológicas em que a presença de Ahp1 se revelasse mais importante para as células de leveduras. Objetivávamos encontrar um efeito semelhante ao descrito por Demasi e col. (2001 e 2006), onde se mostrou que Tsa1 é particularmente importante em situações em que a mitocôndrias estão inativas (uso de antimicina A) e gerando altos níveis de EROs.

A proteína de fusão GFP-Ahp1 foi caracterizada como uma proteína citosólica, em células crescendo em YPD (Park *et al.*, 2000). Por outro lado, a presença de GFP-Ahp1 em mitocôndrias foi reportada, quando as células foram crescidas em meio contendo ácido oléico como fonte de carbono (Farcanasu *et al.*, 1999). Este trabalho, no entanto, foi muito pouco citado em estudos posteriores, constituindo até hoje uma observação não comprovada ou

reproduzida. Nesse controverso contexto, a análise da seqüência de aminoácidos de Ahp1 revelou semelhanças com proteínas de membranas peroxissomais de fungos, como Pmp20 de *Candida boidinii*, que apresenta 42% de identidade com Ahp1 (Jeong *et al.*, 1999; Lee *et al.* 1999a). Além disso, a região C-terminal de Ahp1 apresenta o motivo AHL (Fig. 10), que é semelhante à seqüência sinal de exportação de proteínas para peroxissomos, cujo consenso é S(A) K(H/R) L(I) (Gould *et al.*, 1988). Essas características levantaram a possibilidade teórica de Ahp1 ser uma proteína peroxissomal. Interessantemente, PrxV, a peroxirredoxina de *H. sapiens* que possui maior identidade com Ahp1, apresenta localização celular variada, tendo sido descrita em mitocôndrias, peroxissomos e citosol em células de humanos (Wood *et al.*, 2003a).

A metabolização de ácido oléico é exclusivamente peroxissomal em leveduras, uma vez que as enzimas envolvidas pela β -oxidação de ácidos graxos se encontram confinadas a este microambiente. Dessa forma, em células crescidas em oleato, a atividade mitocondrial e a produção endógena de EROs são elevadas, uma vez que este composto não é utilizado pela via fermentativa (Hiltunen *et al.*, 2003).

Leveduras possuem duas isoformas de catalase, uma citosólica (Ctt1) e outra peroxissomal (Cta1). Levando em conta o aumento da produção de EROs em células respiratoriamente ativas, é esperada em resposta uma indução da expressão de genes e enzimas anti-oxidantes, particularmente de CTA1 – que é reprimido por glicose, nessas condições. No entanto, experimentos de viabilidade de células mutantes Δ -cta1 em meio contendo ácido oléico como fonte de carbono demonstraram que o metabolismo de ácidos graxos em leveduras é independente da presença da isoforma peroxissomal de catalase (Hiltunen *et al.*, 2003). Da mesma forma, a isoforma citosólica Ctt1 também não se mostrou necessária para o crescimento apropriado em oleato. Em conjunto, essas observações suscitaram o seguinte questionamento, que foi explorado nesse trabalho: a função de Ahp1

apresenta alguma relação com Cta1, ou, em outras palavras, a ausência de Cta1 em células crescidas em ácido oléico seria de alguma forma compensada por Ahp1?

Os primeiros resultados obtidos mostraram que a mera ausência de *CTA1* (e, consequentemente, de catalase nos peroxissomos) não acarreta um aumento na expressão do gene *AHP1* em células crescidas em ácido oléico (Fig. 28B). No entanto, quando as mesmas células foram tratadas com hidroperóxidos por 30 minutos (H₂O₂, *t*-BOOH ou Cu-OOH), verificou-se um nítido aumento da expressão do gene *AHP1*, fato este que não foi observado de modo tão pronunciado em células selvagens crescidas nas mesmas condições. Várias repetições desse experimento e análises de densitometria, que levam em conta os níveis de expressão gênica em relação às quantidades de RNA total aplicados em cada canaleta (mensurados através dos controles, isto é, as bandas de rRNA), confirmaram esta observação. À primeira vista, esses dados indicaram a ocorrência de um processo específico de ativação do gene *AHP1*, quando células Δ -cta1 crescidas em oleato são tratadas com hidroperóxidos, em especial, H₂O₂.

Experimento semelhante foi realizado usando como fonte de carbono glicerol, cuja metabolização, assim como a de oleato, depende da cadeia respiratória mitocondrial, mas não induz a atividade peroxissomal. Nesse caso, o mesmo padrão de expressão de *AHP1* em células Δ -cta1 foi observado (Fig. 33), em relação às células crescidas em oleato (Fig. 28B). Por outro lado, em glicose, a ausência do gene *CTA1* não levou a uma indução específica da expressão de *AHP1* por H₂O₂, sendo esta equivalente àquela observada em células selvagens (Fig. 28A). Assim, concluímos que a ausência de catalase nos peroxissomos leva à indução específica da expressão do gene *AHP1* apenas quando as células crescem em fontes de carbono respiratórias e são tratadas com hidroperóxidos. É importante ressaltar novamente que a expressão de Cta1 é fortemente reprimida por glicose (Hortner *et al.*, 1982). Dessa forma, é de se esperar que, em glicose, a homeostase *redox* celular dependa pouco de Cta1.

O fato de a ausência da isoforma citosólica de catalase (gene *CTT1*) não acarretar o mesmo efeito que a de Cta1 sobre a expressão de *AHP1* nas condições estabelecidas (Fig. 34) sugere uma relação entre Ahp1 e processos oxidativos que ocorrem nos peroxissomos (β -oxidação de ácidos graxos) e mitocôndrias (cadeia transportadora de elétrons). A participação efetiva de Ahp1 nesse contexto, todavia, é de difícil avaliação.

Para avaliar até que ponto a presença de Ahp1 se mostra necessária para as células que não possuem Cta1, realizamos uma simulação desta situação através da inibição da atividade catalásica (Cta1 e Ctt1) com aminotriazol (ATZ), e monitoramento do crescimento de culturas tratadas ou não com diferentes hidroperóxidos. Era esperado que células Δ-ahp1 crescendo em oleato, na ausência de atividade catalásica (o que simula, grosso modo, o genótipo triplo mutante Δ -ahp1 cta1 ctt1), apresentassem um fenótipo de sensibilidade ao tratamento com H₂O₂ e outros peróxidos. Esta hipótese foi confirmada, já que células selvagens tratadas com ATZ e H_2O_2 cresceram cerca de 20% a mais que células Δ -ahp1 nas mesmas condições (Fig. 35). Assim como a expressão de AHP1 não é alterada pela mera ausência do gene CTA1 em células crescidas em oleato, a falta de atividade catalásica também não acarreta uma maior sensibilidade a células Δ-ahp1 crescidas em oleato. Esses dados forneceram uma evidência de que a hipótese levantada a partir dos resultados dos experimentos de expressão gênica, isto é, a ativação do gene AHP1 em células Δ -cta1 tratadas com H₂O₂, corresponde, ao menos em parte, a reais efeitos fisiológicos observados no crescimento celular. Ao mesmo tempo, entretanto, indicam também a cooperação de outras proteínas na defesa destas células, já que o efeito observado não foi de hipersensibilidade a H2O2, mas sim de uma sensibilidade moderada. Uma perspectiva desses estudos seria analisar fenótipos de mutantes duplos ou triplos tratados com ATZ e H₂O₂.

Para avaliar se a deleção do gene *CTA1* induz também a expressão de genes que codificam outras Prxs de leveduras, seus níveis de expressão foram determinados. Os padrões

de expressão dos genes que codificam as enzimas Prx1 e Tsa2 foram muito semelhantes àquele observado com *AHP1* em células crescidas em oleato (Figs. 30 e 31), enquanto que o do gene *TSA1* não (Fig. 32). O gene *TSA1* é conhecido por ser bastante expresso em glicose, mesmo em condições basais, o que está de acordo com o fato de esta ser uma proteína abundante no citoplasma de leveduras (Kim *et al.*, 1989; Park *et al.*, 2000). *TSA2*, por sua vez, apresenta níveis de expressão bastante reduzidos em condições basais, tanto em glicose como em glicerol, sendo bastante induzível por hidroperóxidos (Munhoz e Netto, 2004). A expressão de *PRX1* é desreprimida em baixas concentrações de glicose, e também é bastante indutível por tratamento com peróxido (Monteiro *et al.*, 2002). Todos esses padrões foram observados em nossos experimentos, o que contribui para a verificação de que os efeitos determinados em oleato não são frutos de possíveis artefatos nas análises. Assim, a resposta celular à condição de estresse por H₂O₂, quando crescem em condições respiratórias na ausência de Cta1, parece envolver além de Ahp1 também Prx1 e Tsa2.

De acordo com esta idéia, quando os genes *TSA2* ou *PRX1* estão ausentes em células que crescem em oleato, observamos um aumento significativo da expressão basal de *AHP1* nessas condições (Fig. 29), o que não foi observado em células selvagens. Já a expressão basal de *AHP1* em células Δ -tsa1 crescidas em oleato não mostrou um aumento relevante em relação a células selvagens.

A cooperação entre proteínas anti-oxidantes é uma característica deste sistema de defesa celular, dada a redundância parcial entre proteínas com funções similares e a coordenação das expressões gênica e protéica em resposta a estímulos específicos (Hallywell e Gutteridge, 1989; Netto, 2001; Godon *et al.*, 1998). Nosso grupo recentemente demonstrou a existência de um processo cooperativo entre Tsa2, Tsa1 e catalases, na proteção de células contra H_2O_2 (Munhoz e Netto, 2004). Neste trabalho, verificou-se que células Δ -tsa2 apresentam hipersensibilidade a *t*-BOOH, mas não a H_2O_2 , embora a enzima Tsa2 não possua uma maior especificidade por hidroperóxidos orgânicos. Como extratos de células Δ -tsa2

apresentam níveis elevados de atividade catalásica, em comparação com células selvagens ou Δ -tsa1, foi sugerido que as catalases sejam especificamente responsáveis pela proteção destas células ao estresse com H₂O₂ (Munhoz e Netto, 2004). Uma situação similar parece ocorrer em células Δ -cta1 ou quando a atividade catalásica é inibida em células selvagens, nas quais acreditamos que Ahp1 assuma um papel cooperativo importante no crescimento em condições respiratórias e sob estresse oxidativo.

A cooperação entre Tsa1 e Tsa2 na defesa contra os estresses oxidativo e nitrosativo também foi relatada na literatura (Wong *et al.*, 2002). Um outro exemplo que demonstra a redundância parcial entre proteínas anti-oxidantes e indica a existência de sistemas de cooperação entre elas foi fornecido com a construção de linhagens mutantes para as diferentes Prxs de leveduras (Wong *et al.*, 2004). Células que não possuem nenhuma das cinco isoformas de Prx (Δ -prx) são hipersensíveis ao estresse oxidativo (principalmente a *t*-BOOH), mas ainda assim são viáveis. Células Δ -prx apresentam níveis elevados de expressão de genes envolvidos com a defesa anti-oxidante, como *CTT1* e *GPX2* (glutationa peroxidase 2), mesmo na ausência de estímulo com hidroperóxidos. Os autores sugeriram a partir destes dados a existência de cooperação entre Prxs, catalase e glutationa peroxidase citosólicas na defesa celular (Wong *et al.*, 2004).

Em conjunto, os dados de expressão gênica obtidos neste trabalho permitiram as seguintes conclusões: (1) a expressão do gene *AHP1* em células crescidas em condições de metabolismo respiratório exibe uma relação com processos oxidativos que ocorrem nas mitocôndrias e nos peroxissomos; (2) esse sistema envolve também os genes *TSA2* e *PRX1* e as proteínas por eles codificadas, as quais, quando ausentes, acarretam aumentos nos níveis de expressão de *AHP1* em condições basais de crescimento em ácido oléico; (3) nas condições de metabolismo respiratório, sob o estímulo com H_2O_2 , a ausência de catalase peroxissomal, mas não de catalase citosólica, parece ser compensada por Ahp1, Tsa2 e Prx1, e provavelmente também por outras proteínas. Um esquema deste cenário, englobando as

proteínas envolvidas na condição estudada nos experimentos de expressão gênica, é apresentado na Figura 37.



Figura 37. Esquema de uma célula de levedura, apresentando genes e proteínas envolvidos com a defesa na condição de metabolismo respiratório e ausência de Cta1. O esquema representa o núcleo celular, onde, quando o gene *CTA1* é deletado, ocorre uma indução da expressão dos genes *AHP1*, *TSA2* e *PRX1* quando as células crescem em oleato e são submetidas ao tratamento com H_2O_2 . Prx1 migra para a mitocôndria, onde está envolvida com a remoção de EROs geradas pelo metabolismo respiratório. Como não há catalase peroxissomal, H_2O_2 pode acumular no peroxissomo (onde ocorre a β -oxidação dos ácidos graxos – fonte de acetil-CoA para o metabolismo respiratório) e atingir o citosol. Tsa2 e Ahp1 localizam-se no citosol, onde estão envolvidas com a remoção de H_2O_2 proveniente dos peroxissomos e do meio extracelular. Outras proteínas (representadas pelos símbolos ??), também estão envolvidas nesse processo. A presença hipotética de Ahp1 em peroxissomos também é representada.

Devido às controvérsias acerca da localização celular de Ahp1 (citosol, mitocôndria e peroxissomo), também era de nosso interesse investigá-la na condição de crescimento das células em ácido oléico. Como já foi exposto, Farcanasu e col. (1999) relataram a presença de Ahp1 em mitocôndrias nessa condição. Neste trabalho, foi realizado um experimento de sub-fracionamento de células crescidas em glicose e em oleato para abordar tal problemática. Entretanto, infelizmente não obtivemos dados precisos sobre a localização celular de Ahp1. A presença de Ahp1 em peroxissomos, se verificada, seria uma informação que contribuiria de modo decisivo para o modelo proposto por nossos experimentos. Tal dado, todavia, permanece um desafio para futuros trabalhos.

Nossos resultados contribuíram para a caracterização da resposta de leveduras ao estresse oxidativo em situações nas quais os peroxissomos são bastante ativos (crescimento em oleato), que ainda são pouco estudadas. Nossos estudos mostraram que essa resposta é bastante complexa e envolve várias enzimas anti-oxidantes. Além disso, nossos resultados demonstram que Ahp1 é particularmente relevante em situações em que a levedura é exposta a estresse oxidativo por peróxidos orgânicos. Pretendemos investigar em trabalho futuros o envolvimento de Ahp1 na detoxificação de peróxidos orgânicos gerados em situações nas quais o peroxissomo é ativo.

VI - CONCLUSÕES

- Ahp1 é uma Prx exclusivamente dimérica, que apresenta maior eficiência na remoção de peróxidos orgânicos do que de H₂O₂;
- Ahp1 é capaz de remover hidroperóxidos de ácidos graxos, que constituem possíveis substratos desta proteína fisiologicamente;
- Ahp1 é uma peroxirredoxina extremamente resistente à inativação por hidroperóxidos orgânicos, ao contrário de Tsa1, devendo, portanto, ser classificada como uma Prx robusta;
- A estrutura decamérica de Tsa1 apresenta os motivos característicos encontrados em Prxs sensíveis à inativação (motivos GGLG e YF) em regiões próximas ao sítio ativo;
- A ausência do gene AHP1 torna as leveduras bastante sensíveis ao tratamento com hidroperóxidos orgânicos (e.g., t-BOOH), quando estas se encontram na condição de metabolismo respiratório, com seus peroxissomos ativos (crescimento em ácido oléico);
- Na condição de crescimento em ácido oléico, quando as células não têm a isoforma peroxissomal de catalase e são tratadas com hidroperóxidos, há uma relação entre as expressões de *AHP1*, *TSA2* e *PRX1* e processos bioquímicos que ocorrem nos peroxissomos e nas mitocôndrias;
- Nesta situação, Ahp1, Prx1 e Tsa2 contribuem, junto com outras proteínas, na defesa anti-oxidante celular.

VII – RESUMO

A redução incompleta de oxigênio a água durante a respiração celular resulta na formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), compostos oxidantes que podem, em determinadas situações, gerar quadros sérios de estresse oxidativo celular. Células aeróbicas são equipadas com um complexo sistema de defesas anti-oxidantes para lidar com esta situação. Peroxirredoxinas constituem uma família de enzimas anti-oxidantes com a habilidade de remover hidroperóxidos à custa de um agente redutor que contenha tióis, protegendo biomoléculas de danos oxidativos. Ahp1 e Tsa1 são as duas peroxirredoxinas mais abundantes da levedura Saccharomyces cerevisiae, podendo cada uma constituir até 1% do total de proteínas solúveis celulares. Neste trabalho, foi realizada a caracterização de algumas propriedades bioquímicas de Ahp1, principalmente no que diz respeito às suas preferências por substratos e sensibilidade à inativação por hidroperóxidos, as quais foram comparadas com as de Tsa1. Diversos cristais de Ahp1 foram obtidos e difrataram com resolução máxima de 1.8Å. Diversas estratégias para a resolução de sua estrutura tridimensional foram adotadas, sem sucesso. Por outro lado, a estrutura tridimensional preliminar de Tsa1 foi resolvida, buscando relacionar as características funcionais da proteína com a sua organização espacial. Em uma outra linha, relações entre a regulação do gene AHP1 em condições fisiológicas específicas com a de outros genes que codificam enzimas anti-oxidantes foram reveladas. Ahp1, em conjunto com as outras Prxs Tsa2 e Prx1 parece desempenhar um papel importante na defesa contra o estresse oxidativo em situações nas quais os peroxissomos estão ativos e não possuem catalase.

VIII - ABSTRACT

The incomplete reduction of oxygen to water during respiration results in the formation of Reactive Oxygen Species (ROS), oxidizing compounds, which can generate severe cellular oxidative stress. Aerobic cells are equipped with a complex defense system to cope with this condition. Peroxiredoxins make up a family of antioxidant enzymes with the ability to remove hydroperoxides at the expense of a thiol-containing reducing agent, thereby protecting biomolecules from oxidative damage. Ahp1 and Tsa1 are the two most abundant peroxiredoxins in the yeast Saccharomyces cerevisiae, each one making up to 1% of the cellular soluble proteins. In this work, we carried out a biochemical characterization of some of Ahp1's properties, particularly of its substrate preferences and sensitivity to inactivation by hydroperoxides, which have been compared to those of Tsa1. In one approach, Ahp1 crystals were obtained and diffracted at 1.8Å resolution. Several methods were unsuccessfully employed in the attempt to solve Ahp1 structure. On the other hand, the three-dimensional structure of Tsa1 was solved, aiming to correlate its functional properties with its spatial organization. In another part of the work, relations between the regulation of AHP1 and other Prx genes were revealed. Ahp1, together with Tsa2 and Prx1, appears to carry out an important role in the cellular defense against oxidative stress, in conditions where peroxisomes are active and devoid of catalase.

IX – ANEXOS

IX.1 – Anexo I

Artigo de revisão publicado no periódico *Comparative Biochemistry and Physiology, section C: Toxicology and Pharmacology* [*Comp. Biochem. Physiol. C* 146: 180-93 (2007)]

"Reactive cysteine in proteins: Protein folding, antioxidant defense, redox signaling and

more"

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.

IX.2 – Anexo II

Artigo aceito publicado no periódico *Acta Crystallographica, section F* [*Acta Crystallog. F* 63: 665-8 (2007)]

"Crystallization and preliminary X-ray analysis of a decameric form of cytosolic thioredoxin peroxidase 1 (Tsa1), C47S mutant, from Saccharomyces cerevisiae"

Oliveira, M.A.; Genu, V.; Discola, K.F.; Alves, S.V.; Netto, L.E.S.; Guimarães, B.G.

X – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akerman, S.E. & Muller, S. (2005) Peroxiredoxin-linked detoxification of hydroperoxides in *Toxoplasma gondii*. J. Biol. Chem. 280: 564-70.
- Arner, E.S., Holmgren, A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 267: 6102-9.
- Augusto, O.; Bonini, M.G.; Amanso, A.M.; Linares, E.; Santos, C.C.; De Menezes, S.L. (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic. Biol. Med.* 32: 841-59.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1998) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons Inc., New York, USA.
- Biteau, B., Labarre, J., Toledano, M.B. (2003) ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by S. cerevisiae sulphiredoxin. Nature 425: 980-4.
- Bollag, D.M.; Rozycki, M.D.; Edelstein, S.J. (1996) *Protein methods*. John Wiley & Sons Inc., New York, USA.
- 7. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72:** 248-54.
- Brunger, A.T.; Adams, P.D.; Clore, G.M.; DeLano, W.L.; Gros, P.; Grosse-Kunstleve, R.W.; Jiang, J.S.; Kuszewski, J.; Nilges, M.; Pannu, N.S.; Read, R.J.; Rice, L.M.; Simonson, T.; Warren, G.L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54: 905-21.
- Bryk, R.; Griffin, P.; Nathan, C. (2000) Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* 407: 211-5.
- 10. 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.
- Calderbank, J., Keenan, M.H.J., Rose, A.H. (1985) Plasma-membrane phospholipid unsaturation affects expression of the general amino-acid permease in *Saccharomyces cerevisiae* Y185. *J. Gen. Microbiol.* 131: 57-65.
- Cha, M.K., Choi, Y.S., Hong, S.K., Kim, W.C., No, K.T., Kim, I.H. (2003) Nuclear thiol peroxidase as a functional alkyl-hydroperoxide reductase necessary for stationary phase growth of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 278: 24636-43.
- Chae, H.Z., Chung, A.J., Rhee, S.G. (1994a) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. J. Biol. Chem. 269: 27670-8.
- Chae, H.Z., Kim, I.H., Kim, K., Rhee, S.G. (1993) Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 268: 16815-21.
- 15. Chae, H.Z., Uhm, T.B., Rhee, S.G. (1994b) Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91:** 7022-6.
- Chang, T.S.; Jeong, W.; Choi, S.Y.; Yu, S.; Kang, S.W.; Rhee, S.G. (2002) Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 277: 25370-6.

- 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 to cysteine. *J. Biol. Chem.* 279: 50994-1001.
- Chevallet, M., Wagner, E., Luche, S., Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., Rabilloud, T. (2003) Regeneration of peroxiredoxins during recovery after oxidative stress. Only some overoxidized peroxiredoxins can be reduced during recovery after oxidative stress. J. Biol. Chem. 278: 37146-53.
- 19. Coleman, S.T., Epping, E.A., Steggerda, S.M., Moye-Rowley, W.S. (1999) Yap1p activates gene transcription in an oxidant-specific fashion. *Mol. Cell. Biol.* **19:** 8302-13.
- 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: 13981-95.
- 21. Cussiol, J.R.; Alves, S.V.; de Oliveira, M.A.; Netto, L.E. (2003) Organic hydroperoxide resistance gene encodes a thiol-dependent peroxidase. *J. Biol. Chem.* **278**: 11570-8.
- Declercq, J.P.; Evrard, C.; Clippe, A.; Stricht, D.V.; Bernard, A.; Knoops, B. (2001) Crystal structure of human peroxiredoxin 5, a novel type of mammalian peroxiredoxin at 1.5 A resolution. *J. Mol. Biol.* 311: 751-9.
- 23. Delaunay, A., Isnard, A.D., Toledano, M.B (2000) H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J.* **19:** 5157-66.
- 24. Demasi, A.P.; Pereira, G.A.; Netto, L.E. (2001) Cytosolic thioredoxin peroxidase I is essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria. *FEBS Lett.* **509**: 430-4
- 25. Demasi, A.P.; Pereira, G.A.; Netto, L.E. (2006) Yeast oxidative stress response. Influences of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial functional state. *FEBS J.* **273:** 805-16.
- 26. Demasi, M.; Silva, G.M.; Netto, L.E. (2003) 20S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is S-glutathionylated. *J. Biol. Chem.* **278**: 679-85.
- Dubuisson, M.; VanderStricht, 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: 161-5.
- Echalier, A., Trivelli, X., Corbier, C., Rouhier, N., Walker, O., Tsan, P., Jacquot, J.P., Aubry, A., Krimm, I., Lancelin, J.M. (2005) Crystal structure and solution NMR dynamics of a D (Type II) peroxiredoxin glutaredoxin and thioredoxin dependent: a new insight into the peroxiredoxin oligomerism. *Biochemistry* 44: 1755-67.
- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr.* D Biol. Crystallogr. 60: 2126-32.
- 30. Evans, P.R. (1993) Proceedings of CCP4 Study Weekend on Data Collection and Processing: 114-22.
- Evans, M.V.; Turton, H.E.; Grant, C.M.; Dawes, I.W. (1998) Toxicity of linoleic acid hydroperoxide to Saccharomyces cerevisiae: involvement of a respiration-related process for maximal sensitivity and adaptive response. J. Bacteriol. 180: 483-90.
- Evrard, C., Capron, A., Marchand, C., Clippe, A., Wattiez, R., Soumillion, P., Knoops, B., Declercq, J.P. (2004) Crystal structure of a dimeric oxidized form of human peroxiredoxin 5. *J. Mol. Biol.* 337: 1079-90.

- Farcanasu, I.C., Hirata, D., Tsuchiya, E., Mizuta, K., Miyakawa, T. (1999) Involvement of thioredoxin peroxidase type II (Ahp1p) of Saccharomyces cerevisiae in Mn⁺² homeostasis. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63: 1871-81.
- 34. Faxén, K.; Gilderson, G.; Adelroth, P.; Brzezinski, P. (2005) A mechanistic principle for proton pumping by cytochrome c oxidase. *Nature* **437**: 286-9.
- 35. 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.
- 36. Filomeni, G.; Rotilio, G.; Ciriolo, M.R. (2002) Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem. Pharmacol.* **64:** 1057-64.
- Flohé, L.; Budde, H.; Bruns, K.; Castro, H.; Clos, J.; Hofmann, B.; Kansal-Kalavar, S.; Krumme, D.; Menge, U.; Plank-Schumacher, K.; Sztajer, H.; Wissing, J.; Wylegalla, C.; Hecht, H.J. (2002) Tryparedoxin peroxidase of *Leishmania donovani*: molecular cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* 397: 324-35.
- 38. Georgiou, G. & Masip, L. (2003) An overoxidation journey with a return ticket. Science 300: 592-4.
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J.M., Kieffer, S., Perroti, M., Boucheriei, H., Toledano, M.B., Labarre, J. (1998) The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 273: 22480-9.
- 40. Gould, S.J., Keller, G.A., Subramani, S. (1988) Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxi terminus of four peroxisomal proteins. *J. Cell Biol.* **107**: 897-905.
- Grant, C.M., Collinson, L.P., Roe, J.H., Dawes, I.W. (1996) Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol. Microbiol.* 21: 739-46.
- 42. Hallywell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Claredon Press, Oxford, UK.
- 43. He, X.J. & Fassler, J.S. (2005) Identification of novel Yap1p and Skn7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **58**: 1454-67.
- 44. Hillas, P.J.; del Alba, F.S.; Oyarzabal, J.; Wilks, A.; de Montellano, P.R.O. (2000) The AhpC and AhpD antioxidant defense system of *Mycobacterium tuberculosis. J. Biol. Chem.* **275**: 18801-9.
- 45. Hiltunen, J.K., Mursula, A.M., Rottensteiner, H., Wierenga, R.K., Kastaniotis, A.J., Gurvitz, A. (2003) The biochemistry of peroxisomal β-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol*. *Rev.* 27: 35-64.
- 46. Hofmann, B.; Hecht, H.J.; Flohé, L. (2002) Peroxiredoxins. Biol. Chem. 383: 347-64.
- 47. Holmgren, A. (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. J. Biol. Chem. 264: 13963-6.
- 48. Hortner, H.; Ammerer, G.; Hartter, E.; Hamilton, B.; Rytka, J.; Bilinski, T.; Ruis, H. (1982) Regulation of synthesis of catalases and iso-1-cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae* by glucose, oxygen and heme. *Eur. J. Biochem.* **128**: 179–184.
- 49. Izawa, S.; Inoue, Y.; Kimura, A. (1996) Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **320**: 61-7.
- 50. Jamieson, D.J. (1998) Oxidative stress responses of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Yeast 16: 1511-27.
- 51. 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.; 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.

- 52. 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.
- Jeong, J.S., Kwon, S.J., Kang, S.W., Rhee, S.G., Kim, K. (1999) Purification and characterization of a second type Thioredoxin peroxidase (type II TPx) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 38: 776-83.
- 54. Jeong, W., Cha, M.K., Kim, I.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.
- 55. Jeong, W.; Park, S.J.; Chang, T.S.; Lee, D.Y.; Rhee, S.G. (2006) Molecular mechanism of the reduction of cysteine sulfinic acid of peroxiredoxin to cysteine by mammalian sulfiredoxin. *J. Biol. Chem.* **281**: 14400-7.
- 56. Jiang, Z.Y.; Hunt, J.V.; Wolff, S.P. (1992) Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* **202:** 384-9.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. section A* 47: 110-119.
- 58. Jönsson, 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**: 8634-42.
- 59. Kabsch, W. (1988) Evaluation of single-crystal X-ray diffraction data from a position-sensitive detector. J. Appl. Cryst. 21: 916-24.
- 60. Kang, S.W.; Chae, H.Z.; Seo, M.S.; Kim, K.; Baines, I.C.; Rhee, S.G. (1998) Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha. *J. Biol. Chem.* **273**: 6297-302.
- 61. Kim, I.H.; Kim, K.; Rhee, S.G. (1989) Induction of an antioxidant protein of *Saccharomyces cerevisiae* by O₂, Fe3+, or 2-mercaptoethanol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86:** 6018-22.
- 62. Kim, K., Kim, I.H., Lee, K.Y., Rhee, S.G., 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.
- 63. Kim, S.J., Woo, J.R., Hwang, Y.S., Jeong, D.G., Shin, D.H., Kim, K., Ryu, S.E. (2003) The tetrameric structure of *Haemophilus influenza* hybrid Prx5 reveals iInteractions between electron donor and acceptor proteins. *J. Biol. Chem.* **278**: 10790-8.
- 64. Klatt, P. & Lamas, S. (2000) Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem.* **267:** 4928-44.
- 65. Kondo, T.; Yoshida, K.; Urata, Y.; Goto, S.; Gasa, S.; Taniguchi, N. (1993) gamma-Glutamylcysteine synthetase and active transport of glutathione S-conjugate are responsive to heat shock in K562 erythroid cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 20366-72.

- Kong, W., Shiota, S., Shi, Y., Nakayama, H., 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.
- 67. Krems, B., Charizanis, C., Entian, K.D. (1996) The response regulator-like protein Pos9/Skn7 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in oxidative stress resistance. *Curr. Genet.* **29:** 327-34.
- 68. Kuge, S. and Jones, N. (1994) YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.* **13**: 655-64.
- 69. Kuge, S., Jones, N., Nomoto, A. (1997) Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J.* **16:** 1710-20.
- Kwon, S.J., Park, J.W., Choi, W.K., Kim, I.H., Kim, K. (1994) Inhibition of metal-catalyzed oxidation systems by a yeast protector protein in the presence of thioredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201: 8-15.
- Le Moan, N.; Clement, G.; Le Maout, S.; Tacnet, F.; Toledano, M.B. (2006) The Saccharomyces cerevisiae proteome of oxidized protein thiols: contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways. J. Biol. Chem. 281: 10420-30.
- 72. Lee, W.; Choi, K.S.; Riddell, J.; Ip, C.; Ghosh, D.; Park, J.H.; Park, Y.M. (2007) Human peroxiredoxin 1 and 2 are not duplicative proteins: The unique presence of CYS83 in PRX1 underscores the structural and functional differences between PRX1 and PRX2. *J. Biol. Chem.* [*epub ahead of print*]
- 73. Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., Toledano, M.B. (1999a) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J. Biol. Chem.* **274**: 16040-46.
- 74. Lee, J., Spector, D., Godon, C., Labarre, J., Toledano, M.B. (1999b) A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast. *J. Biol. Chem.* **274:** 4537-44.
- 75. Leslie, A. G. W. (1992) Int CCP4/ESF-EAMBCB Newsl. Protein Crystallogr. 26.
- 76. Manevich, Y. & Fisher, A.B. (2005) Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* **38:** 1422-32.
- 77. Martin, J.L. (1995) Thioredoxin: a fold for all reasons. Structure 3: 245-50.
- 78. Matthews, B.W. (1968) Solvent content of protein crystals. J. Mol. Biol. 33: 491-7.
- Melov, S., Ravenscroft, J., Malik, S., Gill, M.S., Walker, D.W., Clayton, P.E., Wallace, D.C., Malfroy, B., Doctrow, S.R., Lithgow, G.J. (2000) Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* 289: 1567-9.
- Meng, T.C.; Buckley, D.A.; Galic, S.; Tiganis, T.; Tonks, N.K. (2004) Regulation of insulin signaling through reversible oxidation of the protein-tyrosine phosphatases TC45 and PTP1B. *J. Biol. Chem.* 279: 37716-25.
- Moellering, D.; Mc Andrew, J.; Patel, R.P.; Forman, H.J.; Mulcahy, R.T.; Jo, H.; Darley-Usmar, V.M. (1999) The induction of GSH synthesis by nanomolar concentrations of NO in endothelial cells: a role for gamma-glutamylcysteine synthetase and gamma-glutamyl transpeptidase. *FEBS Lett.* 448: 292-6.
- Monteiro, G.; Horta, B.B.; Pimenta, D.C.; Augusto, O.; Netto, L.E. (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.

- 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 Rad. Biol. Med.* 32: 278-88.
- 84. 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: 28775-84.
- 85. Morgan, B.A., Banks, G.R., Toone, W.M., Raitt, D., Kuge, S., Johnston, L.H. (1997) The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae. EMBO J.* **16:** 1035-44.
- 86. Müller, F.L.; Liu, Y.; Van Remmen, H. (2004) Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **279**: 49064-73.
- Munhoz, D.C. and 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: 35219-27.
- 88. Murshudov, G.N., Vagin, A.A., Dodson, E.J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr., section D* **53**: 240-55.
- 89. Navazza, J. (1994) AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr*. **A50**: 157-63.
- Netto, L.E.S. (2001) Regulación de las defensas antioxidantes. Antioxidantes 12: Art. 130. www.antioxidantes.com.ar/12/Art130.htm.
- 91. 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:** 15315-21.
- 92. 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. (2006) Reactive cysteine in proteins: Protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. [epub ahead of print]*
- 93. Nguyên-nhu, N.T. and Knoops, B. (2002) Alkyl hydroperoxide reductase 1 protects *Saccharomyces cerevisiae* against metal ion toxicity and glutathione depletion. *Toxicol. Letters* **135**: 219-28.
- Niles, J.C.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. (2006) Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide* 14: 109-21.
- 95. Ogusucu, R.; Rettori, D.; Munhoz, D.C.; Netto, L.E.; Augusto, O. (2007) Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. *Free Radic. Biol. Med.* **42:** 326-34.
- 96. Oliveira, M.A.; Guimarães, B.G.; Cussiol, J.R.; Medrano, F.J.; Gozzo, F.C.; 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.
- 97. 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**: 5723-32.

- 98. 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: 10583-92.
- Pedrajas, J.R., Kosmidou, E., Miranda-Vizuete, A., Gustafsson, J., Wright, A.P.H., Spyrou, G. (1999) Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem.* 274: 6366-73.
- 100.Pedrajas, J.R.; Miranda-Vizuete, A.; Javanmardy, N.; Gustafsson, J.A.; Spyrou, G. (2000) Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* **275:** 16296-301.
- 101.Powis, G.; Gasdaska, J.R.; Baker, A. (1997) Redox signaling and the control of cell growth and death. *Adv. Pharmacol.* **38**: 329-59.
- 102.Prouzet-Mauléon, V., Monribot-Espagne, C., Boucherie, H., Lagniel, G., Lopez, S., Labarre, J., Garin, J., Lauquin, G.J.M. (2002) Identification in *Saccharomyces cerevisiae* of a new stable variant of alkyl hydroperoxide reductase 1 (Ahp1) induced by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 277: 4823-30.
- 103.Qi, Y. & Grishin, N.V. (2005) Structural classification of thioredoxin-like fold proteins. *Proteins* **58**: 376-88.
- 104.Rabilloud, T.; Heller, M.; Gasnier, F.; Luche, S.; Rey, C.; Aebersold, R.; Benahmed, M.; Louisot, P.; Lunardi, J. (2002) Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for in vivo overoxidation of peroxiredoxins at their active site. *J. Biol. Chem.* 277: 19396-401
- 105.Radi, R. (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 4003-8.
- 106.Rahman, I.; Bel, A.; Mulier, B.; Lawson, M.F.; Harrison, D.J.; Macnee, W.; Smith, C.A. (1996) Transcriptional regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase-heavy subunit by oxidants in human alveolar epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229: 832-7.
- 107.Read, R.J. (2001) Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Cryst. D* 57: 1373-82.
- 108. Rhee, S.G. (2006) H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science* **312**: 1882-3.
- 109. 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**: 1543-52.
- 110.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: 183-9.
- 111.Rouhier, N.; Gelhaye, E.; Sautiere, P.E.; Brun, A.; Laurent, P.; Tagu, D.; Gerard, J.; de Fay, E.; Meyer, Y.; Jacquot, J.P. (2001) Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor. *Plant Physiol.* 127: 1299-309.
- 112.Schröder, E., Littlechild, J.A., Lebedev, A.A., Errington, N., Vagin, A.A. & Isupov M.N. (2000) Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7Å resolution. *Structure* 8: 605-15.
- 113.Sies, H. (1993) Strategies of antioxidant defense. Eur. J. Biochem. 215: 213-9.

- 114.Smith, J.J.; Marelli, M.; Christmas, R.H.; Vizeacoumar, F.J.; Dilworth, D.J.; Ideker, T.; Galitski, T.; Dimitrov, K.; Rachubinski, R.A.; Aitchison, J.D. (2002) Transcriptome profiling to identify genes involved in peroxisome assembly and function. *J. Cell Biol.* **158**: 259-71.
- 115.Stadtman, E.R. (1990) Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Rad. Biol. Med.* **9**: 315-25.
- 116.Stadtman, E.R. (1992) Protein oxidation and aging. Science 257: 1220-4.
- 117.Stone, J.R. (2004) An assessment of proposed mechanisms for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems. *Arch. Biochem. Biophys.* **422:** 119-24.
- 118. Storoni, L.C., McCoy, A.J., Read, R.J. (2004) Likelihood-enhanced fast rotation functions. *Acta Cryst. D* **60:** 432-8.
- 119. Terwilliger, T.C. (1999) Reciprocal-space solvent flattening. Acta Crystallogr., section D 55: 1863-71.
- 120. Terwilliger, T.C. (2000) Maximum-likelihood density modification. Acta Crystallogr., section D 56: 965-72.
- 121.Terwilliger, T.C. (2003) SOLVE and RESOLVE: automated structure solution and density modification. *Methods Enzymol.* **374:** 22-37.
- 122. Toren, F. & Holbrook, N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**: 239-47.
- 123.Trivelli, X., Krimm, I., Ebel, C., Verdoucq, L., Prouzet-Mauléon, V., Chartier, Y., Tsan, P., Lauquin, G., Meyer, Y., Lancelin, J. (2003) Characterization of the yeast peroxiredoxin Ahp1 in its reduced and overoxidized inactive forms using NMR. *Biochemistry* **42**: 14139-49.
- 124. Tsuzi, D., Maeta, K., Takatsume, Y., Izawa, S., Inoue, Y. (2004) Regulation of the yeast phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase *GPX2* by oxidative stress is mediated by Yap1 and Skn7. *FEBS Lett.* **565**: 148-54.
- 125. Turrens, J.F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J. Physiol. 552: 335-44.
- 126.Urata, Y.; Yamamoto, H.; Goto, S.; Tsushima, H.; Akazawa, S.; Yamashita, S.; Nagataki, S.; Kondo, T. (1996) Long exposure to high glucose concentration impairs the responsive expression of gamma-glutamylcysteine synthetase by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in mouse endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 15146-52.
- 127.Vagin, A. & Teplyakov, A. (1997) MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. J. *Appl. Cryst.* **30**: 1022-5.
- 128. Valko, M.; Leibfritz D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.; Mazur, M.; Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **39**: 44-84.
- 129.van der Rest, M.E.; Kamminga, A.H.; Nakano, A.; Anraku, Y.; Poolman, B.; Konings, W.N. (1995) The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 59: 304-22.
- 130. Veal, E.A.; Findlay, V.J.; Day, A.M.; Bozonet, S.M.; Evans, J.M.; Quinn, J.; Morgan, B.A. (2004) A 2-Cys peroxiredoxin regulates peroxide-induced oxidation and activation of a stress-activated MAP kinase. *Mol. Cell* **15**: 129-39
- 131. Veenhuis, M., Mateblowski, M., Kunau, W.H., Harder, W. (1987) Proliferation of microbodies in *Saccharomyces cerevisiae. Yeast* **3:** 77-84.

- 132. Verdoucq, L.; Vignols, F; Jacquot, J.P.; Chartier, Y.; Meyer, Y. (1999) In vivo characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family. *J. Biol. Chem.* **274**: 19714-22.
- 133.Vido, K.; Spector, D.; Lagniel, G.; Lopez, S.; Toledano, M.B.; Labarre, J. (2001) A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **276**: 8469-74.
- 134.Vizeacoumar, F.J.; Torres-Guzman, J.C.; Tam, Y.Y.; Aitchison, J.D.; Rachubinski, R.A. (2003) YHR150w and YDR479c encode peroxisomal integral membrane proteins involved in the regulation of peroxisome number, size, and distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell Biol. 161: 321-32.
- 135.Winyard, P.G.; Moody, C.J.; Jacob, C. (2005) Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends Biochem. Sci.* **30:** 453-61.
- 136.Wong, C.M.; Siu, K.L.; Jin, D.Y. (2004) Peroxiredoxin-null yeast cells are hypersensitive to oxidative stress and are genomically unstable. *J. Biol. Chem.* **279**: 23207-13.
- 137.Wong, C.M.; Zhou, Y.; Ng, R. W. M.; 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.
- 138.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**: 653-6.
- 139.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**: 3125-8.
- 140.Wood, M.J., Storz, G., Tjandra, N. (2004) Structural basis for redox regulation of Yap1 transcription factor localization. *Nature* **430**: 917-21.
- 141.Wood, Z.A., Poole, L.B., Hantgan, R.R., Karplus, P.A. (2002) Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry* **41**: 5493-504.
- 142.Wood, Z.A., Poole, L.B., Karplus, P.A. (2003b) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* **300:** 650-3.
- 143.Wood, Z.A., Schröder, E., Harris, J.R., Poole, L.B. (2003a) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **28**: 32-40.
- 144.Woods, J.S. & Ellis, M.E. (1995) Up-regulation of glutathione synthesis in rat kidney by methyl mercury. Relationship to mercury-induced oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* **50**: 1719-24.
- 145.Wu, A. and Moye-Rowley, W.S. (1994) *GSH1*, which encodes γ-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 5832-9.
- 146. Yang, K.S., Kang, S.W., Woo, H.A., Hwang, S.C., Chae, H.Z., Kim, K., 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.