

Caroline Gonçalves de Góes

**Papel da proteína antioxidante Ahp1 de *Saccharomyces cerevisiae* na resposta celular contra estresse oxidativo**

Role of the *Saccharomyces cerevisiae* antioxidant protein Ahp1 in the cellular response against oxidative stress

São Paulo

2023

Caroline Gonçalves de Góes

**Papel da proteína antioxidante Ahp1 de *Saccharomyces cerevisiae* na resposta celular contra estresse oxidativo**

Role of the *Saccharomyces cerevisiae* antioxidant protein Ahp1 in the cellular response against oxidative stress

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

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

EXEMPLAR CORRIGIDO

São Paulo

2023

# FICHA CATALOGRÁFICA

---

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP,  
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a) no formulário:  
'<https://biblioteca.ib.usp.br/ficha-catalografica/src/ficha.php>'

Caroline, Gonçalves de Góes  
Papel da proteína antioxidante Ahp1 de  
Saccharomyces cerevisiae na resposta celular contra  
estresse oxidativo / Caroline Gonçalves de Góes ;  
orientador Luis Eduardo Soares Netto -- São Paulo,  
2023.  
105 p.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Biociências da  
Universidade de São Paulo. Ciências Biológicas  
(Botânica).

1. Estresse oxidativo. 2. Peroxirredoxina. 3.  
Saccharomyces cerevisiae. 4. Ahp1. I. Soares Netto,  
Luis Eduardo, orient. Título.

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

## Comissão Julgadora:

---

Prof.(a). Dr(a).

---

Prof.(a). Dar(a).

---

Prof.(a). Dr(a).

---



Prof.(a). Dr(a).

---

Prof. Dr. Luis Eduardo soares Netto

Orientador

## DEDICATÓRIA

---

Dedico este trabalho para honra e glória de Nosso Senhor Jesus Cristo,  
que me sustentou até aqui.

## EPÍGRAFE

---

"A verdadeira viagem do descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ver com novos olhos."

Marcel Proust.

## AGRADECIMENTOS

---

À Deus, pela sua Misericórdia infinita, que me sustentou e me deu forças para continuar.

Ao meu esposo, Rogério Aleixo, pelo apoio, incentivo e pelos anos de companheirismo e parceria.

Ao meu filho, Daniel, que trouxe alegria e luz para essa jornada.

À minha mãe e irmã, que fizeram enormes sacrifícios para que eu chegasse até aqui.

Ao meu grande amigo Thiago Mesquita, que sempre me incentivou na carreira acadêmica, pelas nossas conversas profundas e por todos os anos de amizade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto, pela confiança depositada, ensinamentos e boa vontade sempre.

Ao colega Fernando Gomes que, sempre me ajudou e por sua disponibilidade em sempre responder meus questionamentos.

Ao colega Thiago Alegria, sempre disposto e solícito, me ajudando com soluções para os mais diversos problemas.

Aos colegas do laboratório, que passaram e os que ainda permanecem, a dinâmica de trabalho diário foi mais divertida com vocês.

Aos funcionários do Departamento de Genética e do Instituto de Biociências.

Ao CNPq (processo: 142191/2017-5), a FAPESP (CEPID/REDOXOMA: 2013/07937-8) e demais agências financiadoras.

# ÍNDICE

---

<i>RESUMO</i>	<b>9</b>
<i>ABSTRACT</i>	<b>11</b>
<i>INTRODUÇÃO</i>	<b>13</b>
<b>I. A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	<b>13</b>
<b>II. Processos Redox e Estresse Oxidativo</b>	<b>16</b>
<b>III. Peroxissomos</b>	<b>20</b>
<b>IV. Peroxirredoxinas (Prxs)</b>	<b>26</b>
<b>V. <u>Alquil hidroperóxido redutase 1 (Ahp1)</u></b>	<b>30</b>
<i>OBJETIVOS GERAIS</i>	<b>35</b>
<i>METODOLOGIAS</i>	<b>36</b>
<b>I. <u>Análise de fenótipos</u></b>	<b>36</b>
a) Meios de Cultivo:	36
b) Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
c) Curvas de crescimento e ensaios de viabilidade	37
c.1) Curvas de crescimento com peróxidos de ácidos graxos	38
d) Ensaio FOX ( <i>Ferrous Oxidation-Xylenol Orange</i> )	39
e) Fracionamento celular	39
f) Cicloheximida Assay	40
g) Lise das amostras	41
h) SDS-PAGE	41
i) <i>Western Blot</i>	42
<b>II. <u>Análises Enzimáticas e Estruturais</u></b>	<b>43</b>
a) Linhagens bacterianas de clonagem e expressão	43
b) Plasmídios	43
c) Amplificação do gene <i>AHP1</i> e clonagem em pET15b	44
d) Expressão e Purificação de proteínas	45
e) Determinação da concentração de proteínas	46
f) Digestão da cauda de Histidina da enzima Trx1	47
g) Mutação sítio-específica	47
h) Detecção de pontes de dissulfeto por SDS-PAGE não redutor	47
i) Ensaio DTNB (reagente de Ellman's)	48
j) Ensaios Enzimáticos	48
<i>RESULTADOS</i>	<b>49</b>
<b>I. <u>Análise do fenótipo de linhagens de <math>\Delta</math>ahp1</u></b>	<b>49</b>
1. <u>Análises de fenótipo em fontes de carbono variadas e sob estresse oxidativo</u>	49
2. <u>Avaliação do consumo de hidroperóxido orgânico exógeno em linhagens mutantes de leveduras</u>	57

3.	<u>Análises do papel de Ahp1 na resposta de leveduras a estresse promovido por peróxidos de ácidos graxos</u>	60
4.	<u>Localização sub-celular de Ahp1</u>	64
5.	<u>Análise de Expressão de Ahp1</u>	68
6.	<u>Análise de degradação proteica (CHX assay)</u>	69
<b>II.</b>	<b><u>Análises enzimáticas e estruturais de Ahp1</u></b>	<b>72</b>
1.	<u>Cisteínas envolvidas no Ciclo Catalítico de Ahp1</u>	72
2.	<u>Parâmetros Cinéticos de Ahp1</u>	75
3.	<u>Ahp1 apresenta estados de alternância entre FF e LU</u>	79
	<b><i>DISCUSSÃO</i></b>	<b>81</b>
1.	<b><u>Análise de fenótipo de leveduras de <i>S. cerevisiae</i> nulas para o gene <i>AHP1</i>.</u></b>	<b>81</b>
2.	<b><u>Ahp1 é citosólica independente do estado metabólico da levedura.</u></b>	<b>88</b>
3.	<b><u>Caracterização cinética de Ahp1.</u></b>	<b>90</b>
4.	<b><u>Análise estrutural de Ahp1.</u></b>	<b>91</b>
	<b><i>CONCLUSÕES</i></b>	<b>93</b>
	<b><i>PERSPECTIVAS</i></b>	<b>94</b>
	<b><i>Referências</i></b>	<b>95</b>



## RESUMO

---

A formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode ocorrer durante o metabolismo celular, por exemplo pela via da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias ou pela via de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos que, pode ocorrer nos peroxissomos ou mitocôndrias, e causa a liberação de peróxido de hidrogênio. Em *Saccharomyces cerevisiae*, a  $\beta$ -oxidação ocorre estritamente nos peroxissomos. Assim, buscando lidar com esses oxidantes, as células aeróbicas possuem um complexo sistema de defesa antioxidantes, ainda não completamente elucidado. Essas leveduras tem metabolismo preferencialmente fermentativo e quando cultivadas em glicose sofrem repressão catabólica. Portanto, em meios de cultura respiratórios, como em Etanol, por exemplo, não ocorre a repressão catabólica de enzimas responsáveis pela biogênese mitocondrial.

*S. cerevisiae* possui cinco enzimas antioxidantes: Tsa1, Tsa2, Prx1, Dot5 e Ahp1. Esta última, com capacidade de reduzir mais eficientemente alquil-hidroperóxidos. Outras seis enzimas podem reduzir peróxidos na levedura, como as catalases (Cta1 e Ctt1), a Citocromo C peroxidase (Ccp1) e as glutationas peroxidases (Gpx1, Gpx2 e Gpx3). Essas enzimas podem ter sua expressão induzida diferencialmente de acordo com o meio de cultivo. No caso de Gpx1, a expressão é induzida em meio contendo oleato, e este também induz a proliferação peroxissomal. Nessas condições, Gpx1 está localizada no peroxissomos, bem como a Cta1. Ahp1 apresenta o motivo AHL na sua extremidade c terminal que se assemelha à sequência PTS1 envolvida no endereçamento de proteínas ao peroxissomos.

Neste trabalho, foi realizada a análise e caracterização de fenótipos de leveduras mutantes para proteínas supostamente envolvidas na defesa de oxidantes gerados pelo peroxissomos, com ênfase no mutante  $\Delta$ ahp1. Nossos resultados indicaram que Ahp1 tem papel relevante na resposta a insultos oxidativos promovidos por peróxidos orgânicos ou inorgânicos adicionados exogenamente, em diferentes condições metabólicas. Além disso, mostramos que Ahp1 apresenta localização citosólica nas condições metabólicas analisadas.

Mostramos ainda que na ausência de Tsa1, Ahp1 atua como um possível mecanismo compensatório, tendo um aumento expressivo nos seus níveis proteicos. Ainda nessa perspectiva,

mostramos que, linhagens que tem um aumento em níveis proteicos de Ahp1, como a linhagem *Δtsa1*, tem maior resistência a peróxidos derivados de ácidos graxos adicionados exogenamente.

Finalmente, em análises bioquímicas e cinéticas, revisitamos o ciclo catalítico de Ahp1, confirmando o papel de Cys31 como cisteína de resolução e Cys62 como cisteína peroxidásica. Nessas análises, observamos que a presença da cauda *Histag* na região N-terminal de Tiorredoxina 1 (Trx1) interfere na sua afinidade com Ahp1. Em paralelo, análises das estruturas disponíveis em bancos de dados, indicaram que Ahp1 passa por alterações conformacionais ao longo de seu ciclo catalítico que se assemelham aos estados FF (“*fully fold*”) e LU (“*locally unfolded*”) bem descritos para 2-Cys Prxs típicas (subfamília Prx1/AhpC) e que estão envolvidos na formação e redução de pontes dissulfeto intermolecular.

## ABSTRACT

---

The formation of reactive oxygen species (ROS) occurs in cellular metabolism, for example during oxidative phosphorylation in the mitochondria, or in some cases, during the  $\beta$ -oxidation of fatty acids, which can occur in the peroxisomes or mitochondria, and causes the release of hydrogen peroxide. In *Saccharomyces cerevisiae*,  $\beta$ -oxidation occurs strictly in the peroxisomes. Thus, aerobic cell displays a complex antioxidant defense system to deal with these oxidants, which were not completely elucidated. This yeast preferably utilizes glucose as a carbon source through a fermentative metabolism, leading to a process known as catabolic repression. Therefore, in a respiratory culture media, such as those containing ethanol as carbon source, the catabolic repression of enzymes responsible for mitochondrial biogenesis does not occur.

*S. cerevisiae* has five antioxidant enzymes: Tsa1, Tsa2, Prx1, Dot5, and Ahp1. The latter, with the ability to more efficiently reduce alkyl hydroperoxides. Other six enzymes can reduce peroxides in yeast, such as catalases (Cta1 and Ctt1), Cytochrome C peroxidase, and Glutathione Peroxidases (Gpx1, Gpx2, and Gpx3). These enzymes may have their expression induced according to the culture medium. In the case of Gpx1, expression is induced in medium containing Oleate, and this medium also induces peroxisomal proliferation. Under these conditions, Gpx1 is located in the peroxisomes, as well as catalase A (Cta1). Ahp1 has the AHL motif at its C-terminal end that resembles the PTS1 sequence involved in targeting proteins to peroxisomes.

In this work, the analysis and characterization of phenotypes of mutant strains for proteins supposedly involved in the defense of oxidants generated by peroxisomes, with emphasis on the  $\Delta$ *ahp1* mutant, was carried out. Our results indicated that Ahp1 plays a relevant role in response to oxidative insults promoted by exogenously added organic or inorganic peroxides, under different metabolic conditions. Furthermore, we showed that Ahp1 presents cytosolic localization under all the metabolic conditions analyzed.

We also showed that in the absence of Tsa1, Ahp1 acts as a possible compensatory mechanism, with a significant increase in its protein levels. In addition, we showed that strains that had an increased Ahp1 protein levels, such as the  $\Delta$ *tsa1* strain, had greater resistance to exogenous added peroxides derived from fatty acids.

Finally, we revisited the catalytic cycle of Ahp1, performing in biochemical and kinetic analyses, though which we confirmed the roles of Cys31 as a resolution cysteine and Cys62 as a peroxidase cysteine. In these analyses, we observed that the presence of a His-tag at the N-terminal end of thioredoxin 1 (Trx1) interferes with its affinity with Ahp1. We also performed analyzes of the structures available in databases, which indicated that Ahp1 undergoes conformational changes throughout its catalytic cycle that resemble the FF (“fully fold”) and LU (“locally unfolded”) states, very similar to typical 2-Cys Prxs (Prx1/AhpC subfamily) and which are involved in the formation and reduction of intermolecular disulfide bonds.

# INTRODUÇÃO

---

## I. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*

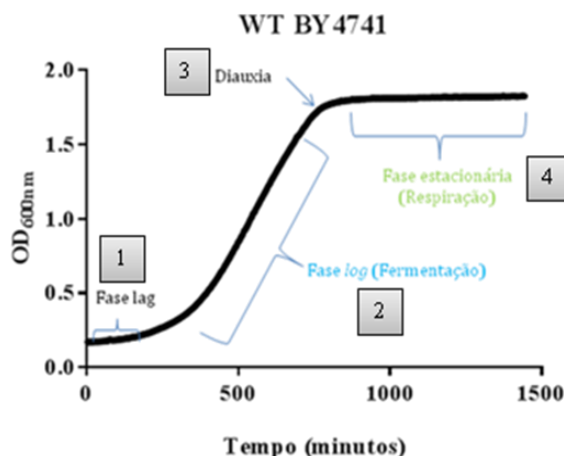
*Saccharomyces cerevisiae* é um eucarioto unicelular com ciclo de vida curto e possui organização celular que se assemelha ao de eucariotos mais complexos. Apresenta alta taxa de recombinação homóloga, o que lhe confere facilidade para sofrer modificação gênica a partir de um DNA (Ácido desoxirribonucleico) recombinante, além de ser facilmente cultivada em meios de cultura distintos (SHERMAN, 2002; CASTRILLO; OLIVER, 2004). Tem estabilidade entre seus estados haploides e diploides, o que possibilita a análise de fenótipos de mutantes com deleção total ou parcial de genes e estudos de complementariedade (SHERMAN, 2002). Seu genoma foi totalmente sequenciado, com cerca de seis mil genes anotados (GOFFEAU et al., 1996). Atualmente, coleções de mutantes por deleção estão comercialmente disponíveis, fazendo com que essas leveduras possam ser utilizadas nas mais diversas áreas, bem como em estudos a respeito da biologia humana (CASTRILLO; OLIVER, 2004). Devido a essas características vários avanços para a compreensão de defesas antioxidantes já foram alcançados com a utilização desse organismo como modelo.

Embora essa levedura seja facilmente cultivada em meios de cultura distintos, seu metabolismo é preferencialmente fermentativo, especialmente, utilizando a glicose como fonte de carbono (HÖRTNER et al., 1982; GALDIERI et al., 2010; OLIVARES-MARIN et al., 2018). Quando em meios ricos com glicose, apresenta uma curva de crescimento característica e bem definida, que apresenta quatro fases, como mostra a figura 1: A fase *Lag* (1) é o estágio de aclimatação das células ao ambiente, aqui as células aumentam de tamanho, mas ainda não se proliferam. Na segunda fase, chamada de Fase *log* (2), as células apresentam metabolismo fermentativo, catabolizando glicose pela via da Glicólise, e gerando ATP's (Adenosina trifosfato); as células têm sua duplicação em escala exponencial logarítmica, resultando em alta proliferação celular. A terceira fase, diauxia (3), ocorre quando a glicose se torna escassa, acarretando em uma diminuição da velocidade de proliferação celular e levando a uma mudança no metabolismo da levedura, de fermentativo para respiração aeróbica, via fosforilação oxidativa. Essa diminuição da divisão celular, culmina na fase estacionária (4), em que a população de células se mantém

constante. Aqui, o ciclo celular tem sua fase  $G_1$  prolongada e a proliferação cessa. Na fase estacionária, as células estão estressadas pela falta de nutrientes e acúmulo de metabólitos tóxicos, principalmente, pelo metabolismo oxidativo. Contudo, a proliferação pode ser retomada, com a adição de glicose ao meio de cultura (Fig. 1) (NEWCOMB et. al., 2003; GALDIERI et. al., 2010; OLIVARES-MARIN et. al., 2018).

Embora a fase de diauxia (Fig. 1, passo 3) seja caracterizada por uma mudança do metabolismo fermentativo para o respiratório, alguns autores sugerem que a levedura *S. cerevisiae* apresenta um metabolismo misto (respiratório/fermentativo), que resulta na produção de etanol, assim que a concentração externa de glicose atinge 0,8 mM, ou seja, controlando a fermentação e respiração, principalmente, pelos níveis de açúcar (OTTERSTEDT et al., 2004).

Durante a fase estacionária (Fig. 1, passo 4), quando a glicose se extingue, a proliferação cessa, a parede celular é espessa, há mais abundância de mitocôndrias e seu material genético está condensado, mas de maneira distinta de como ocorre na metáfase. Essa compactação da cromatina requer a ação de Histonas (GALDIERI et. al., 2010), há aumento em seus estoques de glicogênio, trealose, triacilgliceróis, e provavelmente, polifosfatos, além de induzirem autofagia (NODA; OHSUMI, 1998; NEWCOMB et. al., 2003; GALDIERI et. al., 2010). Há também um aumento da biogênese e proliferação peroxissomal (RAJVANSHI; ARYA; RAJASEKHARAN, 2017). Devido a isso, as mudanças intracelulares nessa fase se assemelham às mudanças de células submetidas a estresse, como por exemplo, indução de genes de proteínas de choque térmico (*heat-shock genes*).



**Figura 1: Modelo de curva de crescimento da levedura selvagem de BY4741 em meio rico contendo glicose.** A curva de crescimento mostra as adaptações metabólicas utilizadas pela levedura em meio rico líquido contendo glicose. Inicia-se com a (1) Fase lag, fase de aclimação das células; depois, Fase log (2), fase de crescimento exponencial em escala logarítmica; (3) Diauxia; e a fase estacionária (4).

Em fases pós-diauxia e estacionária de leveduras crescidas em glicose ocorre uma queda nos níveis de fonte de carbono e de nutrientes. Nesse contexto, a homeostase energética celular parece ser mantida pela ação dos fatores de transcrição Msn2p/Msn4 (*Multicopy suppressor of SNF1 mutation proteins 2 and 4*), que estão relacionados com a regulação positiva de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos, que são ativados em resposta a baixa oferta de glicose. Por outro lado, a via cAMP (*Cyclic adenosine monophosphate*) dependente de PKA (Proteína Kinase A) (cAMP-PKA), é ativada em resposta a níveis elevados de glicose (RAJVANSHI; ARYA; RAJASEKHARAN, 2017). Os fatores de transcrição Msn2p/Msn4 são regulados negativamente pela via cAMP-PKA. Eles também regulam positivamente a expressão de mais de 90% dos genes relacionados com vários tipos de estresse, como: térmico, osmótico, por privação de Carbono e estresse oxidativo (D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007; LEE et. al., 2008; PETKOVA et. al., 2010; RAJVANSHI; ARYA; RAJASEKHARAN, 2017). Além de já terem sido relacionados com a via TOR (*Targeting of Rapamycin*) (RAJVANSHI; ARYA; RAJASEKHARAN, 2017). Essas leveduras quando cultivadas em meio com glicose, apresentam uma redução nos níveis de várias proteínas. Algumas destas são degradadas, e outras enzimas que são importantes para o metabolismo de outras fontes de carbono, como o Etanol/glicerol por exemplo, tem sua expressão gênica reprimida por glicose. Esse fenômeno é conhecido como repressão catabólica (JOHNSTON; CARLSON, 1992; GANCEDO, 1998).

Várias vias de metabolismo de outras fontes de carbono são reprimidas na presença de glicose, como por exemplo, proteínas peroxissomais. No caso destas, a indução é dependente de Adr1 (*Alcohol Dehydrogenase II synthesis Regulator - YDR216W*) e do complexo SNF1p (*Sucrose NonFermenting - YDR477W*) (SIMON et. al., 1992; GANCEDO, 1998; FILIPITS et. al., 1993; GALDIERI et. al., 2010; RAJVANSHI; ARYA; RAJASEKHARAN, 2017). O complexo Snf1 é formado por uma subunidade reguladora, três subunidades adicionais e por SNF1, que é a subunidade catalítica (GALDIERI et. al., 2010). SNF1p é uma serina/treonina quinase ativada em condições de limitação de glicose, que promove a desrepressão de genes reprimidos por glicose (RAJVANSHI; ARYA; RAJASEKHARAN, 2017).

Outras fontes de Carbono, como Etanol/glicerol, não induzem repressão catabólica e podem induzir a ação de fatores de transcrição (OTTERSTEDT et al., 2004). Neste caso, Adr1 é requerido para crescimento em meios contendo glicerol, pois a utilização deste depende dos genes GUT1,

que codifica uma proteína glicerol quinase; e GUT2, que codifica uma e *sn*-glicerol 3-fosfato desidrogenase. A indução de GUT1 é fortemente diminuída em mutantes nulos *Adr1*, porém essa mutação não mostrou efeitos sobre GUT2, embora esse gene tenha uma sequência que poderia favorecer a ligação de *Adr1*. Estes dois genes estão envolvidos no metabolismo do glicerol (GANCEDO, 1998).

O glicerol está envolvido no metabolismo das leveduras por vias distintas: 1) ele pode ser utilizado como fonte de carbono em condições aeróbicas; ou, 2) pode ser um subproduto quando a glicose, e outros açúcares fermentáveis, são convertidos em etanol. A via de metabolismo do glicerol se dá pela sua fosforilação por uma proteína glicerol quinase, seguida pela oxidação do glicerol-3-fosfato, que é catalisada por uma enzima mitocondrial FAD-dependente (Flavina Adenina Dinucleotídeo), a Glicerol 3-fosfato Desidrogenase (mtGPD), liberando um FADH<sub>2</sub> e formando o Fosfato de di-hidroxiacetona (*Dihydroxyacetone phosphate*), que entra na via glicolítica (NEVOIGT; STAHL, 1997). Essa mtGPD se localiza na membrana interna das mitocôndrias e tem sua expressão gênica controlada pela repressão por glicose (GANCEDO; GANCEDO; SOLS, 1968; KLINGENBERG, 1970; NEVOIGT; STAHL, 1997). Assim, em meio Etanol/glicerol, há um aumento de atividade mitocondrial.

Ácidos graxos também podem ser utilizados como uma fonte alternativa de Carbono e atuam positivamente sobre determinados fatores de transcrição, que ativam proteínas importantes para o seu metabolismo. Evidências mostram que os fatores de transcrição *Oaf1* (*Oleate-Activated transcription Factor* - YAL051W) e *Pip2* (*Oaf2*) (*Peroxisome Induction Pathway* - YOR363C), são ativados por ácidos graxos, e estão envolvidos na indução de biogênese de peroxissomos e transcrição de enzimas para a via de  $\beta$ -oxidação. Ambos tem sua transcrição reprimida por glicose (ROTTENSTEINER et al., 1996; GANCEDO, 1998; FARCASANU et al., 1999; GURVITZ; ROTTENSTEINER, 2006; PLETT; CHARON; LINKA, 2020; JOSHI, 2021).

## II. Processos Redox e Estresse Oxidativo

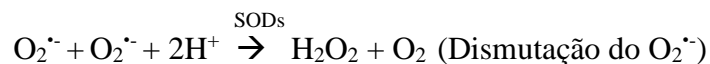
As funções celulares dependem crucialmente de processos e reações bioquímicas específicas que ocorrem de maneira sincronizada dentro das células. Várias dessas reações em vias de sinalização dependem da transferência de elétrons de um átomo para outro, ou seja, processos de óxido-redução. Essas reações podem causar alterações locais ou sistêmicas na homeostase redox



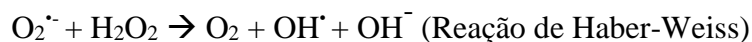
pela atividade de um pro-oxidante (ou antioxidante), que podem levar a um estresse redox, desencadeando diversas respostas celulares, desde modulações sutis na sinalização celular até danos oxidativos graves, tanto em organelas como no DNA. A ação desses oxidantes, se serão moléculas sinalizadores ou danosas as células, depende de inúmeros fatores, como: espécie química, concentração, localização, cinética de produção e eliminação (revisado por D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007; FRANSEN; LISMONT, 2018).

Vários locais nas células produzem oxidantes, tanto espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*), quanto espécies reativas de Nitrogênio (RNS – *Reactive Nitrogen Species*), naturalmente devido ao metabolismo celular, (revisado por SCHRADER; FAHIMI, 2006; D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007; HERRERO et al., 2008; FRANSEN; LISMONT, 2018). Peroxissomos, por exemplo, contém oxidases peroxissomais dependentes de flavina, que produzem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como parte normal da sua atividade catalítica. Além disso, peroxissomos abrigam Xantina oxidase e Óxido Nítrico Sintetase (NOS2) que são fontes de radical ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e óxido nítrico (NO<sup>•</sup>), respectivamente (HERRERO et al., 2008; FRANSEN; LISMONT, 2018). Em condições fisiológicas, a principal fonte de ROS intracelular provém do extravasamento de elétrons (e<sup>-</sup>) da cadeia de transporte de e<sup>-</sup>, que ocorre nas mitocôndrias (HERRERO et al., 2008).

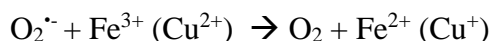
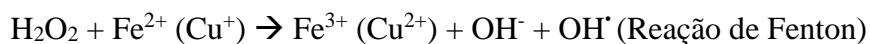
O termo ROS compreende uma variedade de moléculas derivadas do oxigênio molecular (O<sub>2</sub>), enquanto os radicais livres são espécies com um ou mais elétrons desemparelhados (SCHRADER; FAHIMI, 2006; D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007; HERRERO et al., 2008). O oxigênio molecular, mesmo que contenha dois elétrons desemparelhados em sua camada externa, sendo um bi-radical, não é muito reativo. Quando ocorre a excitação de um desses e<sup>-</sup> desemparelhados, o seu *spin* muda, e a espécie resultante é o oxigênio singlete, que é muito reativo, apesar de não ser um radical livre. Por outro lado, quando o oxigênio molecular é reduzido em um e<sup>-</sup>, produz o O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, que é relativamente estável e é um radical livre. Este, no entanto, é precursor da maioria das formas de ROS e é um mediador de reações oxidativas (HERRERO et al., 2008). Esse O<sub>2</sub><sup>•-</sup> pode ser dismutado de maneira espontânea ou ser catalisado pelas enzimas superóxido dismutases (SODs) e gerar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e este pode reagir rapidamente com várias peroxidases e ser reduzido a água (SCHRADER; FAHIMI, 2006; HERRERO et al., 2008):



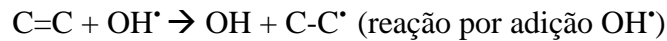
Por outro lado, o  $O_2^{\cdot-}$  pode reagir com  $H_2O_2$ , numa reação catalisada por metais e gerar o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), que é um potente oxidante e tem reatividade indiscriminada. O  $\cdot OH$  pode causar peroxidação lipídica, danos na membrana peroxissomal e perda de função dos peroxissomos (SCHRADER; FAHIMI, 2006; D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007; HERRERO et al., 2008):



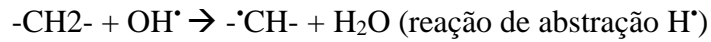
A reação de Haber-Weiss pode ser decomposta em duas reações. Em uma delas, o  $H_2O_2$  reage com íons de metais de transição reduzidos, como o Ferro ( $Fe^{+2}$ ) ou Cobre ( $Cu^{+}$ ), gerando  $\cdot OH$ , essa reação é chamada de reação de Fenton (SCHRADER; FAHIMI, 2006; HERRERO et al., 2008). Na outra reação, o  $O_2^{\cdot-}$  reduz metais de transição oxidados, como o Ferro ( $Fe^{+3}$ ) ou Cobre ( $Cu^{+2}$ ), gerando o oxigênio molecular. A soma dessas duas reações é a reação de Haber-Weiss, na qual os metais de transição ciclam da forma reduzida para oxidada.



A reação de Fenton pode ser um fator inicial de peroxidação lipídica via formação de  $OH^{\cdot}$  (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). A peroxidação lipídica é descrita como a deterioração oxidativa de lipídios (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Peróxidos derivados de ácidos graxos, são formados durante o ataque de radicais livres a grupos metileno das cadeias carbônicas  $-CH_2-$  destas moléculas, principalmente quando esse grupo  $-CH_2-$  estão próximos de Carbonos insaturados e configuram uma fonte importante de danos a membranas (EVANS et al., 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Logo, quanto mais insaturações esse ácido graxo apresentar, maior a probabilidade dele ser atacado por esses radicais e gerar produtos tóxicos, como o radical Carbono ( $C^{\cdot}$ ), por exemplo, como mostram as vias abaixo. Por outro lado, os peróxidos de lipídios podem reagir com  $Fe^{2+}$  de maneira similar ao  $H_2O_2$  (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).



OU



Esses radicais livres centrados no Carbono, em condições aeróbicas, podem reagir com o  $\text{O}_2$ , que pode estar concentrado dentro das membranas, e levar a formação do radical peroxila ( $\text{ROO}^{\bullet}$  ou  $\text{RO}^{\bullet}_2$ ). Esse  $\text{ROO}^{\bullet}$  pode reagir com  $\text{H}^{\bullet}$  de um lipídeo por meio de uma reação de abstração de  $\text{H}^{\bullet}$ , e formar o hidroperóxido de lipídeo, ou peróxido de lipídeo, ( $\text{COOH}$ ). Esse  $\text{COOH}$ , por sua vez, pode resultar num radical peroxil, e atacar outra dupla ligação no mesmo resíduo de ácido graxo. A reação de abstração de  $\text{H}^{\bullet}$  pode ocorrer em diferentes pontos da cadeia de carbono (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).



Em condições em que há pouco  $\text{O}_2$ , esse radical centrado no Carbono, pode reagir com ele mesmo ou com outros componentes celulares, como os grupos  $-\text{SH}$  nas proteínas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Ainda assim, enzimas removedoras de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou agentes quelantes que se ligam a íons de Ferro (reação de Fenton), podem evitar a reação destes radicais, resultando numa inibição da peroxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Para combaterem todos esses desafios redox, as células desenvolveram defesas antioxidantes, tanto enzimáticas (catalases, superóxidos dismutases, glutarredoxinas (Grx), tiorredoxinas (Trx) e peroxirredoxinas (Prx)), como não-enzimáticas (glutationas redutases (GSH), ácido ascórbico, ácido lipóico e  $\alpha$ -tocoferol) (D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007; MONTEIRO et. al., 2007; FRANSEN; LISMONT, 2018). Contudo, um desbalanço na homeostase redox, quer seja mais oxidativo, quer seja mais redutivo, podem levar a morte celular (FRANSEN; LISMONT, 2018). Além disso, o estresse redox ou oxidativo, pode ser causado por pró-oxidantes exógenos.

### III. Peroxissomos

A nomenclatura ‘peroxissomo’ foi definida em 1966 (DE DUVE; BAUDHUIN, 1966), baseada na sua função bioquímica: possuem pelo menos uma enzima que produz  $H_2O_2$ , as Oxidases (Fig. 2 A, 1) e uma que o decompõe, as Catalases (Fig. A, 2). As Catalases podem reduzir o  $H_2O_2$  a  $H_2O$ , por dois mecanismos distintos: I) peroxidásico, que requer um doador de  $e^-$ ,  $R'H_2$  (Fig. 2 A, I), ou II) catalásico, no qual uma segunda molécula de  $H_2O_2$  serve como doadora de  $e^-$  (Fig. 2 A, II) (DE DUVE; BAUDHUIN, 1966; LAZAROW; KUNAU, 1997; SCHRADER; FAHIMI, 2006). Contudo, a presença das oxidases faz dos peroxissomos, fontes de oxidantes intracelulares (SCHRADER; FAHIMI, 2006).

Os peroxissomos são organelas ubíquas, delimitadas por uma membrana, com uma matriz rica em proteínas, tem diâmetro de aproximado de 0,1-0,2 $\mu$ m. São organelas muito frágeis e podem ser facilmente danificadas durante o fracionamento celular (LAZAROW; KUNAU, 1997; REGLINSKI et. al., 2020; FERREIRA; CARVALHO, 2021; CARMICHAEL; SCHRADER, 2022). Estão envolvidos em inúmeros processos metabólicos, principalmente,  $\alpha$  e  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, biossíntese de plasmogênios, oxidação de aminoácidos e síntese de precursores do colesterol (BAUDHUIN; BEAUFAY; DE DUVE; BAUDHUIN, 1966; NOVIKOFF; NOVIKOFF, 1972; LAZAROW; KUNAU, 1997; SCHRADER; FAHIMI, 2006; GURVITZ; ROTTENSTEINER, 2006; VELDHOVEN, 2010; FUJIKI, 2016; PRINZ; JOSHI et. al. 2018; OKUMOTO et al., 2020; PRINZ; TOULMAY; BALLA, 2020; REGLINSKI et al., 2020; JOSHI, 2021). Em plantas e fungos, os peroxissomos também são responsáveis pelo ciclo do glioxilato (LAZAROW; KUNAU, 1997; PLETT; CHARON; LINKA, 2020; JOSHI, 2021).

Essas organelas são estruturas celulares dinâmicas e podem interagir com outras organelas para fim de troca de metabólitos, sinalização e proliferação/divisão. Assim também a utilização de subprodutos de uma organela, podem servir como precursores em outras. Análises da relação entre retículo endoplasmático (RE) e peroxissomo mostraram que, durante a proliferação peroxissomal, o RE é uma fonte de membrana, lipídeos e proteínas para divisão e crescimento de peroxissomos preexistentes (BAUDHUIN; BEAUFAY; DUVE, 1965; NOVIKOFF; NOVIKOFF, 1972; PRINZ; TOULMAY; BALLA, 2020; JOSHI, 2021).

Durante a biogênese peroxissomal essas organelas podem alterar seu número, tamanho (de 0,1-0,2 $\mu$ m para 0,5 $\mu$ m) e abundância, e assim, todas as vias metabólicas necessárias são alteradas

para proliferação peroxissomal (LAZAROW; KUNAU, 1997; REGLINSKI et al., 2020; JOSHI, 2021). A indução de biogênese peroxissomal em *S. cerevisiae* é estimulada pela adição de ácidos graxos ao meio de cultura. Em organismos como *Pichia pastoris* e *Yarrowia lipolytica*, quando cultivados em meios de cultura contendo ácido oleico, proliferação peroxissomal também é favorecida (LAZAROW; KUNAU, 1997; JOSHI, 2021).

Os promotores de alguns genes de *S. cerevisiae* têm motivos específicos que são responsivos a exposição à ácidos graxos. Por exemplo, os promotores de genes de Catalase A peroxissomal (Cta1) e a Oxoacil Tiolase Peroxissomal (POT1/FOX3), apresentam uma sequência de nucleotídeos específica em resposta ao ácido oleico, CGGNNNTNA (onde N pode ser qualquer outro nucleotídeo) (FILIPITS et. al., 1993; LUSHCHAK; GOSPODARYOV, 2005) e ambos são reprimidos por glicose (SIMON et. al., 1995). Além de que, o gene para a enzima Cta1 apresenta elementos de ativação por Adr1 e tem sua transcrição controlada por Snf1, proteínas envolvidas em desrepressão de genes reprimidos por glicose (FILIPITS et. al., 1993).

Peroxisomos tem uma biogênese única que os diferem das demais organelas, que consiste em: 1) fornecimento de lipídeos e proteínas de membrana peroxissomal pelo RE, formando uma vesícula precursora peroxissomal; e, 2) fornecimento de proteínas de matriz pelo citosol, importadas através do sistema de importação de proteínas peroxissomais (VAN DER ZAND et al., 2012; CARMICHAEL; SCHRADER, 2022; PRINZ; TOULMAY; BALLA, 2020; JOSHI, 2021). O processo de importação de proteínas para o peroxissomo é crucial para bom funcionamento dos peroxissomos e para o metabolismo geral da célula (LAZAROW; KUNAU, 1997). Estudos de proteômica, estimam que peroxissomos humanos contém cerca de 90 proteínas, e cerca de 80% dessas proteínas são de matriz organelar e todas são importadas, bem como proteínas importantes de membrana peroxissomal (VELDHOVEN, 2010).

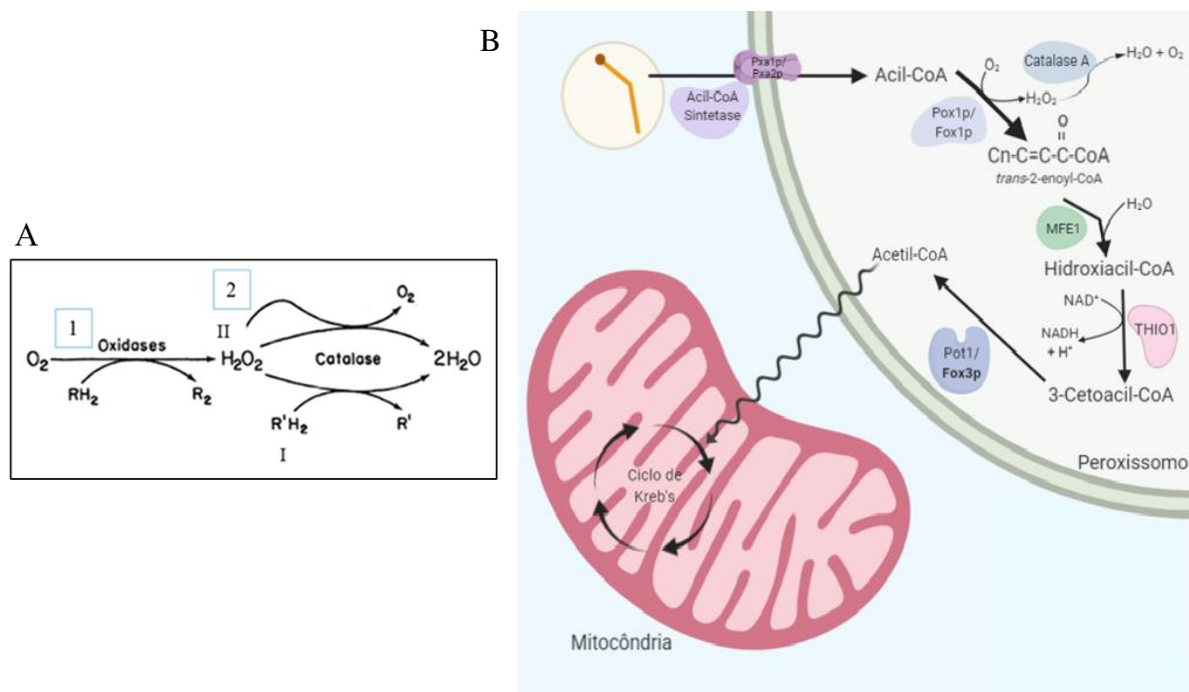
Esse processo de importação proteica é extremamente importante, pois quando tal importação é deficiente ou inexistente, resultam em peroxissomos defeituosos ou disfuncionais. Assim, qualquer desordem nesses peroxissomos culminaria em sérios problemas para as células, quer sejam de levedura ou de mamíferos. Em humanos, as desordens na biogênese peroxissomal (em inglês: *Peroxisome biogenesis disorders - PBDs*) ou na importação de enzimas peroxissomais acarretam em síndromes e doenças graves e são conhecidas como Doenças do Espectro de Zellweger (em inglês: *Zellweger spectrum disorder - ZSD*) (REGLINSKI et al., 2020;

OKUMOTO et al., 2020). Contudo, deficiências de proteínas associadas aos peroxissomos em células humanas, também podem causar distúrbios peroxissomais graves, como, por exemplo: adrenoleucodistrofia (ALD), uma doença genética metabólica, hereditária, recessiva e rara, com caráter degenerativo. Nesta doença os órgãos afetados são as glândulas adrenais e suprarrenais, podendo afetar também o sistema nervoso central e levar a destruição das bainhas de mielina. É causada por uma deficiência, ou não produção, da proteína ALDP (*Adrenoleukodystrophy protein*), que transfere ácidos graxos de cadeia muito longa (AGCML) para dentro dos peroxissomos. Quando não importados para serem metabolizados nos peroxissomos, os AGCML ficam armazenados no citosol, causando citotoxicidade celular.

Outras doenças genéticas que estão associadas a defeitos nos peroxissomos são a doença de Refsum e a acatalasemia (ausência das Catalases) (SHIMOZAWA et al., 1992; FUJIKI, 2016; LIPÍŃSKI et al., 2019; HE et al., 2021). Até o ano de 2021, 14 genes de peroxinas (genes PEX) foram relacionados com as ZSD (HE et al., 2021), sendo a mutação no gene PEX1 a mais comum, frequente em 58% dos casos, seguido pelo gene PEX 6 (16%) e PEX 12 (9%) (MA; AGRAWAL; SUBRAMANI, 2011; HE et. al., 2021).

Em células de mamíferos, a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos ocorre tanto nas mitocôndrias como em peroxissomos, por meio de reações similares, mas com enzimas diferentes e por substratos diferentes. Em plantas e fungos, todo processo de  $\beta$ -oxidação ocorre exclusivamente nos peroxissomos (LAZAROW; KUNAU, 1997; revisado por HILTUNEN et. al., 2003; LIAN; ZHAO, 2014; REGLINSKI et al., 2020; PRINZ; TOULMAY; BALLA, 2020; OKUMOTO et al., 2020). Em leveduras, a via de  $\beta$ -oxidação é a responsável pelo metabolismo dos ácidos graxos, independentemente do tamanho da sua cadeia (LAZAROW; KUNAU, 1997; HILTUNEN et. al., 2003; LIAN; ZHAO, 2014; PRINZ; TOULMAY; BALLA, 2020). Resumidamente: essa via tem início a partir da ativação do ácido graxo pela Acetil-CoA sintetase que catalisa a adição de um grupo polar CoA ao ácido graxo, agora Acil-CoA. Este pode então, ser reconhecido pelos receptores Pxa1/Pxa2 (Fig. 2 B, passo 1). Ao passar pela membrana do peroxissomo, o Acil-CoA é oxidado a trans-2-enoyl-CoA pela oxidase Pox1p/Fox1p (Fig. 2 B, passo 2). Nesse processo ocorre a primeira quebra do ácido graxo por Pox1p/Fox1p que transfere os elétrons diretamente para o  $O_2$ , gerando  $H_2O_2$ . Esse  $H_2O_2$  gerado é decomposto por Cta1, resultando em  $H_2O$  e  $O_2$  (Fig. 2 B, passo 3). Após esse processo, a trans-2-enoyl-CoA é convertida a 3-cetoacil-CoA ((3R)-

hidroxi) pela enzima Mfe2p/Fox2p (Fig. 2 B, passo 4). Esse Cetoacil-CoA ((3R) -hidroxi), sofre então uma clivagem tiolítica pela enzima Pot1/Fox3, gerando, acetil-CoA (Fig. 2 B, passo 5). Então, o Acetil-CoA, é direcionado para as mitocôndrias, podendo entrar no Ciclo de Krebs (HILTUNEN et. al., 2003; OHDATE; INOUE, 2012; PRINZ; TOULMAY; BALLA, 2020) (Fig. B 2, passo 6).



**Figura 2: Resumo da via de  $\beta$ -Oxidação de ácidos graxos de cadeia longa nos Peroxissomos.** Em A, Oxidases reduzem o  $O_2$  a  $H_2O_2$ , pela oxidação de um substrato  $RH_2$  (1) Catalases (2), que podem reduzir o  $H_2O_2$  a  $H_2O$  por dois mecanismos: I) peroxidásico, o qual requer um doador de  $e^-$  ( $R'H_2$ ). Ou, II) mecanismo catalítico, em que uma segunda molécula de  $H_2O_2$  serve como doadora de  $e^-$ . Fonte: DE DUVE; BAUDHUIN, 1966 (adaptado). Em B, esquema simplificado da  $\beta$ -oxidação ácidos graxos em leveduras, onde ácidos graxos de cadeia longa ou curta, são metabolizados nos peroxissomos. Fonte: A autora.

A via de  $\beta$ -oxidação é uma fonte importante de  $H_2O_2$  nas células, e a detoxificação deste é importante para evitar que ocorra um acúmulo excessivo, que podem culminar em danos celulares, como ou até mesmo dano no DNA (revisado por SCHRADER; FAHIMI, 2006). Assim, as catalases são enzimas relevantes nesse contexto.

*S. cerevisiae* apresenta dois genes para catalases, *CTA1* e *CTT1* (Catalase T) (SKONECZNY; CHELSTOWSKA; RYTKA, 1988; HILTUNEN et al., 2003; HERRERO et al., 2008). A catalase peroxissomal (Cta1) tem sua expressão induzida por ácido oleico; porém, Ctt1

(citoplasmática) não tem sua expressão induzida pelo mesmo ácido graxo (LAZAROW; KUNAU, 1997), e está mais relacionada a um papel mais geral como antioxidante e tem sua expressão induzida por vários tipos de estresse, como calor, osmótico, provação e estresse oxidativo promovido  $H_2O_2$  (GRANT; PERRONE; DAWES, 1998). Cta1 parece ter papel importante como eliminador de  $H_2O_2$  em meios respiratórios (SKONECZNY; CHELSTOWSKA; RYTKA, 1988), como em Etanol (2%) ou Ácido Oleico (0,5%), nos quais há um aumento da atividade dessa proteína (83 *units*/mg e 568 *units*/mg de proteína, respectivamente) (SKONECZNY; CHELSTOWSKA; RYTKA, 1988), o que indica um aumento de atividade peroxissomal. Porém, Cta1 não parece ser uma proteína exclusivamente peroxissomal, já sendo localizada em mitocôndrias, principalmente, em meios respiratórios (Oleato 0,5%), atuando também como eliminador de  $H_2O_2$  gerado nas mitocôndrias (PETROVA et. al., 2004).

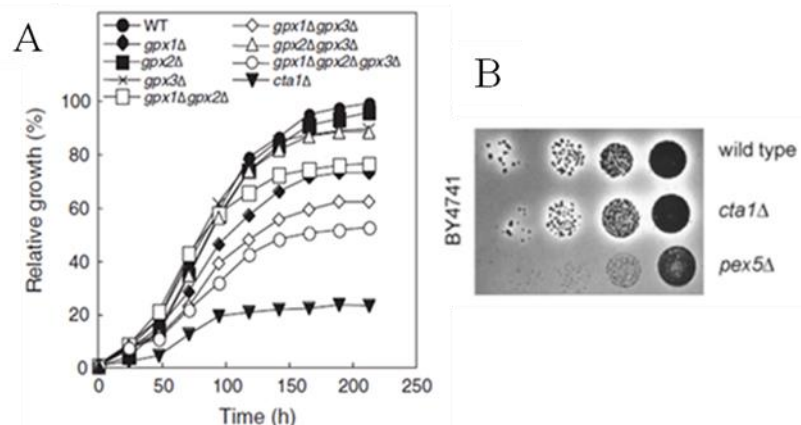
Em meio contendo ácido oleico como fonte de carbono, Cta1 parece ter papel relevante na detoxificação do  $H_2O_2$  gerado durante o processo de  $\beta$ -oxidação (Fig. 3 A) (HERRERO et al., 2008), embora, não participe diretamente da  $\beta$ -oxidação e sua ausência não acarrete perda de viabilidade (Fig. 3 B) (HILTUNEN, et al., 2003). Assim, outras enzimas podem atuar nesse passo de detoxificação.

Mais recentemente, foi demonstrado que uma Glutathione Peroxidase (Gpx1) é importante também na redução de  $H_2O_2$  gerado no peroxissomo (OHDATE; INOUE, 2012). Essas enzimas tem grande capacidade de decompor peróxidos e usam o sistema Glutathione para sua redução (INOUE et. al., 1999). *S. cerevisiae* apresenta três GPxs (INOUE et. al., 1999): Gpx1, que tem expressão induzida por meio com ácido oleico e apresenta localização na matriz peroxissomal e também em mitocôndrias, sendo regulada positivamente pelos fatores de transcrição Msn2/Msn4 (OHDATE; INOUE, 2012); Gpx2, que apresenta localização mitocondrial e foi relacionada a esporulação de *S. cerevisiae* (UKAI et. al., 2011); e, Gpx3 já foi localizada em núcleo, citosol e mitocôndria (KRITSILIGKOU et. al., 2017). Essas GPxs apresentam também uma atividade fosfolipídeo peroxidase, importante para proteção contra peroxidação lipídica (AVERY; AVERY, 2011).

Em leveduras cultivadas em meio contendo Oleato, a deleção das Gpx2 e Gpx3, não parece ser relevante. Mas, na linhagem com a deleção da Gpx1 ( $\Delta gpx1$ ), o crescimento das leveduras é afetado (OHDATE; INOUE, 2012) (Fig. 3 A).



Porém, vale ressaltar que, essas leveduras, quando crescidas em meio contendo oleato, já estão sob um estresse oxidativo endógeno, pois neste caso, o processo de  $\beta$ -oxidação é um gerador de  $H_2O_2$  no peroxissomo (Fig. 2 B).



**Figura 3: Resposta de leveduras BY4741 da deleção de Cta1 ou Gpx1 em meio contendo glicose ou ácido oleico.** Em A, Curva de crescimento de leveduras em meio com 2% de glicose até a  $A_{610nm}=1$ , depois transferidas para meio contendo ácido oleico (0,15%) (Ohdate e Inoue, 2012). Em B, Diluição seriada de leveduras crescidas em condições respiratórias induzidas por meio contendo ácido oleico como fonte de carbono. *Wild type*, leveduras selvagens; *cta1Δ*, leveduras nulas para o gene CTA1 (matriz peroxissomal); *pex5Δ*, leveduras nulas para o gene PEX5 (membrana peroxissomal), adaptado de Hiltunen et. al., 2003.

Leveduras quando crescidas em meios contendo ácidos graxos como fonte de Carbono, apresentam ao redor das colônias a formação de uma zona clara que circunda toda a colônia, o que indica que as leveduras estão metabolizando o ácido graxo do meio de cultura a partir da  $\beta$ -oxidação (Fig. 3 B) (HILTUNEN et. al., 2003). Quando esse processo está ausente ou deficiente, as colônias não apresentam a zona clara, como ocorre na linhagem nula para o gene da Peroxina 5 ( $\Delta pex5$ ), por exemplo, em que as leveduras não são capazes de metabolizar o ácido oleico pela ausência de atividade peroxissomal (Fig. 3 B) (HILTUNEN et. al., 2003). Assim, na ausência de Cta1, mesmo que as leveduras apresentem um crescimento mais lento do que as leveduras selvagens (Fig. 3 A), aparentemente são capazes de, em períodos mais prolongados recuperar o crescimento. Os ensaios de diluição seriada, em que o aparecimento de colônias demora dias para acontecer, mostram um fenótipo das linhagens selvagem e *Acta1* muito similar (Fig. 3 B) (HILTUNEN et. al., 2003). Além disso, uma zona clara aparece ao redor de colônias da linhagem *Acta1* (Fig. 3 B), indicando que o processo  $\beta$ -oxidação não foi prejudicado.

Isso indica que Cta1 não atua diretamente no processo de  $\beta$ -oxidação, mas indiretamente e que outras enzimas com capacidade de remoção de  $H_2O_2$  sejam requeridas para remover esse peróxido. Vale ressaltar que, o  $H_2O_2$  gerado nos peroxissomos, pode sair da organela e chegar ao citosol, onde pode ser detoxificado por outras enzimas antioxidantes, como as Gpxs e as Peroxirredoxinas (FRANSEN; LISMONT, 2018; COX; WINTERBOURN; HAMPTON, 2010).

#### IV. Peroxirredoxinas (Prxs)

A primeira Prx descrita, foi a de *S. cerevisiae*, onde os autores notaram que havia uma proteção da enzima Glutamina Sintetase contra oxidação, em um sistema que incluía tióis reduzidos para gerar  $H_2O_2$  (KIM et. al., 1988). As análises levaram a uma proteína de 25kDa, cujo efeito protetor só se detectava quando algum composto tiólico era utilizado como doador de elétrons, como o DTT por exemplo. Como essa proteína era dependente de tióis para manter a sua atividade protetora, ela foi denominada *Thiol-Specific Antioxidant* (Tsa1) (CHAE et. al., 1993; NETTO, et. al., 1996). Estudos simultâneos em *Salmonella typhimurium* identificaram uma proteína homóloga, conhecida como “*alkylhydroperoxide reductase*”, e era importante para conferir resistência ao estresse oxidativo (JACOBSON, et. al., 1989). Viu-se que muitas proteínas homólogas compartilhavam dessa atividade peroxidase, e o termo peroxirredoxina foi adotado desde então (CHAE, et. al., 1994; RHEE; CHAE; KIM, 2005; COX; WINTERBOURN; HAMPTON, 2010).

As Prxs formam uma família de peroxidases com atividade baseada em um resíduo de cisteína que são conservadas em procariotos e eucariotos. Essa família de enzimas ramifica-se em subclasses com sequências de aminoácidos bastante distintas entre si. Apesar dessas diferenças, essas enzimas possuem, em seu sítio catalítico, uma arginina (R) totalmente conservada que auxilia na estabilização do tiolato ( $RS^-$ ) (HALL et al., 2011) (Fig. 4). Além disso, apresentam o motivo Pxxx(T/S)xxC que contempla resíduos do sítio ativo (Fig. 4) (NELSON et al., 2011; TAIRUM et. al., 2012; POOLE; NELSON, 2016). Essas enzimas são capazes de detoxificar rapidamente  $H_2O_2$ , hidroperóxidos orgânicos (ROOH) e peroxinitrito ( $OONO^-$ ) (TACHIBANA et. al., 2009; NELSON et al., 2011; TAIRUM et. al., 2012). São reconhecidas, também, como sensores biológicos de peróxidos já que essas enzimas são muito abundantes e reativas (D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007; WINTERBOURN; HAMPTON, 2008; NETTO; ANTUNES, 2016).

*S. cerevisiae* apresenta cinco Prxs: Tsa1 (YML028W) e Tsa2 (YDR453C), que estão presentes no citosol (WONG et. al., 2002). Tsa1 é a peroxidase dependente de tiol mais abundante no citosol (91% do total de Prxs de levedura) (TACHIBANA et. al., 2009), enquanto Tsa2 é altamente induzível (PARK et al., 2000; MUNHOZ; NETTO, 2004). Dot5 (YIL010W), presente no núcleo (CHA et. al., 2003; PARK et al., 2000) e Prx1 (YBL064C) que apresenta localização mitocondrial (PEDRAJAS et. al., 2000; PARK et al., 2000). Além de Ahp1, proteína alvo desse estudo, que apresenta localização citosólica quando cultivada em meio contendo glicose. Sendo também a segunda Prx mais abundante em leveduras, 3,9% do total (LEE et. al., 1999a; PARK et al., 2000; TACHIBANA et. al., 2009).



**Figura 4: Alinhamento das cinco peroxirredoxinas presentes em *S. cerevisiae*.** Alinhamento das sequências de proteínas das cinco peroxirredoxinas presentes nas leveduras. O quadrado vermelho marca o motivo catalítico (Pxxx(T/S)xxC) comum às Prxs. O triângulo preto indica a cisteína peroxidásica e, o triângulo azul, a Serina/Treonina que compõem a tríade catalítica. O triângulo roxo, indica a arginina (R). Os círculos marcam as outras duas cisteínas presentes em Ahp1, a Cys31 (C<sub>R</sub>) (laranja) e a Cys120 (azul). O retângulo verde marca o motivo PTS1. Sequências obtidas a partir do *Saccharomyces* Genome Database (SGD ID): S00000160, S000004490, S000002861, S000004099 e S000001272, respectivamente. Alinhamento realizado no software Clustal Omega e para a visualização, Jalview. Os tons na cor roxa indicam o nível de identidade entre resíduos. Fonte: A autora.

Diferentemente de outras enzimas que decompõem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como as catalases, as Prxs não apresentam grupamentos prostéticos e utilizam um resíduo de Cisteína presente em seu sítio ativo

para a redução de peróxidos, chamada de Cisteína Peroxidásica ( $C_P$ ) (NETTO et. al., 1996). O mecanismo catalítico das Prxs se inicia com o ataque da  $C_P$ , que se encontra na forma desprotonada ( $C_P-S^-$ ), a um átomo de oxigênio do peróxido, por meio de uma clivagem heterolítica de uma ligação peróxido (O-O), que libera uma molécula de água (ou álcool correspondente), gerando um derivado de ácido sulfênico ( $C_P-SOH$ ) (revisado por NETTO et. al., 2007; LOWTHER; HAYNES, 2011). Em muitas Prxs (denominadas 2-Cys Prxs), uma segunda cisteína (Cisteína de Resolução -  $C_R$ ), ataca o  $C_P-SOH$ , formando uma ponte de dissulfeto e liberando uma molécula de água (HALL et. al., 2010; NELSON et al., 2011) (Fig. 5 A).

Outras Prxs, porém, não possuem a  $C_R$ , somente a  $C_P$ , estas Prxs monotiólicas, são chamadas de 1-Cys Prx. Nestas, a  $C_P-S^-$  reage diretamente com o peróxido e pode ser reduzida pelo sistema Tiorredoxina (Trx) ou por redutores de baixo peso molecular, como o ascorbato (MONTEIRO et al., 2007) e a glutathiona (GSH) (Fig. 5 A e D).

Para determinadas Prxs (pertencentes ao grupo Prx1/AhpC), está bem estabelecido que essas enzimas passam por uma alternância entre dois estados estruturais, para que ocorra a formação do dissulfeto (HALL et al., 2011; TAIRUM et. al., 2012). Quando a  $C_P$  está em seu estado reduzido, ou superoxidado, a Prx é estabilizada na conformação denominada “*Fully Folded*” (FF). O estado “*Locally Unfolded*” (LU), ocorre quando há o desenovelamento parcial da  $\alpha$ -hélice em que se encontra a  $C_P$ , permitindo a sua aproximação com a  $C_R$ . Se  $C_P$  estiver no estado sulfênico ( $C_P-SOH$ ) pode então ocorrer a formação do dissulfeto que mantém a Prx o tempo todo na forma LU. Esse dissulfeto pode ser reduzido pela Trx (Fig. 5), e o enovelamento da  $\alpha$ -hélice a qual está localizada a  $C_P$ , ocorre novamente (WOOD; POOLE; KARPLUS, 2003; TAIRUM et. al., 2012).

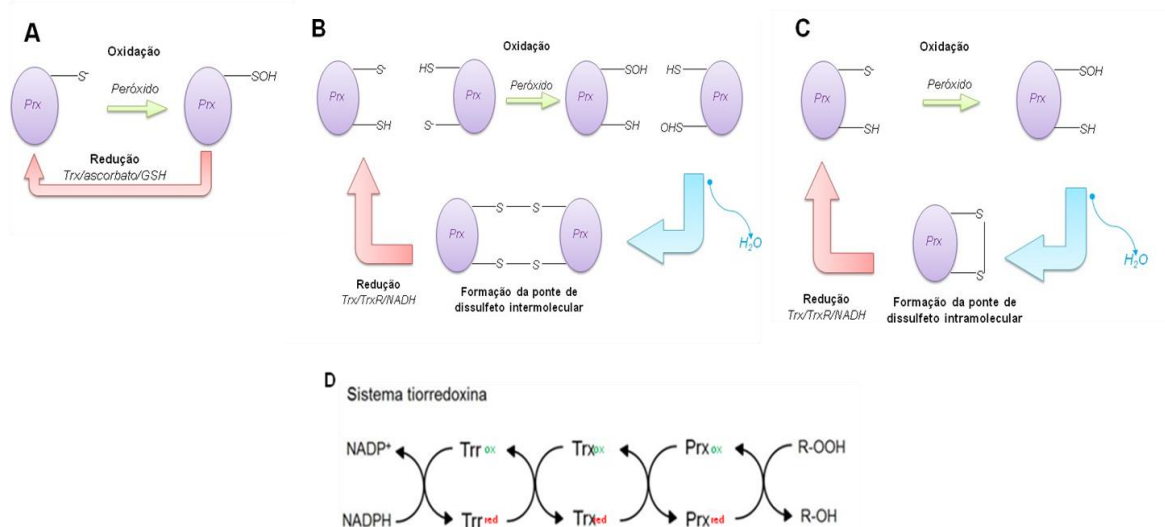
Dois tipos de dissulfetos podem ocorrer e essa característica pode ser utilizada para classificar as Prxs. As 2-Cys Prxs típicas apresentam uma ligação de dissulfeto intermolecular, em que cada Cys se localiza em um dos monômeros do dímero (Fig. 5 B). Por outro lado, as 2-Cys Prxs, nas quais as duas Cys se encontram na mesma cadeia polipeptídica e formam uma ponte de dissulfeto intramolecular, e são chamadas de 2-Cys Prx atípicas (RHEE; CHAE; KIM, 2005) (Fig. 5C). Ambas 2-Cys Prx, são frequentemente reduzidas pelo sistema Trx (NELSON et al., 2011).

As Trxs são tíioil-dissulfeto oxido-redutases de baixo peso molecular (12kDa) que reduzem pontes de dissulfeto, tanto em enzimas, como as Prxs, com em fatores de transcrição. Apresentam em seu sítio ativo duas Cys vicinais altamente conservadas, as quais são utilizadas para reduzir

seus alvos (VERDOUCQ et al., 1999; VIGNOLS et. al., 2005). Trxs estão amplamente distribuídas, porém o número de cópias presentes nos organismos é extremamente variável. Por exemplo, *Escherichia coli*, *S. cerevisiae* e mamíferos possuem um número limitado de Trx. Já em plantas, existem inúmeras isoformas. No genoma de *Arabidopsis*, por exemplo, mais de 40 isoformas foram identificadas (VIGNOLS et. al., 2005). As Trxs também estão envolvidas em inúmeros processos biológicos como: crescimento celular, ativação de transcrição de genes, síntese de DNA e manutenção da viabilidade celular, por meio de enzimas de reparo (DAY, et. al. 2012; ARNÉR et al., 2022). As Trxs ajudam na manutenção de atividade de inúmeras enzimas redutivas importantes como as ribonucleotídeo reductase (RNR), peroxirredoxinas, Metionina sulfóxido reductase e proteínas Tirosinas fosfatases. Em mamíferos, regulam a atividade de fatores de transcrição, de maneira direta ou indireta, como p21, p53, NFκB, HIF e Nrf2 e também estão envolvidas na ativação de fatores de transcrição relacionados com estresse oxidativo (KUGE; JONES, 1994; VERDOUCQ et al., 1999; BORONAT et al., 2017; ARNÉR et al., 2022).

Para redução das Prxs ou de algum substrato proteico, as Cisteínas da Trx reduzem o dissulfeto das Prx, e forma-se um dissulfeto misto entre a Prx e a Trx; que, são reduzidas pela Tiorredoxina reductase (Trr) (Fig. 5 D). Nesse processo, as Trr catalisam a redução das Trx por meio de uma molécula de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), pela via que segue: o FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo), transfere equivalentes redutores de NADPH para as Cys reativas das Trr, e destas para as Cisteínas oxidadas da Trx, as reduzindo (Fig. 5 D). Assim, o sistema Trx é composto por: NADPH, Trx e Trr (Fig. 5 D) (DAI et. al., 1996; ARNÉR et al., 2022).

As Prxs também podem ser divididas quanto a sua similaridade estrutural e sequência de aminoácidos, com implicações evolutivas (POOLE; NELSON, 2016), sendo divididas em seis subfamílias: **Prx1/AhpC**, encontradas em animais, plantas, fungos e bactérias. Inclui as Prxs: Tsa1, Tsa2 e Dot5, de levedura; **Prx6**, encontradas em animais, plantas, fungos e bactérias. Pertence a esta família a Prx1, única 1-Cys Prx encontrada em *S. cerevisiae*; **PrxQ**, encontradas em plantas, fungos e bactérias; **Tpx e AhpE**, encontradas quase exclusivamente em eubactérias; **Prx5**, encontradas em animais, plantas, fungos e bactérias. A esta subfamília está incluída a Ahp1 de levedura (HALL et. al., 2011).



**Figura 5: Representação esquemática do Mecanismo catalítico das Peroxirredoxinas.** Em **A**, mecanismo das 1-Cys Prx; **B**, 2-Cys Prx típicas; e, **C**, 2-Cys Prx atípicas. Em **D**, representação do sistema tiorredoxina, em que a fonte de redução é a molécula de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). As enzimas Tiorredoxina redutase (Trr) reduzidas pelo NADPH, catalisam a redução da Tiorredoxina (Trx). As Trxs têm como um de seus principais substratos, as Prxs. Estas, têm capacidade de reduzir vários peróxidos como o  $H_2O_2$ , por exemplo.

Além dessas cinco Prxs, leveduras apresentam três Gpxs, duas catalases e uma citocromo C peroxidases, todas capazes de reduzir peróxidos. Nosso foco nessa tese é compreender os papéis de Ahp1 dentro desse amplo repertório de enzimas antioxidantes.

## V. Alquil hidroperóxido redutase 1 (Ahp1)

A Ahp1 (YLR109W) foi inicialmente descrita como uma Prx com capacidade de reduzir mais eficientemente alquil-hidroperóxidos orgânicos, como o *tert*-butil hidroperóxido (tBHP) do que  $H_2O_2$  (LEE et al., 1999a; JEONG et. al., 1999; PARK et. al., 2000; GOEHRING; RIVERS; SPRAGUE, 2003; IWAI; NAGANUMA; KUGE, 2010; LIAN et. al., 2012).

Essa enzima é abundante em condições basais, cerca de 3,9% do total de peroxidases dependentes de tiol da levedura (TACHIBANA, et. al., 2009). Porém, Ahp1 tem sua expressão induzida por  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos em um processo mediado pelos fatores de transcrição Yap1 (*Yeast AP-1* - YML007W) e Skn7 (*Suppressor of Kre Null* - YHR206W) (LEE et. al., 1999 a,b). Estes fatores de transcrição também atuam sobre a indução de outras enzimas sob estresse oxidativo, como: Trx2 (Tiorredoxina 2 - YGR209C), Trr1 (Tiorredoxina redutase 1 - YDR353W)

(LEE et. al., 1999), Gsh1 ( $\gamma$ -glutamylcisteína sintetase - YJL101C) e Glr1 (glutathione redutase - YPL091W) (FERNANDES; RODRIGUES-POUSADA; STRUHL, 1997; LEE et. al., 1999b). Embora, YAP1 seja dependente de ativação por Trx2, isso mostrou ser importante para a resposta a estresse oxidativo por hidroperóxidos (KUGE; JONES, 1994).

Ahp1 também já foi descrita como um receptor de alquil-hidroperóxidos que ativa Cad1 (*Cadmium resistance* – YDR423C), um fator de transcrição da família Yap1 (IWAI; NAGANUMA; KUGE, 2010; LIAN et al., 2012). Dados não publicados do nosso grupo, mostraram que Ahp1 é capaz de reduzir peróxido de ácido linoleico, peróxido de ácido oleico e peróxido de cumeno, além de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (GENU, 2007). Essas evidências sugerem que Ahp1 teria a capacidade de remover hidroperóxidos de ácidos graxos *in vivo*.

Essa Prx de *S. cerevisiae* também já foi denominada como: YLR109 (VERDOUCQ et al., 1999) Type II thioredoxin peroxidase (Type II TPx) (JEONG et al., 1999); Thiol Specific Antioxidant II (TSAII); PMP20 (LEE et al., 1999a; JEONG et al., 1999; YAMASHITA et al., 1999); Cytoplasmic Thiol Peroxidase III (cTPxIII) (PARK et al., 2000). Em *Aspergillus fumigatus*, AspF3 é ortóloga a Ahp1 e está envolvida na virulência desse fungo, bem como na proteção contra estresse oxidativo (DIAZ-AREVALO et. al., 2011; HILLMANN et. al., 2016). Em *Toxoplasma gondii*, é denominada Ahp1 (WANG, et al., 2021). Em mamíferos, a proteína homóloga de Ahp1 de levedura é a Prdx5 (KNOOPS et. al., 1999). Já em *Candida boidinii*, sua homóloga é a PMP20 (*peroxisome-associated membrane protein 20*) (GARRARD; GOODMAN, 1989; HORIGUCHI et al., 2001). Os alinhamentos das sequências de aminoácidos entre Prdx5 e Ahp1 apresentam 67% de similaridade e 27% de identidade (YAMASHITA et al., 1999; KNOOPS et. al., 1999). Entre PMP20 de *C. boidinii* e Ahp1, 18,6% de identidade (HORIGUCHI et al., 2001).

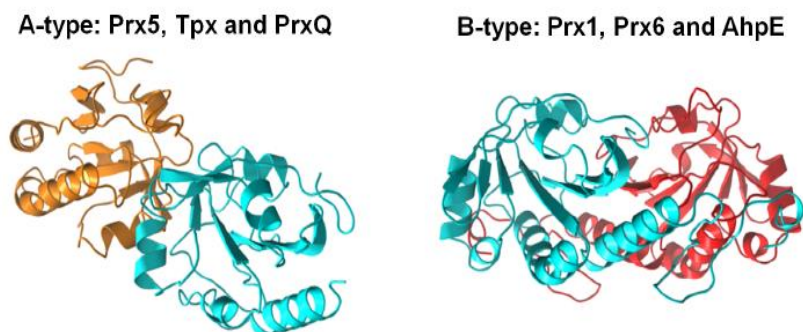
Ahp1 pertence a subfamília Prx5 e os membros desse grupo se apresentam preferencialmente como homodímeros (HALL et al., 2011). De fato, Ahp1 se apresenta como homodímero independente do seu estado redox (LIAN et al., 2012). A estrutura primária dessa enzima, apresenta, na porção C-terminal, uma sequência de três aminoácidos, AHL, comum em proteínas peroxissomais (LEE et. al., 1999a; KLEIN, et. al., 2002; LIAN et. al. 2012). Em sua estrutura quaternária, apresenta na interface dos dímeros, dois resíduos de fenilalanina (Phe58 e Phe95), importantes para a estabilização do homodímero, além dos resíduos de Cisteínas (LIAN et. al. 2012; ALLAN et. al. 2016; BRACHMANN et. al., 2020). Foi sugerido que essa interface



entre os monômeros poderia favorecer uma cooperação positiva na ligação com hidroperóxidos orgânicos (LIAN et al. 2012).

Ahp1 apresenta três cisteínas: Cys62; Cys31 e a Cys120 (Fig. 4), sendo que a Cisteína peroxidásica é a Cys62 (LEE et al., 1999a; JEONG et al., 1999; PARK et al., 2000; LIAN et al., 2012). Houve uma contradição na identificação da C<sub>R</sub> de Ahp1. Primeiramente, Jeong et. al. (1999), descreveram que a C<sub>R</sub> seria a Cys120. Estes autores utilizaram técnicas de digestão proteolítica e cromatografia líquida de alta resolução (HPLC/espectrometria de massas) e ensaios de oxidação de NADPH com as Cisteínas mutadas por uma Serina, para a detecção da C<sub>R</sub>. Anos mais tarde, um grupo chinês mostrou que Cys31 é a C<sub>R</sub> a partir da elucidação de estruturas cristalográficas de Ahp1 nos estados reduzido e oxidado. Porém, ambos descreveram que Ahp1 apresenta um mecanismo do tipo 2-Cys Prx típica ( JEONG et al., 1999; LIAN et al., 2012). Por fim, Alan et. al. (2016), ao utilizaram um *trapping cross-linker* para busca de parceiros de proteínas sensíveis a oxidantes mostraram que a C<sub>R</sub> de Ahp1 é de fato a Cys31 (ALLAN et. al., 2016).

Embora Ahp1 tenha sido classificada como 2-Cys Prx típica, a formação de seus dímeros se assemelha ao tipo A (HALL et. al., 2011), comum em proteínas da subfamília Prx5 (Fig. 7) e não forma decâmeros. De fato, as estruturas de Ahp1 (LIAN et. al. 2012) apresentam um dissulfeto intermolecular que se forma através da interface do dímero tipo A (Fig. 7). Assim, Lian et. al. (2012) sugerem que Ahp1 integre um novo grupo de 2-Cys Prxs típicas.



**Figura 7: Interface de dímeros das Prx.** Dímeros do tipo A (A-type), comum em 2-Cys atípicas e 1-Cys Prxs. Dímeros do tipo B (B-type), a esquerda, comum em 2-Cys típicas Prxs. Adaptado de Poole e Nelson, 2016.

Ahp1 foi descrita primeiramente, como sendo citosólica por estudos de localização por microscopia confocal. Nesses estudos, Ahp1 em fusão com a proteína GFP (*Green Flourescent*



*Protein*) na sua porção C-terminal, foi expressa em leveduras crescidas em meio rico contendo glicose (PARK et al., 2000). Cabe destacar que essa enzima apresenta um motivo composto por uma sequência de três aminoácidos em sua porção C-terminal, AHL (Fig. 4). Esse motivo é comum na porção C-terminal de proteínas peroxissomais, (S/C/A)(K/R/H)(L/M), chamado PTS1 (*Peroxisome Targeting Signal type 1*), que é reconhecido pela proteína receptora, Pex5, localizada na membrana peroxissomal (KLEIN, et al., 2002; SMITH, et al., 2002). Portanto, a fusão com GFP poderia interferir na localização sub-celular de Ahp1. Por outro lado, foi sugerido que em meios de crescimento que promovam biogênese peroxissomal (contendo oleato, por exemplo) que Ahp1 poderia estar localizada no peroxissomo (LEE et al. 1999a).

Também já foi descrito que Ahp1 estaria localizada em mitocôndrias, nesse caso por meio de fusão com GFP na porção N-terminal da enzima, em meio contendo oleato como fonte de Carbono (FARCASANU et al., 1999). Parece razoável supor nesse caso a localização peroxissomal de Ahp1, já que peroxissomos estão intimamente conectados com mitocôndrias. Porém, o RNAm (Ácido Ribonucleico mensageiro) de Ahp1 não aparece em transcriptoma de peroxissomo (SMITH, et al., 2002; YIFRACH, et al., 2022), mas é detectável em proteomas de mitocôndrias (BARTOLOMEO et al., 2020). Embora existam indícios na literatura de que Ahp1 de *S. cerevisiae* possa se localizar em peroxissomos, nenhuma evidência experimental foi apresentada.

Outro aspecto relevante é que Ahp1 sofre modificações pós traducionais como, S-glutathionilação (ALLAN, et al., 2016) e superoxidação (PROUZET-MAULÉON et al., 2002). Além disso, Ahp1 já foi relacionada com a proteção de *S. cerevisiae* contra toxicidade por íons metálicos e por peróxidos, na ausência de glutathiona (NGUYÊN-NHU; KNOOPS, 2022); e com a homeostase de Manganês ( $Mn^{2+}$ ) (FARCASANU et al., 1999). Há evidências também que, Ahp1 seja secretada entre a parede celular e membrana plasmática da levedura sob privação nutricional (CRUZ-GARCIA et al., 2020).

Dentre essas modificações, a qual mais tem recebido atenção é urmilação (GOEHRING; RIVERS; SPRAGUE, 2003a,b; VAN DER VEEN et al., 2011; JÜDES, et al. 2016; BRACHMANN, et al., 2020; RAVICHANDRAN, et al., 2022). A proteína Urm1 (*Ubiquitin related modifier 1*) é similar a Ubiquitina (*Ubiquitin-like*), sendo o único membro de uma sub-família de proteínas com Ubiquitin-fold (UbF), conservada de leveduras até humanos (KADUHR

et. al., 2021). A Urm1 tem dupla função: 1) Atua como um transportador de enxofre para tiação de anticodons de RNAt (RNA transportador); e 2) Modifica proteínas em uma conjugação semelhante a Ubiquitinação dirigida por Lisina, conhecida como Urmilação. Essa modificação coincide com estresse oxidativo e tem como alvo proteínas antioxidantes como Ahp1 em leveduras e Prx5 de mosca, porém ainda não está claro como o mecanismo molecular da urmilação ocorre e se é afetada pela ação dessas enzimas (KADUHR et. al., 2021).

O RNAm de *AHP1* apresenta dois motivos ARE nas posições 265 e 365 na região 3'-UTR (em inglês: *3' untranslated region* - 3' UTR) (CASTELLS-ROCCA, et. al., 2016). Os motivos ARE apresentam uma região rica em Adenosina (A) e Uracila (U) (CASTELLS-ROCCA, et. al., 2016; SAVINOV, et. al., 2021). Tais regiões são alvo de proteínas chamadas de proteínas marcadores de mRNA (*mRNA binding protein*) como, Cth1 e Cth2. Estas proteínas apresentam o motivo *zinc-finger* que estão envolvidos na ligação destas proteínas ao RNAm, induzindo sua degradação. Cth1 e Cth2 regulam, principalmente, mRNA relacionados ao metabolismo de Ferro (CASTELLS-ROCCA, et. al., 2016). Cth1 atua em fases iniciais de privação de Fe, enquanto Cth2 consegue atuar de forma mais constante ao longo do tempo. Os alvos principais de Cth1 são RNAs que codificam para proteínas envolvidas na respiração mitocondrial, enquanto Cth2 induz a degradação de RNAm que codificam proteínas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos, ciclo do ácido tricarboxílico e respiração (CASTELLS-ROCCA, et. al., 2016).

## OBJETIVOS GERAIS

---

O objetivo geral deste trabalho é a caracterização funcional de Ahp1 para a defesa antioxidante de leveduras de *S. cerevisiae* em condições metabólicas distintas. Procuramos explorar o papel de Ahp1 em condições de estresse oxidativo, causado por hidroperóxidos orgânicos sintéticos e peróxidos de ácidos graxos, bem como esclarecer sua localização celular.

## CONCLUSÕES

---

1. A ausência do gene *AHP1* torna as leveduras mais sensíveis a peróxidos orgânicos, como *t*BHP, bem como a peróxidos de ácidos graxos, como OLOOH e LAOOH, mas não a peróxidos inorgânicos como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes meios de crescimento com fontes de carbono distintas.
2. Em meio Oleato 0,1%, a ausência de Ahp1 leva a um crescimento lento, mesmo sem estresse oxidativo, quando comparada com a linhagem WT;
3. Em linhagens nulas para o gene *TSA1*, há aumento dos níveis proteicos de Ahp1, e isso confere um aumento da proteção destas linhagens contra estresse oxidativo exógeno promovido por hidroperóxidos orgânicos;
4. Ahp1 pode ser degradada em meio contendo glicose como fonte de carbono, sob estresse oxidativo, em fase estacionária, sendo que o aumento dos níveis proteicos dessa enzima ocorre na fase *log*;
5. Ahp1 está localizada no citosol em três situações metabólicas distintas;
6. A interação proteína- proteína entre Ahp1 e Trx1 ocorre de maneira muito fina e específica. Sendo que a presença de uma cauda de histidina na região N-terminal de Trx1, interfere na interação desta enzima com Ahp1;
7. Através de análises de estruturas cristalográficas de Ahp1, disponíveis em bancos de acessos públicos, mostramos que essa enzima também demonstra as alterações estruturais locais, bem como outras enzimas da família Prx1/AhpC;

## PERSPECTIVAS

---

1. Analisar a resistência de linhagens de levedura que superexpressam Ahp1 frente a peróxidos orgânicos;
2. Analisar a resistência da linhagem duplo mutante de levedura  $\Delta tsal\Delta ahp1$  frente a peróxidos orgânicos;
3. Analisar a relação entre o aumento da expressão dos níveis proteicos de Ahp1 com um possível aumento do processo de urmilação;
4. Caso essa relação exista, se isso confere maior proteção contra estresse oxidativo, bem como favorece o crescimento invasivo destas leveduras em meios sólidos;
5. Analisar por quais vias podem ocorrer a degradação de Ahp1, seja pelo proteassomo ou por autofagia, bem como, se isso ocorre para outros meios de crescimento como Etanol ou Oleato.

## Referências

- ALEGRIA, T.G.P. Caracterização cinética e busca de inibidores de Ohr (Organic Hydroperoxide Resistance protein) de *Xylella fastidiosa*. **Dissertação de mestrado**. Biologia (Genética). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- ALEGRIA, T.G.P. et. al. Ohr plays a central role in bacterial responses against fatty acid hydroperoxides and peroxyxynitrite. **PNAS**, v. 27, p. 132-141, 2017.
- ALIC, N.; HIGGINS, V. J.; DAWES, I. W. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Gene that is Required for G1 Arrest in Response to the Lipid Oxidation Product Linoleic Acid Hydroperoxide. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, p. 1801-1810, 2001.
- ALLAN, K. M. et. al. Trapping redox partnerships in oxidant-sensitive proteins with a small, thiol-reactive cross-linker. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 101, p. 356-366, 2016.
- ARNÉR, E. S. J. et. al. Thioredoxin and Glutathione reductases. [Chapter 10]. In: Redox Chemistry and Biology of Thiols. **Elsevier**. 723 páginas. 2022.
- AVERY, A. M.; AVERY, S. V. *Saccharomyces cerevisiae* Expresses Three Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 36, p. 33730–33735, 2001.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2014.
- BARTOLOMEO, F. Absolute yeast mitochondrial proteome quantification reveals trade-off between biosynthesis and energy generation during diauxic shift. **PNAS**, v. 11, n. 13, p. 7524–7535, 2020.
- BAUDHUIN, P.; BEAUFAY, H.; DUVE, C. Combined biochemical and morphological study of particulate fractions from Rat liver. **Journal of Cell Biology**, v. 26, p. 219-243, 1965.
- BORONAT, S. et. al. Lack of a peroxiredoxin suppresses the lethality of cells devoid of electron donors by channelling electrons to oxidized ribonucleotide reductase. **PLOS Genetics**, v. 13, n. 6, 2017.
- BRACHMANN, C. et al. Redox requirements for ubiquitin-like urmylation of Ahp1, a 2-Cys peroxiredoxin from yeast. **Redox Biology**, v. 30, p. 2213-2317, 2020
- CARMICHAEL, E.R; SCHRADER, M. Determinants of Peroxisome Membrane Dynamics [Review]. **Frontiers Physiology**, v. 13, 2022.
- CASTELLS-ROCA, L. et. al. Cth2 Protein Mediates Early Adaptation of Yeast Cells to Oxidative Stress Conditions. **PLOS One**, v. 11, n. 1, 2016.
- CASTRILLO, J. I.; OLIVER, S. G. Yeast as a touchstone in post-genomic research: strategies for integrative analysis in functional genomics. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 93–106, 2004.
- COX, A.G.; WINTERBOURN, C.C.; HAMPTON, M.B. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. **Biochemical Journal**, v. 425, p. 313-325, 2010

- CRUZ-GARCIA, D. et al. Reactive oxygen species triggers unconventional secretion of antioxidants and Acl1. **Journal of Cell Biology**, v. 219, n. 4, 2020.
- CHA, M. K. et al. Nuclear Thiol Peroxidase as a functional Alkyl-hydroperoxide Reductase necessary for stationary phase growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 27, p. 24636–24643, 2003.
- CHAE, H.Z. et. al. Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 22, p. 16815-16821, 1993.
- CHAE, H.Z. et. al. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. **PNAS**, v. 91, p. 7017-7021, 1994.
- DAI, S. et. al. Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* NADPH dependent Thioredoxin Reductase at 2.5 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 264, p. 1044-1057, 1996.
- DAY, A. et. al. Inactivation of a peroxiredoxin by hydrogen peroxide is critical for thioredoxin-mediated repair of oxidized proteins and cell survival. **Cell Press**, v. 45, p. 398-408, 2012.
- DE DUVE, C.; BAUDHUIN, P. Peroxisomes (Microbodies and Related Particles) [Review]. **American Physiological Society**, v. 46, n. 2, p. 323-357, 1966.
- DIAZ-AREVALO, D. et. al. CD4<sup>+</sup> T Cells mediate the protective effect of the recombinant Asp f3-based anti-aspergillosis vaccine. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 6, p. 2257–2266, 2011.
- D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis [Review]. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 813-824, 2007.
- EVANS, M. V. et. al. Toxicity of linoleic acid hydroperoxide to *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of a respiration-related process for maximal sensitivity and adaptive response. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 3, p. 483-490, 1998.
- FARCASANU, I. C. et. al. Involvement of Thioredoxin Peroxidase Type II (Ahp1p) of *Saccharomyces cerevisiae* in Mn<sup>2+</sup> Homeostasis. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, n. 11, p. 1871-1881, 1999.
- FERREIRA, J. V.; CARVALHO, P. Pex30-like proteins function as adaptors at distinct ER membrane contact sites. **Journal of Cell Biology**, v. 220, n. 10, p. 1-14, 2021.
- FERNANDES, L., RODRIGUES-POUSADA, C.; STRUHL, K. Yap, a novel family of eight bZIP Proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, n. 12, p. 6982-6993, 1997.
- FILIPITS, M. et. al. A *Saccharomyces cerevisiae* upstream activating sequence mediates induction of peroxisome proliferation by fatty acids. **Gene**, v. 132, p. 49-55, 1993.
- FRANSEN, M.; LISMONT, C. Redox Signaling from and to Peroxisomes: Progress, Challenges, and Prospects. **Antioxidants & Redox Signaling**, 2018.
- FUJIKI, Y. Peroxisome biogenesis and human peroxisome-deficiency disorders. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 92, n. 10, p. 463-477, 2016.
- FURUKAWA, K. et. al. A protein conjugation system in yeast with homology to biosynthetic enzyme reaction of prokaryotes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 7462–7465, 2000.

- GALDIERI, L. et al., Transcriptional regulation in yeast during Diauxic Shift and stationary phase. **OMICS**, v. 14, n. 6, p. 629-638, 2010.
- GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 2, p. 334–61, 1998.
- GANCEDO, C.; GANCEDO, J. M.; SOLS, A. Glycerol Metabolism in Yeasts, Pathways of Utilization and Production. **European Journal of Biochemistry**, v. 5, p. 165-172, 1968.
- GARRARD, L. J.; GOODMAN, J.M. Two Genes Encode the Major Membrane-associated Protein of Methanol-induced Peroxisomes from *Candida boidinii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 23, p. 13929-13937, 1989.
- GAZDAG, Z. et al. tert-Butyl hydroperoxide-induced differing plasma membrane and oxidative stress processes in yeast strains BY4741 and *erg5*Δ. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, p.50-62, 2014.
- GAZDAG, Z. et al. Regulation of the unbalanced redox state in a *Schizosaccharomyces pombe* tert-butyl hydroperoxide-resistant mutant. **Acta Biologica Hungarica**, v. 65, n. 2, p. 218–226, 2014.
- GOEHRING, A. S.; RIVERS, D. M.; SPRAGUE, G. F. Attachment of the Ubiquitin-Related protein Urm1p to the antioxidant protein Ahp1p. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 5, p. 930-936, 2003a.
- GOEHRING, A. S.; RIVERS, D. M.; SPRAGUE, G. F. Urm1ylation: A Ubiquitin-like Pathway that Functions during Invasive Growth and Budding in Yeast. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, p. 4329–4341, 2003b.
- GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 Genes. **Science**, v. 274, p. 546–567, 1996.
- GENU, V.F. Ahp1 e Tsa1 de *Saccharomyces cerevisiae*: regulação gênica, caracterização bioquímica, estrutura e função das duas peroxirredoxinas mais abundantes de leveduras. 2007. **Tese de Doutorado**. Biologia (Genética). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- GURVITZ, A.; ROTTENSTEINER, H. The biochemistry of oleate induction: Transcriptional upregulation and peroxisome proliferation. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 12, p. 1392–1402, 2006.
- GRANT, C.M.; PERRONE, G.; DAWES, I.W. Glutathione and Catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 253, p. 893–898, 1998.
- GREGG, C.; KYRYAKOV, P.; TITORENKO, V. I. Purification of Mitochondria from Yeast Cells. **Journal of Visualized Experiments [JOVE]**, v. 30, 2009.
- HALL, A. et al. Structure-based Insights into the Catalytic Power and Conformational Dexterity of Peroxiredoxins. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 3, p. 795-815, 2011.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxidative stress and redox regulation: adaptation, damage, repair, senescence, and death [Chapter 5]. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5<sup>a</sup> Ed. **Oxford University Press**, Oxford, Reino Unido, 2015.
- HASAN, R. et al. The control of yeast H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response by the Msn2/4 transcription factors. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 233–241, 2002.



- HE, Y. et. al. PEX26 gene genotype-phenotype correlation in neonates with Zellweger syndrome. **Translational Pediatrics**, v. 10, n. 7, p. 1825-1833, 2021.
- HERRERO, E. et al. Redox control and oxidative stress in yeast cells [Review]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1780, p. 1217-1235, 2008.
- HILLMANN, F. et. al. The crystal structure of peroxiredoxin asp f3 provides mechanistic insight into oxidative stress resistance and virulence of *Aspergillus fumigatus*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 33396, 2016.
- HILTUNEN, J. K. et. al. The biochemistry of peroxisomal L-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [Review]. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 35-64, 2003.
- HORIGUCHI, H. et al. Antioxidant system within yeast peroxisome. Biochemical and physiological characterization of CbPmp20 in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 17, p. 14279–14288, 2001.
- HÖRTNER, H. et al. Regulation of Synthesis of Catalases and Iso-1-cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae* by Glucose, Oxygen and Heme. **European Journal of Biochemistry**, v. 128, n. 1, p. 179–184, 1982.
- INOUE, Y. et. al. Genetic Analysis of Glutathione Peroxidase in Oxidative Stress Response of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 38, p. 27002-27009, 1999.
- IWAI, K.; NAGANUMA, A.; KUGE, S. Peroxiredoxin Ahp1 Acts as a Receptor for Alkylhydroperoxides to Induce Disulfide Bond Formation in the Cad1 Transcription Factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 14, p. 10597–10604, 2010.
- JACOBSON, F.S. et. al. An Alkyl Hydroperoxide Reductase from involved in the defense of DNA against oxidative damage. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 3, p. 1488-1496, 1989.
- JEONG, J. S. et. al. Purification and characterization of a second type thioredoxin peroxidase (Type II TPx) from *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 776–783, 1999.
- JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion Oxidation in the presence of Xylenol Orange for Detection of Lipid Hydroperoxide in Low Density Lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, p. 384-389, 1992.
- JOHNSTON, M., CARLSON, M. Regulation of carbon and phosphate utilization. In *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae*. Vol. 2: Gene expression. Jones, E.W., Pringle, J.R., Broach, J.R. (eds.). **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Plainview, USA. 1992.
- JOSHI, A.S. et. al. Lipid droplet and peroxisome biogenesis occur at the same ER subdomains. **Nature Communications**, v. 9, n. 2940, p. 1-12, 2018.
- JOSHI, A.S. Peroxisomal Membrane Contact Sites in Yeasts. **Front. Cell Dev. Biol.**, v. 9, n. 735031, p. 1-7, 2021.
- JÜDES, A. Sulfur transfer and activation by ubiquitin-like modifier system Uba4•Urm1 link protein urmylation and tRNA thiolation in yeast. **Microbial Cell**, v. 3, n. 11, p. 554-564, 2016.
- KADHUR, L. Urm1, not quite a ubiquitin like modifier?. **Microbial Cell**, v. 8, n. 11, p. 256-261, 2021.

- KANEKO, T.; BABA, N.; MATSUO, M. Phospholipid Hydroperoxides are significantly less toxic to cultured endothelial cells than Fatty Acid Hydroperoxides. *Life Sciences*, v. 55, n. 19, p. 1443-1449, 1994.
- KÁLMÁN, N. et. al. Adaptation to tert-butyl hydroperoxide at a plasma membrane level in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* parental strain and its t-BuOOH-resistant mutant. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, p. 215-225. 2014.
- KIM, K. et. al. The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O<sub>2</sub> mixed-function oxidation system. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 10, p. 4704- 4711, 1988.
- KURNIAWAN, J.; SUGA, K.; KUHL, T. L. Interaction forces and membrane charge tunability: Oleic acid containing membranes in different pH conditions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1859, p. 211-217, 2017.
- KNOOPS, B. et. al. Cloning and Characterization of AOEB166, a Novel Mammalian Antioxidant Enzyme of the Peroxiredoxin Family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 43, p. 30451–30458, 1999.
- KNOOPS, B. Peroxiredoxin 5: Structure, Mechanism, and Function of the Mammalian Atypical 2-Cys Peroxiredoxin [Review]. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 3, p. 817-829, 2011.
- KLEIN, A.T.J. et. al. *Saccharomyces cerevisiae* Acyl-CoA Oxidase Follows a Novel, Non-PTS1, Import Pathway into Peroxisomes That Is Dependent on Pex5p. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 28, p. 25011–25019, 2002.
- KLINGENBERG, M. Localization of the Glycerol-Phosphate Dehydrogenase in the Outer Phase of the Mitochondrial Inner Membrane. **European Journal of Biochemistry**, v. 13, p. 247-252, 1970.
- KRITSILIGKOU, P. et. al. Unconventional Targeting of a Thiol Peroxidase to the Mitochondrial Intermembrane Space Facilitates Oxidative Protein Folding. **Cell Reports**, v. 18, p. 2729-2741, 2017.
- KROPOTOV, A. et. al. Mitochondrial targeting of human peroxiredoxin V protein and regulation of PRDX5 gene expression by nuclear transcription factors controlling biogenesis of mitochondria. **FEBS Journal**, v. 274, p. 5804–5814, 2007.
- KUGE, S.; JONES, N. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. **The EMBO Journal**, v. 13, n. 3, p. 655-664, 1994.
- LAWRENCE, A.; BESIR, H. Staining of Proteins in Gels with Coomassie G-250 without Organic Solvent and Acetic Acid. **Journal of Visualized Experiments [JOVE]**, doi: 10.3791/1350, 2009.
- LAZAROW, P. B.; KUNAU, W.-H. Peroxisomes. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Volume 3, Cell Cycle and Cell Biology. [s.l.] **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 1131 páginas. 1997.
- LIAN, F. M. et al. Structural snapshots of yeast alkyl hydroperoxide reductase Ahp1 peroxiredoxin reveal a novel two-cysteine mechanism of electron transfer to eliminate reactive oxygen species. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 21, p. 17077–17087, 2012.

- LIAN, F.M. et. al. Crystal structure of sulfonic peroxiredoxin Ahp1 in complex with thioredoxin Trx2 mimics a conformational intermediate during the catalytic cycle. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1055-1060, 2020.
- LIAN, J.; ZHAO, H. Reversal of the  $\beta$ -Oxidation Cycle in *Saccharomyces cerevisiae* for Production of Fuels and Chemicals. **American Chemical Society**, v. 4, p. 332-341, 2015.
- LIPIŃSKI, P. et. al. Mild Zellweger syndrome due to functionally confirmed novel PEX1 variants. **Journal of Applied Genetics**, v. 61, p. 87-91, 2019.
- LEE, J. et al. A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 8, p. 4537–4544, 1999a.
- LEE, J. et. al. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 23, p. 16040-16046, 1999b.
- LEE, P. et. al. Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4. **Molecular Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 882–895, 2008.
- LOWTHER, W. T.; HAYNES, A. C. Reduction of cysteine sulfinic acid in eukaryotic, typical 2-Cys peroxiredoxins by sulfiredoxin. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 1, p. 99–109, 2011.
- LUSHCHAK, V. I.; GOSPODARYOV, D.V. Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell Biology International**, v. 29, p. 187-192, 2005.
- MA, C.; AGRAWAL, G.; SUBRAMANI, S. Peroxisome assembly: matrix and membrane protein biogenesis. **The Journal of Cell Biology**, v. 193, n. 1, p. 7-16, 2011.
- MIYAMOTO, S. et. al. Linoleic acid hydroperoxide reacts with hypochlorous acid, generating peroxy radical intermediates and singlet molecular oxygen. **PNAS**, v. 103, n. 2, p. 293-298, 2005.
- MONTEIRO, G. et al. Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 12, p. 4886–91, 2007.
- MULLER, E. G. D. Thioredoxin Deficiency in Yeast Prolongs S Phase and Shortens the G1 Interval of the Cell Cycle. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 14, p. 9194-9202, 1991.
- MUNHOZ, D.C.; NETTO, L.E.S. Cytosolic Thioredoxin Peroxidase I and II are Important defenses of Yeast against Organic Hydroperoxide Insult. Catalases and peroxiredoxins cooperate in the decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by Yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 34, p. 35219–35227, 2004.
- NELSON, K. J. et. al. Analysis of the peroxiredoxin family: using active site structure and sequence information for global classification and residue analysis. **Proteins**, v. 79, n. 3, p. 947–964, 2011.
- NELSON, K.J.; PARSONAGE, D. Measurement of Peroxiredoxin Activity. **Current Protocols in Toxicology**, v. 49, n. 7, 2011.
- NETTO, L. E. S. et. al. Removal of Hydrogen Peroxide by Thiol-specific Antioxidant Enzyme (TSA) Is Involved with Its Antioxidant Properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 16, p. 15315–15321, 1996.

- NETTO, L. E. S. et. al. Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more [Review]. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 180-193, 2007.
- NETTO, L.E.S.; ANTUNES, F. The Roles of Peroxiredoxin and Thioredoxin in Hydrogen Peroxide Sensing and in Signal Transduction [MiniReview]. *Molecules and Cells*, v. 39, n. 1, p. 65-71, 2016.
- NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, p, 231-241, 1997.
- NEWCOMB, L.L. et. al. Glucose Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle Genes. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 1, p. 143-149, 2003.
- NIELSEN, M.H.; KIDMOSE, R.T.; JENNER, L.B. Structure of TSA2 reveals novel features of the active-site loop of peroxiredoxins. **Acta Crystallographica**, v. D72, p. 158–167, 2016.
- NODA, T.; OHSUMI, Y. Tor, a Phosphatidylinositol Kinase Homologue, Controls Autophagy in Yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 7, p. 3963-3966, 1998.
- NOVIKOFF, P. M.; NOVIKOFF, A. B. Peroxisomes in absorptive cells of mammalian small intestine. **Journal of Cell Biology**, v. 53, p, 532-560, 1972.
- NGUYÊN-NHU, N. T. et. al. Human peroxiredoxin 5 gene organization, initial characterization of its promoter and identification of alternative forms of mRNA. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1769, p. 472-483, 2007.
- OHDATE, T.; INOUE, Y. Involvement of glutathione peroxidase 1 in growth and peroxisome formation in *Saccharomyces cerevisiae* in oleic acid medium. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1821, p. 1295-1305, 2012.
- OKUMOTO, K. et. al. Peroxisome: Metabolic Functions and Biogenesis. In: *Peroxisome Biology: Experimental Models, Peroxisomal Disorders and Neurological Diseases*, Springer Nature Switzerland, 2020.
- OLIVARES-MARIN, I. K. et. al. *Saccharomyces cerevisiae* Exponential Growth Kinetics in Batch Culture to Analyze Respiratory and Fermentative Metabolism. **Journal of Visualized Experiments**, v. 139, 2018.
- OLIVEIRA, M. A. et. al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of NADPH-dependent thioredoxin reductase I from *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, v. F61, p. 387–390, 2005.
- OTTERSTEDT, K. et. al. Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO reports**, v. 5, n. 5, p. 532–537, 2004.
- PARSONAGE, D. et. al. Analysis of the Link between Enzymatic Activity and Oligomeric State in AhpC, a Bacterial Peroxiredoxin. **Biochemistry**, v. 44, n. 31, 2005.
- PARK, S. G. et. al. Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 8, p. 5723–5732, 2000.
- PEDRAJAS, J. R. et. al. Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* Contain One-conserved Cysteine Type Peroxiredoxin with Thioredoxin Peroxidase Activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, v. 21, p. 16296 –16301, 2000.

- PETROVA, V. Y. et. al. Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. **Biochemical Journal**, v. 380, p. 393-400, 2004.
- PETKOVA, M. I. et. al. Mtl1 is required to activate general stress response through Tor1 and Ras2 inhibition under conditions of glucose starvation and oxidative stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 25, p. 19521–19531, 2010.
- POOLE, L. B.; NELSON, K. J. Distribution, and features of the six classes of Peroxiredoxins. **Molecules and cells**, v. 39, n. 1, p. 53–9, 2016.
- PLETT, A.; CHARTON, L.; LINKA, N. Peroxisomal Cofactor Transport. **Biomolecules**, v. 10, n. 1174, p. 1-17, 2020.
- PRINZ, W.A.; TOULMAY, A.; BALLA, T. The functional universe of membrane contact sites [Review]. **Nature Reviews**, v. 21, p. 7-24, 2020.
- PROUZET-MAULÉON, V. et. al. Identification in *Saccharomyces cerevisiae* of a New Stable Variant of Alkyl Hydroperoxide Reductase 1 (Ahp1) Induced by Oxidative Stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 7, p. 4823–4830, 2002.
- RAJVANSHI, P.K.; ARYA, M.; RAJASEKHARAN, R. The stress-regulatory transcription factors Msn2 and Msn4 regulate fatty acid oxidation in budding yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 45, p. 18628–18643, 2017.
- RAVICHANDRAN, K. E. et. al. E2/E3-independent ubiquitin-like protein conjugation by Urm1 is directly coupled to cysteine persulfidation. **The EMBO Journal**, v. e111318, 2022.
- REGLINSKI, K. et. al. Fluidity and lipid composition of membranes of Peroxisomes, Mitochondria, and the ER from Oleic Acid-induced *Saccharomyces cerevisiae*. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, n. October, 2020.
- ROTTENSTEINER, H. et al. Pip2p: a transcriptional regulator of peroxisome proliferation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 12, p. 2924–34, 1996.
- RUBIO-TEXEIRA, M. Urmylation controls Nil1p and Gln3p-dependent expression of nitrogen-catabolite repressed genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 581, p. 541–550, 2007.
- RHEE, S.G.; CHAE, H.Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 38, p. 1543-1552, 2005.
- SAVINOV, A. et. al. Effects of sequence motifs in the yeast 3' untranslated region determined from massively parallel assays of random sequences. **Genome Biology**, v. 22, n. 293, 2021.
- SIMON, M. M. et. al. A C-terminal region of the *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor ADR1 plays an important role in the regulation of peroxisome proliferation by fatty acids. **Molecular & General Genetics**, v. 249, p. 289-296, 1995.
- SIMON, M.M. et. al. Control of peroxisome proliferation in *Saccharomyces cerevisiae* by ADR1, SNF1 (CAT1, CCR1) and SNF4 (CAT3). **Yeast**, v. 8, p. 303-309, 1992.
- SINHA, H. et al. Sequential elimination of major-effect contributors identifies additional quantitative trait loci conditioning high-temperature growth in yeast. **Genetics**, v. 180, p. 1661–1670, 2008.

- SCHRADER, M.; FAHIMI, H. D. Peroxisomes and oxidative stress [Review]. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1763, p. 1755-1766, 2006.
- SHERMAN, F. Getting Started with Yeast. **Methods in Enzymology**, v. 350, p. 3–41, 2002.
- SHIMOZAWA, N. et al. Responsible for Zellweger Syndrome That Affects Peroxisome Assembly. **Science**, v. 255, n. 1990, p. 11–13, 1992.
- SMITH, J. J. et. al. Transcriptome profiling to identify genes involved in peroxisome assembly and function. **The Journal of Cell Biology**, v. 158, n. 2, p. 259-271, 2002.
- SKONECZNY, M.; CHELSTOWSKA, A.; RYTKA, J. Study of the coinduction by fatty acids of catalase A and acyl-CoA oxidase in standard and mutant *Saccharomyces cerevisiae* strains. **European Journal of Biochemistry**, v. 174, p. 297-302, 1988.
- TACHIBANA, T. et. al. A major Peroxiredoxin-induced activation of Yap1 transcription factor is mediated by reduction-sensitive disulfide bonds and reveals a low level of transcriptional activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 7, p. 4464 – 4472, 2009.
- TAN, Q. et. al. Involvement of Urm1, a ubiquitin-like protein, in the regulation of oxidative stress response of *Toxoplasma gondii*. **American Society for Microbiology**, v. 10, n. 2, 2022.
- TAIRUM, C.A.; OLIVEIRA, M.A.; HORTA, B.B.; ZARA, F.J.; NETTO, L.E.S. Disulfide Biochemistry in 2-Cys Peroxiredoxin: Requirement of Glu50 and Arg146 for the Reduction of Yeast Tsa1 by Thioredoxin. **Journal of Molecular Biology**, v. 424, p. 28-41, 2012.
- TRAN, J.R.; BRODSKY, J.L. Assays to Measure ER-Associated Degradation in Yeast. **Methods in Molecular Biology**, v. 832, p. 505-518, 2012.
- TEMPLE, M. D.; PERRONE, G. G.; DAWES, I. W. Complex cellular responses to reactive oxygen species. **Trends in Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 319–326, 2005.
- UKAI, Y. et. al. Glutathione peroxidase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is distributed in mitochondria and involved in sporulation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 411, p. 580-585, 2011.
- VAN DER VEEN, A. G. et al. Role of the ubiquitin-like protein Urm1 as a noncanonical lysine-directed protein modifier. **PNAS**, v. 108, n. 5, p. 1763–1770, 2011
- VAN DER ZAND, A. et al. Biochemically distinct vesicles from the endoplasmic reticulum fuse to form peroxisomes. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 397–409, 2012.
- VELDHOVEN, P. P. V. Biochemistry and genetics of inherited disorders of peroxisomal fatty acid metabolism. **Journal of Lipid Research**, v. 51, p. 2863- 2895, 2010.
- VERDOUCQ, L. et. al. *In Vivo* characterization of a Thioredoxin h Target Protein Defines a New Peroxiredoxin Family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 28, 19714–19722, 1999.
- VIGNOLS, F. et. al. A yeast two-hybrid knockout strain to explore thioredoxin-interacting proteins *in vivo*. **PNAS**, v. 102, n. 46, p. 16729-16734, 2005.
- WANG, L. et. al. URM1-Mediated Ubiquitin-Like modification is required for oxidative stress adaptation during infection of the Rice Blast Fungus. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.
- WANG, J. et. al. Alkyl Hydroperoxide Reductase as a Determinant of Parasite Antiperoxide Response in *Toxoplasma gondii*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2021.

- WINTERBOURN, C.C.; HAMPTON, M.B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radic Biol Med**, v. 1, n. 45, p. 549-61, 2008.
- WOOD, Z.A.; POOLE, L.B.; KARPLUS, A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. **Science**, v. 300, p. 650-653, 2003.
- WONG, C. M. et. al. Cooperation of Yeast Peroxiredoxins Tsa1p and Tsa2p in the Cellular Defense against Oxidative and Nitrosative Stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 7, p. 5385–5394, 2002.
- YAMASHITA, H. et. al. Characterization of Human and Murine PMP20 Peroxisomal Proteins That Exhibit Antioxidant Activity *in Vitro*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 42, p. 29897-29904, 1999.
- YANG, H.C. et. al. tert-Butyl Hydroperoxide (tBHP)-Induced Lipid Peroxidation and Embryonic Defects Resemble Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficiency in *C. elegans*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, 2020.
- YIFRACH, E. et. al. Systematic multi-level analysis of an organelle proteome reveals new peroxisomal functions. **Molecular Systems Biology**, v. 18, 2022.