## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

### **RENATA OGUSUCU**

### Interações de peroxirredoxinas citossólicas da levedura

Saccharomyces cerevisiae com peróxidos.

Estudos cinéticos e funcionais

São Paulo

Data do Depósito na SPG

27/01/2009

# Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

### **RENATA OGUSUCU**

Interações de peroxirredoxinas citossólicas da levedura Saccharomyces cerevisiae com peróxidos. Estudos cinéticos e funcionais

> Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientadora: Profa. Dra. Ohara Augusto

São Paulo

2009

### Renata Ogusucu

### Interações de peroxirredoxinas citossólicas da levedura Saccharomyces

cerevisiae com peróxidos. Estudos cinéticos e funcionais.

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Aprovado em: \_\_\_\_\_

Banca Examinadora:

Prof. Dr	
Instituição	
Assinatura	
Prof. Dr	
Instituição	
Assinatura	
Prof. Dr	
Instituição	·····
Assinatura	
Prof. Dr.	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
Instituição	·····
Assinatura	
Prof. Dr.	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
Instituição	·····
Assinatura	

#### AGRADECIMENTOS

À Ohara Augusto, pela orientação, confiança e algumas broncas também.

Ao Dr. Luis Eduardo Soares Netto, pela colaboração em todas as etapas deste trabalho.

Ao amigo, colaborador e guru Dr. Daniel Rettori.

Ao Prof. Pedro Vitoriano de Oliveira e Juliana Naozuka, pelos experimentos de espectrometria de absorção atômica.

Aos meus colegas de laboratório: Berê, Edlaine, Rita, Leonora, Toledo, Danilo, Sandra, Rafael, Natália, Luciana, Daniel, Fernanda e Giselle. Essas pessoas conviveram com meus defeitos por praticamente todos os dias há quase 5 anos!

Aos professores do Instituto de Química, pela convivência, empréstimos de equipamentos e reagentes.

Aos funcionários do Instituto de Química, especialmente da secretaria de Pós-Graduação (sem pedidos de socorro desta vez, só gratidão).

Aos colegas do Instituto de Química que tornaram o trabalho muito mais divertido (as horas de folga então...).

À minha família (biológica e adquirida).

À FAPESP, CAPES e CNPq (Redoxoma) pelo financiamento.

"Eu quase que nada não sei. Mas desconfio de muita coisa".

Guimarães Rosa

Grande Sertão: Veredas

#### RESUMO

Ogusucu, R. Interações de peroxirredoxinas citossólicas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com peróxidos. Estudos cinéticos e funcionais. 2009. 96 p. Tese de doutorado – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

As peroxirredoxinas constituem uma família de tiol-proteínas, que reduzem peróxido de hidrogênio, peróxidos orgânicos e peroxinitrito a água, álcool e nitrito, respectivamente, utilizando equivalentes redutores fornecidos pela tiorredoxina, tiorredoxina redutase e NADPH. As peroxirredoxinas são enzimas abundantes (constituem aproximadamente 0,7 % do total de proteínas solúveis presentes em leveduras) e foram identificadas em diversas espécies de animais, plantas e bactérias, porém seu papel fisiológico ainda é discutido. Até recentemente, as peroxirredoxinas eram consideradas pouco eficientes para detoxificar peróxidos, em comparação às catalases e heme-peroxidases. De fato, as constantes de segunda ordem determinadas para as reações de peroxirredoxinas com peróxido de hidrogênio eram da ordem de 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, valores muito menores que os de hemeproteínas (~10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>). Neste trabalho, um método de cinética competitiva foi desenvolvido para re-determinar essas constantes de velocidade, utilizando a peroxidase de raiz forte como competidora das peroxirredoxinas de S. cerevisiae, Tsa1 e Tsa2. Este método foi validado e as constantes de velocidade determinadas para Tsa1 e Tsa2 foram da ordem de k~ 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> para a reação com peróxido de hidrogênio e da ordem de k~10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> para a reação com peroxinitrito. Utilizando a mesma metodologia, foi possível ainda determinar o  $pK_a$  da cisteína peroxidásica da Tsa1 e Tsa2 (Cys<sup>47</sup>), como sendo 5,4 e 6,3, respectivamente. Paralelamente, o papel fisiológico das peroxirredoxinas foi examinado em linhagens de S. cerevisiae com deleção de Tsa1, Tsa2 ou de ambas isoformas. Os estudos foram realizados sob condições fermentativas e a linhagem tsa1/1tsa2/1 se mostrou mais resistente ao peróxido de hidrogênio (1 mM) e o consumiu mais rapidamente que a WT. Além disso, a linhagem *tsa1/1 tsa2/1* produziu guantidades mais altas do radical 1-hidroxietila, produto da oxidação do etanol, que é o principal metabólito da levedura em anaerobiose. O mecanismo de formação do radical 1-hidroxietila foi examinado e a quantificação da concentração de ferro "quelatável", ferro total e cobre mostrou que a reação de Fenton não era sua principal fonte. Outro mecanismo investigado foi a formação do radical através da atividade peroxidásica da Sod1, cuja expressão e atividade se mostraram aumentadas cerca de 5 e 2 vezes, respectivamente, na linhagem *tsa1*/*tsa2*/1. Na linhagem mutante ainda foi observado que o tratamento com peróxido de hidrogênio aumentou a concentração de radicais derivados e adutos do DNA, detectados por imuno-spin trapping e incorporação de <sup>14</sup>C derivado da glicose. Em conjunto, os resultados deste trabalho reforçam a importância das peroxirredoxinas na defesa antioxidante e mostram que as respostas compensatórias empregadas pela levedura para contornar as deleções de Tsa1 e Tsa2 podem ser deletérias longo prazo.

**Palavras chaves:** Peroxirredoxinas, *Saccharomyces cerevisiae*, cinética de peroxirredoxinas, atividades antioxidantes da Sod1, radicais livres derivados do etanol, dano oxidativo ao DNA.

#### ABSTRACT

Ogusucu, R. *Saccharomyces cerevisiae* cytosolic peroxiredoxin interactions with peroxides. Kinetics and functional studies. 2009. 96 p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Peroxiredoxins constitute a family of cysteine-based peroxidases that are able to reduce hydrogen peroxide, organic peroxides and peroxinitrite to water, alcohol and nitrite, respectively, through the use of reducing equivalents provided by thioredoxin, thioredoxin reductase and NADPH. Peroxiredoxins are abundant enzymes (correspond to approximately 0.7% of total soluble protein in yeasts) and have been identified in several species ranging from animals, plants and bacteria, but their physiological role remains under scrutiny. Peoxiredoxins were regarded as less eficient enzymes in comparison with catalases and heme-peroxidases for detoxification of peroxides. Second-order rate constants determined for the reaction of peroxiredoxins with hydrogen peroxide were in the range of 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, which is guite low, as compared with those of heme-proteins (~10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>). In the present work, a competitive kinetic approach with horseradish peroxidase was developed in order to determine the second order rate constant of the reaction of peroxiredoxins with peroxynitrite and hydrogen peroxide. This method was validated and permitted for the determination of the second order rate constant value of the reaction of Tsa1 and Tsa2 with peroxynitrite (k~10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) and hydrogen peroxide (k~ 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) at pH 7.4, 25 °C. It also permitted the determination of the pK<sub>a</sub> of the peroxidatic cysteine of Tsa1 and Tsa2 (Cys<sup>47</sup>) as 5.4 and 6.3, respectively. In parallel, the physiological role of peroxiredoxins was examined in S. cerevisiae strains with deletion of Tsa1, Tsa2 or of both isoforms. Under fermentative conditions,  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  cells were more resistant to 1 mM hydrogen peroxide than WT cells, and consumed it faster. In addition,  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  cells produced higher yields of the 1hydroxyethyl radical from the oxidation of the glucose metabolite ethanol, as shown by spintrapping experiments. A major role for Fenton chemistry in radical formation was excluded by comparing WT and  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  cells with respect to their levels of chelatable iron ions, total

iron and copper ions, and of 1-hydroxyethyl radical produced in the presence of metal ion chelators. The main route for 1-hydroxyethyl radical formation was ascribed to the peroxidase activity of Sod1, whose expression and activity increased about five- and two-fold, respectively, in  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  compared to WT cells. Relevantly,  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  cells challenged with hydrogen peroxide contained higher levels of DNA-derived radicals and adducts as monitored by immuno-spin trapping and incorporation of <sup>14</sup>C from glucose into DNA, respectively. Taken together, our results reinforce the importance of peroxiredoxins in the antioxidant defense show that the compensatory responses employed by yeast to counterbalance the deletions of Tsa1 and Tsa2 may be deleterious in the long time range.

**Keywords:** Peroxiredoxins, *Saccharomyces cerevisiae*, peroxiredoxin kinetics, antioxidant activities of Sod1, ethanol-derived free radicals, oxidative damage to DNA

#### LISTA DE ABREVIATURAS

DBNBS - ácido 3,5 - dibromo-4-nitrosobenzeno sulfônico

**DDC** – dietilditiocarbamato

DMPO - N-óxido de 5,5'-dimetil-1-pirrolina

**DTPA** – ácido dietilenotriaminopentaacético

EPR - ressonância paramagnética eletrônica

HRP - peroxidase de raiz forte

NBT – nitroazul de tetrazólio

**Peroxinitrito** – o termo refere-se a soma do ânion peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) e ácido peroxinitroso (ONOOH). A nomenclatura recomendada pela IUPAC para o peroxinitrito é oxoperoxinitrato (-1) e para o ácido peroxinitroso é oxoperoxinitrato de hidrogênio

**POBN** - α(4-piridil-1-óxido)-*N*-tert-butilnitrona

Sod1 – Cu,Zn superóxido dismutase citossólica

**TEMED** – N, N, N', N' – Tetrametiletilenediamina

Tsa1 – tiorredoxina peroxidase citossólica I, também conhecida como cTPxI (YML028W)

Tsa2 - tiorredoxina peroxidase citossólica II, também conhecida como cTPxII (YDR453C)

WT – linhagem tipo selvagem de S. cerevisiae

*tsa1*⊿ - linhagem de *S. cerevisiae*, derivada da WT, que apresenta deleção do gene que codifica a enzima Tsa1

*tsa2*⊿- linhagem de *S. cerevisiae*, derivada da WT, que apresenta deleção do gene que codifica a enzima Tsa2

*tsa1∆tsa2∆* - linhagem de *S. cerevisiae*, derivada da WT, que apresenta deleção dos genes que codificam as enzimas Tsa1 e Tsa2

### SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 – Peroxirredoxinas	12
1.2 – Saccharomyces cerevisiae	16
2. OBJETIVO	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Reagentes	20
3.2. Expressão e purificaçao de Tsa1 e Tsa2	20
3.3. Redução e quantificação de Tsa1 e Tsa2	22
3.4 Quantificação de tióis da Tsa1 e Tsa2	22
3.5. Estudos de cinética competitiva	22
3.6. Estudos de cinética direta	24
3.7. Estudos de cinética competitiva por medidas de absorbância	24
3.8. Simulações cinéticas	25
3.9. Oxidação da dihidrorodamina 123	25
3.10. Linhagens de Saccharomyces cerevisiae e condições de cultivo	25
3.11. Experimentos de viabilidade	27
3.12. Consumo de peróxido de hidrogênio	28
3.13. Produção do radical 1-hidroxietila	28
3.14. Detecção de ferro "quelatável"	30
3.15. Determinação da concentração de ferro, cobre e zinco	30
3.16. Determinação da concentração de peróxidos totais	31
3.17. Preparação de extratos celulares	31
3.18. Expressão de <i>SOD1</i> em células WT e <i>tsa1∆tsa2∆</i>	32
3.19. Atividade dismutásica em extratos de células WT e <i>tsa1∆tsa2∆</i>	33
3.20. Atividade peroxidásica das linhagens WT e <i>tsa1∆tsa2∆</i>	34
3.21. Extração e quantificação de DNA	34
3.22. Detecção de adutos de DMPO no DNA das linhagens WT e <i>tsa1∆tsa2∆</i>	35
3.23. Incorporação de <sup>14</sup> C no DNA das linhagens WT e <i>tsa1∆tsa2∆</i> metabolizando	36
glicose e <sup>14</sup> C-glicose	

4. RESULTADOS 38			
4.1. Cinética das reações das peroxirredoxinas Tsa1 e Tsa2 com peróxidos			
4.1.1. Validação do método de cinética competitiva	38		
4.1.2. Cinética das reações entre Tsa1 e Tsa2 com peróxido de hidrogênio e	40		
peroxinitrito			
4.1.3. Determinação do p $K_a$ da cisteína peroxidásica de Tsa1 e Tsa2	45		
4.1.4. A reação entre Tsa1 e Tsa2 com peroxinitrito	46		
4.2. Estudos em culturas de S. cerevisiae com deleção de peroxirredoxinas	50		
citossólicas			
4.2.1. Viabilidade celular e produção de radicais	50		
4.2.2. Mecanismo de formação do radical 1-hidroxietila na linhagem $tsa1\Delta tsa2\Delta$			
4.2.3. Instabilidade genômica da linhagem tsa1∆tsa2∆	70		
5. DISCUSSÃO	73		
5.1. Reações entre Tsa1 e Tsa2 com peróxidos	73		
5.2. Efeitos das deleções de Tsa1 e Tsa2 em leveduras	77		
6. CONCLUSÕES	84		
BIBLIOGRAFIA	85		
LISTA DE ANEXOS	92		
Súmula curricular	93		
Publicações resultantes deste trabalho	96		

#### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1 Peroxirredoxinas

Os seres vivos são constantemente expostos a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas pela atividade metabólica normal das células, ou em resposta a estímulos externos. Para proteção contra a toxicidade dessas espécies, os organismos aeróbicos desenvolveram vários mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos de defesa (Halliwell & Gutteridge, 2007). As peroxirredoxinas, que estão entre essas defesas antioxidantes, constituem uma família de peroxidases que tem atraído cada vez mais atenção na literatura, devido à sua abundância nas células e sua versatilidade. As peroxirredoxinas reduzem peróxido de hidrogênio, peróxidos orgânicos e peroxinitrito a água, álcool e nitrito, respectivamente, utilizando equivalentes redutores fornecidos pela tiorredoxina, tiorredoxina redutase e NADPH (Fig. 1) (Hoffman et al., 2002; Wood et al., 2003a). Esta atividade catalítica é exercida por um resíduo de cisteína específico localizado em uma seqüência conservada no N-terminal, que é a característica da família (Netto et al., 1996; Hoffman et al., 2002; Wood et al., 2003a; Rhee et al., 2005).

As peroxirredoxinas são comumente divididas em dois grupos, chamados 1-Cys Prxs e 2-Cys Prxs, dependendo do número de resíduos de cisteínas conservadas (Hoffman et al., 2002; Wood et al., 2003a). As 1-Cys Prxs conservam apenas a "cisteína peroxídásica", responsável pela atividade catalítica da enzima. Já as 2-Cys Prxs conservam também um outro resíduo de cisteína, denominado "cisteína de resolução". As 2-Cys Prxs ainda são subdividas em típicas e atípicas, de acordo com as suas características mecanísticas e estruturais. Resumidamente, após a reação com peróxido, as 2-Cys Prxs típicas formam um dímero através da ligação entre a cisteína peroxidásica oxidada e a cisteína de resolução de outro monômero (Fig. 1). Já nas 2-Cys Prxs atípicas, a cisteína peroxidásica oxidada forma uma ponte dissulfeto com a cisteína de resolução do mesmo monômero, logo, essas enzimas não formam dímeros. Em ambos os tipos de 2-Cys Prxs, a ponte dissulfeto é reduzida pelo sistema tiorredoxina, regenerando assim o sítio ativo da enzima (Fig. 1) (Hoffman et al., 2002; Wood et al., 2003a, Munhoz & Netto, 2004).



Fig. 1. Ciclo catalítico das peroxirredoxinas 2-Cys típicas.

A primeira peroxirredoxina descoberta foi a Tsa1 (thiol-specific antioxidant 1), também chamada de tiorredoxina peroxidase citossólica I, da levedura Saccharomyces cerevisiae (Kim et al., 1988). A Tsa1 é uma enzima citossólica, expressa constitutivamente e é bastante abundante (constitui cerca de 0,7% do total de proteínas solúveis) (Kim et al., 1988; Wong et al., 2002; Munhoz & Netto, 2004). Além da Tsa1, a S. cerevisiae possui outras quatro isoformas de peroxirredoxinas, com diferentes padrões de expressão e compartimentalização (Park et al., 2000). A isoforma Tsa2, também é citossólica, e é expressa apenas em condições de estresse oxidativo. Supõe-se que a Tsa2 seja uma duplicação da Tsa1, pois essas proteínas apresentam 96% de similaridade e 86% de identidade nas seqüências de aminoácidos (Wong et al., 2002; Munhoz & Netto, 2004). As demais isoformas de peroxirredoxinas são menos conhecidas e são localizadas no citoplasma (Ahp1), núcleo (nTPx) e mitocôndria (mTPx) (Park et al., 2000). Assim como na S. cerevisiae, em diversas espécies de animais, vegetais, fungos e bactérias as peroxirredoxinas também são encontradas em diferentes isoformas, com diferentes padrões de expressão e compartimentalização (Park et al., 2000; Wong et al., 2002; Wong et al., 2004; Munhoz & Netto, 2004). Os papéis fisiológicos redundantes ou não-redundantes destas diferentes isoformas de peroxirredoxinas permanecem em estudo.

Em leveduras, o papel das peroxirredoxinas na defesa antioxidante vem sendo bastante estudado *in vivo*, através de estudos de viabilidade em linhagens com deleção de

peroxirredoxinas (Park et al., 2000; Wong et al., 2002; Wong et al., 2004; Munhoz & Netto, 2004; Demasi et al., 2006). Os efeitos da deleção de uma ou mais isoformas de peroxirredoxinas em *S. cerevisiae* não são visíveis sob cultivo em meio fermentativo, porém, a viabilidade destas linhagens é prejudicada na presença de concentrações elevadas de oxidantes, como peróxido de hidrogênio ou peroxinitrito (Park et al., 2000; Wong et al., 2002; Wong et al., 2004; Munhoz & Netto, 2004; Demasi et al., 2006). Até recentemente, os estudos cinéticos mostravam que as peroxirredoxinas eram enzimas pouco eficientes na redução de peróxidos em comparação com catalases e glutationa peroxidases, com a desvantagem de depender de equivalentes redutores, cuja disponibilidade pode estar diminuída em condições estressantes. Por isso, a importância das peroxirredoxinas na defesa antioxidante chegou a ser questionada (Hoffman et al., 2002).

Além de antioxidante, a Tsa1 também é considerada uma proteína supressora de mutações. Esta atribuição foi feita após a observação de que em linhagens de *S. cerevisiae*, a deleção da Tsa1 causa um aumento significativo da taxa de mutações e rearranjos cromossômicos, incluindo translocações, deleções e adição de telômeros, enquanto que a deleção de outras enzimas antioxidantes, como catalase e superóxido dismutase, não induz esses processos (Huang et al., 2003; Wong et al., 2004; Huang & Kolodner, 2005; Ragu et al., 2007; Iraqui et al., 2008).

Outro papel atribuído às peroxirredoxinas é o de regular eventos de sinalização celular mediados por peróxido de hidrogênio (Wood et al., 2003b). Embora os detalhes mecanísticos não sejam conhecidos, propõe-se que as 2-Cys Prxs sejam suficientes para controlar as baixas concentrações de peróxido de hidrogênio presentes em concentrações fsiológicas entre 1 - 700 nM (Stone, 2004). Em condições estressantes, quando os níveis de peróxido atingem a faixa de micromolar, a cisteína peroxidásica das 2-Cys Prxs é oxidada a ácido sulfínico e sua redução deixa de ser feita pelo sistema tiorredoxina e passa a ser dependente da enzima sulfirredoxina, alterando o ciclo catalítico das 2-Cys Prxs (Biteau et al., 2003). Quando isto ocorre, as peroxirredoxinas deixam de controlar os níveis de peróxido de hidrogênio, permitindo sua reação com outras biomoléculas e provocando a

ativação de cascatas de sinalização (Wood et al., 2003b). De fato, as peroxirredoxinas foram relacionadas à indução de apoptose em células da tireóide em resposta ao hormônio TSH (Kim et al., 2000), ativação do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) em fibroblastos de camundongos (Choi et al., 2005), a ativação do fator de transcrição Pap1 na levedura *Schizosaccharomyces pombe* (Veal et al., 2004; Vivancos et al., 2005; Bozonet et al., 2005) e ainda, regulação da atividade do fator NF-κB em células HeLa (Hansen et al., 2007).

Adicionalmente, uma atividade de chaperona molecular foi atribuída às peroxirredoxinas (Jang et al., 2004; Moon et al., 2005; Chuang et al., 2006; Rand & Grant, 2006). Novamente, os detalhes mecanísticos desta atividade não foram elucidados, mas propõe-se que formas de baixo peso molecular atuem como peroxidases e formas de alto peso molecular (aproximadamente 500 kDa em *S. cerevisiae*) atuem como chaperona molecular. A detecção destas formas de alto peso molecular em células HeLa, em *Helicobacter pylori* e em *S. cerevisiae* são considerados indicadores da indução da atividade chaperona e, nestes modelos experimentais, observou-se um aumento da quantidade de proteínas desnaturadas em resposta à deleção da Tsa1 (Jang et al., 2004; Moon et al., 2005; Chuang et al., 2006; Demasi et al., 2006; Rand & Grant, 2006).

Considerando a versatilidade das peroxirredoxinas, assim como sua abundância nas células, não é surpreendente a relação encontrada entre suas atividades e sua expressão com a progressão de vários processos patológicos (Allen et al., 2003; Wood-Allum et al., 2006; Fang et al., 2007; Yao et al., 2007). Apesar dos atributos das peroxirredoxinas permitirem sua atuação como defesa antioxidante, como reguladoras da sinalização celular e como chaperona molecular, estes papéis ainda não foram bem caracterizados *in vivo*. Por isso, estudos mecanísticos que explorem o papel fisiológico das peroxirredoxinas constituem uma área promissora de estudo.

15

#### 1.2. Saccharomyces cerevisiae

A levedura *S. cerevisiae* é um dos organismos mais utilizados como modelo para estudos em bioquímica e genética de eucariotos. Processos metabólicos como a replicação do DNA, o enovelamento de proteínas, a divisão celular, entre outros, são bastante conservados da levedura até eucariotos mais complexos (Outeiro & Giorgini, 2006; Gitler, 2008). Além disso, as leveduras possuem um sistema genético bem caracterizado e razoavelmente maleável, permitindo a introdução e/ou deleção de genes de interesse (Munhoz & Netto, 2004; Outeiro & Giorgini, 2006; Landry et al., 2006). Adicionalmente, as culturas de leveduras crescem rapidamente e podem ser mantidas na forma haplóide, facilitando a detecção das alterações causadas por transformações genéticas (Landry et al., 2006). Algumas desvantagens da utilização de leveduras como modelo experimental são bem conhecidas. Por ser um organismo unicelular, a *S. cerevisiae* apresenta várias diferenças em relação a eucariotos superiores, além disso, é um anaeróbio facultativo que na presença de glicose obtém energia principalmente através da fermentação, mesmo na presença de oxigênio. Nestas condições, além do ATP, outro produto formado é o etanol (Outeiro & Giorgini, 2006; Landry et al., 2006).

Uma característica importante da *S. cerevisiae* é o diauxismo que, para esta espécie, significa o consumo preferencial de glicose, mesmo na presença de outras fontes de carbono. Esta seletividade é possível devido a "repressão por glicose", que consiste na inibição da expressão dos genes relacionados à respiração celular, biogênese de mitocôndria, gliconeogênese e transporte de galactose, sacarose e maltose, em ambientes com altas concentrações de glicose (Ronne, 1995; Barnett & Entian, 2005; Piskur et al., 2006; Macierzynska et al., 2007). A expressão destes genes é induzida apenas quando a concentração de glicose diminui e a levedura é obrigada a utilizar outras fontes de carbono para obtenção de energia (Rettori & Volpe, 2000; Piskur et al, 2006).

Na *S. cerevisiae*, a oxidação do piruvato a CO<sub>2</sub> rende 16 ATP, enquanto em células animais, o mesmo processo rende 30 ATP (Bakker et al., 2001). Esta diferença é atribuída a ausência do complexo I em leveduras, pois, embora existam 3 NADH desidrogenases na

membrana interna mitocondrial, a oxidação do NADH não é acoplada à translocação de prótons para o espaço intermembranas (Bakker et al., 2001). É interessante notar que embora o rendimento em ATP da fermentação seja cerca de 8 vezes menor que o da respiração, esta estratégia não é necessariamente pouco eficiente para obtenção de energia, pois o piruvato produzido na glicólise não é "perdido", mas convertido a etanol, que pode ser oxidado quando a concentração de glicose tornar-se limitante. Além disso, a produção de etanol confere uma vantagem adaptativa para leveduras que crescem no meio ambiente, pois inibe o crescimento de outros microorganismos (Querol et al., 2003; Piskur et al., 2006).

A possibilidade de cultivar a *S. cerevisiae* na ausência ou na presença de oxigênio, torna a espécie bastante útil em estudos de estresse oxidativo. Assim como os eucariotos superiores, a levedura possui mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos para controlar os níveis intracelulares de oxidantes. Para detoxificar peróxido de hidrogênio, por exemplo, são conhecidos 5 tipos de peroxirredoxinas, 2 catalases, citocromo c peroxidase, glutationa peroxidase e glutarredoxinas, além da Sod1 e Sod2 que catalisam a dismutação do ânion radical superóxido (Munhoz & Netto, 2004; Demasi et al., 2006). Estas enzimas são encontradas em diferentes compartimentos celulares e sua expressão é regulada não apenas pela concentração de oxidantes, mas também pela fonte de carbono disponível (Polakis & Bartley, 1965; Galiazzo & Labbe-Bois, 1993; Longo et al., 1996; Jamieson, 1998; Macierzinska et al., 2007). De fato, o cultivo em meio respiratório induz a biogênese de mitocôndrias, que são consideradas as principais fontes de radical superóxido e das espécies dele derivadas (Halliwell & Gutteridge, 2007). Além disso, a repressão por glicose afeta a expressão de genes controlados pelo fator de transcrição Hap1, incluindo os que codificam os dois tipos de catalases e Sod2 (Jamieson, 1998).

Assim como observado em eucariotos superiores, a resposta da *S. cerevisiae* ao estresse oxidativo é bastante complexa e envolve a cooperação de vários fatores de transcrição (Jamieson, 1998, Schüller, 2003; Herrero et al., 2008). Por exemplo, os genes que codificam as enzimas Tsa1, catalase T e o sistema tiorredoxina são regulados por Yap1

17

e Skn7, já a ativação da expressão do gene SOD1 envolve não apenas estes fatores de transcrição, mas também do Ace1 (que por sua vez também está relacionado a homeostase de cobre) (Jamieson, 1998; Rutherford & Bird, 2004). Já os dois tipos de catalase descritos em levedura são regulados pelos fatores Yap1, Skn7, Hap1 e Msn2/4, sendo que estes últimos estão associados a repressão por glicose e resposta a choque térmico, respectivamente (Jamieson, 1998; Demasi et al., 2006). Deste modo, é possível observar que há uma grande variedade de fatores que regulam a transcrição de genes relacionados a defesa antioxidante, evidenciando a dificuldade de se estudar *in vivo* as estratégias empregadas pela *S. cerevisiae* para responder a condições estressantes, causadas por sua própria atividade metabólica ou pelo ambiente.

#### 2. OBJETIVO

Visando contribuir para a elucidação dos papéis fisiológicos redudantes e não redundantes das peroxirredoxinas, nos propusemos a estudar a cinética das reações de Tsa1 e Tsa2 com peróxidos *in vitro*, e o efeito das deleções destas isoformas em culturas de *Saccharomyces cerevisiae*.

#### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1. Reagentes

Foram utilizados reagentes de grau analítico, adquiridos da Sigma-Aldrich, Merck, Difco ou Synth. Todas as soluções utilizadas foram preparadas em água destilada purificada em sistema Millipore Milli-Q e tratada com resina Chelex 100, para remoção de íons metálicos.

O peroxinitrito foi sintetizado a partir de nitrito de sódio (0,6 M) e peróxido de hidrogênio (0,65 M) em um reator tipo *quenched flow* (Beckman *et al.*, 1990; Denicola *et al.*, 1996). Foi usado peróxido de hidrogênio em excesso para diminuir a contaminação por nitrito (Saha *et al.*, 1998) e o excesso de peróxido de hidrogênio foi removido por dióxido de manganês. Níveis de peróxido de hidrogênio (< 1%) e nitrito (entre 10-30%) contaminantes foram determinados como descrito anteriormente (Kissner *et al.*, 1997). Antes de cada experimento, o estoque de peroxinitrito foi diluído em hidróxido de sódio 0,1 M e sua concentração nesta solução de trabalho foi determinada por espectrofotometria em 302 nm ( $\varepsilon_{302} = 1670$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (Beckman *et al.*, 1990; Denicola *et al.*, 1996).

A concentração de peróxido de hidrogênio (Synth) foi determinada a cada experimento por espectrofotometria em 240 nm ( $\varepsilon_{240} = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Claiborne, 1995) ou monitorando-se a oxidação da HRP. Neste caso, foi obtido o espectro de absorção de 5 µM de HRP, antes e depois desta enzima ser misturada a uma solução diluída de peróxido de hidrogênio. Através da diferença de absorbância da amostra reduzida e oxidada em 403. nm ( $\Delta \varepsilon_{403} = 5.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), foi possível calcular a concentração de HRP que reagiu com peróxido de hidrogênio e conseqüentemente, a concentração de peróxido presente na solução.

#### 3.2. Expressão e purificação de Tsa1 e Tsa2

As proteínas recombinantes Tsa1 e Tsa2, com cauda de histidina, foram produzidas e purificadas no laboratório do Dr. Luis Eduardo Soares Netto (Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo) como descrito em Munhoz & Netto (2004).

A linhagem de *Escherichia coli* BL 21 transformada com os plasmídeos pET15b/TSA1 (Novagen) ou p-PROEX/TSA2 (Invitrogen) foi cultivada por 12 h em 50 mL de meio LB (peptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L, pH 7,5 ajustado com hidróxido de sódio) contendo ampicilina (100  $\mu$ g/mL). Após este período, as células obtidas foram transferidas para 1 litro de meio LB fresco e a cultura foi novamente incubada até atingir DO<sub>600</sub> entre 0,6-0,8. Nesta fase do crescimento, a produção de Tsa1 ou Tsa2 foi induzida através da adição de IPTG (isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactospiranosídeo) para uma concentração final de 1 mM. Após mais 3 h de cultivo, as células de *E. coli* foram coletadas e lavadas em 20 mL de tampão fosfato 20 mM, pH 7,4, contendo 500 mM de cloreto de sódio. As células obtidas foram congeladas a -20 °C até o momento da extração das proteínas recombinantes.

Para purificação da Tsa1 ou Tsa2, as células de *E. coli* foram descongeladas e ressuspendidas em tampão fosfato 20 mM, pH 7,4. Estas células foram lisadas em 6 ciclos de 20 segundos de sonicação, intercalados por 30 segundos de repouso em gelo. A suspensão obtida foi mantida em gelo e incubada por 20 min, sob agitação, com sulfato de estreptomicina (concentração final igual a 1%). Após este período, a suspensão foi centrifugada (31500 X g, por 30 min) e a parte solúvel foi filtrada utilizando-se uma membrana com poro de 0,22 μm. Por fim, a Tsa1 ou Tsa2 foram separadas das demais proteínas por cromatografia de afinidade, utilizando coluna de níquel (GE Healthcare) ou cobalto (BD Biosciences). Para eluição da Tsa1 ou Tsa2 foi utilizado tampão fosfato 20 mM, pH 7,4 contendo 100 mM de cloreto de sódio e concentrações crescentes de imidazol (20, 100, e 200 mM). O excesso de imidazol da solução de Tsa1 ou Tsa2 foi removido por filtração em coluna de Sephadex G25 (PD-10, GE Healthcare) e as proteínas purificadas foram armazenadas em tampão fosfato 20 mM, pH 7,4, a 8 ℃.

21

#### 3.3. <u>Redução e quantificação de Tsa1 e Tsa2</u>

Antes de cada experimento, Tsa1 e Tsa2 foram reduzidas através de incubações de 1h30min com 10 mM de DTT, em temperatura ambiente. O excesso de DTT foi removido por filtração em colunas de Sephadex G25 (PD10, GE Healthcare). A concentração da enzima na solução obtida foi determinada por espectrofotometria em 280 nm, utilizando os coeficientes de extinção molar ( $\varepsilon_{280}$ Tsa1 = 23590 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>;  $\varepsilon_{280}$ Tsa2 = 26150 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) determinados pelo programa *ProtParam* (*ExPaSy Proteomics Server, the Swiss Institute of Bioinformatics*, Genebra, Suíça), disponível em (http://bo.expasy.org/tools/protparam.html) (Gasteiger *et al.*, 2005).

#### 3.4. Quantificação de tióis da Tsa1 e Tsa2

A concentração de sulfidrilas reduzidas nos estoques de Tsa1 ou Tsa2 foi determinada pelo ensaio do DTNB (ácido 5,5-ditio-2-nitrobenzoico) (Bonini & Augusto, 2001). Para isto, diluições das peroxirredoxinas em tampão fosfato 0,1 M, pH 9,0, foram misturadas a 1 mM de DTNB (preparado em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4), de forma que o pH final ficasse em torno de 8,3. Após 15 min de incubação em temperatura ambiente, a concentração de tióis nas proteínas foi determinada através da absorbância em 412 nm ( $\epsilon_{412}$  = 13600 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>).

#### 3.5. Estudos de cinética competitiva

Os valores das constantes de velocidade de segunda ordem das reações da Tsa1 e Tsa2 com peróxido de hidrogênio e peroxinitrito foram determinadas através do método de cinética competitiva (Winternbourn, 1987; Trujillo et al., 2004; Trujillo et al., 2008). A peroxidase de raiz forte (HRP) foi escolhida como competidora das peroxirredoxinas por reagir de forma rápida com peróxido de hidrogênio ( $k_{HRP}$ =1,7 x 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) (Dunford *et al.*, 1978) e peroxinitrito ( $k_{HRP}$ =1,02 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) (valor obtido por nosso grupo e por Floris *et al.*  (1993)), formando o composto I. Adicionalmente, a oxidação da HRP a composto I pode ser monitorada por espectrofotometria devido ao decaimento da absorbância em 403 nm ( $\Delta \epsilon_{403} = 5.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) durante o processo.

Os experimentos de cinética competitiva foram realizados em um espectrômetro de fluxo interrompido (Applied Photophysics SX-18MV) com tempo de mistura de aproximadamente 2 ms. Nestes experimentos, soluções de HRP contendo concentrações variadas de Tsa1 ou Tsa2 reduzidas (0-20  $\mu$ M) (preparadas em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, contendo 0,1 mM de DTPA) foram misturadas a concentrações sub-estequiométricas de peróxido de hidrogênio ou peroxinitrito, e a formação do composto I da HRP foi monitorada em 403 nm. Para determinar a fração de inibição da reação da HRP causada pelas adição de peroxirredoxinas, inicialmente, obteve-se o valor de  $\Delta$ Abs<sub>403</sub>, ou seja, a diferença entre a absorbância no final e no início da reação. A seguir, os valores de  $\Delta$ Abs<sub>403</sub> das reações com peroxirredoxinas foram divididos por  $\Delta$ Abs<sub>403</sub> da reação sem peroxirredoxinas, obtendo-se a proporção de composto I formado (1-F) e, conseqüentemente, a fração de inibição da reação da HRP e a constante de velocidade de segunda ordem da reação da peroxirredoxina é estabelecida pela Equação 1:

$$\left(\frac{F}{1-F}\right) k_{HRP}[HRP] = k_{Tsa}[Tsa]$$
(Equação 1)

Ao relacionar em um gráfico os valores de (F/1-F)k<sub>HRP</sub>[HRP] com as concentrações de peroxirredoxina que causaram esta inibição, determina-se uma reta cujo coeficiente angular é numericamente igual a constante de velocidade de segunda ordem para a reação da peroxirredoxina.

#### 3.6. Estudos de cinética direta

O valor de constante de velocidade de segunda ordem da reação entre Tsa1 e peroxinitrito também foi determinada através de experimentos de cinética direta, utilizando o método da velocidade inicial (Trujillo et al., 2004). Para isto, a decomposição do peroxinitrito (50  $\mu$ M) foi monitorada em 310 nm na ausência e presença de Tsa1 (50  $\mu$ M), em tampão fosfato 100 mM contendo 0,1 mM de DTPA, pH 7,4, a 25 °C ± 0,2, utilizando-se um espectrofotômetro de fluxo interrompido (Applied Photophysics SX-18MV) A decomposição do peroxinitrito é usualmente monitorada em 302 nm ( $\epsilon_{302}$ = 1,67 x 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), mas nestes experimentos, foi monitorada em 310 nm ( $\epsilon_{310}$ = 1,60 x 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) para evitar interferências causadas pela absorção de luz por proteínas (Trujillo et al., 2004). A velocidade inicial da reação entre Tsa1 e peroxinitrito foi determinada a partir do decaimento do peroxinitrito entre 2 e 10 ms, e fazendo-se as substituições adequadas, a constante de velocidade de segunda ordem foi determinada através da Equação 2:

$$\frac{d[ONOO^{-}]}{dt} = k_{Tsa1}[ONOO^{-}][Tsa1]$$
(Equação 2)

#### 3.7. Estudos de cinética competitiva por medidas de absorbância

Os estudos de cinética competitiva apresentados neste trabalho foram, em sua maioria, realizados em um espectrofotômetro de fluxo interrompido, mas resultados semelhantes foram obtidos utilizando um espectrofotômetro comum. Nestes experimentos, soluções de HRP (8  $\mu$ M) contendo diferentes concentrações de Tsa1 (0-16  $\mu$ M) foram misturadas a peróxido de hidrogênio (4  $\mu$ M) em tampão fosfato 100 mM, contendo 0,1 mM DTPA, pH 7,4, a 25 °C. Após 2 min de incubação, a oxidação da HRP a composto I foi verificada através da medida de absorbância em 403 nm ( $\Delta \epsilon_{403} = 5.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Subtraindo-se o valor encontrado nestas medidas pelo valor de absorbância de 8  $\mu$ M de HRP, determinou-se  $\Delta Abs_{403}$  de cada reação, o que permitiu a obtenção dos valores de F e

1-F. Assim como nos experimentos anteriores, a constante de velocidade de segunda ordem foi determinada através do gráfico que relaciona (F/1-F)k<sub>HRP</sub>[HRP] com as concentrações respectivas de Tsa1, seguindo-se a relação estabelecida pela Equação 1.

#### 3.8. Simulações cinéticas

Para simulações cinéticas foi utilizado o programa Gepasi (versão 3.3) (Mendes, 1993; Mendes, 1997). A formação do composto I da HRP foi simulada neste programa na presença de diferentes concentrações de Tsa1 ou Tsa2, utilizando as Equações 3 e 4 e os valores das constantes de velocidade de segunda ordem determinados neste trabalho ( $k_{HRP}$  e  $k_{Tsa}$ ).

$$HRP + H_2O_2 \xrightarrow{k_{HRP}} HRP_{compostoI}$$
(Equação 3)  
$$Tsa_{reduzida} + H_2O_2 \xrightarrow{k_{Tsa}} Tsa_{oxidada}$$
(Equação 4)

3.9. Oxidação da dihidrorodamina 123

Soluções de dihidrorodamina 123 (DHR) (100  $\mu$ M) em tampão fosfato (100 mM) pH 7,4 contendo as proteínas em estado reduzido ou não (0-45  $\mu$ M), foram misturadas rapidamente com peroxinitrito (20  $\mu$ M). A oxidação da DHR a rodamina foi monitorada em um espectrofotômetro a 500nm ( $\varepsilon_{500} = 78800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Crow, 1997). Soluções estoque de DHR foram preparadas em acetonitrila e guardadas a –20 °C, ao abrigo da luz.

#### 3.10. Linhagens de Saccharomyces cerevisiae e condições de cultivo

Foram utilizadas linhagens de *S. cerevisiae* do tipo selvagem (WT) e linhagens com deleção de Tsa1 ou Tsa2 ou ambas (Tabela 1), cedidas pelo Dr. Luis E. S. Netto (Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo). A linhagem WT foi transformada com o

plasmídeo YEp600 contendo o gene da Sod1 humana para obtenção de células que superexpressam Sod1. Este plasmídeo foi extraído da linhagem de levedura EGy118 cedida pela Dra. Edith B. Gralla (Departamento de Química e Bioquímica, University of California, Los Angeles).

 Linhagem
 Deleções
 Genótipo

 BY4741
 Matα; His3Δ1; Leu2Δ0; Met15 Δ0; Ura3Δ0

 tsa1Δ
 TSA1
 Matα; His3Δ1; Leu2Δ0; Met15 Δ0; Ura3Δ0; YML028W : : Kan mx4

 tsa2Δ
 TSA2
 Matα; His3Δ1; Leu2Δ0; Met15 Δ0; Ura3Δ0; YML028W : : Kan mx4

 tsa1Δ
 TSA2
 Matα; His3Δ1; Leu2Δ0; Met15 Δ0; Ura3Δ0; YDR453C : : Kan mx4

 tsa1Δtsa2Δ
 TSA1 e 2
 Matα; His3Δ1; Leu2Δ0; Met15 Δ0; Ura3Δ0; tsa1 : : KAN; tsa2 : LEU2

Tabela 1. Genótipos das linhagens de S. cerevisiae utilizadas.

Culturas permanentes destas linhagens foram mantidas a -80 °C em solução de glicerol estéril 20% mas, para evitar a perda de material por repetidos ciclos de congelamento e descongelamento, estoques foram também mantidos em placas com meio de cultura sintético YNB (*yeast nitrogen base*) (Difco) (Guthrie & Fink, 1991) suplementado por glicose (20 g/L), ágar (20 g/L) e *dropout* (1,18 g/L) (Tabela 2). O *dropout* é uma mistura de aminoácidos e nucleosídeos preparada de acordo com as quantidades especificadas na tabela 2. Para os experimentos em condições fermentativas, colônias de leveduras foram inoculadas em 10 mL do meio de cultura YNB, suplementado com *dropout* e 2% de glicose, e incubadas a 30 °C, sob agitação de 250 rpm, por 15 h. Após este período, as culturas foram diluídas para uma DO<sub>600</sub> = 0,2 e incubadas nas mesmas condições até atingirem DO<sub>600</sub> = 0,8, correspondente à fase logarítmica do crescimento. Para cultivo em condições respiratórias, a fonte de carbono do meio foi alterada para 3% de etanol ou uma mistura de 2% de glicose. Nestes experimentos, as colônias de levedura foram primeiramente cultivadas em meio fermentativo por 15 h e, após diluição para DO<sub>600</sub> = 0,2, foram cultivadas em meio respiratório por 8 h.

Nutrientes	Quantidade (g)	
Adenina (sal hemi-sulfato)	2,5	
L-arginina	1,2	
L-ácido aspártico	6	
L-ácido glutâmico	6	
L-histidina	1,2	
L-leucina	3,6	
L-lisina	1,8	
L-metionina	1,2	
L-fenilalanina	3	
L-serina	22,5	
L-treonina	12	
L-triptofano	2,4	
L-tirosina	1,8	
L-valina	9	
Uracila	1,2	
Isoleucina	2,4	

#### Tabela 2. Aminoácidos e nucleosídeos presentes no dropout.

#### 3.11. Experimentos de viabilidade

Tratamentos com concentrações tóxicas (1-2 mM) de peróxido de hidrogênio ou peroxinitrito foram realizados com as linhagens WT,  $tsa1\Delta$ ,  $tsa2\Delta$  e  $tsa1\Delta$ tsa2 $\Delta$ , coletadas na fase exponencial do crescimento. Nos experimentos com peróxido de hidrogênio, 5 x 10<sup>7</sup> células de cada linhagem foram lavadas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 contendo 0,1 mM de DTPA e foram ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura. Metade das suspensões celulares foi tratada com 1 ou 2 mM de peróxido de hidrogênio por 30 min, a 30 °C, sob agitação de 350 rpm. A outra metade foi incubada nas mesmas condições, mas não receberam o tratamento com o oxidante. Após este período, as suspensões fora diluídas e 100 µL das diluições  $1/10^4$  e  $1/10^5$  foram plaqueadas em meio YNB com ágar. Após 2 dias incubação em estufa a 30 °C, o número de colônias (UFC) em cada placa foi contado. Os

resultados mostram a porcentagem de UFC das amostras tratadas em relação aos controles correspondentes. Nos experimentos com peroxinitrito, as amostras foram ressuspendidas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, contendo 0,1 mM de DTPA, ao invés de meio de cultura e o peroxinitrito foi adicionado em fluxo de 0,4 µmol/min, de forma que a concentração final fosse 1 ou 2 mM. As diluições seriais e o plaqueamento foram realizados como descrito para os experimentos com peróxido de hidrogênio.

#### 3.12. Consumo de peróxido de hidrogênio

A velocidade de consumo de peróxido de hidrogênio foi determinada para as linhagens WT,  $tsa1\Delta$ ,  $tsa2\Delta$  e  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  através do teste FOX (Wolff, 1994). Para isto, células na fase exponencial do crescimento foram tratadas com 1 mM de peróxido de hidrogênio, a 30 °C, sob agitação. Após 2,5, 5, 10, 20 e 30 min de incubação, 50 µL de cada amostra foram diluídos em meio de cultura e misturados a 950 µL de reagente FOX (100 µM de alaranjado de xilenol; 250 µM de sulfato ferroso amoniacal; 100 mM de sorbitol; 25 mM de ácido sulfúrico). Após 30 min à temperatura ambiente, a absorbância destas amostras foi lida em 560 nm e comparada com os valores de uma curva padrão feita com soluções de peróxido de hidrogênio de concentrações conhecidas (0 a 5 µM).

#### 3.13. Produção do radical 1-hidroxietila

A produção de radicais livres foi estudada por EPR, utilizando um espectrômetro Bruker ER 200D-SRD de banda X modernizado com instrumentação EMX e equipado com cavidade de alta sensibilidade (4119HS). Estes experimentos foram realizados com as linhagens WT,  $tsa1\Delta$ ,  $tsa2\Delta$  e  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  cultivadas em meio fermentativo e com as linhagens WT e  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  cultivadas em meio respiratório. Em ambos os casos, 5 x 10<sup>7</sup> células de cada linhagem foram ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura e incubadas com 90 mM de POBN ( $\alpha$ -(4-piridil-1-óxido)-*N*-tert-butilnitrona) por 5 min, em temperatura ambiente (Roe et al., 2002). A seguir, estas amostras foram tratadas com 1 mM de peróxido de hidrogênio por 30 min, sob agitação de 350 rpm e transferidas para uma cela de quartzo para obtenção dos espectros de EPR. Este procedimento foi um pouco alterado nos experimentos com peroxinitrito, que foi adicionado às suspensões celulares em fluxo de 0,4 µmol/min (concentração final igual a 2 mM). Em alguns experimentos, as células foram tratadas como descrito acima, mas 171 mM de [2-<sup>13</sup>C] etanol foram adicionados à incubação. Também foram realizados experimentos onde as células foram pré-incubadas com 2 mM de desferrioxamina ou 10 mM de dietilditiocarbamato por 30 min ou 1 h antes da adição do peróxido de hidrogênio. Por fim, suspensões celulares da WT e *tsa1∆tsa2∆* foram aquecidas a 90 °C por 20 min antes da adição de POBN e peróxido de hidrogênio.

O papel da enzima Sod1 na produção de radicais também foi estudado por EPR, em experimentos com as linhagens WT e  $tsa1 \Delta tsa2 \Delta te$  com enzimas purificadas. Nos estudos *in vivo*, 5 x 10<sup>7</sup> células/mL foram pré-incubadas com 10 mM de dietilditiocarbamato, 10 mM de batocuproína ou 2 mM de desferrioxamina, a 30 °C, por 30 min, ou foram aquecidas a 90 °C por 20 min. A seguir, estas amostras foram tratadas com 1 mM de peróxido de hidrogênio (na presença de 90 mM de POBN), a 30 °C, por 30 min. Nos experimentos com proteínas purificadas, 10  $\mu$ M de catalase, peroxidase de raiz forte, citocromo *c* ou Sod1 foram incubados com 90 mM de POBN, 1 mM de peróxido de hidrogênio e 171 mM de etanol, por 30 min, a 30 °C, em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, contendo 0,1 mM de DTPA. Apenas com a Sod1 foram realizados experimentos cinéticos, variando-se a concentração de etanol (43 - 171 mM) e o tempo de incubação (2 - 60 min). Neste caso, a produção de radicais foi quantificada comparando-se os valores obtidos após a dupla integração dos espectros em cada condição, com o da dupla integração do espectro de 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidine-1-oxila obtido no mesmo dia e nas mesmas condições instrumentais.

29

#### 3.14. Detecção de ferro "quelatável"

A detecção de ferro "quelatável" nas linhagens WT e tsa1 dtsa2 foi realizada como descrito Srinivasan e colaboradores (2000), com algumas modificações. em Aproximadamente 10<sup>9</sup> células de cada linhagem foram coletadas na fase exponencial e ressuspendidas em 10 mL de meio de cultura YNB, sem glicose, contendo 2 mM de desferrioxamina. Após incubação de 30 min, a 30 ℃, com agitação, estas leveduras foram lavadas com 10 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 gelado e ressuspendidas em 400 μL do mesmo tampão contendo 40 µL de glicerol. Estas amostras foram transferidas para seringas descartáveis de 1 mL e congeladas em nitrogênio líquido. Para aquisição dos espectros de EPR, a ponta da seringa foi cortada com uma tesoura e a amostra ainda congelada foi despejada em um Dewar preenchido com nitrogênio líquido. A quantificação de ferro "quelatável" nestas amostras foi feita utilizando-se uma curva padrão, preparada a partir de espectros de EPR de soluções de 2 mM de desferrioxamina, 10% de glicerol e diferentes concentrações de sulfato ferroso amoniacal. A concentração de desferrioxamina-Fe(III) em cada solução foi determinada por espectrofotometria em 430 nm ( $\epsilon_{430}$  = 2.865 M<sup>-</sup> <sup>1</sup>.cm<sup>-1</sup>) (Yegorov et al., 1993). Os espectros de EPR dos padrões foram obtidos no mesmo dia e sob as mesmas condições instrumentais utilizadas para as amostras. Com os valores da dupla integração dos espectros de EPR foi possível construir uma curva padrão e determinar os níveis de desferrioxamina-Fe(III) presentes na WT e tsa1 dtsa2 d.

#### 3.15. Determinação da concentração de ferro, cobre e zinco

A concentração total de ferro, cobre e zinco nas linhagens WT e *tsa1∆tsa2∆* foi determinada através de espectroscopia de absorção atômica. Para estes experimentos, 10<sup>9</sup> células das duas linhagens, coletadas como no item anterior, foram lavadas em água deionizada, ressuspendidas em uma solução composta por ácido nítrico, peróxido de hidrogênio e água (2v: 1v: 3v), e digeridas em forno de microondas. A análise do conteúdo

de metais nestas amostras foi feita em um espectrômetro de absorção atômica (Analytikjena AG, AAS ZEEnit 60). Íons ferro foram detectados a 324,8 nm, cobre a 248,3 nm e zinco a 213,9 nm (Naozuka & Oliveira, 2007).

#### 3.16. Determinação da concentração de peróxidos totais

Os níveis de peróxidos totais nas linhagens WT e *tsa1* $\Delta$  *tsa2* $\Delta$  foram determinados por FOX (Wolff, 1994; Salmon et al., 2000). Cerca de 5 x 10<sup>7</sup> células/mL de cada linhagem foram lavadas e ressuspendidas em meio de cultura e foram tratadas ou não com 1 mM de peróxido de hidrogênio. Após 30 min de incubação, as células foram lavadas duas vezes e ressuspendidas em 100 µl de tampão fosfato 50 mM. O mesmo volume de pérolas de vidro (425-600 µm) foi adicionado e as amostras foram agitadas em vórtex (1 min) e resfriadas em gelo. Após a adição de 900 µL de metanol frio contendo 4 mM de hidroxitolueno butilado, as amostras foram agitadas em vórtex por 2 vezes (1 min cada vez) e resfriadas em gelo. A seguir, as amostras foram centrifugadas (1000 x g, 10 min) e os sobrenadantes foram recuperados (100 µL) e misturados a 900 µL do reagente FOX (100 µM de alaranjado de xilenol; 250 µM de sulfato ferroso amoniacal; 25 mM de ácido sulfúrico e 4 mM de hidroxitolueno butilado preparado em 90% (v/v) de metanol). Após 30 min de incubação à temperatura ambiente, a absorbância das amostras foi lida a 560 nm. De acordo com curvas de calibração realizados com peróxidos padrão, um coeficiente de extinção aparente foi determinado (4,5 x 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (Salmon et al., 2000).

#### 3.17. Preparação de extratos celulares

Extratos das linhagens WT e *tsa1*Δ*tsa2*Δ foram obtidos como descrito em Munhoz & Netto (2004). Células das duas linhagens foram coletadas na fase exponencial do crescimento. A seguir, foram lavadas e ressuspendidas em tampão Hepes 50 mM, contendo 50 mM de cloreto de sódio, 2 µg/mL de leupeptina e 1 µg/mL de pepstatina. O mesmo

volume de pérolas de vidro (425-600  $\mu$ m) foi adicionado. Após 2 ciclos de 6 min de agitação em vórtex e 6 min de resfriamento em gelo, as amostras foram centrifugadas a 16000 x g por 5 min. Os sobrenadantes foram coletados e centrifugados a 16000 x g por 30 min para remoção de precipitados.

#### 3.18. Expressão de SOD1 em células WT e tsa1∆tsa2∆

Os níveis de Sod1 nas linhagens WT e tsa1/sta2/ foram determinados através de western blot. Para isto, 40 µg de extratos celulares de ambas linhagens foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) e transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-D Extra, Amersham Biosciences). A membrana foi lavada com tampão TBS (NaCl 150 mM; Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) por 3 vezes (10 min cada vez) e bloqueada com TBST (tampão TBS acrescido de 0,05% de Tween-20) contendo 5% de leite desnatado (incubação em temperatura ambiente por 90 min). Excesso da solução bloqueadora foi removido por 3 lavagens de 10 min com TBST. A membrana foi incubada por 2 h com anticorpo primário anti-Sod1 humana (Calbiochem) (diluição 1:1500, preparada em TBST contendo 0,1% de leite desnatado) e novamente lavada com TBST. O anticorpo secundário utilizado foi o anti-IgG (ovelha) conjugado com peroxidase (Calbiochem) (diluição 1:7000), também preparado em TBST contendo 0,1% de leite desnatado. Esta incubação foi feita por 1 h, em temperatura ambiente e o excesso de anticorpo foi removido através de 3 lavagens, de 10 min cada, com TBST. A presença de Sod1 foi revelada em filme de raios-X após tratamento da membrana por 5 min com soluções de peróxido e luminol do kit de detecção SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology). Após a digitalização dos filmes de raio-x, as bandas foram quantificadas por densitometria, utilizando o programa ImageQuant V5.2, (Molecular Dynamics).

#### 3.19. Atividade dismutásica em extratos de células WT e tsa1∆tsa2∆

A atividade dismutásica das linhagens de WT e *tsa1∆tsa2∆* foi estudada através do monitoramento da inibição da redução do citocromo *c* por diferentes quantidades de extratos celulares e, também, em gel nativo.

Para estudar a atividade dismutásica em gel nativo (Beauchamp & Fridovich, 1971; Flohé & Otting, 1984), 40 μg de extratos celulares das duas linhagens foram separados por eletroforese em gel nativo de poliacrilamida (12%). Após a eletroforese, o gel foi incubado no escuro com uma solução composta por 0,25 mg/mL de NBT e 0,1 mg/mL de riboflavina por 20 min. A seguir, adicionou-se uma solução de 10 mg/mL de TEMED e o gel foi exposto a luz, sob agitação, até o aparecimento das bandas. A atividade dismutásica foi estimada através da quantificação destas bandas por densitometria, utilizando o programa *ImageQuant* V5.2, (*Molecular Dynamics*).

A atividade dismutásica também foi estudada através do monitoramento da inibição da redução do ferricitocromo *c* por diferentes concentrações de extratos de células WT e *tsa1∆tsa2∆* (0-50 µg) (McCord & Fridovich, 1969; Oberley & Spitz, 1985). Para produção de superóxido, foram utilizados 100 µM de xantina e xantina oxidase (uma quantidade de enzima suficiente para causar variação de absorbância de 0,025 unidade/min) e para reduzir o peróxido de hidrogênio produzido pela oxidação da xantina, também foi adicionada uma unidade de catalase. As reações foram preparadas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, contendo 0,1 mM de DTPA, a 30 °C e foram monitoradas em 550 nm por 150 segundos. Os resultados destes experimentos são expressos em um gráfico que relaciona a porcentagem de inibição foi utilizada a Equação 5:

#### 3.20. Atividade peroxidásica das linhagens WT e tsa1 Atsa2 A

A atividade peroxidásica dependente de bicarbonato das linhagens WT e *tsa1∆tsa2∆* foi estudada por EPR, monitorando-se a oxidação do captador de spin DMPO a DMPO/•OH. Nestes experimentos, 5x10<sup>7</sup> células lavadas e ressuspendidas em 1 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, contendo 0,1 mM de DTPA, foram incubadas com 80 mM de DMPO por 5 min à temperatura ambiente. A seguir, estas amostras foram tratadas com 1 mM de peróxido de hidrogênio e 25 mM de bicarbonato de sódio (15 min, 30 °C) e imediatamente transferidas para celas de quartzo para aquisição dos espectros de EPR.

#### 3.21. Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA das linhagens WT e tsa1/dtsa2/ foi realizada de acordo com Ramirez e colaboradores (2007) com modificações (Philippsen et al., 1991). Inicialmente, as células (1 x 10<sup>8</sup>) das linhagens WT e *tsa1* dtsa2 lavadas por 2 vezes com água, foram ressuspendidas e incubadas em 800 µL do tampão de digestão da parede celular (sorbitol 0,9 M; EDTA 0,1 M; ditiotreitol 50 mM e 3.5 mg/mL de zymolyase 20T) por 2 h, a 37 °C. Após este período, as amostras foram centrifugadas (1000 x g, 10 min) e os esferoblastos obtidos foram ressuspendidos em 500 μL de tampão de lise (SDS 1%; NaCl 100 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; DTPA 25 mM), aos quais foram adicionados 25 µL de uma solução de proteinase K (20 mg/mL de proteinase K; CaCl<sub>2</sub> 1 mM; Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). Após 1 h de incubação a 52℃, as amostras foram resfriadas até 37℃, e tratadas com 10 µL de uma solução de RNAse (RNAse 20 mg/mL; acetato de sódio 1 mM, pH 4,5) por 1 h, a 37 ℃. A seguir, 500 μL de fenol, pH 8,0 foi adicionado às amostras e misturado por inversão. Após centrifugação (11.700 x g, 2 min), 350 µL da fase aguosa (superior) de cada amostra foram transferidos para um novo tubo, que receberam também, 150 µL de tampão de lise, 250 µL de fenol e 250 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24v:1v). Após nova centrifugação (11700 x g, 2 min), 350 µL da fase aquosa foram transferidos para um novo tubo e acrescentou-se
150  $\mu$ L de tampão de lise e 500  $\mu$ L da solução de clorofórmio: álcool isoamílico. Após nova centrifugação (11700 x g, 2 min), 300  $\mu$ L da fase aquosa foram recuperados e misturados a 750  $\mu$ L de isopropanol gelado e 36  $\mu$ L de acetato de amônio 9 M. As amostras foram incubadas a -20 °C por no mínimo 1 h e, após este período, foram centrifugadas (11700 x g, 5 min) e lavadas 2 vezes com etanol 70% gelado. O DNA obtido foi ressuspendido em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM). A concentração de DNA nestas soluções foi determinada por absorbância 260 nm. Considera-se que 1 unidade de absorbância neste comprimento de onda corresponde a 50  $\mu$ g/mL de DNA dupla fita. A absorbância em 280 nm também monitorada para determinar a contaminação por proteínas; nos experimentos foram utilizadas apenas amostras cuja razão A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> era maior que 1,8.

#### 3.22. Detecção de adutos de DMPO no DNA das linhagens WT e tsa1 Atsa2 A

A detecção de adutos de DMPO/DNA das linhagens WT e *tsa1∆tsa2∆* foi realizada por imuno-*slot blot*, como descrito por Ramirez e colaboradores (2007).

Cerca de 5 x 10<sup>7</sup> células/mL das linhagens WT e *tsa1* $\Delta$ *tsa2* $\Delta$  foram lavadas, ressuspendidas em meio de cultura e tratadas com 100 mM de DMPO e 1 mM de peróxido de hidrogênio, por 30 min, 30 °C. Após este tratamento, o DNA destas amostras foi extraído como descrito acima, e diluído em 100 µL de água para uma concentração final igual a 10 ng/µL. Para desnaturar o DNA, esta solução diluída foi fervida por 10 min, resfriada em gelo e misturada a 100 µL de NaOH 1M. As amostras desnaturadas de DNA foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Hybond-C Extra, Amersham Biosciences*), utilizando um aparelho de *slot blot.* Para esta transferência, a membrana foi posicionada no aparelho sobre 2 folhas de papel Whatman 3 MM umedecidos com SSC 2X (NaCl 3 M; citrato de sódio 0,3 M e pH ajustado para 7,0 com HCl). O DNA foi aplicado nos *slots* e foi deixado em contato com a membrana por 60 min. Somente após este intervalo é que a bomba de vácuo conectada ao aparelho foi ligada. Após a passagem da solução de DNA, a membrana foi

incubada com uma solução de neutralização por 30 min (EDTA 1 mM; NaCl 1,5 M; Tris-HCl, 0,5 M pH 7,2). Por fim, a membrana foi lavada com água destilada e guardada.

Para detecção dos adutos de DMPO/DNA, a membrana foi bloqueada com tampão PBS, contendo 3% de leite desnatado (NaCl 0,725 M; KCl 0,027 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,08 M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,014 M), por 1 hora, sob agitação. Antes da incubação com anticorpo primário, a membrana foi lavada com PBS, contendo 0,05% de leite desnatado e 0,1% de *Tween-20*, por 10 min. O anticorpo anti-DMPOna foi diluído (1:10000) neste tampão de lavagem e foi incubado com a membrana por 1 h, à temperatura ambiente. Após 3 lavagens de 10 min, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG (coelho) conjugado com peroxidase (Sigma), que foi diluído no tampão de lavagem (1:10000), por 1 h. O excesso de anticorpo foi removido por mais 3 lavagens de 10 min. A presença de adutos de DMPO/DNA foi revelada em filme de raio-X, após tratamento da membrana por 5 min com soluções de peróxido e luminol do *kit* de detecção *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (*Pierce Biotechnology*).

# 3.23. <u>Incorporação de <sup>14</sup>C no DNA das linhagens WT e *tsa1∆tsa2∆* metabolizando glicose e <sup>14</sup>C-glicose</u>

O cultivo das linhagens WT e *tsa1∆tsa2∆* em meio suplementado com <sup>14</sup>C- glicose foi realizado como descrito por Sentandreu & Northcote (1969), com modificações. Foi utilizada <sup>14</sup>C-glicose (Schwarz/Mann) de atividade específica de 230 mCi/mM e concentração de 1 mCi/mL.

Cerca de 2 x 10<sup>8</sup> células de cada linhagem foram ressuspendidas em 500 μL de meio de cultura, contendo 4 vezes menos glicose que o usual e suplementado com 50 μCi de <sup>14</sup>Cglicose. A seguir, foi feito o tratamento com 1 mM de peróxido de hidrogênio por 30 min, 30 °C, na presença ou ausência de 90 mM do captador de spin POBN. Após este período, as amostras foram lavadas e procedeu-se a extração de DNA, como descrito anteriormente. Cem nanogramas de DNA de cada condição experimental foram transferidos para papel defiltro e incubados com 5 mL de líquido de cintilação. A detecção de produtos derivados da glicose radioativa no DNA das linhagens foi feita em um detector de radioisótopos por cintilação líquida (*Liquid scintillation analyser*, 1660 TR, Packard).

## 4. RESULTADOS

#### 4.1. Cinética das reações das peroxirredoxinas Tsa1 e Tsa2 com peróxidos

#### 4.1.1 Validação do método de cinética competitiva

Estudos cinéticos baseados na determinação da velocidade inicial da reação das peroxirredoxinas com peróxidos só foram realizados com peroxinitrito, pois este é o único peróxido cuja decomposição pode ser monitorada por espectrofotometria em concentrações na faixa de micromolar (Beckman et al., 1990; Bryk et al., 2000; Jaeger et al., 2004; Trujillo et al., 2004). Porém, mesmo o peroxinitrito apresenta um valor de coeficiente de extinção molar relativamente baixo ( $\varepsilon_{302}$ = 1,67 x10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) e sua absorção máxima ocorre em uma faixa do espectro de ultra-violeta em que as proteínas também absorvem luz, exigindo o uso de concentrações altas de reagentes (30-50 µM) para obtenção de medidas confiáveis. Para contornar esta limitação é que desenvolvemos um método competitivo para os estudos cinéticos das peroxirredoxinas Tsa1 e Tsa2 (Winterbourn, 1987; Trujillo et al., 2004).

Antecipando que as constantes de velocidade de segunda ordem da Tsa1 e Tsa2 em reações com peroxinitrito e peróxido de hidrogênio seriam altas, a peroxidase de raiz forte (HRP) foi escolhida como competidora das peroxirredoxinas. A HRP reage rapidamente com peróxido de hidrogênio ( $k_{HRP}$ = 1,7 x 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) (Dunford et al., 1978) e peroxinitrito ( $k_{HRP}$ =1,02 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) (valor obtido por nosso grupo e por Floris et al. (1993)) para formar composto I. Esta reação é facilmente monitorada em 403 nm devido a grande diferença de absorbância entre as formas nativa e oxidada da HRP ( $\Delta \epsilon_{403} = 5,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Esta característica permitiu o uso de concentrações baixas dos reagentes nos experimentos de competição. As reações concorrentes nestes experimentos são similares às descritas nas Equações 3 e 4 (substituindo-se o peróxido de hidrogênio por peroxinitrito, dependendo do experimento).

Primeiramente, para validar o método competitivo, a constante de velocidade de segunda ordem da reação entre Tsa1 e peroxinitrito foi determinada por cinética direta, utilizando o método da velocidade inicial, e também através da competição com HRP. No

experimento de competição, a oxidação de 8  $\mu$ M de HRP por 8  $\mu$ M de peroxinitrito foi monitorada na presença de diferentes concentrações de Tsa1 (0 - 20  $\mu$ M). A inibição da reação da HRP com peroxinitrito foi dependente da concentração de Tsa1 utilizada (Fig. 2), por isso, a constante de velocidade da reação entre Tsa1 e peroxinitrito pôde ser obtida através da relação estabelecida pela Equação 1. O gráfico que relaciona os valores de (F/1-F)k<sub>HRP</sub>[HRP] com as concentrações respectivas de Tsa1 gerou uma reta, cujo coeficiente angular é numericamente igual ao valor da constante de velocidade de segunda ordem da reação entre Tsa1 e peroxinitrito (7,4 ± 0,9 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, pH 7,4 e 25 °C) (Fig. 2).



Fig. 2. Determinação do valor da constante de velocidade da reação entre Tsa1 e peroxinitrito por cinética competitiva. (A) Inibição da formação do composto I da HRP pelas concentrações especificadas de Tsa1 em misturas contendo HRP (8,2  $\mu$ M) e peroxinitrito (8  $\mu$ M) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, contendo 0,1 mM de DTPA, a 25 °C. (B) Gráfico de (F/(1-F)) $k_{HRP}$ [HRP] versus [Tsa1], de acordo com os dados obtidos em A. O coeficiente angular da reta determinada neste gráfico é numericamente igual ao  $k_{Tsa1} = (7,5 \pm 0,9) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

A seguir, a velocidade inicial da reação entre Tsa1 e peroxinitrito foi determinada através do decaimento de peroxinitrito (50  $\mu$ M), na presença e na ausência de 50  $\mu$ M da enzima (Beckman et al., 1990; Bryk et al., 2000; Trujillo et al., 2004) (Equação 3 e Fig. 3). Este experimento foi repetido duas vezes, e a constante de velocidade de segunda ordem aparente foi igual a  $6,5 \pm 1,0 \times 10^5 \,\text{M}^{-1} \,\text{s}^{-1}$ , pH 7,4 e 25°C, um valor próximo ao determinado por cinética competitiva, validando este método.



Fig.3. Determinação do valor da constante de velocidade da reação entre Tsa1 e peroxinitrito por cinética direta (método da velocidade inicial). O decaimento de 50 μM de peroxinitrito na ausência e na presença de 50 μM de Tsa1 em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, contendo 0,1 mM de DTPA, a 25 °C foi monitorado a 310 nm. A partir da velocidade inicial da decomposição do peroxinitrito nas duas condições foi possível determinar a constante de velocidade.

4.1.2. <u>Cinética das reações entre Tsa1 e Tsa2 com peróxido de hidrogênio e</u> peroxinitrito

A constante de velocidade da reação entre Tsa2 e peroxinitrito também foi determinada em experimentos de competição com HRP. Assim como a Tsa1, a Tsa2 inibiu a reação da HRP de forma dependente da concentração, e a constante de velocidade de

sua reação com peroxinitrito foi determinada através do gráfico que relaciona (F/(1-F))k<sub>HRP</sub>[HRP] com as concentrações respectivas da enzima. O valor obtido foi 5,1 x  $10^5 \pm 0,6$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, em pH 7,4 (Fig. 4).



Fig. 4. Determinação do valor da constante de velocidade da reação entre Tsa2 e peroxinitrito por cinética competitiva. (A) Inibição da formação do composto I da HRP pelas concentrações especificadas de Tsa2 em misturas contendo HRP (8  $\mu$ M), peroxinitrito (8  $\mu$ M) e DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, a 25 °C. (B) Gráfico de (F/(1-F)) $k_{HRP}$ [HRP] versus [Tsa2], de acordo com os dados obtidos em A. O coeficiente angular da reta determinada neste gráfico é numericamente igual ao  $k_{Tsa2} = (5, 1 \pm 0, 6) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

Utilizando a mesma abordagem, as constantes de velocidade das reações da Tsa1 e Tsa2 com peróxido de hidrogênio foram determinadas (Figs. 5 e 6). Os valores obtidos foram 2,2 x 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> e 1,3 x 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, para Tsa1 e Tsa2 respectivamente, e são cerca de 100 vezes maiores que os atribuídos até então para peroxirredoxinas de diversas espécies (inclusive de levedura). Estes resultados mostram que, na verdade, as peroxirredoxinas são capazes de reduzir peróxido de hidrogênio de forma tão eficiente quanto heme- e selênioproteínas.



Fig. 5. Determinação do valor da constante de velocidade da reação entre Tsa1 e peróxido de hidrogênio. (A) Oxidação da HRP (3,67  $\mu$ M) por peróxido de hidrogênio (1,5  $\mu$ M) na presença de diferentes concentrações de Tsa1 (0-7,8  $\mu$ M). As reações foram feitas em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, contendo 0,1 mM de DTPA, a 25 °C. (B) Gráfico de (F/(1-F))k<sub>HRP</sub>[HRP] versus [Tsa1]. Coeficiente angular =  $k_{Tsa1}$  = 2,2 x 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>.



Fig. 6. Determinação do valor da constante de velocidade da reação entre Tsa2 e peróxido de hidrogênio por cinética competitiva. As misturas de reação continham HRP (3,67  $\mu$ M), peróxido de hidrogênio (1,5  $\mu$ M) e as concentrações especificadas de Tsa2. As reações foram feitas em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, contendo 0,1 mM de DTPA, a 25 °C. (A) Formação do composto I da HRP na presença das concentrações especificadas de Tsa2. A linha sem ruído corresponde a simulação deste experimento realizada no programa Gepasi. (B) Gráfico de (F/(1-F))k<sub>HRP</sub>[HRP] versus [Tsa2]. O coeficiente angular da reta =  $k_{Tsa2} = 1,30 \pm 0.14 \times 10^7$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>.

Como exposto anteriormente, experimentos de cinética direta não poderiam ser feitos com peróxido de hidrogênio, por isso, as constantes de velocidade das reações da Tsa1 e Tsa2 com peróxido de hidrogênio foram validadas através de simulações cinéticas, utilizando o programa Gepasi (Mendes, 1993; Mendes, 1997). Nesta abordagem, a formação do composto I da HRP foi simulada, utilizando-se diferentes concentrações de Tsa1 ou Tsa2, e empregando-se as constantes de velocidade das peroxirredoxinas, determinadas através dos experimentos de competição, e a constante de velocidade da HRP, determinada por Dunford e colaboradores (1978). A aproximação entre o decaimento da HRP observado nos experimentos e nas simulações serviu para validar mais uma vez o método competitivo (Fig. 6).

A constante de velocidade da reação entre Tsa1 e peróxido de hidrogênio também foi determinada em um espectrofotômetro comum, pois espectrômetros de fluxo interrompido não são amplamente encontrados. No espectrofotômetro comum, o decaimento da HRP não é monitorado, mas a concentração fina de composto I formado pode ser determinada através de medidas de absorbância em 403 nm. Nestes experimentos, soluções de HRP (4 μM) contendo diferentes concentrações de Tsa1 (0-16 μM) foram misturadas rapidamente ao peróxido de hidrogênio, e após 2 min de incubação, a absorbância das misturas foi determinada no espectrofotômetro. Novamente, a inibição da oxidação da HRP por peróxido de hidrogênio foi dependente da concentração de Tsa1 utilizada, e através do gráfico que relaciona (F/(1-F))k<sub>HRP</sub>[HRP] versus [Tsa1] foi obtido o valor de 2,5 x 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> para a constante de velocidade de segunda ordem desta reação (Fig. 7). Este valor é bem próximo do determinado em espectrômetros de fluxo interrompido, ampliando a aplicabilidade do método competitivo.



Fig. 7. Determinação do valor da constante de velocidade da reação entre Tsa1 e peróxido de hidrogênio por medidas de absorbância. Foram feitas misturas de HRP (8  $\mu$ M) e Tsa1 (concentrações especificadas na figura) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, contendo 0,1 mM de DTPA. À estas misturas foram adicionados 4  $\mu$ M de peróxido de hidrogênio e após 2 min de incubação, a formação do composto I da HRP foi monitorada a 403 nm. (A) Formação do composto I da HRP na presença das concentrações especificadas de Tsa1. (B) Gráfico de (F/(1-F)k<sub>HRP</sub>[HRP]. Coeficiente angular da reta =  $k_{Tsa1} = 2,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

## 4.1.3. Determinação do pKa da cisteína peroxidásica de Tsa1 e Tsa2

Os valores das constantes de velocidade determinadas para reações entre Tsa1 e Tsa2 com peróxido de hidrogênio são bastante altas (k~ 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>), principalmente quando comparadas com as constantes publicadas para reações entre glutationa ou cisteína livre com o mesmo oxidante (respectivamente, 0,89 e 2,9 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) (Winterbourn & Hampton, 2008). A eficiência catalítica das peroxirredoxinas está associada à manutenção da cisteína peroxidásica na forma tiolato, e por isso, um baixo valor de pK<sub>a</sub> é esperado. Para determinar o pK<sub>a</sub> da cisteína peroxidásica (Cys<sup>47</sup>) da Tsa1 e Tsa2, o método competitivo, utilizando a HRP como competidora das peroxirredoxinas, também foi empregado. Nestes experimentos, o valor da constante de velocidade de segunda ordem das reações entre Tsa1 e Tsa2 e peróxido de hidrogênio foi determinada em diferentes pHs (4,5 a 7,4), aproveitando que nesta faixa, a reação da HRP com peróxido de hidrogênio é independente de pH. Os valores das constantes de velocidade determinadas foram relacionadas em um gráfico com os pHs correspondentes e um único pK<sub>a</sub> de 5,4 e 6,3 foi determinado para Tsa1 e Tsa2, respectivamente (Fig. 8). Estes valores são atribuídos a cisteína peroxidásica (Cys<sup>47</sup>), pois a cisteína de resolução (Cys<sup>170</sup>) provavelmente apresenta um valor de pK<sub>a</sub> similar ao determinado para cisteína livre (pK<sub>a</sub>= 8,4).



Fig. 8. Variação do valor da constante de velocidade de segunda ordem da reação entre Tsa1 ( $\bullet$ ) ou Tsa2 ( $\bullet$ ) com peróxido de hidrogênio em função do pH. As constantes de velocidade foram determinadas nas mesmas condições experimentais descritas nas legendas das figuras 5 e 6, com exceção do pH da reação. Tampão fosfato 100 mM foi usado no intervalo de pH de 4,5 – 5,8 e o tampão fosfato foi usado no intervalo de 6,0 – 7,4.

#### 4.1.4. A reação entre Tsa1 e Tsa2 com peroxinitrito

Os valores das constantes de velocidade de segunda ordem das reações com peroxinitrito são menores que os determinados com peróxido de hidrogênio, porém a esta

comparação deve ser feita com cautela, pois a decomposição do peroxinitrito é bastante complexa (Augusto et al., 2002; Trujillo et al., 2008). O peroxinitrito apresenta pK<sub>a</sub> baixo, em torno de 6,6 e decompõe-se rapidamente ao ser protonado (k= 0,17 s<sup>-1</sup>, pH 7,4 e 25°C), produzindo nitrato (65%) e dióxido de nitrogênio, além do radical hidroxila (35%) (Equação 6).

$$ONOO \xrightarrow{H^{*}}_{pK_{s}=6,6} ONOOH \longrightarrow [ONO^{*}OH] \xrightarrow{*} 0,65 \text{ NO}_{3}^{*} + 0,65 \text{ H}^{+} \\ 0,35 \text{ NO}_{2}^{*} + 0,35 \text{ HO}^{\bullet}$$
(Equação 6)

Deste modo, a reação direta do peroxinitrito com seus alvos, compete com seu decaimento unimolecular, cujos produtos (NO<sub>2</sub><sup>•</sup> e HO<sup>•</sup>) podem oxidar os mesmos alvos. Grupos tiól são oxidados diretamente por peroxinitrito por mecanismo de dois elétrons, produzindo o ácido sulfênico correspondente, que a seguir reage com um segundo tiól, formando um dissulfeto (Equação 7). Deste modo, a estequiometria da reação é de 2 tióis oxidados para cada peroxinitrito (Gatti et al., 1994; Quijano et al., 1997; Bonini & Augusto, 2001; Trujillo & Radi, 2002; Carballal et al., 2003).

$$ONOO^{-} + RS^{-} \xrightarrow{RSOH} RSSR + OH^{-}$$

$$NO_{2}^{-} \qquad (Equação 7)$$

Grupos tiól também podem reagir com os radicais derivados do decaimento unimolecular do peroxinitrito, produzindo radicais tiila e sulfenila, que por sua vez, podem iniciar reações em cadeia (Gatti et al., 1994; Quijano et al., 1997; Bonini & Augusto, 2001). A estequiometria deste último processo pode variar de acordo com as condições experimentais, mas é sempre menor que 2 tióis por peroxinitrito, pois apenas 35% deste oxidante se decompõe a radicais (Radi et al., 2000; Augusto et al., 2002) (Equação 6). Em conjunto, estas características tornaram necessário o estudo mais detalhado da reação do peroxinitrito com Tsa1 e Tsa2.

A dependência de tióis reduzidos para a ocorrência da reação entre peroxirredoxinas e peroxinitrito foi determinada através de experimentos de competição com dihidrorodamina. Nestes experimentos, soluções de diferentes concentrações de Tsa1 ou Tsa2 (oxidadas ou reduzidas), contendo dihidrorodamina, foram misturadas rapidamente ao peroxinitrito, e apenas nas incubações contendo peroxirredoxinas reduzidas a oxidação da dihidrorodamina a rodamina foi inibida (Fig. 9) (Trujillo et al., 2004; Dubuisson et al., 2004). A seguir, a esteguiometria das reações da Tsa1 e Tsa2 com peroxinitrito foi estudada através da determinação da concentração de tióis presentes nas peroxirredoxinas antes e depois destas reações, utilizando o método do DTNB (Bonini & Augusto, 2001). No início dos experimentos, foi determinada a concentração de 1,8 tióis/monômero de Tsa1 ou Tsa2, indicando que 90% da enzima estava na forma reduzida. Diferentes concentrações de peroxinitrito foram adicionadas às soluções de peroxirredoxinas, e observou-se que a oxidação dos tióis depende da concentração de oxidante utilizada. As concentrações de tióis após as reações e as concentrações de peroxinitrito foram relacionadas em um gráfico, e a partir da regressão linear destes dados, foi determinada uma reta, cujo coeficiente angular é aproximadamente 2, indicando a estequiometria de 2 tióis oxidados para cada peroxinitrito adicionado (Fig. 9). Em conjunto, estes resultados mostram que a reação estudada em nossas condições experimentais é, de fato, a reação direta entre o peroxinitrito e a cisteína peroxidásica da Tsa1 e Tsa2 (Cys<sup>47</sup>), como demonstrado anteriormente para outras peroxirredoxinas (Trujillo et al., 2004; Dubuisson et al., 2004). Esta estequiometria pode ser explicada pelo mecanismo mostrado na figura 1 (Hoffman et al., 2002; Wood et al., 2003a, onde a cisteína peroxidásica (Cys<sup>47</sup>) é oxidada a ácido sulfênico após reação com um peróxido, e a seguir, reage com a cisteína de resolução (Cys<sup>170</sup>) de um outro monômero, formando uma ponte dissulfeto.



Fig. 9. Dependência de tióis para a reação entre Tsa1 ou Tsa2 com peroxinitrito. (A). Inibição da oxidação da DHR 123 por peroxinitrito por concentrações crescentes de Tsa1 ou Tsa2. As misturas de reação continham DHR 123 (100 μM), peroxinitrito (20 μM) e as concentrações especificadas de Tsa1 (■), Tsa1 oxidada (□), Tsa2 (•) ou Tsa2 oxidada (○), e foram realizadas em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, contendo 0,1 mM de DTPA. (B) Oxidação dos tióis de Tsa1 e Tsa2 por peroxinitrito. As concentrações especificadas de peroxinitrito foram adicionadas a 20 μM de Tsa1 (■) ou Tsa2 (•), em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, contendo 0,1 mM de DTPA, a 25°C. Após 15 min de incubação, a concentração de tióis remanescentes foi determinada através do ensaio do DTNB. As barras representam o desvio padrão dos experimentos, realizados em triplicata.

Após a verificação de que a reação das peroxirredoxinas Tsa1 e Tsa2 com peroxinitrito segue o descrito para a reação com peróxido de hidrogênio (Fig. 1), as constantes de velocidade de segunda ordem independentes de pH foram determinadas, assumindo que o ácido peroxinitroso é a espécie que reage com o ânion tiolato das peroxirredoxinas (Equação 8) (Trujillo & Radi, 2002).

$$k_{ap} = k \left( \frac{\left[ H^{+} \right]}{K_{ONOOH} + \left[ H^{+} \right]} \right) \left( \frac{\left[ H^{+} \right]}{K_{TsaSH} + \left[ H^{+} \right]} \right)$$

Equação 8

Após a substituição dos valores apropriados ( $k_{ap}$  corresponde à constante de velocidade de segunda ordem obtida experimentalmente em pH 7,4;  $K_{ONOOH} = 2,5 \times 10^{-7}$  M,  $K_{TsaSH} = 3,98 \times 10^{-6}$  e 5,01 x10<sup>-7</sup> M para Tsa1 e Tsa2, respectivamente), as constantes de velocidade de segunda ordem independentes de pH determinadas foram 5,3 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> e 3,9 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, respectivamente, para Tsa1 e Tsa2). Estes dados mostram que de fato, a reação destas peroxirredoxinas com peróxido de hidrogênio é mais rápida que com peroxinitrito.

#### 4.2. Estudos em culturas de <u>S. cerevisiae</u> com deleção das peroxirredoxinas citossólicas

## 4.2.1. Viabilidade celular e produção de radicais

Para contribuir com a elucidação do papel fisiológico das peroxirredoxinas, os estudos foram realizados com quatro linhagens de *S. cerevisiae*: a linhagem WT é a levedura do tipo selvagem; a *tsa1* $\Delta$  apresenta deleção do gene que codifica a Tsa1; a *tsa2* $\Delta$  apresenta deleção do gene que codifica a Tsa2; a *tsa1* $\Delta$ tsa2 $\Delta$  apresenta deleção dos 2 genes.

Primeiramente, curvas de crescimento destas linhagens foram realizadas, monitorando-se o aumento da turbidez do meio ( $DO_{600}$ ) ao longo do tempo de cultivo em meio fermentativo (Fig.10). As semelhanças entre as taxas de crescimento das quatro linhagens mostram que a deleção de Tsa1 ou Tsa2 ou mesmo de ambas isoformas não é letal e não afeta de forma significativa seu crescimento, em acordo com o descrito na literatura (Wong et al., 2002; Wong et al., 2004; Demasi et al., 2006).



Fig 10. Curva de crescimento das linhagens WT,  $tsa1\Delta$ ,  $tsa2\Delta$  e  $tsa1\Delta$   $tsa2\Delta$  em condições fermentativas.

Os efeitos das deleções de peroxirredoxinas foram observados apenas quando as linhagens foram tratadas com concentrações tóxicas de oxidantes. Os efeitos da exposição ao peróxido de hidrogênio, hidroperóxido de tércio butila e peroxinitrito já haviam sido estudados anteriormente nestas mesmas linhagens de leveduras, através de cultivo em meio de cultura sólido misturado ao peróxido (*spot assays*) (Wong et al., 2002. Munhoz & Netto, 2004; Wong et al., 2004; Demasi et al., 2006). Porém, esta abordagem não é adequada para experimentos com peroxinitrito, que pode reagir com vários componentes do meio de cultura (aminoácido, nucleosídeos e carboidratos) diretamente ou através dos radicais produzidos por sua decomposição unimolecular (Equação 6) (Gatti et al., 1994; Quijano et al., 1997). De fato, em experimentos onde as linhagens WT,  $tsa1\Delta$ ,  $tsa2\Delta$  e  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  foram submetidas a um fluxo de peroxinitito (0.4 µmol/min; concentração final igual a 2 mM), não foram observadas diferenças significativas no número de unidades formadoras de colônia detectadas (Fig. 11), porém, o efeito da adição de peroxinitrito pôde ser avaliado quando as amostras foram ressuspendidas em tampão fosfato (Fig. 11).



Fig. 11. Porcentagem de células viáveis das linhagens WT, *tsa1 Δ*, *tsa2 Δ* e *tsa1 Δ tsa2 Δ* submetidas ao tratamento com 2 mM de peroxinitrito. (A) O peroxinitrito foi adicionado às células ressuspendidas em meio de cultura. (B) O peroxinitrito foi adicionado às células ressuspendidas em tampão fosfato.

A confirmação de que o peroxinitrito estava reagindo com componentes do meio de cultura e produzindo radicais foi feita através de EPR, utilizando o captador de spin DBNBS (ácido 3,5 – dibromo-4-nitrosobenzeno sulfônico). A adição de peroxinitrito ao meio de cultura, na presença ou ausência de leveduras levou a detecção de um espectro de EPR ( $a_N$ = 13,6 G) característico de radical-adutos de DBNBS derivados de aminoácidos como tirosina e triptofano (Li et al., 1998; Bonini et al., 2004) (Fig. 12). A intensidade deste sinal foi menor na

presença de leveduras, confirmando que os componentes do meio de cultura competem com as células pelo oxidante. Estes resultados enfatizam mais uma vez a importância de se considerar a reatividade do peroxinitrito na programação de experimentos com células (Gatti et al., 1994).



Fig. 12. Espectros de EPR das linhagens WT e *tsa1∆tsa2∆* obtidos após tratamento com 2 mM de peroxinitrito, na presença do captador de spin DBNBS. Os parâmetros do espectrômetro foram: Potência de microonda, 20 mW; amplitude de modulação, 1G; ganho, 7,1 x 10<sup>5</sup>; constante de tempo, 82 ms; número de acumulações, 4.

Os experimentos de viabilidade também foram realizados com peróxido de hidrogênio. Neste caso, a adição do oxidante pôde ser feita em meio de cultura, pois o composto é razoavelmente estável e não reage com os componentes do meio. A adição de 2 mM de peróxido de hidrogênio diminui consideravelmente o número de células viáveis (Fig. 13), por isso, o mesmo experimento foi realizado com 1 mM. Neste caso, foi observado que na presença de 1 mM de peróxido de hidrogênio não há diferenças significativas entre

as linhagens WT,  $tsa1\Delta e tsa2\Delta$ , porém, foi surpreendente verificar que a linhagem  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  foi a menos afetada pelo tratamento (Fig. 13). Além da maior resistência, a linhagem  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  consumiu peróxido de hidrogênio de forma mais rápida que as demais linhagens (Fig. 14), enquanto as linhagens WT,  $tsa1\Delta$  e  $tsa2\Delta$  praticamente não apresentaram diferenças.



Fig. 13. Viabilidade das linhagens WT, *tsa1*Δ, *tsa2*Δ e *tsa1*Δ *tsa2*Δ submetidas ao tratamento com peróxido de hidrogênio. (A) Porcentagem de células viáveis após tratamento com 2mM de peróxido de hidrogênio. (B) Porcentagem de células viáveis após tratamento com 1mM de peróxido de hidrogênio.



Fig. 14. Consumo de 1 mM de peróxido de hidrogênio pelas linhagens WT e  $tsa1\Delta tsa2\Delta$ , monitorado através do teste FOX. Os valores correspondem a média ± os desvios padrão obtidos a partir de três experimentos independentes; p  $\leq 0.05$ , *t*-test.

A maior resistência da *tsa1∆tsa2*∆ pode estar relacionada a sua capacidade de consumir peróxido de hidrogênio de forma mais rápida que as outras linhagens. Porém, este aumento do metabolismo de peróxido de hidrogênio pode ser desvantajoso por possibilitar o aumento da produção de intermediários radicalares (Roe et al., 2002; Halliwell & Gutridge, 2007). Por isso, a produção de radicais pelas linhagens WT, *tsa1∆, tsa2∆* e *tsa1∆tsa2∆* foi examinada por EPR, utilizando o captador de spin POBN (Roe et al., 2002). Após incubações de amostras das quatro linhagens com 1 mM de peróxido de hidrogênio, a concentração de radicais detectada foi pequena, com exceção da linhagem *tsa1∆tsa2∆*, que apresentou um sinal de EPR significativamente maior (Fig.15). Estes experimentos foram repetidos diversas vezes e os resultados sempre foram similares, com a produção de radical-aduto dependente de todos os componentes da incubação (leveduras, glicose e peróxido de hidrogênio).



Fig. 15. Espectros dos radicais-adutos de POBN produzidos pelas linhagens WT,  $tsa1\Delta$ ,  $tsa2\Delta$  e  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  tratadas com 1 mM de peróxido de hidrogênio. Cerca de 5 x 10<sup>7</sup> células/mL ressuspendidas em meio de cultura contendo 2% de glicose, foram tratadas com 90 mM de POBN e 1 mM de peróxido de hidrogênio por 30 min, a 30 °C. Alíquotas destas incubações foram transferidas para celas de quartzo e os espectros de EPR foram adquiridos utilizando-se os seguintes parâmetros: Potência de microonda, 20 mW; amplitude de modulação, 1G; ganho, 7,1 x 10<sup>5</sup>; constante de tempo, 82 ms; número de acumulações, 4.

O espectro de EPR produzido pela linhagem  $tsa1 \Delta tsa2\Delta$  é característico do radicaladuto POBN/1-hidroxietila ( $a_N$ = 15,8 G;  $a_H$ = 2,6 G) e sua produção já havia sido reportada em leveduras cultivadas em meio fermentativo, condição em que o etanol é o principal metabólito produzido (Roe et al., 2002). Para confirmar a identidade do radical-aduto captado, a linhagem  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  foi ressuspendida em meio de cultura fermentativo suplementado com 171 mM de [2-<sup>13</sup>C]etanol e tratada com peróxido de hidrogênio. Neste caso, o sinal de EPR de seis linhas foi substituído por um sinal de doze linhas ( $a_N$ = 15,5 G;  $a_H$ = 2,6 G;  $a_{13C}$ = 4,2 G) (Fig. 16), evidenciando a contribuição do átomo <sup>13</sup>C (I= <sup>1</sup>/<sub>2</sub>) e comprovando que o radical detectado é de fato derivado do etanol.



Fig. 16. Espectros dos radicais-adutos de POBN produzidos pela linhagem *tsa1∆tsa2∆* tratadas com 1 mM de peróxido de hidrogênio. Cerca de 5 x 10<sup>7</sup> células/mL foram ressuspendidas em meio de cultura contendo 2% de glicose ou em meio contendo 2% de glicose e 1% de [2-<sup>13</sup>C]etanol e, a seguir, tratadas com 90 mM de POBN e 1 mM de peróxido de hidrogênio por 30 min, a 30 °C. Aliquotas destas incubações foram transferidas para celas de quartzo e os espectros de EPR foram adquiridos utilizando-se os seguintes parâmetros: Potência de microonda, 20 mW; amplitude de modulação, 1G; ganho, 7,1 x 10<sup>5</sup>; constante de tempo, 82 ms; número de acumulações, 4.

A produção de radicais também foi estudada em amostras das quatro linhagens submetidas ao tratamento com fluxo de peroxinitrito, porém nestas condições não foram detectados sinais de EPR (Fig. 17). Este resultado não indica necessariamente que as leveduras não tenham produzido espécies radicalares nestas condições, pois o próprio peroxinitrito ou os oxidantes dele derivados podem destruir os radicais-adutos, impedindo sua detecção (Augusto et al., 1994).



# Tampão fosfato managemente the second se

Fig. 17. Espectros de EPR das linhagens especificadas tratadas com 2 mM de peroxinitrito. Cerca de  $5 \times 10^7$  células/mL foram ressuspendidas em tampão fosfato e, a seguir, tratadas com 90 mM de POBN e um fluxo de 0,4 µmol/min de peroxinitrito, em temperatura ambiente. Aliquotas destas incubações foram transferidas para celas de quartzo e os espectros de EPR foram adquiridos utilizando-se os seguintes parâmetros: Potência de microonda, 20 mW; amplitude de modulação, 1G; ganho, 7,1 x 10<sup>5</sup>; constante de tempo, 82 ms; número de acumulações, 4.

Os resultados descritos acima foram obtidos utilizando leveduras cultivadas em meio fermentativo (2% de glicose), mas a produção de radicais pelas linhagens WT e *tsa1∆tsa2∆* também foi estudada substituindo-se a glicose por uma mistura de glicerol (2%) e glicose (0,1%). Neste tipo de cultivo, as mitocôndrias da levedura estão ativas e a produção de ATP ocorre principalmente através da respiração celular (Galiazzo & Labbe-Bois, 1993; Munhoz & Netto, 2004; Macierzynska et al., 2007), mas o crescimento da cultura é baixo. A adição de glicose aumenta a atividade metabólica das leveduras e facilita a obtenção de células, mas não é suficiente para inibir a respiração celular. Durante o cultivo nestas condições, devido às diferenças metabólicas apresentadas pelas leveduras, a

detecção de radicais livres foi feita utilizando os captadores de spin DMPO e POBN, que apresentam maior eficiência para captar radicais derivados de oxigênio e carbono, respectivamente. Nos dois casos, a produção de radicais pela linhagem  $tsa1 \Delta tsa2\Delta$  foi maior (Fig.18), mas as diferenças não foram tão acentuadas como nos experimentos em condições fermentativas (Fig. 15). É interessante notar que a mudança das condições de cultivo afeta também a expressão de genes relacionados a defesa antioxidantes, como por exemplo, dos dois tipos de catalases identificados em leveduras. Deste modo, é possível que a dificuldade em detectar diferenças quanto a produção de radicais na linhagem  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  seja decorrente do controle mais eficiente das espécies reativas durante o cultivo em meio respiratório.



Fig. 18. Produção de radicais nas linhagens WT e  $tsa1 \Delta tsa2\Delta$  cultivadas em meio respiratório. (A) Cerca de 5 x 10<sup>7</sup> células/mL de cada linhagem foram cultivadas em meio suplementado com 2% de glicerol e 0,1% de glicose e tratadas com 1 mM de peróxido de hidrogênio, na presença de 90 mM de POBN. (B) Amostras cultivadas como descrito em A, mas foram tratadas com peróxido de hidrogênio, alterando-se o captador de spin para DMPO (100mM). Potência de microonda, 20 mW; amplitude de modulação, 1G; ganho, 7,1 x 10<sup>5</sup>; constante de tempo, 82 ms; número de acumulações, 4.

#### 4.2.2. Mecanismo de formação do radical 1-hidroxietila na linhagem tsa1 Atsa2 A

O radical 1-hidroxietila detectado nos experimentos de EPR é derivado do etanol, o principal metabólito fermentativo da levedura. A produção de 1-hidroxietila pode ocorrer através da oxidação do etanol por uma espécie reativa com as características do radical hidroxila (Equação 9), cuja produção em sistemas biológicos é freqüentemente atribuída à reação de Fenton (Equação 10).

$$CH_{3}CH_{2}OH + HO^{\bullet} \longrightarrow CH_{3}C^{\bullet}HOH + H_{2}O \qquad (Equação 9)$$
$$H_{2}O_{2} + Me^{n+} \longrightarrow HO^{\bullet} + H_{2}O + Me^{(n+1)+} \qquad (Equação 10)$$

Íons ferro são essenciais para o crescimento celular, mas sua concentração é rigorosamente controlada no interior das células. Porém, em condições estressantes, estes íons ferro podem ser disponibilizados para catalisar reações químicas, como a reação de Fenton, e tornam-se mais acessíveis a quelantes. Deste modo, utilizando a desferrioxamina foi possível detectar e quantificar, por EPR, os íons ferro disponíveis nas linhagens WT e  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  (Srinivasan et al., 2000). Ao contrário do esperado, a linhagem WT apresentou concentração mais elevada de complexos ferro(III)-desferrioxamina que a  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  (respectivamente, 1,00 ± 0,05 e 0,28 ± 0,03 µg/g de células) (Fig. 19 e tabela 3).

**Tabela 3 – Concentração de ferro "quelatável" por desferioxamina (Fe(III)-DF) e ferro total, cobre e zinco, e peróxidos totais nas linhagens WT e** *tsa1Δtsa2Δ***. A concentração de ferro "quelatável foi determinada por EPR; as concentrações de ferro total, cobre e zinco foram determinadas por espectrometria de absorção atômica; e peróxidos totais foram determinados por FOX. Os valores mostrados correspondem a média ± desvios padrão obtidos a partir de três experimentos diferentes.** 

Linhagens	Fe(III)-DF (µg/g)	Ferro (µg/g)	Cobre (µg/g)	Zinco (µg/g)	Peróxidos <sup>a</sup> (nmol/g)
WT	$1,\!00\pm0,\!05$	104 ± 2	1,11±0,02	$22\pm5$	$75\pm5$
tsa1∆tsa2∆	$0,\!28\pm0,\!03$	$64\pm7$	$1,\!58\pm0,\!04$	$23\pm3$	$95\pm10$

<sup>a</sup> Peróxidos totais também foram determinados após tratamento com 1 mM de peróxido de hidrogênio e os valores obtidos foram 100  $\pm$  11 e 94  $\pm$  8 por nmol/g, para as linhagens WT e *tsa1\Deltatsa2\Delta*, respectivamente.



Fig. 19. Espectro de EPR dos complexos Fe(III)-DF das linhagens WT e  $tsa1\Delta tsa2\Delta$ . Aproximadamente 10<sup>9</sup> células de cada linhagem foram coletadas na fase exponencial do crescimento e tratadas com 2 mM de desferrioxamina por 30 min. A seguir, as amostras foram ressuspendidas em Tris-HCI 20 mM, pH 7,4, contendo 10% de glicerol e congeladas em nitrogênio líquido. As amostras foram mantidas congeladas durante a aquisição dos espectros. As condições instrumentais utilizadas foram: Potência de microonda, 20 mW; amplitude de modulação, 5G; ganho, 1,12 x 10<sup>5</sup>; constante de tempo, 163,84 ms.

Em paralelo, foi observado que a pré-incubação de amostras das linhagens WT e *tsa1*Δ*tsa2*Δ com desferrioxamina ou batocuproína, antes da adição de POBN e peróxido de hidrogênio, não impede a produção de POBN/1-hidroxietila, embora diminua sua concentração em aproximadamente 30% (Fig. 20).



Fig. 20. Efeitos da desferrioxamina e batocuproína no rendimento do radical-aduto POBN/1hidroxietila produzido pelas linhagens WT e  $tsa1 \Delta tsa2\Delta$  tratadas com 1 mM de peróxido de hidrogênio. Cerca de 5 x 10<sup>7</sup> células/mL das duas linhagens, ressuspendidas em meio de cultura, foram tratadas com 2 mM de desferrioxamina ou 2 mM de batocuproína por 30 min antes da adição de 2% de glicose, 90 mM de POBN e 1 mM de peróxido de hidrogênio. Após 30 min de incubação a 30°C, alíquotas foram transferidas para celas de quartzo para aquisição dos espectros de EPR, em temperatura ambiente. Condições instrumentais utilizadas: Potência de microonda, 20 mW; amplitude de modulação, 1G, constante de tempo, 82 ms, ganho, 7,1 x 10<sup>5</sup>, número de acumulações, 4.

O conteúdo total de ferro nestas duas linhagens também foi determinado por espectrometria de absorção atômica e, concordando com os experimentos anteriores, os níveis de ferro na linhagem WT foram maiores que na *tsa1∆tsa2∆* (Tabela 3). Em contraste, foi observado que a concentração de cobre na linhagem *tsa1∆tsa2∆* é maior que na WT, enquanto os níveis de zinco não diferem de forma significativa (Tabela 3). Os íons cobre também poderiam catalisar a produção de radical hidroxila, mas assim como a desferrioxamina, a pré-incubação das amostras com batocuproína não foi suficiente para inibir a produção de POBN/1-hidroxietila (Fig. 20). Em conjunto, estes resultados indicam que a reação de Fenton catalisada por íons ferro ou cobre não é a principal via de formação do radical 1-hidroxietila.

As peroxirredoxinas também são consideradas importantes na detoxificação de peróxidos orgânicos, por isso, a deleção de Tsa1 e Tsa2 poderia causar o acúmulo de peróxidos orgânicos e radicais peroxila derivados (ROO<sup>•</sup>), que poderia oxidar etanol ao radical 1-hidroxietila (k~  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (Packer et al., 1981). Porém, as medidas dos níveis de peróxidos presentes nas linhagens WT e *tsa1*Δ*tsa2*Δ foram similares em condições basais ou após o tratamento com peróxido de hidrogênio (Tabela 3), mostrando que os radicais derivados de peróxidos orgânicos não são a principal fonte do radical 1-hidroxietila detectado na linhagem *tsa1*Δ*tsa2*Δ.

O aumento da concentração de cobre na *tsa1∆tsa2∆* sugeriu que o aumento da expressão de Sod1 poderia estar relacionado ao aumento da produção de 1-hidroxietila nesta linhagem. Por um lado, em linhagens de leveduras, a deleção de *TSA1* foi relacionada ao aumento da transcrição de genes que codificam proteínas antioxidantes (catalase, citocromo c peroxidase, tiorredoxina e Sod1) (Wong et al., 2004; Demasi et al., 2006). Adicionalmente, a atividade peroxidásica da Sod1 pode oxidar etanol a 1-hidroxietila, embora esta reação tenha sido considerada ineficiente (Yim et al., 1993; Zhang et al., 2000). É preciso ressaltar que estes trabalhos foram realizados em tampão bicarbonato, onde a atividade peroxidásica da Sod1 produz preferencialmente o ânion radical carbonato (Zhang

et al., 2000; Liochev & Fridovich, 2004; Medinas et al., 2007), que por sua vez não oxida álcoois de forma eficiente (Augusto et al., 2002).

Diferentes enzimas purificadas (Sod1, catalase, citocromo c e HRP) foram comparadas quanto à eficiência em oxidar o etanol ao radical 1-hidroxietila na presença de peróxido de hidrogênio e POBN, em tampão fosfato contendo DTPA. Apenas em incubações contendo Sod1, o radical-aduto POBN/1-hidroxietila foi produzido em concentrações relevantes (Fig. 21). O sinal detectado na incubação contendo HRP corresponde à oxidação do POBN e foi detectado mesmo na ausência de etanol (Fig. 21). Como a atividade peroxidásica da Sod1 é considerada pouco eficiente para oxidar o etanol (Yim et al., 1993; Zhang et al., 2000), este experimento foi repetido, substituindo-se o etanol por [2-<sup>13</sup>C]etanol. A detecção de um sinal de EPR de 12 linhas (ao invés do espectro de 6 linhas observado anteriormente) confirmou que nestas condições, a Sod1 produz o radical 1-hidroxietila (Fig. 21). Adicionalmente, a produção de POBN/1-hidroxietila se mostrou dependente do tempo de incubação e da concentração de etanol utilizada (Fig. 22), indicando que este processo é de fato dependente da atividade enzimática da Sod1, e não é decorrente de reação de Fenton catalisada por íons cobre liberados do sítio ativo da enzima durante sua inativação.



Fig. 21. Produção do radical-aduto POBN/1-hidroxietila por diferentes enzimas. As enzimas especificadas (10 μM) foram tratadas com 1 mM de peróxido de hidrogênio, 90 mM de POBN e 0,171 M de etanol em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, contendo 0,1 mM de DTPA, por 30 min, a 30 °C. Nos experimentos com Sod1 foram utilizados etanol não-marcado ou [2-<sup>13</sup>C]etanol. Alíquotas destas incubações foram transferidas para uma cela de quartzo para aquisição dos espectros de EPR, utilizando as seguintes condições instrumentais: Potência de microonda, 20 mW; amplitude de modulação, 1G, constante de tempo, 82 ms, ganho, 7,1 x 10<sup>5</sup>, número de acumulações, 4.



Fig. 22. Produção do radical-aduto POBN/1-hidroxietila pela Sod1 em função do tempo. Foram feitas incubações da Sod1 ( $10\mu$ M) com 90 mM de POBN, 1 mM de peróxido de hidrogênio e as concentrações especificadas de etanol, em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, contendo 0,1 mM de DTPA, a 30 °C pelos períodos de tempo especificados. Após intervalos de tempo específicos, as reações foram interrompidas pela adição de 10 unidades de catalase. As amostras foram transferidas para uma cela de quartzo para aquisição dos espectros de EPR, utilizando-se os seguintes parâmetros: Potência de microonda, 20 mW; amplitude de modulação, 1G, constante de tempo, 82 ms, ganho, 7,1 x  $10^5$ , número de acumulações, 4.

Para comprovar o papel da atividade peroxidásica da Sod1 na produção de POBN/1hidroxietila, células da linhagem *tsa1∆tsa2∆* foram pré-incubadas com dietilditiocarbamato ou foram aquecidas a 90 °C, por 20 min, e apenas depois foram tratadas com peróxido de hidrogênio. Nestas duas condições, não houve produção de POBN/1-hidroxietila (Fig. 23), reafirmando a dependência de atividade enzimática, mais especificamente, da Sod1 para produção do radical 1-hidroxietila.



# 

Fig. 23. Efeitos do dietilditiocarbamato (DDC) e aquecimento no rendimento do radical-aduto POBN/1hidroxietila produzido pela linhagem  $tsa1 \Delta tsa2\Delta$  tratada com 1 mM de peróxido de hidrogênio. Cerca de 5 10<sup>7</sup> células/mL ressuspendidas em meio de cultura foram pré-incubdas com 10 mM de DDC por 1 hora ou aquecidas a 90 °C por 20 min e resfriadas até a temperatura ambiente antes da adição de 90 mM de POBN e 1 mM de peróxido de hidrogênio. Após 30 min de incubação a 30 °C, alíquotas foram transferidas para celas de quartzo e os espectros de EPR foram adquiridos utilizando-se os seguintes parâmetros: Potência de microonda, 20 mW; amplitude de modulação, 1G, constante de tempo, 82 ms, ganho, 7,1 x 10<sup>5</sup>, número de acumulações, 4.

Neste sentido, também foi observado que na linhagem *tsa1∆tsa2∆* a expressão de Sod1 é aumentada em aproximadamente 5 vezes, em relação a WT (Fig. 24). Paralelamente, a atividade dismutásica, estudada através da redução do NBT em gel nativo (Fig. 24) e da inibição da redução do citocromo c (McCord & Fridovich, 1969; Beauchamp & Fridovich, 1971; Oberley & Spitz, 1985), aumenta cerca de 2 vezes (Fig. 25). Além disso, a linhagem *tsa1∆tsa2∆* apresentou um aumento da atividade peroxidásica dependente de bicarbonato, que é típica da Sod1 (Fig. 25). Estes resultados mostram que tanto a atividade superóxido

dismutase como a atividade peroxidásica dependente de bicarbonato são cerca de duas vezes maiores na linhagem  $tsa1 \Delta tsa2\Delta$ , em comparação a WT (Fig. 25). Porém, o aumento da concentração de Sod1, como detectado por *western blot*, é de aproximadamente 5 vezes (Fig. 24), indicando que nem toda Sod1 sintetizada está na forma ativa. É interessante notar que o aumento da concentração de cobre na linhagem  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  também não é proporcional ao aumento da síntese de Sod1, mas se correlaciona com o aumento de atividade desta enzima.



Fig. 24. Níveis de expressão da Sod1 e da atividade superóxido dismutase em extratos celulares das linhagens WT e *tsa1\datsa2}<i>\datsa2\datsa2\datsa2\datsa2\datsa2}<i>\datsa2\datsa2\datsa2}<i>\datsa2\datsa2\datsa2\datsa2}<i>\datsa2\datsa2\datsa2\datsa2\datsa2* 



Fig. 25. Atividade superóxido dismutase e peroxidásica dependente de bicarbonato das linhagens WT,  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  e WT<sub>hSod1</sub>. A atividade superóxido dismutase foi estimada através do monitoramento da inibição da redução do citocromo c por diferentes concentrações de extratos celulares das linhagens WT (**•**),  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  (•) e WT<sub>hSod1</sub> (**•**). A inserção mostra a atividade peroxidásica dependente de bicarbonato nestas linhagens monitorada através da oxidação do DMPO. Células destas linhagens foram ressuspendidas em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, contendo 0,1 mM de DTPA, e foram incubadas com 80 mM de DMPO por 5 min. A seguir foram adicionados 25 mM de bicarbonato de sódio e 1 mM de peróxido de hidrogênio. Após 15 min de incubação a 30 °C, as reações foram transferidas para celas de quartzo para aquisição dos espectros de EPR. A figura mostra as médias ± desvios padrão de três experimentos diferentes, p ≤ 0,05. Os parâmetros instrumentais utilizados foram: Potência de microonda, 20 mW; amplitude de modulação, 1G, constante de tempo, 82 ms, ganho, 7,1 x 10<sup>5</sup>, número de acumulações, 4.

O papel da Sod1 na produção de radicais também foi explorado através de experimentos com amostras da linhagem WT transformadas com o gene da Sod1 humana. A linhagem obtida (WT<sub>hSod1</sub>) produz maior quantidade de Sod1 e, como a *tsa1∆tsa2∆*, tem maior atividade dismutásica e peroxidásica dependente de bicarbonato (Fig. 26), além de produzir mais radicais que a WT (Fig. 26). Deste modo, os resultados obtidos indicam uma relação entre o aumento da atividade da Sod1 e o aumento da produção de radicais.



Fig. 26. Produção do radical-aduto POBN/1-hidroxietila pelas linhagens WT, *tsa1\Deltatsa2\Delta*, e WT<sub>hSod1</sub>. Cerca de 5 x 10<sup>7</sup> células/mL de cada linhagem foi ressuspendida em meio de cultura e foi tratada com 90 mM de POBN e 1 mM de peróxido de hidrogênio por 30 min, a 30 °C. Após este período, foram adquiridos os espectros de EPR destas amostras utilizando-se as seguintes condições: Potência de microonda, 20 mW; amplitude de modulação, 1G, constante de tempo, 82 ms, ganho, 7,1 x 10<sup>5</sup>, número de acumulações, 4.

#### 4.2.3. Instabilidade genômica da linhagem tsa1 Atsa2 A

A relação entre deleção de genes relacionados a defesa antioxidante e o aumento da taxa de mutações em S. *cerevisiae* vem sendo bastante estudada, uma vez que as espécies reativas formadas pela própria atividade metabólica da levedura podem provocar oxidação de nucleotídeos, quebra da dupla fita do DNA, formação de ligações cruzadas entre DNA e proteínas e a remoção de bases nitrogenadas (Gralla & Valentine, 1991; Myung et al., 2001; Huang et al., 2003; Wong et al., 2004; Ragu et al., 2007; Iraqui et al., 2008). Mais
especificamente, a peroxirredoxina Tsa1 é considerada uma enzima supressora de mutações, devido ao aumento de mutações pontuais e ao acúmulo de translocações, inversões, fusões e deleções de partes de cromossomos e aneuploidias em linhagens que sofreram deleção desta enzima (Huang et al., 2003; Wong et al., 2004; Ragu et al., 2007; Iraqui et al., 2008). Embora estes estudos mostrem uma relação significativa entre a deleção da Tsa1 e o aumento de mutações, os mecanismos que levam a estas alterações ainda não foram elucidados.

A detecção de um maior rendimento em radicais na linhagem tsa1/dtsa2/ tornou interessante verificar a ocorrência de danos ao DNA desta linhagem, uma vez que o radical 1-hidroxietila pode clivar e alquilar ácidos nucleicos (Augusto, 1993; Nakao & Augusto, 1998). Para verificar a produção de adutos de DNA nas condições experimentais usadas neste trabalho, amostras das linhagens WT e tsa1/sta2/ foram tratadas com peróxido de hidrogênio em meio de cultura contendo [14C]glicose. O DNA destas amostras foi extraído e a incorporação de <sup>14</sup>C foi determinada em um detector de radioisótopos por cintilação líquida. Como mostrado na Fig. 27, a incorporação de <sup>14</sup>C foi maior na linhagem *tsa1∆tsa2∆* tratada com peróxido de hidrogênio. Tal incorporação diminuiu na presença de POBN, indicando que uma fração considerável do isótopo 14C incorporado ao DNA é devida a radicais lives, provavelmente o radical 1-hidroxietila. Paralelamente, a detecção de radicais de DNA destas amostras foi realizada através do tratamento das linhagens WT e tsa1/dtsa2/ com peróxido de hidrogênio na presença do captador de spin DMPO. O DNA destas amostras foi extraído e a formação de adutos DMPO/DNA<sup>•</sup> foi detectada utilizando o anticorpo anti-DMPO (Ramirez et al., 2007). Deste modo, foi possível confirmar que na linhagem tsa1/dtsa2/d há uma produção aumentada de radicais derivados do DNA (Fig. 27). Em conjunto, estes resultados permitem associar o aumento da produção do radical 1hidroxietila ao aumento de danos oxidativos ao DNA da linhagem tsa11tsa21 tratada com peróxido de hidrogênio.



Fig. 27. Adutos e radicais derivados do DNA nas linhagens WT e *tsa1* $\Delta$ *tsa2* $\Delta$  tratadas com peróxido de hidrogênio. (A) Incorporação de <sup>14</sup>C no DNA das linhagens WT e *tsa1* $\Delta$ *tsa2* $\Delta$  durante o metabolismo de <sup>14</sup>C-glicose, na presença ou na ausência de 1mM de peróxido de hidrogênio e 90 mM de POBN, como especificado. Os valores correspondem a média ± os desvios padrão de três experimentos diferentes; \*p ≤ 0.05, teste t. (B) Níveis de radicais derivados do DNA nas linhagens WT e *tsa1* $\Delta$ *tsa2* $\Delta$  tratadas ou não com peróxido de hidrogênio, detectados por imuno-*dot blot* utilizando o anticorpo anti-DMPO/aduto. O controle positivo corresponde a 100 ng de DNA extraído da linhagem WT e tratado com DMPO (50 mM), CuCl<sub>2</sub> (1 mM) e peróxido de hidrogênio (20  $\mu$ M), em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, por 30 min, a 30 °C. As barras correspondem a intensidade do spot, determinada através do programa ImageQuant 5.1 (Molecular Dynamics). Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes.

## 5. DISCUSSÃO

## 5.1. <u>Reações entre Tsa1 e Tsa2 com peróxidos</u>

As peroxirredoxinas constituem uma família de tiol-proteínas identificadas inicialmente em leveduras, mas também encontradas em bactérias, plantas e animais (Hofmann et al., 2002). Freqüentemente, em uma única espécie, são encontradas várias isoformas de peroxirredoxinas diferentes com padrões de expressão е compartimentalização (Park et al., 2000; Wong et al., 2004). Devido a sua abundância e capacidade de reduzir diferentes substratos (peróxido de hidrogênio, peróxidos orgânicos e peroxinitrito), as peroxirredoxinas são consideradas importantes defesas antioxidantes, e nos últimos anos também vêm sendo relacionadas a regulação de eventos de sinalização celular mediados por peróxido de hidrogênio (Wood et al., 2003a; Wood et al., 2003b; Demasi et al., 2006). Para executar qualquer uma destas funções, seria esperado que as peroxirredoxinas reagissem de forma rápida com seus substratos, mas até recentemente, as constantes de velocidade de segunda ordem atribuídas a estas enzimas, inclusive Tsa1 e Tsa2, em reações com peróxidos eram da ordem de 10<sup>4</sup> a 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, valores baixos guando comparados aos determinados para heme- ou selênio-proteínas (Flohé et al., 2002; Hoffman et al., 2002; Wood et al., 2003; Munhoz & Netto, 2004). É preciso ressaltar que estes valores foram obtidos através de experimentos de cinética do estado estacionário, onde os valores de K<sub>cat</sub> e K<sub>M</sub> são determinados através do monitoramento da oxidação do NADPH. Deste modo, era possível que as constantes determinadas refletissem o passo determinante de todo o processo (Fig. 1) e não a reação entre a peroxirredoxina e o peróxido. Para resolver o aparente paradoxo entre a importância atribuída as peroxirredoxinas e os baixos valores de constantes de velocidade então atribuídos, desenvolvemos um método competitivo utilizando a peroxidase de raiz forte (HRP) para determinar os valores das constantes de velocidade de segunda ordem para reações da Tsa1 e Tsa2 com peróxido de hidrogênio e peroxinitrito.

O método competitivo mostrou-se confiável, pois forneceu um valor de constante de velocidade para reação entre Tsa1 e peroxinitrito bastante próximo ao que foi determinado

por cinética direta (Figs. 2 e 3). Uma vez validado, o método competitivo foi usado para determinar as constantes de velocidade de segunda ordem das reações da Tsa1 e Tsa2 com peróxido de hidrogênio. Para ambas, os valores determinados foram altos, da ordem de 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, como os determinados mais recentemente para outras peroxirredoxinas, modificando a visão de que seriam enzimas pouco eficientes. Na verdade, peroxirredoxinas de fato, podem competir com heme- ou selênio-proteínas na detoxificação de peróxido de hidrogênio (Parsonage et al., 2005; Ogusucu et al., 2007; Peskin et al., 2007; Parsonage et al., 2007).

Utilizando o método competitivo também foram determinadas as constantes de velocidade para reações da Tsa1 e Tsa2 com peroxinitrito. Os valores, da ordem de  $10^5 \text{ M}^{-1}$  s<sup>-1</sup>, são compatíveis com os publicados para as peroxirredoxinas de *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* (Trujillo et al., 2004) e *Toxoplasma gondii* (Akerman & Müller, 2005), mas são menores que os determinados para a peroxirredoxina AhpC de *Mycobacterium tuberculosis* (1,3 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>) e para PRDX5 humana (1,2 x 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>) (Trujillo et al., 2007).

Utilizando o método competitivo também foi possível determinar o pK<sub>a</sub> da cisteína peroxidásica (Cys<sup>47</sup>) da Tsa1 e da Tsa2, respectivamente, 5,4 e 6,3 (Fig. 8). Esta diferença entre os valores determinados foi inesperada, considerando os 86% de identidade na seqüência de aminoácidos apresentada pelas duas isoformas (Wong et al., 2002). É interessante notar que apesar da diferença nos valores de pK<sub>a</sub>, a Tsa1 e Tsa2 são igualmente eficientes para reduzir peróxido de hidrogênio e peroxinitrito. Utilizando esta metodologia, os valores de pK<sub>a</sub> da cisteína peroxidásica descritos para outras peroxirredoxinas também são bem mais baixos que o da cisteína livre (pK<sub>a</sub>= 8,4) (Ogusucu et al., 2007; Peskin et al., 2007; Trujillo et al., 2007). Embora a estabilização da forma tiolato da cisteína peroxidásica seja atribuída a um resíduo de arginina altamente conservado no sítio ativo da enzima (Arg<sup>123</sup>, na Tsa1 e Tsa2) (Wood et al., 2003), a alta reatividade das peroxirredoxinas parece não ser decorrente apenas do baixo valor de pK<sub>a</sub> (Peskin et al., 2007; Trujillo et al., 2007). De fato, a PRDX5 (peroxirredoxina 5 humana) apresenta pK<sub>a</sub> igual a 5,2 e reage com peroxinitrito com constante de velocidade da ordem de  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  e

com peróxido de hidrogênio com constante da ordem de 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (Trujillo et al., 2007). Em conjunto, tanto os nossos resultados como os da literatura indicam que o pK<sub>a</sub> é apenas um dos fatores que determinam a reatividade da cisteína peroxidásica. Mais estudos cinéticos envolvendo diferentes peroxirredoxinas e diferentes substratos, além da obtenção de dados estruturais, são necessários para melhor compreensão das características que determinam as diferenças quanto a reatividade e os papéis redundantes e não-redundantes das diferentes peroxirredoxinas.

Além dos valores das constantes de velocidade de segunda ordem para as reações entre Tsa1 e Tsa2 com oxidantes, nossos experimentos cinéticos fornecem um método simples para a determinação dessas constantes para tióis-proteínas. Tais proteínas vêm recebendo crescente atenção na literatura devido aos seus papéis na sinalização celular. De fato, embora a maioria dos experimentos agui descritos tenha sido feita em um espectrômetro de fluxo interrompido, é possível obter resultados convincentes em espectrofotômetros comuns (Fig. 7). A principal vantagem do método competitivo é que, ao contrário dos experimentos de cinética de estado estacionário, não requer a adição de sistemas redutores e por isso, pode ser aplicado para estudar peroxirredoxinas cujo redutor biológico não é conhecido. A desvantagem do método é que não pode ser aplicado ao estudo de reações com peróxidos orgânicos, pois estes oxidantes reagem com HRP de forma relativamente lenta, complexa, com geração de intermediários radicalares (Furtmuller et al., 2000). Recentemente, descreveu-se a determinação de valores de constantes de velocidade de segunda ordem através do monitoramento da variação da fluorescência de peroxirredoxinas decorrentes de suas oxidações (Parsonage et al., 2005; Trujillo et al., 2007; Parsonage et al., 2008). As reações entre PRDX5 com peroxinitrito, peróxido de hidrogênio, hidroperóxido de tércio-butila e hidroperóxido de cumeno foram estudadas monitorando-se o aumento de fluorescência do Trp<sup>84</sup>, utilizando uma forma da enzima em que a cisteína de resolução foi substituída por uma serina (Trujillo et al., 2007). Porem este método não pode ser amplamente aplicado, pois muitas peroxirredoxinas não apresentam variação de fluorescência mensurável com oxidação. Uma outra abordagem (mais trabalhosa) baseada em mudanças de fluorescência foi empregada em estudos cinéticos da AhpC (peroxirredoxina de *Salmonella typhimurium*) (Parsonage et al., 2005; Parsonage et al., 2008). Nestes trabalhos, como redutor da AhpC foi utilizada uma forma truncada da AhpF constituída apenas pelo seu domínio N-terminal (região doadora de elétron para AhpC) com acréscimo de um resíduo de triptofano. A perda de fluorescência decorrente da redução da AhpC pela AhpF, na presença de peróxido de hidrogênio foi monitorada em um espectrômetro de fluxo interrompido. Através dos valores de K<sub>cat</sub> e K<sub>M</sub> obtidos nestes experimentos, os autores determinaram a constante de velocidade da reação de oxidação da AhpC por peróxido de hidrogênio.

Em resumo, os estudos cinéticos realizados neste trabalho permitiram a determinação das constantes de velocidade das peroxirredoxinas Tsa1 e Tsa2 e dos valores de pKa das respectivas cisteínas peroxidásicas, além de apresentar uma nova abordagem experimental para este tipo de estudo. Os resultados obtidos através do método competitivo com HRP estão resumidos na tabela 4.

Tabela 4- Valores de pKa e das constantes de velocidade de segunda ordem dete	erminadas para
Tsa1 e Tsa2 em reações com peróxido de hidrogênio e peroxinitrito, a 25 °C.	-

Peroxirredoxina	pK <sub>2</sub>	<b>k</b> peróxido de hidrogênio	k <sub>peroxinitrito</sub> (Μ <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )						
	r u	(M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	рН 7,4	independente de pH					
Tsa1	5,4	2,2 x 10 <sup>7</sup>	7,4 x 10 <sup>5</sup>	5,3 x 10 <sup>6</sup>					
Tsa2	6,3	1,3 x 10 <sup>7</sup>	5,1 x 10 <sup>5</sup>	3,9 x 10 <sup>6</sup>					

Nossos resultados, além de contribuir para mostrar que as peroxirredoxinas são enzimas bastante eficientes na remoção de peróxidos, fornecem embasamento para a hipótese de que sejam importantes mediadoras dos processos de sinalização celular mediado por peróxido de hidrogênio. Sob estresse oxidativo, enzimas como a catalase devem ser mais relevantes para a detoxificação de peróxidos que peroxirredoxinas, principalmente por não dependerem de equivalentes redutores, que podem ser escassos nestas condições. Porém, em condições normais, os níveis intracelulares de peróxido de hidrogênio variam de 1 nM a 700 nM (Stone et al., 2004), concentrações pelas quais as peroxirredoxinas competem com heme-proteínas, com a vantagem adicional de sofrerem modificações conformacionais que são consistentes com seus papéis de reguladoras da sinalização redox mediada por peróxido de hidrogênio (Wood et al., 2003).

### 5.2. Efeitos das deleções de Tsa1 e Tsa2 em leveduras

Paralelamente aos estudos cinéticos, o papel fisiológico das peroxirredoxinas foi examinado em culturas de *S. cerevisiae* que sofreram deleção da Tsa1 ( $tsa1\Delta$ ), Tsa2 ( $tsa2\Delta$ ) ou ambas isoformas ( $tsa1\Delta tsa2\Delta$ ). A levedura é um organismo bastante utilizado como modelo neste tipo de estudo, pois é um eucarioto que suporta manipulação genética extensiva, sobrevivendo a deleção ou super-expressão de genes da própria levedura ou de outras espécies (Munhoz & Netto, 2004; Outeiro & Giorgini, 2005). Além disso, a *S. cerevisiae* é bastante utilizada em estudos de estresse oxidativo, devido a possibilidade de cultivá-la em aerobiose ou anaerobiose.

Embora as peroxirredoxinas sejam enzimas abundantes nas células (em *S. cerevisiae* apenas a Tsa1 corresponde a 0,7% do conteúdo de proteínas solúveis), a deleção de uma ou mesmo das cinco isoformas não altera seu crescimento em meio fermentativo (Fig. 10) (Wong et al., 2002; Wong et al., 2004). Porém, na presença de 1 mM de peróxido de hidrogênio foi observado que a linhagem  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  é mais resistente que a WT. Anteriormente, foi mostrado que a deleção de uma ou mais isoformas de peroxirredoxinas em leveduras aumenta a susceptibilidade a peróxidos (Wong et al., 2002; Wong et al., 2004; Munhoz & Netto, 2004), porém, é preciso ressaltar que estes trabalhos empregam uma metodologia diferente (*spot assay*) e concentrações mais elevadas do oxidante. De fato, nossos experimentos de viabilidade realizados com 2 mM de peróxido de hidrogênio (Fig. 15) mostraram que as linhagens  $tsa1\Delta$ ,  $tsa2\Delta$  e  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  são mais susceptíveis ao tratamento, porém, a redução do número de células viáveis foi bastante alta, inclusive para a WT, tornando difícil determinar a significância deste resultado.

Além da maior resistência a 1 mM de peróxido de hidrogênio, a *tsa1∆tsa2∆* consumiu o peróxido de forma mais rápida que as demais linhagens (Fig. 17), sugerindo que a ausência de Tsa1 e Tsa2 estaria sendo compensada pela atividade de outras enzimas. De fato, a *S. cerevisiae* possui vários sistemas antioxidantes capazes de reduzir peróxidos, como por exemplo, dois tipos de catalase, citocromo *c* peroxidase, glutarredoxinas, além de mais três isoformas de peroxirredoxinas (Munhoz & Netto, 2004; Demasi et al., 2006). Especificamente, já foi demonstrado que na linhagem *tsa1∆* há o aumento de expressão da catalase T, tiorredoxina peroxidase mitocondrial, tiorredoxina, tiorredoxina redutase, Sod1, Sod2, além das enzimas que atuam na síntese de glutationa (Wong et al., 2004; Demasi et al., 2006). Logo, o aumento de expressão destas enzimas poderia explicar tanto o aumento da resistência da linhagem *tsa1∆tsa2∆* como também sua maior capacidade de remover peróxido de hidrogênio.

Embora o aumento do metabolismo de peróxido de hidrogênio na linhagem *tsa1∆tsa2∆* possa estar relacionado a sua maior resistência, também pode causar como efeito colateral o aumento da produção de radicais livres. Anteriormente, através da utilização da sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato, foi verificado o aumento da produção das chamadas espécies reativas de oxigênio em linhagens de levedura com deleção de peroxirredoxinas (Wong et al., 2002; Wong et al., 2004). Porém, a utilização deste tipo de sonda é bastante sujeita a artefatos, por isso, a produção de radicais nas nossas linhagens foi determinada através de EPR, que é um método menos sensível, mas capaz de detectar estas espécies de forma inequívoca.

Os experimentos de EPR foram realizados incubando as linhagens WT,  $tsa1\Delta$ ,  $tsa2\Delta$ e  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  com peróxido de hidrogênio (1 mM) na presença do captador de spin POBN (90 mM) (Roe et al., 2000). De fato, a produção de radical-aduto pela linhagem  $tsa1\Delta tsa2\Delta$ foi significativamente maior que pela WT,  $tsa1\Delta$  e  $tsa2\Delta$ .

O radical detectado nos experimentos de EPR foi inequivocamente identificado como o 1-hidroxietila (Fig. 16), produzido pela oxidação do etanol, que é o principal produto da

fermentação da glicose (Roe et al., 2000). Para oxidar o etanol a 1-hidroxietila seria necessária uma espécie reativa com as características do radical hidroxila, e em sistemas biológicos, a principal fonte desta espécie é a reação de Fenton (Equações 9 e 10). Em condições normais, a concentração de metais de transição é fortemente regulada, de tal maneira que não existe metal "livre" no interior da célula. Porém, sob condições estressantes, os íons metálicos podem ser liberados dos estoques intracelulares e serem disponibilizados para catalisar reações radicalares (Srinivasan et al., 2000; de Freitas et al., 2000). Para verificar ser a produção do radical 1-hidroxietila nas linhagens WT e principalmente, na *tsa1∆tsa2∆*, ocorreria através desta via, a concentração de ferro (total e quelatável), cobre e zinco foi determinada (Fig. 20) (Tabela 3). Na linhagem *tsa1∆tsa2∆* foi observada uma concentração menor de ferro total e "quelatável" em comparação a WT, e a pré-incubação das linhagens com desferrioxamina não inibiu completamente a produção do radical 1-hidroxietila, contrariando a hipótese de que a reação de Fenton catalisada por ferro seria a principal responsável pela produção de 1-hidroxietila.

Um outro mecanismo que poderia levar a produção de 1-hidroxietila seria a oxidação do etanol através da atividade peroxidásica de outras enzimas. Anteriormente, o aumento de expressão de outras enzimas antioxidantes, como a catalase, citocromo *c* peroxidase e Sod1 foi detectado na linhagem  $tsa1\Delta$  (Wong et al., 2004, Demasi et al., 2006). Anteriormente, foi sugerido que a catalase seria a principal responsável pelo consumo de peróxido de hidrogênio pelas linhagens  $tsa1\Delta$  e  $tsa2\Delta$ , uma vez que este consumo era inibido por azida (Munhoz & Netto, 2004). Porém, nossos resultados indicam que parte do consumo de peróxido de hidrogênio (Fig. 14) por células da linhagem  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  é realizado pela Sod1, que é induzida nesta linhagem (Fig. 24). Embora as catalases sejam enzimas eficientes que apresentam atividade específica em torno de 17750 U/nmol (Zamocky et al., 1995), seus níveis são baixos em extratos das linhagens WT,  $tsa1\Delta$  e  $tsa2\Delta$  durante a fase exponencial do crescimento em condições fermentativas (Munhoz & Netto, 2004). De fato, os valores de atividade da catalase reportados para extratos de levedura

variam entre 0,38 – 1,3 U/mg (Izawa et al., 1996; Munhoz & Netto, 2004), que correspondem a aproximadamente 5 x  $10^{-5}$  nmol de catalase/mg. Em contraste, Sod1 é uma enzima abundante e seus níveis em extratos da linhagem *tsa1∆tsa2∆* pode ser estimado como sendo em torno de 1 x  $10^{-1}$  nmol de Sod1/mg, baseando-se nos dados da Fig. 25 (67 U/mg de proteína) e nos valores de atividade específica reportados para a enzima de fígado bovino (~90 U/nmol) (Flohé & Ötting, 1994).

A verificação que na linhagem tsa1 dtsa2 d a concentração de íons cobre é maior que na WT (Tabela 3), e a expressão da Sod1 também é aumentada, levou a hipótese de que a atividade peroxidásica desta enzima poderia ser responsável pela produção aumentada de 1-hidroxietila (Fig. 22). A atividade peroxidásica da Sod1 permite que a enzima utilize o peróxido de hidrogênio para oxidar diferentes substratos, como o formato, urato, azida, bicarbonato e resíduos de aminoácidos de seu próprio sítio ativo (Hodgson & Fridovich, 1975). Anteriormente, foi verificado que a atividade peroxidásica da Sod1 não é eficiente para oxidar etanol (Yim et al., 1993; Zhang et al., 2000), porém, estes experimentos haviam sido realizados em presença de bicarbonato, que "direciona" a atividade da enzima para produção do ânion radical carbonato, que por sua vez, não é eficiente para oxidar etanol a 1-hidroxietila (Augusto et al., 2002). De fato, quando incubações de Sod1, peróxido de hidrogênio e etanol foram realizadas em tampão fosfato, na presença do captador de spin POBN, foi detectado um sinal de EPR correspondente ao do radical-aduto POBN/1hidroxietila ( $a_N$ = 15,8 G;  $a_H$ = 2,6 G) (Fig. 15). Para confirmar que o sinal era realmente um produto da oxidação do etanol, experimentos similares foram realizados substituindo-se o etanol por [2-13C]etanol e, como esperado, foi produzido um radical-aduto de 12 linhas, evidenciando a contribuição do átomo <sup>13</sup>C ( $a_N$ = 15,5 G;  $a_H$ = 2,6 G;  $a_{13C}$ = 4,2 G) (Fig. 16). Nas culturas de leveduras, o papel da Sod1 na produção do 1-hidroxietila foi evidenciado principalmente através do tratamento térmico (90℃, 10 min) e da adição de dietilditiocarbamato que eliminaram a produção deste radical (Fig. 23). Além disso, independente da metodologia empregada, foi observado o aumento (2 vezes) da atividade superóxido dismutase e da atividade peroxidásica dependente de bicarbonato na linhagem *tsa1* $\Delta$ *tsa2* $\Delta$  (Fig. 25). Porém, é interessante observar que o aumento da concentração de Sod1 nos extratos de *tsa1* $\Delta$ *tsa2* $\Delta$  é de aproximadamente 5 vezes indicando que nem toda a proteína Sod1 produzida apresenta atividade enzimática (Figuras 24 e 25). Possivelmente, esta diferença está relacionada a disponibilidade de cobre, cuja concentração na linhagem *tsa1* $\Delta$ *tsa2* $\Delta$  foi aumentada em menos de 2 vezes (Tabela 3).

A relação entre a deleção de genes relacionados à defesa antioxidante e o aumento de mutações já foi bastante estudado, mesmo em S. cerevisiae. Porém, a Tsa1 é especificamente considerada uma proteína "supressora de mutações", devido à observação de que nas linhagens tsa1a as taxas de mutações são ainda maiores e incluem translocações, deleções e adição de telômeros, em comparação a outras linhagens que apresentam deleções de genes relacionados ao estresse oxidativo (sod1, lys7, skn7, yap1, entre outros) (Huang et al., 2003; Wong et al., 2004; Ragu et al., 2007). Estes estudos foram realizados principalmente através da determinação do número de células de S. cerevisiae que sofreram mutações ou rearranjos cromossômicos que provocam a inativação do gene can1. Apenas células que sofreram mutação em can1 crescem em meio de cultura contendo canavanina, permitindo então a determinação da taxa de mutação na linhagem. Além disso, o seqüenciamento da região do DNA que contém o gene can1 permite verificar o tipo de alteração ocorrida (Huang et al., 2003; Wong et al., 2004; Ragu et al., 2007; Iragui et al., 2008). Embora estes estudos apresentem de forma consistente a relação entre hipermutabilidade e a deleção de Tsa1, não foram estabelecidos os mecanismos pelos quais isto ocorre. A verificação de que a linhagem tsa1/dtsa2/ produz mais radicais que a WT, através da atividade peroxidásica da Sod1 e a identificação deste radical como o 1hidroxietila levaram a hipótese de que estas espécies poderiam ser responsáveis pelo fenótipo hipermutável associado a deleção de Tsa1. De fato, o radical 1-hidroxietila reage com biomoléculas como DNA e RNA, formando adutos detectados in vitro e in vivo (Nakao & Augusto, 1998) e a produção de 1-hidroxietila próxima ao DNA é possível, pois a Sod1, apesar de ser uma enzima citossólica, também pode ser encontrada no núcleo, nos peroxissomos e espaço intermembranas das mitocôndrias (Joffe et al., 2003). A detecção de concentrações mais altas de <sup>14</sup>C (derivado do metabolismo da <sup>14</sup>C glicose) no DNA da linhagem *tsa1* $\Delta$ *tsa2* $\Delta$  indicou que um fração considerável de produtos de oxidação da glicose, provavelmente o radical 1-hidroxietila, pode provocar danos no DNA (Fig. 27). Através de experimentos utilizando o anticorpo anti-DMPO, foi detectado uma concentração maior de radicais derivados do DNA na linhagem *tsa1* $\Delta$ *tsa2* $\Delta$  (Fig. 27), confirmando a associação entre a maior produção de radicais nesta linhagem com o aumento de danos ao DNA. Os resultados apresentados atribuem a produção do radical 1-hidroxietila principalmente à atividade peroxidásica da Sod1, embora alguma participação da reação de Fenton (~30%) (Fig. 20) não possa ser excluída.

As vias de sinalização relacionadas ao aumento do nível de expressão da Sod1 na linhagem *tsa1∆tsa2∆* não são conhecidas, mas provavelmente envolvem os regulons Yap1 e Skn7 que controlam os genes *SOD1*, *TSA1* e *TSA2* (Jamieson, 1998; Lee et al., 1999). A deleção dos genes *TSA1* e *TSA2* provavelmente causa um aumento da concentração intracelular de peróxido de hidrogênio, o que provocaria a ativação de Yap1 e Skn7, e causaria um aumento da expressão da SOD1. Porém, a resposta ao estresse oxidativo é bastante complexa e é influenciada por vários fatores de transcrição, por isso, a participação de outros reguladores, como Hap1, na resposta a deleção de *TSA1* e *TSA2* não pode ser excluída.

A Sod1 é considerada uma das principais defesas antioxidantes devido a sua eficiência na dismutação do ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (Valentine et al., 2005). Leveduras *sod1*, que apresentam deleção do gene *SOD1*, apresentam cerca de 3-4 vezes mais mutações espontâneas que a linhagem WT (Gralla & Valentine, 1991), mas a super-expressão da Sod1 já foi associada ao aumento de danos ao DNA em células de mamíferos com funcionamento alterado dos sistemas de reparo do DNA (Peter et al., 2001; Karanjawala et al., 2002; Karanjawala et al., 2003; Bonatto, 2007). Alguns trabalhos sugerem que os efeitos deletérios da super-expressão da

Sod1 estão relacionados ao aumento da concentração intracelular de peróxido de hidrogênio, mas é mais provável que sejam decorrentes da competição da enzima com outras metaloproteínas por cofatores (íons cobre e zinco) e de outras atividades enzimáticas executadas pela Sod1 (superóxido oxidase, peroxinitrito sintase, tiol oxidase e peroxidásica) (Yim et al., 1993; Zhang et al., 2000; Liochev & Fridovich, 2004; Medinas et al., 2007). Nossos estudos das linhagens WT e *tsa1∆tsa2∆* enfatizam a possível importância da atividade peroxidásica da Sod1, evidenciada pelo aumento dos danos ao DNA observados na linhagem mutante (Fig. 27).

Em conjunto, nossos resultados mostram que a deleção de peroxirredoxinas, embora não seja letal, altera a regulação das defesas antioxidantes da célula, envolvendo nesse processo o aumento de expressão de várias enzimas, entre elas a catalase, citocromo *c* peroxidase e a Sod1. Estas alterações estão relacionadas ao consumo mais rápido de peróxido de hidrogênio pela linhagem *tsa1∆tsa2∆* e têm como principal efeito colateral o aumento da produção do radical 1-hidroxietila, através da oxidação do etanol pela atividade peroxidásica da Sod1. Assim, nossos resultados forneceram uma seqüência de eventos moleculares pela qual a resposta de S. cerevisiae para compensar a deleção das peroxirredoxinas citossólicas leva a sua hipermutabilidade.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que ao contrário do estabelecido anteriormente, as peroxirredoxinas são enzimas eficientes para reduzir diferentes tipos de peróxidos e reagem eles com valores de constantes de velocidade comparáveis aos de catalases e heme-peroxidases. Logo, a importância destas enzimas na defesa antioxidante é reforçada, pois além de serem cataliticamente muito eficientes, são bastante abundantes e estão presentes em um mesmo tipo celular na forma de diferentes isoformas, com diferentes padrões de expressão e compartimentalização.

O papel das peroxirredoxinas *in vivo* também foi estudado através da utilização de linhagens com deleções de Tsa1 e Tsa2; Nossos experimentos ressaltam que embora a deleção destas isoformas não seja letal, provocam uma grande reorganização do sistema antioxidante, exigindo a atividade das enzimas restantes compensem estas deleções, causando efeitos colaterais, como o aumento da produção de radicais pela atividade peroxidásica da Sod1. Logo, estes resultados mostram que a resposta compensatória da *S. cerevisiae* pode ser deletéria ao longo prazo, enfatizando a interdependência dos diferentes sistemas antioxidantes presentes em um mesmo tipo celular.

## **BIBLIOGRAFIA**

Allen, S., Heath, P. R., Kirby, J., Wharton, S. B., Cookson, M. R., Menzies, F. M., Banks, R. E., and Shaw, P. J. (2003) Analysis of the cytosolic proteome in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis reveals alterations to the proteasome, antioxidant defenses, and nitric oxide synthetic pathways. *J. Biol. Chem.* **278**: 6371-6383.

Augusto, O. (1993) Alkylation and cleavage of DNA by carbon-centered radical metabolites. *Free Radic. Biol. Med.* **15**:329-336.

Augusto, O., Gatti, R. M., and Radi, R. (1994) Spin-trapping studies of peroxynitrite decomposition and of 3-morpholinosydnonimine *N*-ethylcarbamide autooxidation: Direct evidence for metal-independent formation of free-radical intermediates. *Arch. Biochem. Biophys.* **310**: 118-125.

Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos, C. C. X., and Lopes de Menezes, S. L. (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free. Radic. Biol. Med.* **32**: 841-859.

Bakker, B. M., Overkamp, K. M., van Maris, A. J. A., Kötter, P., Luttik, M. A. H., van Dijken, J. P., and Pronk, J. T. (2001) Stoichiometry and compartmentalization of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae. FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 15-37.

Barnett, J. A., Entian, K-D. (2005) A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast* **22**: 835-894.

Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**: 276-287.

Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 1620-1625.

Biteau, B., Labarre, J., Toledano, M. B. (2003) ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by S. cerevisiae sulphiredoxin. *Nature*. 425:980-984.

Bonatto, D. (2007) A systems biology analysis of protein-protein interactions between yeast superoxide dismutases and DNA repair pathways. *Free Radic. Biol. Med.* **43**:557-567.

Bonini, M. G., Augusto, O. (2001) Carbon dioxide stimulates the production of thiyl, sulfinyl, and disulfide radical anion from thiol oxidation by peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* **276**:9749-9754.

Bonini, M. G., Fernandes, D. C., and Augusto, O. (2004) Albumin oxidation to diverse radicals by the peroxidase activity of Cu,Zn-superoxide dismutase in the presence of bicarbonate or nitrite: diffusible radicals produce cysteinyl and solvent-exposed and -unexposed tyrosyl radicals. *Biochemistry* **43**:344-351.

Bozonet, S.M., Findlay, V.J., Day, A.M., Cameron, J., Veal, E.A., and Morgan, B.A. (2005) Oxidation of a eukaryotic 2-Cys peroxiredoxin is a molecular switch controlling the transcriptional response to increasing levels of hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* **280**:23319-23327.

Bryk, R., Griffin, P., and Nathan, C. (2000) Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* **407**: 211-215.

Carballal, S., Radi, R., Kirk, M. C., Barnes, S., Freeman, B. A., and Alvarez, B. (2003) Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite, *Biochemistry* **42**: 9906–9914

Choi, M.H., Lee, I.K., Kim, G.W., Kim, B.U., Han, Y.H., Yu, D.Y., Park, H.S., Kim, K.Y., Lee, J.S., Choi, C., Bae, Y.S., Lee, B.I., Rhee, S.G., and Kang, S.W. (2005) Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature*. **435**:347-353.

Chuang, M.H., Wu, M.S., Lo, W.L., Lin, J.T., Wong, C.H., and Chiou, S.H. (2006) The antioxidant protein alkylhydroperoxide reductase of Helicobacter pylori switches from a peroxide reductase to a molecular chaperone function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:2552-2557

Claiborne, A. (In) Greenwald, R. A. (ed) **Handbook of methods form oxygen radicals research**, CRC Press, Inc, Boca Raton, FL (1995) pp.283-284.

Crow, J. P. (1997) Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide* **1**:145-157.

De Freitas, J. M., Liba, A., Meneghini, R., Valentine, J. S., and Gralla E. B. (2000) Yeast lacking Cu-Zn-Superoxide dismutase show altered iron homeostasis. Role of oxidative stress in iron metabolism. *J. Biol. Chem.* **275**: 11645-11649.

Demasi, A. P., Pereira, G. A., and Netto, L. E. S. (2006) Yeast oxidative stress response. Influence of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial functional state. *FEBS J.* **273**: 805-816.

Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996) Peroxynitrite Reaction with Carbon Dioxide/Bicarbonate: Kinetics and Influence on Peroxynitrite-Mediated Oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* **333**: 49-58.

Dubuisson, M., Vander Stricht, D., Clippe, A., Etienne, F., Nauser, T., Kissner, R., Koppenol, W. H., Rees, J. F., and Knoops, B. (2004) Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase. *FEBS Lett.* **571**: 161-165.

Dunford, H. B., Hewson, W. D., and Steiner, H. (1978) Horseradish-peroxidase .29. Reactions in water and deuterium-oxide cyanide binding, compound-I formation, and reactions of compound-I and compoud-II with ferrocyanide. *Can. J. Chem.* **56**: 2844-2852.

Fang, J., Nakamura, T., Cho, D. H., Gu, Z., and Lipton, S.A. (2007) S-nitrosylation of peroxiredoxin 2 promotes oxidative stress-induced neuronal cell death in Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **104**:18742-18747.

Flohé L, and Otting F. (1984) Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol.* 105:93-104.

Flohé, L., Budde, H., Bruns, K., Castro, H., Clos, J., Hofmann, B., Kansal-Kalavar, S., Krumme, D., Menge, U., Plank-Schumacher, K., Sztajer, H., Wissing, J., Wylegalla, C., and Hecht, H. J. (2002) Tryparedoxin peroxidase of Leishmania donovani: molecular cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism. *Arch Biochem Biophys.* **397**:324-335.

Floris, R., Piersma, S. R., Yang, G., Jones, P., and Wever, R. (1993) Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase. *Eur. J. Biochem.* **215**, 767-775.

Furtmuller, P. G.; Burner, U.; Jantschko, W.; Regelsberger, G.; Obinger, C. (2000) Twoelectron reduction and one-electron oxidation of organic hydroperoxides by human myeloperoxidase. *FEBS Lett.* **484**:139-143.

Galiazzo, F., Labbe-Bois, R. (1993) Regulation of Cu,Zn- and Mn-superoxide dismutase transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS*. **315**: 197-200.

Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., and Bairoch A. **Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server;** (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005). pp. 571-607.

Gatti, R., Radi, R., and Augusto, O. (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of albumin to the protein-thiyl free radical, *FEBS Lett.* **348**: 287–290.

Gitler, A. D. (2008) Beer and bread to brains and beyond: can yeast cells teach us about neurodegenerative disease? *Neurosignals*. **16**:52-62.

Gralla, E. B., and Valentine, J.S. (1991) Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu,Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *J Bacteriol.* **173**:5918-20.

Guthrie, C., and Fink, G. R. (1991) Guide to yeast genetics and molecular biology – part A. *Methods Enzymol* **194**: 14

Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (2007) Free Radicals in Biology and Medicine 4th Ed., Oxford University Press, Oxford, UK

Hansen, J. M., Moriarty-Craige, S., and Jones, D.P. (2007) Nuclear and cytoplasmic peroxiredoxin-1 differentially regulate NF-kappaB activities. *Free Radic. Biol. Med.* **43**:282-288.

Herrero, E., Ros, J., Belli, G., and Cabiscol, E. (2008) Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1780**:1217-1235.

Hodgson, E. K., and Fridovich, I. (1975) The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry* **14**: 5294-5299.

Hofmann, B., Hecht, H-J., and Flohé, L. (2002) Peroxiredoxins. Biol. Chem. 383: 347-364.

Huang, M., Rio, A., Nicolas, A., and Kolodner, R. D. (2003) A genomewide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes that suppress the accumulation of mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 11529-11534.

Huang, M.E., and Kolodner, R.D. (2005) A biological network in Saccharomyces cerevisiae prevents the deleterious effects of endogenous oxidative DNA damage. *Mol Cell*. **17**:709-720.

Iraqui, I., Faye, G., Ragu, S., Masurel-Heneman, A., Kolodner, R. D., and Huang, M.E. (2008) Human peroxiredoxin PrxI is an orthologue of yeast Tsa1, capable of suppressing genome instability in Saccharomyces cerevisiae. *Cancer Res.* **68**:1055-1063.

Izawa S, Inoue Y, Kimura A. (1996) Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic Saccharomyces cerevisiae. *Biochem. J.* **320** (Pt 1):61-77.

Jamieson, D. J. (1998) Oxidative stress responses of the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Yeast* **14**: 1511-1527.

Jang, H. H.; Lee, K. O.; Chi, Y. H.; Jung, B. G.; Park, S. K.; Park, J. H.; Lee, J. R.; Lee, S. S.; Moon, J. C.; Yun, J. W.; Choi, Y. O.; Kim, W. Y.; Kang, J. S.; Cheong, G-W.; Yun, D-J.; Rhee, S. G.; Cho, M. J.; Lee, S. Y. (2004) Two enzymes in one: two yeast peroxiredoxins display oxidative stressdependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell.* **117**: 625-635.

Jaeger, T., Budde, H., Flohé, L., Menge, U., Singh, M., Trujillo, M., and Radi, R. (2004) Multiple thioredoxin-mediated routes to detoxify hydroperoxides in *Mycobacterium tuberculosis*. Arch Biochem Biophys. **423**:182-191.

Joffe, A., Geacintov, N. E., Shafirovich, V. (2003) DNA lesions derived from the site selective oxidation of Guanine by carbonate radical anions. *Chem Res Toxicol.* **16**:1528-1538.

Karanjawala, Z. E., Murphy, N., Hinton, D. R., Hsieh, C. L., and Lieber, M. R. (2002) Oxygen metabolism causes chromosome breaks and is associated with the neuronal apoptosis observed in DNA double-strand break repair mutants. *Curr Biol.* **12**: 397-402.

Karanjawala, Z. E., Hsieh, C. L., and Lieber, M. R. (2003) Overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase is lethal for mice lacking double-strand break repair. *DNA Repair (Amst).* **2**:285-294.

Kim, K., Kim, IH, Lee, K. Y., Rhee, S. G., and Stadtman, E. R. (1988) The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/ $O_2$  mixed-function oxidation system. *J. Biol. Chem.* **263**:4704-4711.

Kim, H., Lee, T-H., Park, E.S., Suh, J.M., Park, S.J., Chung, H.K., Kwon, O.Y., Kim, Y.K., Ro, H.K., and Shong, (2000) M. Role of peroxiredoxins in regulating intracellular hydrogen peroxide and hydrogen peroxide-induced apoptosis in thyroid cells. *J Biol Chem.* **275**:18266-18270.

Kissner, R., Nauser, T., Bugnon, P., Lye, P. G., and Koppenol, W. H. (1997) Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 1285-1292.

Landry, C. R., Townsend, J. P., Hartl, D. L., Cavalieri, D. (2006) Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Ecol.* **15**: 575-591.

Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., and Toledano, M. B. (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J. Biol. Chem.* **274**:16040-16046.

Li, A. S. W., Cummings, K. B., Roethling, H. P., Buettner, G. R., and Chignell C. F. (1998) A spin-trapping database implemented on the IBM PC/AT. *J. Magn. Res.* **79:**140-142.

Liochev, S. I., and Fridovich, I. (2004) CO2, not HCO3-, facilitates oxidations by Cu,Zn superoxide dismutase plus H2O2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* A.**101**:743-744.

Liochev SI, Fridovich I. (2007) The effects of superoxide dismutase on H2O2 formation. *Free Radic. Biol. Med.* **42**:1465-1469.

Longo, V. D., Gralla, E. B., and Valentine, J. S. (1996) Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**: 12275-12280.

Macierzyńska, E., Grzelak, A., Bartosz, G. (2007) The effect of growth médium on the antioxidant defense of Saccharomyces cerevisiae. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **12**: 448-456.

McCord, J. M. and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 244: 6049-6055.

Medinas, D. B., Cerchiaro, G., Trindade, D. F., and Augusto, O. (2007) The carbonate radical and related oxidants derived from bicarbonate buffer. *IUBMB Life*. **59**:255-62.

Mendes, P. (1993) A software package for modeling the dynamics, steady states and control of biochemical and other systems. *Comput. Appl. Biosci.* **9**:563–571.

Mendes, p. (1997) Biochemistry by numbers: simulation of biochemical pathways with Gepasi 3. *Trends Biochem. Sci.* **22**:361–363.

Moon, J.C., Hah, Y.S., Kim, W.Y., Jung, B.G., Jang, H.H., Lee, J.R., Kim, S.Y., Lee, Y.M., Jeon, M.G., Kim, C.W., Cho, M.J., and Lee, S.Y. (2005) Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H2O2-induced cell death. *J Biol Chem.* **280**:28775-28784

Munhoz, D. C., and Netto, L. E. S. (2004) Cytosolic thioredoxin peroxidase I and II are important defenses of yeast against organic hydroperoxide insult. *J. Biol. Chem.* **279**: 35219-35227.

Myung, K., Chen, C., and Kolodner, R. D. (2001) Multiple pathways cooperate in the suppression of genome instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. **411**:1073-1076.

Nakao, L. S., and Augusto, O. (1998) Nucleic acid alkylation by free radical metabolites of ethanol. Formation of 8-(1-hydroxyethyl)guanine and 8-(2-hydroxyethyl)guanine adducts. *Chem Res Toxicol.* **11**:888-894.

Naozuka, J., and Oliveira, P.V. (2007) Cu, Fe, Mn and Zn distribution in protein fractions of Brazil-nut, cupuassu seed and coconut pulp by solid-liquid extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.* **18**: 1547-1553.

Netto, L. E. S.; Chae, H. Z.; Kang, S. W.; Rhee, S. G.; Stadtman, E. R. (1996) Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. *J. Biol. Chem.* **271**:15315-15321.

Oberley, L.W., and Spitz, D.R., Assay of Superoxide Dismutase Using Nitroblue Tetrazolium, in **Handbook of Methods for Oxy Radical Research**, CRC Press, 1985, pp. 217-220.

Outeiro, T. F., Giorgini, F. (2006) Yeast as a drug Discovery platform in Huntington's and Parkinson's diseases. *Biotechnol. J.* **1**: 258-269.

Park, S. G., Cha, M., Jeong, W., and Kim, I (2000) Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **275**:5723-5732.

Parsonage, D., Youngblood, D. S., Sarma, G. N., Wood, Z. A., Karplus, P. A., Poole, L. B. (2005) Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Biochemistry* **44**:10583-10592.

Parsonage, D., Karplus, P. A., and Poole, L. B. (2008) Substrate specificity and redox potential of AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**:8209-8214.

Peskin, A. V., Low, F. M., Paton, L. N., Maghzal, G. H., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. (2007) The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H2O2 is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. *J. Biol. Chem.* **282**: 11885-11892.

Peter, Y., Rotman, G., Lotem, J., Elson, A., Shiloh, Y., and Groner, Y. (2001) Elevated Cu/Zn-SOD exacerbates radiation sensitivity and hematopoietic abnormalities of Atm-deficient mice. *EMBO J.* **20**:1538-1546.

Philippsen, P., Stotz, A., and Scherf, C. (1991) DNA of Saccharomyces cerevisiae. *Methods Enzymol.* **194**: 169-182.

Piškur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., Compagno, C. (2006) How did Saccharomyces evolve to become a good brewer? *Trends Genet.* **22**: 183-186.

Polakis, E. S., and Bartley, W. (1965) Changes in the enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae* during aerobic growth on different carbon sources. *Biochem. J.* **97**: 284-297.

Querol, A., Fernández-Espinar, M. T., del Olmo, M., and Barrio, E. (2003) Adaptive evolution of wine yeast. *Int J Food Microbiol.* **86**:3-10.

Quijano, C., Alvarez, B., Gatti, R. M., Augusto, O. and Radi, R. (1997) Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups, *Biochem. J.* **322**: 167–173.

Ragu, S., Faye, G., Iraqui, I., Masurel-Heneman, A., Kolodner, R. D., and Huang, M. E. (2007) Oxygen metabolism and reactive oxygen species cause chromosomal rearrangements and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**: 9747-9752.

Ramirez, D. C., Gomez-Mejiba, S. E., and Mason, R. P. (2007) Immuno-spin trapping analyses of DNA radicals. *Nat. Protoc.* **2**: 512-522.

Rand, J. D., and Grant, C. M. (2006) The thioredoxin system protects ribosomes against stress-induced aggregation. *Mol. Biol. Cell* **17**: 387-401.

Rettori, D., Volpe, P.L.O. (2000) Microcalorimetria: uma técnica aplicada ao estudo do diauxismo da Saccharomyces cerevisiae, Química Nova 23: 257-261.

Rhee, S. G.; Chae, H. Z.; Kim, K. (2005) Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **38**:1543-1552.

Roe, J. A., Wiedau-Pazos, M., Moy, V. N., Goto, J. J., Gralla, E. B., Valentine, J. S. (2002) In vivo peroxidative acitivity of FALS-mutant human CuZnSODs expressed in yeast. *Free. Radic. Biol. Med.* **32**: 169-174.

Ronne, H. (1995) Glucose repression in fungi. Trends Genet. 11: 12-17.

Rutherford, J. C., and Bird, A. J. (2004) Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryotic cell.* **3**: 1-13.

Saha, A., Goldstein, S., Cabelli, D., and Czapski, G. (1998) Determination of optimal conditions for synthesis of peroxynitrite by mixing acidified hydrogen peroxide with nitrite. *Free Radic. Biol. Med.* **24**: 653-659.

Salmon, J-H., Fornairon-Bonnefond, C., Mazauric, J-P., and Moutounet, M. (2000) Oxygen consumption by wine lees: impact on lees integrity during wine ageing *Food Chem.* **71**: 519-528.

Schüller, H-J. (2003) Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae. Curr. Genet.* **43**: 139-160.

Sentandreu, R., and Northcote, D. H. (1969) Yeast cell-wall synthesis. *Biochem. J.* **115**: 231-240.

Srinivasan, C., Liba, A., Imlay, J. A., Valentine, J. S., Gralla, E. B. (2000) Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of "free iron" as measured by whole cell electron paramagnetic resonance. *J. Biol. Chem.* **275**: 29187-29192.

Stone, J. R. (2004) An assessment of proposed mechanisms for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems. *Ach. Biochem. Biophys.* **422**: 119-124.

Trujillo, M., and Radi, R. (2002) Peroxynitrite reaction with the reduced and the oxidized forms of lipoic acid: new insights into the reaction of peroxynitrite with thiols, *Arch. Biochem. Biophys.* **397**: 91–98.

Trujillo, M.; Budde, H.; Piñeyro, M. D.; Stehr, M.; Robello, C.; Flohé, L.; Radi, R. (2004) *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. *J. Biol. Chem.* **279**:34175-34182.

Trujillo, M., Clippe, A., Manta, B., Ferrer-Sueta, G., Smeets, A., Declercq, J. P., Knoops, B., and Radi, R. (2007) Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **467**:95-106.

Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., and Radi, R. (2008) Kinetic studies on peroxynitrite reduction by peroxiredoxins. *Methods Enzymol.***441**:173-196.

Valentine, J. S., Doucette, P. A., Zittin-Potter, S. (2005) Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. Annu. Rev. Biochem. **74**:563-593.

Veal, E. A., Findlay, V. J., Day, A. M., Bozonet, S. M., Evans, J. M., Quinn, J., and Morgan, B. A. (2004) A 2-Cys peroxiredoxin regulates peroxide-induced oxidation and activation of a stress-activated MAP kinase. *Mol. Cell.* **15**: 129-139.

Vivancos, A. P., Castillo, E. A., Biteau, B., Nicot, C., Ayté, J., Toledano, M. B., and Hidalgo, E. (2005) A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.**102**: 8875-8880.

Winternbourn, C. C. (1987) The ability of scavengers to distinguish OH· production in the ironcatalyzed Haber-Weiss reaction: Comparison of four assays for OH·. *Free Radic. Biol. Med.* **3**:33-39.

Winterbourn, C. C., Hampton, M. B. (2008) Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **45**:549-61.

Wong, C., Zhou, Y. Z., Ng, R. W. M., Jung, H., and Jin D. (2002) Cooperation of yeast peroxiredoxins Tsa1p and Tsa2p in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J. Biol. Chem.* **277**: 5385-5394.

Wong, C., Siu, K., and Jin, D. (2004) Peroxiredoxin-null yeast cells are hypersensitive to oxidative stress and are genomically unstable. *J. Biol. Chem.* **279**: 23207-23213.

Wood, Z. A., Schröder, E., Harris, J. R., and Poole, L. B. (2003a) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **28**: 32-39

Wood, Z. A., Poole, L. B., Karplus, P. A. (2003b) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science.* **300**: 650-653.

Wood-Allum, C. A., Barber, S. C., Kirby, J., Heath, P., Holden, H., Mead, R., Higginbottom, A., Allen, S., Beaujeux, T., Alexson, S. E., Ince, P. G., Shaw, P. J. (2006) Impairment of mitochondrial anti-oxidant defence in SOD1-related motor neuron injury and amelioration by ebselen. *Brain* **129**: 1693-1709.

Yao, J., Taylor, M., Davey, F., Ren, Y., Aiton, J., Coote, P., Fang, F., Chen, J. X., Yan, S. D., Gunn-Moore, F. J. (2007) Interaction of amyloid binding alcohol dehydrogenase/Abeta mediates upregulation of peroxiredoxin II in the brains of Alzheimer's disease patients and a transgenic Alzheimer's disease mouse model. *Mol. Cell. Neurosci.***35**:377-382.

Yegorov, D. Yu., Kozlov, A. V., Azizova, O. A., Vladimirov, Y. A. (1993) Simultaneous determination of Fe(III) and Fe(II) in water solutions and tissue homogenates using desferal and 1,10-phenanthroline. *Free Radic. Biol. Med.* **15**: 565-574.

Yim, M. B., Chock, P. B. and Stadtman, E. R. (1993) Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator. *J. Biol. Chem.* **268**: 4099-4105.

Zamocky, M., Herzog, C., Nykyri, L. M., and Koller, F. (1995) Site-directed mutagenesis of the lower parts of the major substrate channel of yeast catalase A leads to highly increased peroxidatic activity. *FEBS Lett.* **367**:241-245.

Zhang, H., Joseph, J., Felix, C. and Kalyanaraman, B. (2000) Bicarbonate enhances the hydroxylation, nitration, and peroxidation reactions catalyzed by copper, zinc superoxide dismutase. Intermediacy of carbonate anion radical. *J. Biol. Chem.* **275**: 14038-14045.

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO I: Súmula curricular

ANEXO II: Publicações resultantes deste trabalho

Ogusucu, R., Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L.E., and Augusto, O. (2006) Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. *Free Radic. Biol. Med.* **42**:326-334.

Ogusucu, R., Rettori, D., Netto, L. E., and Augusto, O. (2009) Superoxide dismutase1-mediated production of ethanol- and DNA-derived radicals in yeasts challenged with hydrogen peroxide. Molecular insights into the genome instability of peroxiredoxin-null strains. *J. Biol. Chem.*, no prelo.

## SÚMULA CURRICULAR

# DADOS PESSOAIS

Nome: Renata Ogusucu Local e data de nascimento: Bauru – SP, 10 de agosto de 1978.

# EDUCAÇÃO

Julho 2004 – Atual Doutorado em Ciências (Bioquímica) Orientadora: Profa. Dra. Ohara Augusto Projeto de pesquisa: Interações de peroxirredoxinas citossólicas da levedura Saccharomyces cerevisiae com peróxidos. Estudos cinéticos e funcionais. Instituição: Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP)

# 2000 - 2002

Mestrado em Genética e Biologia Molecular Orientadora: Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni Projeto de Pesquisa: Expressão diferencial de genes em linhagens de *Escherichia coli* submetidas ao tratamento com cloro. Instituição: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

### 1997 - 2000

Iniciação Científica Orientadora: Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni Projeto de Pesquisa: Proteínas diferenciais em calos de *Cereus peruvianus* (Cactaceae) submetidos a estresse de temperatura. Instituição: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

1996 – 2000 Bacharelado em Ciências Biológicas Instituição: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

# **BOLSAS RECEBIDAS**

### Doutorado

Bolsa concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), de 2005 a 2008.

## Mestrado

Bolsa concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), de 2000 a 2002.

## Iniciação científica

Bolsa concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), 1999.

# PUBLICAÇÕES

Ogusucu, R., Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L.E., and Augusto, O. (2006) Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. *Free Radic. Biol. Med.* **42**:326-334.

Ogusucu, R., Rettori, D., Netto, L. E., and Augusto, O. (2009) Superoxide dismutase1mediated production of ethanol- and DNA-derived radicals in yeasts challenged with hydrogen peroxide. Molecular insights into the genome instability of peroxiredoxin-null strains. *J. Biol. Chem.*, no prelo.

## **RESUMOS EM CONGRESSOS**

<u>Ogusucu, R.</u>; Rettori D; Munhoz, D. C.; Netto, L. E. S.; Augusto. Increased radical production in *Saccharomyces cerevisiae* Tsa1/Tsa2-null cultures challenged with hydrogen peroxide is likely to be mediated by SOD1. In: 5<sup>th</sup> Meeting of the South American Group for Free Radical Research, 2007, Montevideo, Uruguay.

<u>Ogusucu</u>, R.; Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L. E. S., Augusto, O. Reactions of yeast thioredoxin peroxidase I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite. In: SFRBM's 13<sup>th</sup> Annual Meeting, 2006, Denver, USA, Free Radical Biology and Medicine, v. 41, p.S150.

<u>Ogusucu</u>, R.; Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L. E. S., Augusto, O. Increased radical production in Tsa1/Tsa2-null cultures is likely to be mediated by SOD1. In: SFRBM's 13<sup>th</sup> Annual Meeting, 2006, Denver, USA, Free Radical Biology and Medicine, v. 41, p.S150.

<u>Ogusucu</u>, R.; Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L. E. S., Augusto, O. Reaction of yeast cytosolic thioredoxin peroxidase I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: Kinetics and inhibition of radical production in cultures. In: 4<sup>th</sup> Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine, 2004. Águas de Lindóia, Brazil.

<u>Ogusucu, R</u>.; Sato, M. I. Z.; Ottoboni, L. M. M. Differentail gene expression in *Escherichia coli strains* submitted to chlorine stress. In: XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2001, Foz do Iguaçu, Brazil, p.205.

<u>Ogusucu, R</u>.; Sato M. I. Z.; Orsi, R. H.; Manfio, G. P.; Ottoboni, L. M. M. Genetic variability and chlorine stress response in *Escherichia colii* strains isolated from drinking water. In. 9<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology, 2000, Amsterdan, Netherlands. Interactions in the microbial world, p. 204.

<u>Ogusucu, R</u>.; Mangolin, C. A.; Machado, M. F. P. S.; Ottoboni, L. M. M. Eletroforese em duas dimensões de proteínas de calos de *Cereus peruvianos* submetidos a estresse de temperatura. In. 45° Congresso Nacional de Genética, 1999, Gramado, Brazil, Genetics and Molecular Biology, v. 22, p. 487-488.

## **EXPERIÊNCIA DIDÁTICA**

Docente do módulo de Microbiologia, do curso de Especialização em Biotecnologia, Faculdades Oswaldo Cruz. Agosto a outubro de 2008.

Docente do módulo de Microbiologia, do curso de Especialização em Biotecnologia, Faculdades Oswaldo Cruz. Outubro a dezembro de 2008.

Docente do módulo de Bioquímica e Biologia Molecular, do curso de Especialização em Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdades Oswaldo Cruz. Outubro a dezembro de 2008.

Programa de Estágio Docente, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, disciplina de Bioquímica e Biologia Molecular para o curso de graduação em Farmácia (Fev/2005-Jul/2005).



Available online at www.sciencedirect.com



Free Radical Biology & Medicine 42 (2007) 326-334

www.elsevier.com/locate/freeradbiomed

Original Contribution

# Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: Rate constants by competitive kinetics

Renata Ogusucu<sup>a,1</sup>, Daniel Rettori<sup>a,1,2</sup>, Daniela Cristina Munhoz<sup>b</sup>, Luis Eduardo Soares Netto<sup>b</sup>, Ohara Augusto<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil <sup>b</sup> Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Received 20 July 2006; revised 28 September 2006; accepted 14 October 2006 Available online 20 October 2006

#### Abstract

Peroxiredoxins are receiving increasing attention as defenders against oxidative damage and sensors of hydrogen peroxide-mediated signaling events. Likely to be critical for both functions is a rapid reaction with hydrogen peroxide, typically with second-order rate constants higher than  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Until recently, however, the values reported for these rate constants have been in the range of  $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , including those for cytosolic thioredoxin peroxidases I (Tsa1) and II (Tsa2) from *Saccharomyces cerevisiae*. To resolve this apparent paradox, we developed a competitive kinetic approach with horseradish peroxidase to determine the second-order rate constant of the reaction of peroxiredoxins with peroxynitrite and hydrogen peroxide. This method was validated and allowed for the determination of the second-order rate constant of the reaction of Tsa1 and Tsa2 with peroxynitrite ( $k \sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) and hydrogen peroxide ( $k \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) at pH 7.4, 25°C. It also permitted the determination of the p $K_a$  of the peroxidatic cysteine of Tsa1 and Tsa2 (Cys<sup>47</sup>) as 5.4 and 6.3, respectively. In addition to providing a useful method for studying thiol protein kinetics, our studies add to recent reports challenging the popular belief that peroxiredoxins are poor enzymes toward hydrogen peroxide, as compared with heme and selenium proteins.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Peroxiredoxins; Hydrogen peroxide; Peroxynitrite; Peroxiredoxin kinetics; Yeast; Antioxidant defense; Hydrogen peroxide-mediated signaling

#### Introduction

Living organisms are constantly exposed to oxygen- and nitrogen-derived reactive species that are produced during metabolism and in response to external stimuli. To protect themselves against the toxicity of these species, aerobic organisms have evolved an array of defense mechanisms [1]. Among these, a family of cysteine-based peroxidases, known as peroxiredoxins (most of which are thioredoxin peroxidases), is attracting increasing attention due to its ubiquity and versatility.

Peroxiredoxins are abundant in cells and have been identified in organisms ranging from bacteria to yeasts, plants, and humans [2–4]. These enzymes have been shown to detoxify hydrogen peroxide, organic peroxides, and peroxynitrite by reducing them to water, alcohol, and nitrite, respectively, through the use of reducing equivalents provided by thioredoxin and other thiol-electron donors [2–11]. In addition to detoxifying peroxides, specific peroxiredoxins have been shown to act as molecular chaperones [12,13] and to play roles in regulating hydrogen peroxide-mediated cell signaling events [2,3,14,15]. Interestingly, multiple isoforms of peroxiredoxins are often found in one species and may have both redundant and nonredundant physiological functions. These functions and the mechanisms by which they are fulfilled remain under scrutiny.

*Abbreviations:* Tsa1, cytosolic thioredoxin peroxidase I; Tsa2, cytosolic thioredoxin peroxidase II; DHR, dihydrorhodamine 123; DTNB, 5,5'-dithio-2-nitrobenzoic acid; DTPA, diethylenetriamine-*N*,*N*,*N*,*N*-pentaacetic acid; DTT, dithiothreitol; HRP, horseradish peroxidase; peroxynitrite, the sum of peroxynitrite anion (ONOO<sup>-</sup>, oxoperoxonitrate (-1)) and peroxynitrous acid (ONOOH, hydrogen oxoperoxonitrate).

<sup>\*</sup> Corresponding author. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 26077, CEP 05513-970, São Paulo, SP, Brazil. Fax: +55 11 3091 2186.

E-mail address: oaugusto@iq.usp.br (O. Augusto).

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Contributed equally to this work.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Present address: Universidade Bandeirante de São Paulo (UNIBAN), Brazil.

A role for Tsa1 and Tsa2 in the defense of Saccharomyces cerevisiae against reactive oxygen and nitrogen species has been supported by a variety of studies, but mechanistic details remain unknown [6,7,9-12]. Tsa1 was the first peroxiredoxin identified in a eukaryotic cell and is a very abundant cytosolic protein under basal conditions, corresponding to 0.7% of total soluble protein from yeast grown aerobically [16]. Tsa2 appears to be a duplication of Tsa1 because they share 86% identity in their amino acid sequence, and both are located in the cytosol. Contrary to Tsa1, Tsa2 levels under normal conditions are very low but are highly induced upon yeast treatment with hydrogen peroxide and *tert*-butylhydroperoxide [9,10]. The antioxidant functions of Tsa1 and Tsa2 have been supported mostly by viability assays of strains with deletions of the corresponding genes ( $\Delta$ Tsa1,  $\Delta$ Tsa2, and  $\Delta$ Tsa1/ $\Delta$ Tsa2) treated with oxidants [6,7,9-12]. Biochemical assays have also been used but the catalytic efficiency  $(k_{cat}/K_M)$  of purified Tsa1 and Tsa2 in decomposing hydrogen peroxide, tert-butylhydroperoxide, and cumene hydroperoxide has been determined only recently [10]. The obtained values of  $k_{cat}/K_{M}$  were in the order of 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> which was comparable to values previously determined for peroxiredoxins from other organisms ( $k_{cat}/K_{M}$  ranging from 10<sup>4</sup> to  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) but much lower than those reported for other peroxide detoxifying enzymes of yeast such as heme peroxidase and catalases  $(k \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$  [2–4,17,18].

The apparent contradiction between the physiological role of Tsa1 and Tsa2 in detoxifying peroxides and the apparent second-order rate constant of their reaction with the oxidants determined from  $k_{cat}$  and  $K_M$  values was intriguing to us. We reasoned that this determination could be misleading because the rate-determining step of the monitored oxidation in vitro may be different than the direct reaction between the peroxiredoxin and the peroxide under study. Indeed,  $k_{cat}$  and  $K_M$  values are usually obtained from measurements of the rates of NADPH oxidation promoted by peroxides in the presence of peroxiredoxin, its reducing thiol, and the corresponding thiol reductase (Fig. 1), and the rates and steady-state concentrations of the reactants of all the steps are not necessarily known. Very recently, similar considerations stimulated the development of a

new assay to determine  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$  of a bacterial peroxiredoxin reacting with hydrogen peroxide; this assay placed the catalytic efficiency of the enzyme in the range of 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> [19].

Meanwhile, in order to contribute to the understanding of the physiological roles of Tsa1 and Tsa2, we considered it important to determine the second-order rate constant of their reaction with hydrogen peroxide and peroxynitrite by methodologies other than the determination of  $k_{cat'}K_{M}$ . To this end, we devised a method based on competitive kinetics [20–23] with HRP. The method was validated and applied to determine second-order rate constants and the p $K_a$  of the peroxidatic cysteine of Tsa1 and Tsa2 (Cys<sup>47</sup>). The results and their implications are presented here.

#### **Experimental procedures**

#### Materials

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Merck, or Fisher, and were analytical grade or better. Horseradish peroxidase (HRP, type VI-A) and dihydrorhodamine 123 were from Sigma-Aldrich. Peroxynitrite was synthesized from 0.6 M sodium nitrite and 0.65 M hydrogen peroxide in a quenched flow reactor [24]; excess hydrogen peroxide was used to minimize nitrite contamination [25]. To eliminate excess hydrogen peroxide, the peroxynitrite solution was treated with manganese dioxide. Synthesized peroxynitrite was kept at -80°C in aliquots. Before use, each aliquot was thawed, tested for contaminating hydrogen peroxide (<1%) and nitrite (10-30%), and employed only when the contaminants were below the specified levels [26,27]. Concentrations of stock solutions of peroxynitrite were determined spectrophotometrically at 302 nm ( $\epsilon_{302}$ =1670 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) [24–27]. Hydrogen peroxide concentrations (purchased from Synth) were determined spectrophotometrically at 240 nm ( $\varepsilon_{240}$  = 43.6 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) [28]. All solutions were prepared with water purified in a Millipore Milli-Q system. All buffers were treated with Chelex-100 to remove trace amounts of metal ions contaminants prior to use.



Fig. 1. Sequence of reactions responsible for peroxide detoxification by peroxiredoxins. Tsa1 and Tsa 2 detailed structures remain unknown but are expected to be homodimers that switch to decamers depending on the oxidation state as has been demonstrated for other 2-Cys peroxiredoxins. Each homodimer contains a peroxidatic  $(Cys^{47})$  and a resolving  $(Cys^{170})$  cysteine residue. In the scheme, the gray boxes highlight the cysteine residues involved in peroxide detoxification, that is, the peroxidatic cysteine of one subunit and the resolving cysteine of another. The peroxidatic cysteine residue that, in turn, is reduced by the resolving cysteine rendering an overall stoichiometry of one reduced peroxide per two cysteine residues oxidized to the disulfide level. The oxidized residues are reduced back by the thioredoxin (Trx)/thioredoxin reductase (TR) system. Yeast TR contains two redox couples (FAD/FADH<sub>2</sub> and dithiol/disulfide) but the electron transfer sequence remains under investigation, justifying the use of dashed lines in the scheme. Adapted from Refs. [2–4].

# *Expression, purification, reduction, quantification, and thiol contents of Tsa1 and Tsa2*

His-tagged Tsa1 and Tsa2 were expressed in the Escherichia coli strain Bl 21 (DE3) and purified from cell extracts as previously described [10]. Before the experiments, Tsa1 and Tsa2 were reduced with more than 10 times excess DTT for 45 min at room temperature to recover oxidized thiol groups. Excess DTT was removed by dialysis or filtration in PD10 columns (GE Healthcare). Protein concentrations were determined spectrophotometrically at 280 nm. The extinction coefficients for the monomeric forms of Tsa1 and Tsa2 ( $\varepsilon_{280}$ Tsa1=23,590  $M^{-1}$  cm<sup>-1</sup>;  $\epsilon_{280}$  Tsa2=26,150  $M^{-1}$  cm<sup>-1</sup>) were calculated using the ProtParam tool (ExPASy Proteomics Server, the Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland) available on the website (http://bo.expasy.org/ tools/protparam.html) [10]. Thus, the concentration of Tsa1 and Tsa2 employed here always refers to the concentration of the corresponding monomer. The thiol content of Tsa1 and Tsa2 before and after treatment with peroxynitrite was determined by the DTNB (5,5'-dithio-2-nitrobenzoic acid) assay as previously described [27].

#### Direct kinetic studies

The kinetics of peroxynitrite decomposition in the absence and presence of Tsa1 and Tsa2 were monitored in a stoppedflow spectrophotometer (Applied Photophysics SX-18MV) in 100 mM phosphate buffer containing 0.1 mM DTPA, pH 7.4, at  $25\pm0.2^{\circ}$ C. Although peroxynitrite decomposition is usually monitored at 302 nm ( $\varepsilon_{302}=1.67\times10^3$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), here it was monitored at 310 nm ( $\varepsilon_{310}=1.6\times10^3$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) to avoid interferences by background protein absorption at 302 nm [22]. The initial rate approach was used to determine the secondorder rate constant [22]. To this end, peroxynitrite decay from 2 to 10 ms was fit to a linear plot and the obtained rate was substituted in the equation below to determine the apparent second-order rate constant at pH 7.4 [22].

$$\frac{d[\text{ONOO}^{-}]}{dt} = k_{\text{Tsa1}}[\text{ONOO}^{-}][\text{Tsa1}].$$
(1)

The apparent second-order rate constants of the reaction of HRP with hydrogen peroxide [29] and peroxynitrite [30] have been determined before under various conditions by monitoring HRP decay to compound I ( $\Delta \varepsilon_{403} = 5.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) in stopped-flow instruments. We repeated some of these experiments to determine the apparent second-order rate constants under our experimental conditions (100 mM phosphate buffer containing 0.1 mM DTPA, pH 7.4, and  $25\pm0.2^{\circ}$ C). HRP concentration was determined spectrophotometrically at 403 nm ( $\varepsilon_{403} = 1.02 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). HRP solutions were mixed with peroxynitrite or hydrogen peroxide, and HRP oxidation was monitored at 403 nm. In the case of peroxynitrite, the apparent second-order rate constant ( $k_{\text{HRP}} = 1.02 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) was determined by the pseudo-first-order approach. The oxidation of 2  $\mu$ M HRP by different peroxynitrite concentrations (10–

100  $\mu$ M) was monitored and the obtained  $k_{obs}$  values were plotted against peroxynitrite concentrations to determine the apparent second-order rate constant [30]. In the case of hydrogen peroxide ( $k_{HRP}=1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), the initial rate approach was used (HRP=3.7  $\mu$ M; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=1.5  $\mu$ M) (see above) to keep the reaction slow enough to follow on the stopped-flow apparatus [29].

#### Competitive kinetic studies by the stopped-flow technique

To circumvent the fact that the reactants have low specific light absorption in the UV-visible range, competitive kinetic experiments were designed to obtain the apparent secondorder rate constants (see Results) [20-23]. Anticipating that peroxiredoxins react rapidly with peroxides, its chosen competitor was HRP which reacts quickly with both hydrogen peroxide  $(k_{\text{HRP}}=1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$  [29] and peroxynitrite  $(k_{\text{HRP}}=1.02 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$  [30] to produce compound I. The latter values were determined by us at pH 7.4 and were in perfect agreement with previously reported values (see above). The determination of HRP concentration, the incubation conditions, and the employed stopped-flow spectrophotometer were the same as described above. HRP solutions containing different concentrations of reduced Tsa1 or Tsa2 (or none at all) were mixed with hydrogen peroxide or peroxynitrite, and HRP decay was monitored at 403 nm. The percentage of inhibition of HRP oxidation (F/1-F) was plotted against Tsa1 and Tsa2 concentrations that caused it to obtain the corresponding second-order rate constant  $(k_{Tsax})$  as established by the equation below [20].

$$\left(\frac{F}{1-F}\right)k_{\rm HRP}[\rm HRP] = k_{\rm Tsa}[\rm Tsa].$$
<sup>(2)</sup>

#### Competitive kinetic studies by absorbance measurements

Most of the competitive kinetic studies shown here were performed in a stopped-flow spectrophotometer (Applied Photophysics SX-18MV). Similar data, however, can be obtained in a standard spectrophotometer. This was confirmed by experiments where HRP solutions (8  $\mu$ M) containing different concentrations of Tsa1 (or none at all) were mixed with hydrogen peroxide (4  $\mu$ M) in 100 mM phosphate buffer containing 0.1 mM DTPA, pH 7.4, at 25°C. After 2 min incubation, HRP oxidation to compound I was monitored at 403 nm, and the second-order rate constant was determined as described above (Eq. (2)).

#### Oxidation of dihydrorhodamine 123

Dihydrorhodamine 123 (DHR) solutions (100  $\mu$ M) containing different concentrations of reduced or nonreduced Tsa1 or Tsa2 (0–45  $\mu$ M) were rapidly mixed with peroxynitrite (20  $\mu$ M) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. DHR oxidation to rhodamine 123 was followed spectrophotometrically at 500 nm ( $\varepsilon_{500}$ =78,800 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) [31]. Stock solutions of DHR (29 mM) in acetonitrile were stored at -20°C in the dark.

#### Kinetic simulations

The Gepasi software (version 3.3) [32,33] was used to simulate the kinetics of HRP compound I formation in the absence and presence of different concentrations of Tsa1 or Tsa2. The equations below and the second-order rate constant values determined in this work ( $k_{\text{HRP}}$  and  $k_{\text{Tsa}}$ ) were used in the simulations (see Results).

$$HRP + H_2O_2 \xrightarrow{\kappa_{HRP}} HRP \text{ compound I}$$
(3)

$$Tsa + H_2O_2 \xrightarrow{k_{Tsa}} Tsa_{oxidized}.$$
 (4)

#### Results

#### Validation of the competitive kinetic approach with HRP

Direct measurements of the rates of peroxide-mediated oxidation of peroxiredoxins by stopped-flow kinetics have been performed only for peroxynitrite because it is the only peroxide that possesses a distinguishable light absorption in the UV range [8,22-34]. But even peroxynitrite has a low extinction coefficient ( $\epsilon_{302}$ =1.67×10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) in a region where protein absorption interferes, demanding considerable amounts of protein to be used ( $\sim$ 30–50  $\mu$ M) for reliable rate measurements (also, see Experimental procedures). Thus, a competitive kinetic approach was designed to monitor the rates of Tsa1 and Tsa2 oxidation by peroxynitrite and hydrogen peroxide. Previously, manganese porphyrins have been used to compete with peroxiredoxins for peroxynitrite [22,23]. However, we decided to use HRP as the peroxiredoxin competitor because it reacts rapidly with both hydrogen peroxide ( $k=1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) and peroxynitrite  $(k=1.02 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$  to produce compound I. The latter values were determined by us at pH 7.4 and were in perfect agreement with previously reported values [29,30] (see Experimental procedures). Another advantage of using HRP as the peroxiredoxin competitor is the considerable change of light absorption in the visible range that results from its oxidation to compound I ( $\Delta \epsilon_{403} = 5.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [29,35], permitting the use of low protein concentrations (<10  $\mu$ M).The employed peroxide concentrations should be stoichiometric or substoichiometric to HRP because compound I is not stable in the presence of excess peroxide [35,36].

To validate the competitive kinetic approach, we first monitored the oxidation of 8 µM HRP by 8 µM peroxynitrite in the absence and presence of various Tsa1 concentrations (Fig. 2A). The competitive mechanism applied because Tsa1 inhibited HRP oxidation in a concentration-dependent manner, and a linear relationship was obtained between (F/(1-F)) $k_{\text{HRP}}$  [HRP] and Tsa1 concentration (Eq. (1)) (Fig. 2B). From the slope of the plot, an apparent second-order rate constant of  $7.4\pm0.9\times10^5$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> at pH 7.4 and 25°C was determined (see Experimental procedures). Next, the second-order rate constant of the reaction of Tsa1 with peroxynitrite was determined by direct kinetics [8,22,23,34]. To this end, the rate of peroxynitrite decomposition was monitored by the decay of its absorbance at 310 nm in the absence and presence of Tsa1 (Fig. 2C). This experiment was repeated twice, and an apparent second-order rate constant of  $6.5\pm$  $1.0 \times 10^5$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> at pH 7.4 and 25°C was calculated by the initial rate approach (see Experimental procedures).

The close agreement between the rate constant values determined by direct kinetics  $(6.5\pm1.0\times10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$  and competitive kinetics  $(7.4\pm0.9\times10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$  validates the latter. Thus, this method was applied to study the kinetics of the reaction of Tsa1 and Tsa2 with peroxynitrite and hydrogen peroxide and to determine the  $pK_a$  of the active site of the enzymes.

#### *Kinetics of the reaction with peroxynitrite and hydrogen peroxide*

Tsa2 was shown to compete with HRP for peroxynitrite by experiments similar to those shown in Fig. 2A for Tsa1. The plot of (F/(1-F))  $k_{\text{HRP}}$  [HRP] against Tsa2 concentration was also linear (data not shown), and the apparent second-order rate constants of Tsa1 and Tsa2 were shown to be in the same range  $(10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$  at pH 7.4 (Table 1).



Fig. 2. Rate constant determination of the reaction between peroxynitrite and Tsa1 by competitive and direct kinetics. (A) Inhibition of HRP compound I formation by the specified concentrations of Tsa1 in mixtures of HRP (8.2  $\mu$ M), peroxynitrite (8  $\mu$ M), and DTPA (0.1 mM) in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4, at 25°C. (B) Plot of data shown in (A) as (*F*/(1–*F*))  $k_{\text{HRP}}$  [HRP] against [Tsa1]; slope= $k_{\text{Tsa1}} = (7.5 \pm 0.9) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . (C) Direct kinetics of the decomposition of 50  $\mu$ M peroxynitrite in the absence and presence of 50  $\mu$ M Tsa1 in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4, at 25°C. Incubations, experimental conditions, and the kinetic approaches used to determine second-order rate constants are described under Experimental procedures.

Table 1 Values of  $pK_a$  and second-order rate constants determined for Tsa1 and Tsa2 reacting with hydrogen peroxide and peroxynitrite at 25°C

Peroxiredoxin	$pK_a$	$k_{\rm hydrogen\ peroxide}\ ({\rm M}^{-1}\ {\rm s}^{-1})$	$k_{\text{peroxynitrite}} (M^{-1} \text{ s}^{-1})$						
		рН 7.4	pH 7.4	pH independent					
Tsa1	5.4	$2.2 \times 10^{7}$	$7.4 \times 10^{5}$	$5.3 \times 10^{6}$					
Tsa2	6.3	$1.3 \times 10^{7}$	$5.1 \times 10^{5}$	$3.9 \times 10^{6}$					

The competitive mechanism also applied in the case of hydrogen peroxide because different experiments showed that hydrogen peroxide-mediated oxidation of HRP to compound I was inhibited by Tsa1 and Tsa2 in a concentration-dependent manner (see, for instance, Fig. 3A). Plots of (F/(1-F))  $k_{\rm HRP}$  [HRP]  $k_{\rm HRP}$  against Tsa1 and Tsa2 concentration were linear (Eq. (2)) and permitted the determination of second-order rate constants (Fig. 3B) (Table 1). The determined second rate-order constants for Tsa1 and Tsa2 reacting with hydrogen peroxide at pH 7.4 were extremely high (around  $10^7 \, {\rm M}^{-1} \, {\rm s}^{-1}$ ).

Although the second-order rate constant values determined by competitive kinetics in the case of hydrogen peroxide cannot be validated by direct kinetics, they can be tested by kinetic simulations [32,33]. To this end, formation of compound I in the absence and presence of different Tsa1 and Tsa2 concentrations was simulated by employing the determined second-order rate constant values (Table 1). A good agreement between the experimental and the simulated kinetics was always observed (see, for instance, the noiseless lines in Fig. 3A), further validating the kinetic competitive approach.

Since stopped-flow instruments are not widely available, it was important to compare the second-order rate constant values obtained from experiments performed in stopped-flow and standard spectrophotometers. In the latter case, we should rely on one-time point absorbance measurements after the completion of the reactions that are extremely rapid (Figs. 2 and 3).



Fig. 3. Rate constant determination of the reaction between hydrogen peroxide and Tsa2 by competitive kinetics. The reaction mixtures contained HRP (3.67  $\mu$ M), hydrogen peroxide (1.5  $\mu$ M), DTPA (0.1 mM), and the specified concentrations of Tsa2 in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4, at 25°C. (A) Formation of HRP compound I in the absence or presence of the specified Tsa2 concentrations; the noiseless line superimposed to the experimental trace obtained in the absence and presence of 3.5  $\mu$ M Tsa2 corresponds to kinetic simulations. (B) Plot of (*F*/(1–*F*))  $k_{\rm HRP}$  [HRP] against [Tsa2]; slope= $k_{\rm Tsa2}$ = (1.30±0.14)×10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Incubations, experimental conditions, approaches used to determine second-order rate constants, and kinetic simulations are described under Experimental procedures.



Fig. 4. Rate constant determination of the reaction between hydrogen peroxide and Tsa1 by absorbance measurements. The reaction mixtures contained HRP (8  $\mu$ M), DTPA (0.1 mM), and the specified concentrations of Tsa1 in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4, at 25°C. Then, hydrogen peroxide (4  $\mu$ M) was added and after a 2-min incubation, formation of HRP compound I was monitored at 403 nm. (A) Formation of HRP compound I in the absence or presence of the specified Tsa1 concentrations. (B) Plot of  $(F/(1-F)) k_{\text{HRP}}$  [HRP] against [Tsa1]; slope= $k_{\text{Tsa1}}$ =2.5×10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Incubations, experimental conditions, and the approaches used to determine second-order rate constants are described under Experimental procedures.

Thus, we monitored the amount of HRP oxidized by hydrogen peroxide (4  $\mu$ M) in the absence and presence of different Tsa1 concentrations (2–16  $\mu$ M) after a 2-min incubation. As anticipated, Tsa1 inhibited HRP oxidation in a concentration-dependent manner (Fig. 4A). Likewise, the plot of (*F*/(1–*F*))  $k_{\rm HRP}$  [HRP] against Tsa1 concentration was linear (Eq. (2)) (Fig. 4B) and the obtained value of the second-order rate constant (2.5×10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) was in close agreement with those obtained from stopped-flow experiments (Table 1). This comparison extends the usefulness of the competitive HRP approach.

#### Determination of the pKa of the peroxidatic cysteine

Since the second-order rate constant of the reaction of HRP with hydrogen peroxide is pH independent in the range of pH 4.5 to 7.0 [35,37], the kinetic competitive approach with HRP can be useful for determining the  $pK_a$  of the peroxired xin active site. To this end, the second-order rate constants for the reaction of hydrogen peroxide with Tsa1 and Tsa2 were also determined at different pH by experiments similar to those shown in Fig. 3. The experimental pH profiles showed a single  $pK_a$  of 5.4 and 6.3 for Tsa1 and Tsa2, respectively (Fig. 5). These values should correspond to the  $pK_a$  of the peroxidatic cysteine residue of Tsa1 and Tsa2 (Cys<sup>47</sup>). Indeed, the resolving cysteine residue  $(Cys^{170})$  is expected to have a pK<sub>a</sub> similar to that of the free amino acid cysteine ( $pK_a = 8.4$ ) whereas hydrogen peroxide has a  $pK_a$  of 11.7 [38]. The difference of almost 1 unit in the  $pK_a$  of peroxidatic cysteine of Tsa1 and Tsa2 was surprising because of their 86% identity in amino acid sequence.

# Comparison of the reaction with peroxynitrite and hydrogen peroxide

The second-order rate constants obtained for the reaction with peroxynitrite are, apparently, considerably lower than



Fig. 5. Variation of the second-order rate constants of the reaction between Tsa1 ( $\blacksquare$ ) or Tsa2 ( $\bigcirc$ ) with hydrogen peroxide as a function of the pH. Rate constants were determined under the experimental conditions described in the legend to Fig. 3 except for the pH and alternative use of Tsa1 or Tsa2. Acetate (100 mM) and phosphate buffer (100 mM) were used in the pH range of 4.5–5.8 and 6.0–7.4, respectively.

those obtained for hydrogen peroxide. However, peroxynitrite chemistry is more complex than that of hydrogen peroxide (for reviews, see [39,40] and references therein). Peroxynitrite has a low  $pK_a$  (6.6) and rapidly decomposes upon protonation  $(k=0.17 \text{ s}^{-1} \text{ at pH } 7.4 \text{ and } 25^{\circ}\text{C})$  to produce nitrate (about 65% yield) and nitrogen dioxide plus the hydroxyl radical (about 35% yield, each). Thus, direct oxidation of targets by peroxynitrite competes with its unimolecular decay, which produces radicals that can also oxidize the targets. For instance, peroxynitrite can oxidize thiols directly by a two-electron mechanism that produces the corresponding sulfenic derivative, which subsequently reacts with a second thiol to produce the disulfide, resulting in a stoichiometry of two thiols oxidized per peroxynitrite [27,41-45]. In addition, the radicals derived from the proton-catalyzed decay of peroxynitrite oxidize thiols to produce thiyl and sulfenyl radicals that can trigger radical chain reactions [27,43,44]. This process occurs with a stoichiometry that varies with the experimental conditions but is always lower than two thiols per oxidant because only 35% peroxynitrite decomposes to radicals [39,40]. Thus, it was important to examine the reaction of Tsa1 and Tsa2 with peroxynitrite in regard to thiol dependence and stoichiometry. Reduced thiols were required for a fast reaction with peroxynitrite because only reduced Tsa1 and Tsa2 were capable of inhibiting peroxynitritemediated oxidation of dihydrorhodamine to rhodamine (Fig. 6A) [8,22,34]. To establish the stoichiometry, the thiol contents of reduced Tsa1 and Tsa2 were determined before and after reaction with peroxynitrite by the DTNB assay [27]. Untreated Tsa1 and Tsa2 (20  $\mu$ M) showed ~1.8 thiol/monomer that is close to the expected 2 thiol/monomer ratio (Fig. 1). The enzyme thiol groups were oxidized by peroxynitrite in a concentration-dependent manner as shown by plotting thiol depletion versus added peroxynitrite concentration (Fig. 6B). The results obtained with both enzymes can be fitted in a straight line whose slope was  $\sim 2$ , indicating that one peroxynitrite oxidizes two thiol groups of Tsa1 or Tsa2 (Fig. 6B). These results indicate that under our experimental conditions, the main reaction occurring is the direct reaction between peroxynitrite and the peroxidatic cysteine residue of Tsa1 and Tsa2, as has been previously demonstrated for other peroxiredoxins [8,22,34]. In the case of Tsa1 and Tsa2, peroxynitrite should oxidize the peroxidatic cysteine residue  $(Cys^{47})$  of one monomer to the sulfenic acid derivative that subsequently reacts with the resolving cysteine  $(Cys^{170})$  from the other subunit to form an intersubunit disulfide bond (Fig. 1).

After establishing that the main reaction of peroxynitrite with Tsa1 and Tsa2 is equivalent to that of hydrogen peroxide (Fig. 1), it became relevant to further compare the corresponding rate constants. A pH-independent second-order rate constant for the reaction of peroxynitrite with Tsa1 and Tsa2 can be calculated from Eq. (2) that is derived by assuming that peroxynitrous acid reacts with the thiolate anion [45].

$$ONOOH + RS^{-} \xrightarrow{RS} RSOH \xrightarrow{RS^{-}} RSSR + OH^{-}$$
$$NO_{2}^{-}$$

$$k_{ap} = k \left( \frac{[\mathrm{H}^+]}{K_{\mathrm{ONOOH}} + [\mathrm{H}^+]} \right) \left( \frac{[\mathrm{H}^+]}{K_{\mathrm{TsaSH}} + [\mathrm{H}^+]} \right)$$
(5)

By substituting the appropriate values ( $k_{ap}$  determined at pH 7.4;  $K_{ONOOH} = 2.5 \times 10^{-7}$  M,  $K_{TsaSH} = 3.98 \times 10^{-6}$  and  $5.01 \times 10^{-7}$  M for Tsa1 and Tsa2, respectively), the pH-independent second-order rate constants were calculated as  $5.3 \times 10^{6}$  and  $3.9 \times 10^{6}$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> for Tsa1 and Tsa2, respectively (Table 1). Thus, Tsa1 and Tsa2 react faster with hydrogen peroxide than with peroxynitrite.



Fig. 6. Thiol dependence of Tsa1 and Tsa2 reaction with peroxynitrite. (A). Inhibition of peroxynitrite-mediated DHR oxidation by increasing concentrations of Tsa1 or Tsa2. The reaction mixtures contained DHR 123 (100  $\mu$ M), peroxynitrite (20  $\mu$ M), DTPA (0.1 mM), and the specified concentrations of Tsa1 ( $\blacksquare$ ), oxidized Tsa1 ( $\square$ ), Tsa2 ( $\bullet$ ), or oxidized Tsa2 ( $\bigcirc$ ) in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4, at 25°C. Rhodamine formation was monitored at 500 nm; initial thiol contents were determined by the DTNB assay as ~1.8 thiol per Tsa1 and Tsa2 monomer (see Experimental procedures). Error bars represent±SD of experiments in triplicate. (B) Oxidation of Tsa1 and Tsa2 thiols by peroxynitrite. The specified concentrations of peroxynitrite were added to 20  $\mu$ M Tsa 1 ( $\blacksquare$ ) or Tsa2 ( $\bullet$ ) in 100 mM phosphate buffer containing DTPA (0.1 mM), pH 7.4, at 25°C. After a 15-min incubation, remaining thiols were determined by the DTNB assay (Experimental procedures). Error bars represent±SD of experiments in triplicate.

#### Discussion

Peroxiredoxins are receiving increasing attention as enzymatic defenses against oxidative damage and as sensors of hydrogen peroxide-mediated signaling events [2–4]. Likely to be critical for both functions is a rapid reaction with hydrogen peroxide, typically with second-order rate constant higher than  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [17,18]. Until very recently, however, the values reported for these rate constants have been determined by steady-state kinetics ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ) and shown to be in the range of  $10^4$  to  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  including the rate constants for Tsa1 and Tsa2 from *S. cerevisiae* [4,10]. To resolve this apparent paradox, we tested a competitive kinetic approach to determine the second-order rate constant of the reaction of Tsa1 and Tsa2 with hydrogen peroxide and peroxynitrite by using HRP as the competitor enzyme.

The competitive kinetic approach was shown to be reliable because it provided a second-order rate constant value for the reaction between Tsa1 and peroxynitrite in clear agreement with that obtained by direct stopped-flow kinetics (Fig. 2). In addition, the results showed that Tsa1 and Tsa2 competed with HRP for the oxidants in a concentration- and rate constantdependent manner (Eq. (1)) (Figs. 2–4) [20–23]. From these experiments, the second-order rate constants for Tsa1 and Tsa2 were determined and shown to be high, in the range of  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for hydrogen peroxide and  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for peroxynitrite at pH 7.4, 25°C (Table 1). Importantly, these high rate constant values add to very recent reports demonstrating that peroxiredoxins are as efficient as heme and selenium proteins in reacting with hydrogen peroxide [19,46,47].

Thus, our kinetic studies provided a simple method for the determination of second-order rate constants for the reaction of peroxiredoxins with hydrogen peroxide and peroxynitrite. Although most of our experiments were performed in a stopped-flow instrument, we showed that reliable secondorder rate constant values can be obtained in standard spectrophotometers (Fig. 4). In contrast to the steady-state approach (Fig. 1), the competitive one does not require the reducing system and, thus, can be applied to peroxiredoxins whose physiological reductant is unknown. A disadvantage of the competitive approach with HRP is that it cannot be applied to study the reaction of peroxiredoxins with organic peroxides because they react with peroxidase enzymes in processes that are relatively slow, complex, and produce radical intermediates [48]. A possibility of determining the second-order rate constant of peroxiredoxins with organic peroxides is to combine the HRP competitive approach described here with the selenium glutathione peroxidase competitive approach proposed by Peshenko and Shichi [49]. In this approach, peroxynitrite and organic peroxides compete for the peroxiredoxin and the remaining organic peroxide is determined by the glutathione peroxidase/ glutathione reductase/NADPH coupled assay. This method can be used to determine the second-order rate constant of the reaction of a peroxiredoxin with an organic peroxide if the enzyme does not accept glutathione as electron donor, and the second-order rate constant of its reaction with peroxynitrite is known. The latter value can be obtained by the HRP competitive approach.

Our kinetic studies also allowed us to determine the  $pK_a$  values of the peroxidatic cysteine residue (Cys<sup>47</sup>) of Tsa1 and Tsa2 to be 5.4 and 6.3, respectively (Fig. 5, Table 1). This 1 unit difference in the  $pK_a$  was unexpected because Tsa1 and Tsa2 have 86% identity in amino acid sequence. Despite the difference in Cys<sup>47</sup>  $pK_a$  values, Tsa1 and Tsa2 reacted with hydrogen peroxide with similar rate constants at pH 7.4 (Table 1), emphasizing that  $pK_a$  is only one of the factors that affect

Tsa2	1		MVA	EVQI	KQA	PPF	KKT	AVV	-DG	IFE	EISI	EKY	KGK	YVVL	AFV	PLA	FSF	VCP	TEI	VAFS	5
Tsal	1		MVA	QVQI	KQA	PTF	KKT	AVV	-DG	VFDI	EVSI	DKY	KGK	YVVL	AFI	PLA	FTF	VCP	TEI	IAFS	5
2CysDm	1		-MP	QLQ	KPA	PAF	AGT	AVV	-NG	VFKI	DIKI	SDY	KGK	YLVL	FFY	PLD	FTF	VCP	TEI	IAFS	3
2CysTc	1	MSC	GDA	KLNH	HPA	PDF	NET	ALM	PNG	TFKI	KVAI	SSY	KGK	VLVL	FFY	PMD	FTF	VCP	TEI	CQFS	5
2CysHs	1	MXS	GNA	RIG	KPA	PDF	KAT	AVV	-DG	AFKI	EVKI	SDY	KGK	YVVL	FFY	PLD	FTF	VCP	TEI	IAFS	5
2CysEc	1			MFPH	KTL	TDS	KYK	AFV	-DG	EIK	EISI	QDY	IGK	YVVL	AFY	PLD	FTF	VCP	TEII	NRFS	5
2CysTv	1		-MS	LVNE	KAA	PDF	EAN	AFV	-NG	EVK	KIRI	SSY	RGK	VVVL	FFY	PAD	FTF	VCP	TEVI	EGFA	A
2CysSe	1		-MS	LINT	rki:	KPF	KNQ	AFK	-NG	EFI	EVTE	CKDI	EGRI	NS <b>V</b> F	F <b>F</b> Y	PAD	FTF	VCP	TEL	GDVA	A
2CysEcoli	1		-MS	LINT	[KI	KPF	KNQ	AFK	-NG	EFII	EITE	CKDI	EGR	NS <b>V</b> F	FFY	PAD	FTF	VCP	TEL	GDVA	A
								*.	:*		. :		*:	: *:	*	*	*:*:	* * *	**:	. :	
Tsa2	117	EKE	GIA	L <b>R</b> GI	LFI	IDP	KGI	IRH	ITI	NDL	SVGE	NVN	EAL	RLVE	GFQ	WTD	KN-0	GTV	LPCI	WTE	2
Tsal	117	EEE	GVA	L <b>R</b> GI	LFI	IDP	KGV	IRH	ITI	NDLI	PVGE	NVE	EAL	RLVE	AFQ	WTD	KN-0	GTV	LPCI	WTE	?
2CysDm	116	EET	GIP	F <b>R</b> GI	LFI	IDD	KQN	LRQ	ITVI	NDL	PVGE	SVE	ETL	RLVQ	AFQ	YTD	KY-C	GEV	CPAI	WKE	2
2CysTc	121	EED	GVA	Y <b>R</b> GI	LFI	IDP	KQN	LRQ	ITVI	NDLI	PVGE	DVD	EAL	RLVK	AFQ	FVE	EH-C	GEV	CPA	WKE	2
2CysHs	120	TDE	GIA	Y <b>R</b> GI	LFI	IDG	KGV	LRQ	ITVI	NDL	PVGE	SVE	EAL	RLVQ	AFQ	YTD	EH-C	GEV	CPA	GWKE	2
2CysEc	114	EEN	GHP	MRST	rvi	LAK	DLS	VRH	ISS	NYHA	AIGE	SVE	EII	RLID	AIT	FND	EN-0	GDI	CPA	EWR-	-
2CysTv	113	EET	GNA	Q <b>R</b> GI	LFI	INP	DGI	VKY	VVI	TDDI	VGI	STE	ETL	RVLE	ALQ	s	(	GL	CPVI	WHE	2
2CysSe	113	EDE	GLA	DRAT	FV	VDP	QGI	IQA	IEV	TAE	GIGE	DAS	DLL	RKIK	AAQ	YVA	AHP	GEV	<u>C</u> PA	KWKE	2
2CysEcoli	113	EDE	GLA	DRAT	FV	VDP	QGI	IQA	IEV	TAE	GIGE	DAS	DLL	RKIK	AAQ	YVA	SHP	GEV	CPA	WKE	2
			* .	*.	.:	:		::	:		:**	·	: :'	* :.			,	* :	*	*	

Fig. 7. Multiple sequence alignment of 2-Cys peroxiredoxins. The alignment was performed using CLUSTAL W 1.8 software [52] and the facility from Network Protein Sequence Analysis (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgibin/npsa\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\_clustalw.html). Only partial alignment is shown and the numbers on the left side of the sequences refer to the position of the residues in the sequence. Tsa1 (gi=464970)and Tsa2 (gi=2499475) are from *Saccharomyces cerevisiae*; 2CysDm (gi=12744791) is from *Drosophila melanogaster*; 2CysTc (gi=70873021) is from *Trypanosoma cruzi*; 2CysHs (gi=32189392) is from *Homo sapiens*; 2cysEc (gi=19173077) is from *Encephalitozoon cuniculi*; 2CysTv (gi=14324437) is from *Thermoplasma volcanium* GSS1; 2CysSe (gi=56414255) is from *Salmonella enterica subsp. enterica serovar*; 2CysEcoli (gi=75514700) is from *Escherichia coli*. Letters presented in bold represent residues that are not in identical positions among the sequences. Letters shaded in gray represents residues that can explain differences in catalytical properties of Tsa1 and Tsa2 (see text for details). \*, :, symbols represent positions fully, strongly, and moderately conserved, respectively.

333

cysteine residue reactivity [50]. Also worth noting was the fact that the determined second-order rate constants were higher for hydrogen peroxide than for peroxynitrite which is usually more reactive toward thiols (see Results) [42]. Even the pHindependent rate constant values for the reactions with peroxynitrite, which were calculated by taking into consideration the low peroxynitrite  $pK_a$  (pKa=6.6) together with the determined  $pK_a$  of the peroxidatic cysteine of both Tsa1 and Tsa2 (Eq. (3)), were lower than those determined for hydrogen peroxide at pH 7.4 (Table 1). Possibly, the conserved Pro<sup>40</sup> in the narrow pocket where  $Cys^{47}$  is located [3,51] limits the accessibility of peroxynitrite whose peroxo bond has N=O instead of a hydrogen (H) substituent. In regard to the Cys<sup>47</sup>  $pK_a$ values, an important structural factor is likely to be the substitution of Thr<sup>44</sup> in Tsa1 by Ser in Tsa2 (Fig. 7) [52]. Indeed, the residues considered to be important for lowering peroxidatic Cys  $pK_a$  in peroxiredoxin classes are the conserved Arg<sup>123</sup> and Thr<sup>44</sup> and the main conformation of the nonconserved residue 41. The latter contributes through its peptide amide and carbonyl group which donates a hydrogen bond to the sulfur of Cys<sup>47</sup> and accepts a hydrogen bond from the oxygen of Thr<sup>44</sup> [3]. Residues 123 (Arg) and 41 (Leu) are conserved in Tsa1 and Tsa2 but Thr<sup>44</sup> in Tsa1 is replaced by Ser<sup>44</sup> in Tsa2 (Fig. 7) [52]. Although the same hydrogen bonds are possible with Thr or Ser, their strengths are expected to vary, affecting the overall electrostatic environment of Cys<sup>47</sup> and, thus, its  $pK_a$ . However, site-specific mutagenesis of equivalent Thr residues to Ser in peroxiredoxins from Leismania donovani increased their peroxidase activity toward tert-butylhydroperoxide twice [53]. Most eukaryotic 2-Cys peroxiredoxins possess a conserved aspartate in the position equivalent to Asp<sup>150</sup> of Tsa1, but Tsa2 contains an Asn in this position (Fig. 7). No catalytic role for  $Asp^{150}$  has been described so far but it is feasible since an equivalent residue in human 2-Cys peroxiredoxin is near the resolving Cys (Protein Data Bank id=1OMV). Thus, the understanding of how these molecular effects can be translated into a difference of 1 pKa unit will depend on the determination of detailed Tsa1 and Tsa2 tridimensional structures.

In summary, our studies provide a useful method for determining the second-order rate constant of the reactions of peroxiredoxins with hydrogen peroxide and peroxynitrite. This method can be used to determine the  $pK_a$  of the reactive cysteine residue and can be applied to study other important thiol proteins. Our studies also demonstrate that Tsa1 and Tsa2 react with hydrogen peroxide and peroxynitrite with second-order rate constants comparable to those of heme and selenium proteins. Thus, they provide chemical ground for their action as sensors of hydrogen peroxide-mediated signaling events [2-4,14,15,17,18] and as enzymatic defenders against oxidative and nitrosoactive stress in yeast [6-11].

#### Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Projeto Milênio Redoxoma). R. Ogusucu (CAPES/FAPESP) and D. Rettori (FAPESP) were recipients of fellowships from the specified funding agencies.

#### References

- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Oxford Univ. Press; 1998.
- [2] Rhee, S. G.; Chae, H. Z.; Kim, K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 38:1543–1552; 2005.
- [3] Wood, Z. A.; Schroder, E.; Robin Harris, J.; Poole, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28: 32–40; 2003.
- [4] Hofmann, B.; Hecht, H-J.; Flohé, L. Peroxiredoxins. *Biol. Chem.* 383: 347–364; 2002.
- [5] Kim, K.; Kim, I-H.; Lee, K. Y.; Rhee, S. G.; Stadtman, E. R. 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. *J. Biol. Chem.* 263:4704–4711; 1988.
- [6] Netto, L. E. S.; Chae, H. Z.; Kang, S. W.; Rhee, S. G.; Stadtman, E. R. Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. *J. Biol. Chem.* 271: 15315–15321; 1996.
- [7] Park, S. G.; Cha, M. K.; Jeong, W.; Kim, I-H. Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275:5723–5732; 2000.
- [8] Bryk, R.; Griffin, P.; Nathan, C. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* 407:211–215; 2000.
- [9] Wong, C-M.; Zhou, Y.; Ng, R. W. M.; Kung, H-F.; Jin, D-Y. Cooperation of yeast peroxiredoxins Tsa1p and Tsa2p in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J. Biol. Chem.* 277:5385–5394; 2002.
- [10] Munhoz, D. C.; Netto, L. E. S. Cytosolic thioredoxin peroxidase I and II are important defenses of yeast against organic hydroperoxide insult. *J. Biol. Chem.* 279:35219–35227; 2004.
- [11] Wong, C. M.; Siu, K. L.; Jin, D. Y. Peroxiredoxin-null yeast cells are hypersensitive to oxidative stress and are genomically unstable. *J. Biol. Chem.* 279:23207–23213; 2004.
- [12] Jang, H. H.; Lee, K. O.; Chi, Y. H.; Jung, B. G.; Park, S. K.; Park, J. H.; Lee, J. R.; Lee, S. S.; Moon, J. C.; Yun, J. W.; Choi, Y. O.; Kim, W. Y.; Kang, J. S.; Cheong, G-W.; Yun, D-J.; Rhee, S. G.; Cho, M. J.; Lee, S. Y. Two enzymes in one: two yeast peroxiredoxins display oxidative stressdependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* 117:625–635; 2004.
- [13] Moon, J. C.; Hah, Y. S.; Kim, W. Y.; Jung, B. G.; Jang, H. H.; Lee, J. R.; Kim, S. Y.; Lee, Y. M.; Jeon, M. G.; Kim, C. W.; Cho, M. J.; Lee, S. Y. Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H2O2-induced cell death. J. Biol. Chem. 280:28775–28784; 2005.
- [14] Woo, H. A.; Chae, H. Z.; Hwang, S. C.; Yang, K-S.; Kang, S. W.; Kim, K.; Rhee, S. G. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science* **300**:653–656; 2003.
- [15] Wood, Z. A.; Poole, L. B.; Karplus, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* **300**:650–653; 2003.
- [16] Kim, I. H.; Kim, K.; Rhee, S. G. Induction of an antioxidant protein of Saccharomyces cerevisiae by O<sub>2</sub>, Fe<sup>+3</sup>, or 2-mercaptoethanol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6018–6022; 1989.
- [17] Stone, J. R. An assessment of proposed mechanisms for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 422:119–124; 2004.
- [18] Forman, H. J.; Fukuto, J. M.; Torres, M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287:C246–C256; 2004.
- [19] Parsonage, D.; Youngblood, D. S.; Sarma, G. N.; Wood, Z. A.; Karplus, P. A.; Poole, L. B. Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Biochemistry* 44:10583–10592; 2005.

- [20] Winternbourn, C. C. The ability of scavengers to distinguish OHproduction in the iron-catalyzed Haber-Weiss reaction: comparison of four assays for OH-. *Free Radic. Biol. Med.* 3:33–39; 1987.
- [21] Radi, R. Kinetic analysis of reactivity of peroxynitrite with biomolecules. *Methods Enzymol.* 269:354–366; 1996.
- [22] Trujillo, M.; Budde, H.; Piñeyro, M. D.; Stehr, M.; Robello, C.; Flohé, L.; Radi, R. *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. *J. Biol. Chem.* 279:34175–34182; 2004.
- [23] Jaeger, T.; Budde, H.; Flohe, L.; Menge, U.; Singh, M.; Trujillo, M.; Radi, R. Multiple thioredoxin-mediated routes to detoxify hydroperoxides in Mycobacterium tuberculosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 423:182–191; 2003.
- [24] Beckman, J. S.; Beckman, T. W.; Chen, J.; Marshall, P. A.; Freeman, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 87:1620–1625; 1990.
- [25] Saha, A.; Goldstein, S.; Cabelli, D.; Czapski, G. Determination of optimal conditions for synthesis of peroxynitrite by mixing acidified hydrogen peroxide with nitrite. *Free Radic. Biol. Med.* 24:653–659; 1998.
- [26] Bonini, M. G.; Radi, R.; Ferrer-Sueta, G.; Ferreira, A. M.; Augusto, O. Direct EPR detection of carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* 274:10802–10806; 1999.
- [27] Bonini, M. G.; Augusto, O. Carbon dioxide stimulates the production of thiyl, sulfinyl, and disulfide radical anion from thiol oxidation by peroxynitrite. J. Biol. Chem. 276:9749–9754; 2001.
- [28] Claiborne, A. Catalase activity. In: Greenwald, R. A., ed. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton, FL: CRC Press; 1985:283–284.
- [29] Dolman, D.; Newell, G. A.; Thurlow, M. D.; Dunford, H. B. A kinetic study of horseradish peroxidase with hydrogen peroxide. *Can. J. Biochem.* 53:495–501; 1975.
- [30] Floris, R.; Piersma, S. R.; Yang, G.; Jones, P.; Wever, R. Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase. *Eur. J. Biochem.* 215:767–775; 1993.
- [31] Crow, J. P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide* 1: 145–157; 1997.
- [32] Mendes, P. A software package for modeling the dynamics, steady states and control of biochemical and other systems. *Comput. Appl. Biosci.* 9: 563–571; 1993.
- [33] Mendes, P. Biochemistry by numbers: simulation of biochemical pathways with Gepasi 3. *Trends Biochem. Sci.* 22:361–363; 1997.
- [34] Dubuisson, M.; Vander Stricht, D.; Clippe, A.; Etienne, F.; Nauser, T.; Kissner, R.; Koppenol, W. H.; Rees, J. F.; Knoops, B. Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase. *FEBS Lett.* **571:**161–165; 2004.
- [35] Dunford, H. B. Spectroscopy of horseradish peroxidase. I. Optical, resonance raman, magnetic circular dichroism, x-ray absorption, and diffraction. In: Dunford, H. B., ed. *Heme peroxidases*. New York: Wiley; 1999;135–174.
- [36] Nakajima, R.; Yamazaki, I. The mechanism of oxyperoxidase formation from ferryl peroxidase and hydrogen peroxide. J. Biol. Chem. 262: 2576–2581; 1987.

- [37] Job, D.; Ricard, J.; Dunford, H. B. Kinetics of formation of the primary compound (compound I) from hydrogen peroxide and turnip peroxidases. *Can. J. Biochem.* 56:702–707; 1978.
- [38] Hess, W. T. Hydrogen peroxide. In: Kroschwitz, J. I., Howe-Grant, M., eds. *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology, volume 13.* New York: Wiley; 1995:962.
- [39] Augusto, O.; Bonini, M. G.; Amanso, A. M.; Linares, E.; Santos, C. X. C.; Menezes, S. L. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic. Biol. Med.* **32**:841–859; 2002.
- [40] Radi, R.; Denicola, A.; Alvarez, B.; Ferrer-Sueta, G.; Rubbo, H. The biological chemistry of peroxinitrite. In: Ignarro, L. J., ed. *Nitric oxide: biology and pathobiology*. New York: Academic Press; 2000:57–89.
- [41] Carballal, S.; Radi, R.; Kirk, M. C.; Barnes, S.; Freeman, B. A.; Alvarez, B. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite*Biochemistry* **42**:9906–9914; 2003.
- [42] Radi, R.; Beckman, J. S.; Bush, K. M.; Freeman, B. A Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. J. Biol. Chem. 266:4244–4250; 2001.
- [43] Quijano, C.; Alvarez, B.; Gatti, R. M.; Augusto, O.; Radi, R. Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochem. J.* 322:167–173; 1997.
- [44] Gatti, R.; Radi, R.; Augusto, O. Peroxynitrite-mediated oxidation of albumin to the protein-thiyl free radical. *FEBS Lett.* 348:287–290; 1994.
- [45] Trujillo, M.; Radi, R. Peroxynitrite reaction with the reduced and the oxidized forms of lipoic acid: new insights into the reaction of peroxynitrite with thiols. *Arch. Biochem. Biophys.* 397:91–98; 2002.
- [46] Akerman, S. E.; Muller, S. Peroxiredoxin-linked detoxification of hydroperoxides in *Toxoplasma gondii*. J. Biol. Chem. 280:564–570; 2005.
- [47] Baker, L. M.; Poole, L. B. Catalytic mechanism of thiol peroxidase from Escherichia coli. Sulfenic acid formation and overoxidation of essential CYS61. J. Biol. Chem. 278:9203–9211; 2003.
- [48] Furtmuller, P. G.; Burner, U.; Jantschko, W.; Regelsberger, G.; Obinger, C. Two-electron reduction and one-electron oxidation of organic hydroperoxides by human myeloperoxidase. *FEBS Lett.* 484:139–143; 2000.
- [49] Peshenko, I. V.; Shichi, H. Oxidation of active center cysteine of bovine 1\_cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* 31:292–303; 2001.
- [50] Britto, P. J.; Knipling, L.; Wolff, J. J. The local electrostatic environment determines cysteine reactivity of tubulin. J. Biol. Chem. 277:29018–29027; 2002.
- [51] Copley, S. D.; Novak, W. R. P.; Babbit, P. C. Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry* 43:13981–13995; 2004.
- [52] Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–4680; 1994.
- [53] Flohe, L.; Budde, H.; Bruns, K.; Castro, H.; Clos, J.; Hofmann, B.; Kansal-Kalavar, S.; Krumme, D.; Menge, U.; Plank-Schumacher, K.; Sztajer, H.; Wissing, J.; Wylegalla, C.; Hecht, H. J. Tryparedoxin peroxidase of *Leishmania donovani*: molecular cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**: 324–335; 2002.

# SUPEROXIDE DISMUTASE1-MEDIATED PRODUCTION OF ETHANOL- AND DNA-DERIVED RADICALS IN YEASTS CHALLENGED WITH HYDROGEN PEROXIDE MOLECULAR INSIGHTS INTO THE GENOME INSTABILITY OF PEROXIREDOXIN-NULL STRAINS\*

Renata Ogusucu<sup>1</sup>, Daniel Rettori<sup>1¶</sup>, Luis E. S. Netto<sup>2</sup> and Ohara Augusto<sup>1</sup>

From Departamento de Bioquímica, Instituto de Química<sup>1</sup> and Departamento de Biologia, Instituto de Biociências<sup>2</sup>

Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Running head: Ethanol- and DNA-derived radicals in TSA1TSA2-null cultures

Address correspondence to: Ohara Augusto, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química,

Universidade de São Paulo, Caixa Postal 26077, CEP 05513-970, São Paulo, SP, Brazil. Tel: 55 11 3091-3873; Fax: 55 11 3091-2186; E-mail: <u>oaugusto@iq.usp.br</u>

Peroxiredoxins are receiving increasing attention as defenders against oxidative damage and sensors of hydrogen peroxidemediated signaling events. In the yeast Saccharomyces cerevisiae, deletion of one or more isoforms of the peroxiredoxins is not lethal but compromises genome stability by mechanisms that remain under scrutiny. Here, we show that cytosolic peroxiredoxinnull cells ( $tsa1\Delta tsa2\Delta$ ) are more resistant to hydrogen peroxide than WT cells, and consume it faster under fermentative conditions. Also,  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  cells produced higher yields of the 1-hydroxyethyl radical from oxidation of the glucose metabolite spin-trapping ethanol, as proved by experiments. A major role for Fenton chemistry in radical formation was excluded by comparing WT and  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  cells with respect to their levels of total and chelatable metal ions, and of radical produced in the presence of chelators. The main route for 1hydroxyethyl radical formation was ascribed peroxidase activity of Cu,Znto the superoxide dismutase (Sod1), whose expression and activity increased about fiveand two-fold, respectively, in  $tsa1\Delta tsa2\Delta$ compared to WT cells. Accordingly, overexpression of human Sod1 in WT yeasts led to increased 1-hydroxyethyl radical production. Relevantly,  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  cells challenged with hydrogen peroxide contained higher levels of DNA-derived radicals and adducts as monitored by immuno-spin trapping and incorporation of <sup>14</sup>C from glucose into DNA, respectively. The results indicate that part of hvdrogen peroxide consumption bv  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  cells is mediated by induced Sod1,

## which oxidizes ethanol to the 1-hydroxyethyl radical, which, in turn, leads to increased DNA damage. Overall, our studies provide a pathway to account for the hypermutability of peroxiredoxin-null strains.

Living organisms are constantly exposed to oxygen- and nitrogen-derived reactive species that are produced by normal metabolic activity and in response to external stimuli. To protect themselves against the toxicity of these species, aerobic organisms have evolved a range of defense mechanisms (1). Among these, a family of cysteine-based peroxidases, currently named peroxiredoxins, has attracted considerable attention because of its ubiquity and versatility. These enzymes have been shown to detoxify hydrogen peroxide, organic peroxides and peroxynitrite through oxidation of their reactive cysteine residues, which are recycled back by reducing equivalents provided by thioredoxin and other thiol-electron donors (reviewed in 2-5). In addition to detoxifying peroxides, specific peroxiredoxins have been shown to act as molecular chaperones (6, 7) and to play roles in regulating hydrogen peroxide-mediated cell signaling events (3, 8, 9).

Many organisms have multiple peroxiredoxins. Six peroxiredoxins have been identified in human cells, and five in the yeast Saccharomyces Peroxiredoxin cerevisiae. isoforms are distributed to different locations within the cell, and two of the yeast peroxiredoxins, Tsa1 and Tsa2, are cytosolic, (10). Tsa1 was the first peroxiredoxin identified in eukaryotes. It is expressed constitutively and corresponds to 0.7% of total soluble protein content in this species. In contrast, the levels of

6

Tsa2 are very low under normal conditions, but are highly induced upon treatment of the yeast with peroxides (11, 12). Tsa1 and Tsa2 share 86% identity in their amino acid sequence, and both react with hydrogen peroxide with second order rate constants similar to those of hemoproteins, such as catalase ( $k\sim10^7$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) (13). Deletion of the *TSA1* gene increases the expression of Tsa2 and other peroxiredoxin isoforms (10, 14, 15), suggesting that these peroxidases have both redundant and nonredundant physiological functions.

The deletion of one or all of the peroxiredoxin genes in S. cerevisiae is not lethal, probably because of the resulting increase in the levels of other antioxidant enzymes, such as catalase, cytochrome c peroxidase and Sod1, that has been demonstrated by transcriptional and proteomic analysis (10, 15, 16). A problem arising from this compensatory response, however, is the mutator phenotype of the peroxiredoxin null-strains that display increased spontaneous mutation rates and accumulated gross chromosomal rearrangements (16-19). These consequences are particularly conspicuous TSA1-null cells, suggesting a major in contribution of Tsa1 to genome stability. Such protection has been attributed to the ability of Tsa1 to reduce the levels of reactive oxygen species that would otherwise oxidize DNA leading mutations. chromossomal to rearrangements and cell death. These genetic and lethality studies, however, did not provide mechanistic insights on how deletion of peroxiredoxin genes leads to DNA damage nor to its molecular nature (16-19).

Here, contrary to the common notion, we show that deletion of both *TSA1* and *TSA2* genes in *S. cerevisiae* increases resistance to toxic concentrations of hydrogen peroxide. In parallel, hydrogen peroxide consumption and ethanol- and DNA-derived radical formation are increased mainly through higher expression of the enzyme Sod1.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

*Materials*- All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Merck or Fisher, and were analytical grade or better. Yeast nitrogen base (20) was from Difco and media supplements (amino acids, adenine and uracil) were from Sigma-Aldrich or Synth. Desferrioxamine was

from Novartis. Bathocuproine purchased disulfonic acid and [2-13C] ethanol were from Sigma-Aldrich. Hydrogen peroxide concentration was determined spectrophotometrically at 240 nm ( $\varepsilon_{240} = 43.6 \text{ M}^{-1}$ cm<sup>-1</sup>) (21). All solutions were prepared with water purified in a Millipore Milli-Q system. All buffers were treated with Chelex-100 to remove trace amounts of metal ion contaminants prior to use.

S. cerevisiae strains and growth conditions- The wild type strain employed was BY4741 (Mat $\alpha$ ; *His3\Delta 1; Leu2\Delta 0; Met15\Delta 0; Ura3\Delta 0*) whereas the mutant strains were:  $tsal\Delta$  (Mat $\alpha$ ; His3 $\Delta l$ ; *Leu2Δ0; Met15Δ0; Ura3Δ0; YML028W:: Kan* mx4),  $tsa2\Delta$  (Mat $\alpha$ ; His $3\Delta l$ ; Leu $2\Delta 0$ ; Met $15\Delta 0$ ; Ura3 $\Delta 0$ ; YDR453C:: Kan mx4) and tsa1 $\Delta$  tsa2 $\Delta$ (Mat $\alpha$ ; His3 $\Delta$ 1; Leu2 $\Delta$ 0; Met15 $\Delta$ 0; Ura3 $\Delta$ 0; tsa1:: Kan; tsa2:: Leu2). The first three strains were obtained from EUROSCARF (web.unifrankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/complete.html ), whereas the double mutant (generated according to 14) was kindly donated by Dr. Jin (University of Hong Kong, ChinaUniversity). Yeasts over-expressing Sod1 were obtained by standard transformation (22) of the BY47411 strain with the YEp600 plasmid containing one copy of the human Sod1 gene with its own promoter. This plasmid was extracted from EGy118 yeasts provided by Dr. Edith B. Gralla. The strains were grown in complete synthetic media (yeast nitrogen base) supplemented with 2% glucose, amino acids, adenine, and uracil under shaking at 300 rpm, 30°C (11). For all experiments, strains were grown overnight, diluted to  $OD_{600nm} = 0.2$  and collected as soon as they reached mid-log phase ( $OD_{600nm} = 0.8$ ). Growth curves under fermentative conditions were obtained for the four strains by diluting overnight cultures to  $OD_{600nm} = 0.2$  and by monitoring the optical density at 2 h intervals.

*Viability assay-* The viability of the cells was monitored by the number of colony forming units (CFU). Cell cultures at mid-log phase of growth were washed with 0.1 M phosphate buffer containing 0.1 mM DTPA, pH 7.4 and resuspended in growth media to a density of 5 x  $10^7$  cells/mL. Half of the cell suspension was treated with 1 mM hydrogen peroxide under shaking at 350 rpm for 30 min at 30°C; the other

bc
half was treated with the same volume of buffer and incubated as above. The cell suspensions were then serially diluted and 100 µL aliquots of  $1/10^4$  and  $1/10^5$  dilution were plated onto complete synthetic media supplemented with 2% glucose and 2% agar. The plates were incubated at 30°C for 2 days and the CFU number counted. The results shown are expressed as the percentage of CFU of hydrogen peroxide-treated cultures in relation to the corresponding controls. Hydrogen peroxide consumption- Hydrogen peroxide consumption was determined by the ferrous oxidation xylenol orange assay (FOX) (23). Cells at mid-log phase were treated with 1 mM hydrogen peroxide as above. At the specified times, 50 µL aliquots were diluted with 500  $\mu$ L of growth media and mixed with 950  $\mu$ L of FOX solution (100 µM xylenol orange, 250 uM ammonium ferrous sulfate, 100 mM sorbitol and 25 mM sulfuric acid). After 30 min incubation at room temperature, the absorbance of the samples was read at 560 nm. Calibration was performed with a standard solution of hydrogen peroxide.

ASBMB

The Journal of Biological Chemistry

Detection of ethanol-derived radicals-Production of the 1-hydroxyethyl radical formed from the oxidation of ethanol, a glucose metabolite, was detected by EPR spin-trapping experiments with POBN (24, 25). Cells (5 x  $10^{7}$ cells/mL) in growth media containing glucose were pre-incubated with 90 mM POBN for 5 min and 1 mM hydrogen peroxide was added under shaking at 30°C. After 30 min, aliquots were transferred to flat cells and the EPR spectra scanned. In some experiments, cells were incubated with POBN as above and 171 mM [2-<sup>13</sup>C]ethanol was added together with hydrogen peroxide. In other experiments, cells in growth media containing glucose were pre-incubated desferrioxamine, with 2 mМ 2 mМ bathocuproine disulfonic acid or with 10 mM DDC for 30 min or 1 h before addition of the components specified above. Also, cells in media alone were heated at 90°C for 20 min and brought to 30°C before addition of glucose, POBN and hydrogen peroxide. In the case of purified enzymes, 10 µM catalase, horseradish peroxidase, cytochrome c or bovine Sod1 was incubated with 90 mM POBN, 1 mM hydrogen peroxide, 0.1 mM DTPA and 171 mM ethanol in

100 mM phosphate buffer, pH 7.4, at 30°C. After 30 min incubation, the samples were transferred to flat cells and the EPR spectra scanned. In the case of Sod1, kinetic experiments were also performed. EPR spectra were recorded at room temperature  $(25 \pm 2^{\circ}C)$  on a Bruker EMX spectrometer equipped with an ER4122 SHQ 9807 high sensitivity cavity. Radical adduct quantification was performed by double integration of the EPR spectra and comparison with a standard solution of 4-hydroxy-2,2,6,6tetra-methyl-piperidinyloxy. Computer simulation analyses of some spectra were performed by using a program written by Duling (26).

Chelatable iron ion measurements- Chelatable iron levels in the strains were determined by low chelation temperature EPR after with desferrioxamine (27, 28). WT and  $tsal\Delta tsa2\Delta$ cells were collected at mid-log growth phase. Approximately 10<sup>9</sup> cells of each strain were resuspended in 10 mL of fresh growth medium without glucose, but containing 2 mM desferrioxamine. After 30 min incubation at 30°C, cells were collected and washed with 10 mL of cold Tris-HCl buffer (20 mM), pH 7.4. The cell pellet was resuspended in 400 µL of the same buffer containing 10% glycerol, transferred to a 1 mL disposable syringe and frozen in liquid nitrogen. The samples were extruded from the syringe into a finger-tip Dewar flask containing liquid nitrogen and examined by EPR at 77°K in the region of  $g \sim 4.0$  (28). The concentration of the desferrioxamine-iron complex present in the cell suspensions was obtained by double integration of the EPR signal and comparison with a standard curve constructed with known concentrations of the iron(III)-desferrioxamine complex. This was prepared by mixing different concentrations of ferrous ammonium sulfate with 2 mM desferrioxamine; the complex concentration was determined spectrophotometrically ( $\varepsilon_{430}=2,865$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (29).

Total iron, copper and zinc ion measurements-Levels of iron, copper and zinc ions in each strain were determined by atomic absorption spectrometry. Approximately  $10^9$  cells from each strain were washed in metal-free water, resuspended in a solution of nitric acid, hydrogen peroxide and water (2v:1v:3v) and digested in a microwave oven. The metal contents of the digested samples were determined in a Analytikjena AG, AAS ZEEnit 60 instrument. Iron, copper and zinc were detected at 324.8, 248.3 and 213.9nm, respectively (30).

Total peroxide measurements- Levels of total peroxides in WT and  $tsal \Delta tsa2 \Delta$  strains were determined by the FOX assay (23) as adapted to yeasts (31). Cells (5 x  $10^7$  cells/mL) of each strain were washed and resuspended in growth media and treated or not with 1 mM hydrogen peroxide. After 30 min incubation, the cells were washed twice and resuspended in 100 µl of 50 mM phosphate buffer. An equal volume of glass beads (425-600  $\mu$ m) was added and the samples were vortexed (1 min) and ice-cooled. After addition of 900 µl of cool methanol containing 4 mM butylated hydroxytoluene, the samples were submitted to two cycles of vortexing (1 min) and ice-cooling. Next, the samples were centrifuged (1,000g, 10 min). The supernatants were collected (100 µl) and mixed with 900 µl of the FOX reagent (100 µM xylenol orange, 250 µM ammonium ferrous sulphate, 25 mM sulfuric acid, and 4 mM butylated hydroxytoluene in 90% (v/v) methanol). After 30 min incubation at room temperature, the absorbance of the samples was read at 560 nm. According to previous calibrations performed with standard peroxides, a mean apparent extinction coefficient of 4.5 x  $10^4 \,\mathrm{M}^{-1} \,\mathrm{cm}^{-1}$  was employed (31).

Expression of Sod1- The level of Sod1 expression in WT and  $tsal\Delta$   $tsa2\Delta$  strains was determined by western blot analysis. To this end, cell extracts of the strains were obtained as previously described (11). Briefly, cells collected at mid-log growth phase were washed and resuspended in 50 mM Hepes buffer containing 50 mM NaCl, 2  $\mu$ g/mL of leupeptin and 1  $\mu$ g/mL of pepstatin. Next, an equal volume of glass beads (425-600 µm) was added. After 2 cycles of vortexing (6 min) and ice-cooling (6 min), the samples were centrifuged (16,000g, 5 min). The supernatants were collected and centrifuged again (16,000g, 30 min) to remove precipitated material. The supernatants are referred to as cell extracts and their protein contents were determined by the Bradford method with a Bio-Rad Kit. Cell extracts (40 ug protein) were submitted to electrophoresis (12% acrylamide

gel) and transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond-D Extra, Amersham Biosciences). After washing (3 times, 10 min) with TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl), the membrane was blocked with TBST (TBS plus 0.05% Tween-20) containing 5% nonfat milk, at room temperature for 90 min. The primary antibody was anti-human Sod1 (Calbiochem) prepared in TBST containing 0.1% non-fat milk (1:1.500 dilution). Excess antibody was removed by washing 3 times with TBST. The membrane was then incubated with the secondary antibody (anti-sheep IgG. peroxidase conjugated) (Calbiochem) prepared in TBST containing 0.1% non-fat milk (1:7,000 dilution). After 1 h incubation, the membrane was washed 3 times with TBST and treated for 5 min with the solutions from the kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology) and exposed to an X-ray film. Relative quantification of the bands was performed by densitometry (ImageQuant V5.2, Molecular Dynamics).

Superoxide dismutase activity- Superoxide dismutase activity in WT and  $tsal \Delta tsa2 \Delta$  cell extracts was determined by native PAGE staining (32) and inhibition of cytochrome c reduction (33, 34). After electrophoresis of cell extracts (40 µg protein) under non-reducing conditions, the gel was incubated in the dark for 20 min with a solution composed of 0.25 mg/mL nitroblue tetrazolium plus 0.1 mg/mL riboflavin. Then, a solution of 10 mg/mL N,N,N',N'tetramethylethylenediamine was added and the gel kept under shaking and light until bands became visible (32). Relative quantification of the bands was performed by densitometry (ImageQuant V5.2, Molecular Dynamics). The cytochrome c reduction assay was performed as previously described (33, 34). The incubations contained 100 µM xanthine, xanthine oxidase in amounts that cause an absorbance change of 0.025/min, 1 unit of catalase and cell extracts (0-50 µg protein) in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4, 30°C.

*Bicarbonate-dependent peroxidase activity-* This activity was evaluated in whole cells by EPR monitoring of the oxidation of the spin-trap DMPO to DMPO/OH radical adduct was monitored (35, 36). Cells (5 x 10<sup>7</sup> cells/mL) of each strain were resuspended in 100 mM

phosphate buffer containing 0.1 mM DTPA, pH 7.4, and incubated with 80 mM DMPO (5,5-dimethylpyrroline-N-oxide) at room temperature for 5 min. After addition of 25 mM sodium bicarbonate and 1 mM hydrogen peroxide, the samples were incubated at 30°C for 15 min, transferred to flat cells and their EPR spectra

samples were incubated at 30°C for 15 min, transferred to flat cells and their EPR spectra scanned at room temperature as described above. Quantification of radical adduct was performed by double integration of the EPR spectra and comparison with a standard solution of 4-hydroxy-2,2,6,6-tetra-methyl-piperidinyloxy.

ASBMB

The Journal of Biological Chemistry

Detection of DNA-derived radicals- Formation of DNA-derived radicals was monitored by immuno-spin trapping employing DMPO and the antibody against oxidized DMPO adducts (37). Cells (5 x  $10^7$  cells/mL) of each strain were washed, resuspended in fresh media and treated with 100 mM DMPO and 1 mM hydrogen peroxide at 30°C. After 30 min incubation, the cells were washed with distilled water (2 times) and resuspended in 800 µL of a buffer to digest cell walls (0.9 M sorbitol, 0.1 M EDTA, 50 mM dithiotreitol and 3.5 µg/mL of zymolyase 20T) (38). After 2 h incubation at 37°C, samples were centrifuged (1000g, 10 min) and the spheroplasts obtained resuspended in lysis buffer (1% SDS, 100 mM NaCl, 25 mM DTPA in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0). From this point on, DNA extraction and transfer onto nitrocellulose membrane followed the previously described protocol (37). DNA extracted from WT cells (100 ng) treated with 50 mM DMPO, 1 mM CuCl<sub>2</sub> and 20 µM hydrogen peroxide in phosphate buffer, pH 7.4, for 30 min at 30°C was employed as a positive control. DNA radicals/DMPO nitrone adducts blotted onto the nitrocellulose membrane were detected with the anti-DMPO nitrone adduct antibody provided by Dr. Ronald P. Mason (37). First, the membrane was blocked for 1 hour with PBS buffer (0.725 M NaCl, 2.7 mM KCl, 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) containing 3% non-fat milk. After washing for 10 min with PBS supplemented with 0.05% non-fat milk and 0.1% Tween-20, the membrane was incubated with the anti-DMPO/adduct antibody for 1 h. The antibody was prepared in PBS supplemented with 0.05% non-fat milk and 0.1% Tween-20 (1:10,000 dilution). Excess antibody was removed by three 10 min washes with the same buffer, and the membrane was incubated 1 h with the secondary antibody (anti- rabbit IgG, peroxidase conjugated). After one PBS wash, the membrane was incubated with the solutions from the kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology) for 5 min and exposed to an X-ray film. Relative quantification of the bands was performed by densitometry (ImageQuant V5.2, Molecular Dynamics).

Detection of DNA adducts -To probe for the addition of glucose metabolites to yeast DNA, we monitored incorporation of <sup>14</sup>C at the DNA by the strains grown in media supplemented with <sup>14</sup>C-glucose (Schwarz/Mann; 1 mCi/mL and 230 mCi/mM). Cells  $(2 \times 10^8)$  harvested at the exponential growth phase were resuspended in 500 µL of fresh media containing 4 times less glucose than usual and supplemented with 50  $\mu$ Ci of <sup>14</sup>C-glucose (39). These samples were treated with 1 mM hydrogen peroxide for 30 min at 30°C, in the absence or presence of POBN (90 mM). DNA from the samples was extracted as above. DNA (100 ng) from each experimental condition was transferred to filter paper which was incubated with scintillation liquid. Radioactivity was measured in a liquid scintillation analyzer (166 TR, Packard).

## RESULTS

 $tsal\Delta tsa2\Delta$  Cells are more resistant to hydrogen peroxide but metabolize it faster producing ethanol-derived radicals- As previously reported (11, 14, 16),  $tsal\Delta$ ,  $tsal\Delta$ ,  $tsal\Delta tsal\Delta$  yeast cells were shown to be viable and to grow similarly to the WT strain in fermentative media (data not shown). However, surprisingly,  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells were significantly more resistant than WT cells to toxic concentrations of hydrogen peroxide (Fig 1A). No significant differences were observed between the WT and  $tsal\Delta$  and  $tsa2\Delta$  cells. The unexpected resistance of the double mutant cells to hydrogen peroxide led us to explore this phenomenon in more detail. First, the consumption of 1 mM hydrogen peroxide by the strains was compared. No significant differences were observed in the rates of hydrogen peroxide consumption by the WT and single mutants (data not shown). The  $tsal\Delta tsa2\Delta$  strain, however, consumed hydrogen peroxide considerably faster than the WT strain (Fig. 1B), suggesting an increased capacity to metabolize hydrogen peroxide (Fig. 1A).

Hydrogen peroxide consumption by yeast cells may produce radical intermediates (25). Thus, radical production by the strains while metabolizing 1 mM hydrogen peroxide EPR was compared by spin-trapping experiments with POBN. After 30 min of incubation, radical production was marginal except for  $tsal \Delta tsa2 \Delta$  cells that yielded a clear EPR signal whose parameters ( $a_N = 15.8$  G;  $a_H =$ 2.6 G) are characteristic of the POBN/<sup>•</sup>1hvdroxvethvl radical adduct (POBN/<sup>•</sup>CHOHCH<sub>3</sub>) (Fig. 2) (24, 25). To confirm radical identity, we performed parallel experiments where 171 mM [2-<sup>13</sup>C]ethanol was added together with hydrogen peroxide to the incubations containing  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells, growth media, glucose and POBN. In these cases, the 6line spectrum detected in the presence of glucose alone was substituted by a 12-line spectrum (Fig. 2). Computer simulation showed that the latter is spectrum EPR composite of an the POBN/<sup>•</sup>CHOHCH<sub>3</sub> and POBN/<sup>•13</sup>CHOH<sup>13</sup>CH<sub>3</sub> radical adduct ( $a_N$ = 15.5 G;  $a_H$ = 2.6 G;  $a_{13C}$ = 4.2 G) (24) in relative yields of 30 and 70%, respectively (Fig. 2). Detection of the hyperfine splitting of <sup>13</sup>C from ethanol, unambiguously proves that the main radical produced by  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells challenged with hydrogen peroxide is the 1-hydroxyethyl radical.

The spin-trapping experiments were repeated several times and the results were consistent. Considerable yields of the POBN/<sup>•</sup>1-hydroxyethyl radical adduct were obtained only in cultures of the  $tsal\Delta$   $tsa2\Delta$  strain and were dependent on all incubation components, that is, yeast cells, glucose and hydrogen peroxide (Fig. 2). Thus, in spite of being more resistant to hydrogen peroxide, the  $tsal\Delta tsa2\Delta$  strain removes it faster and produces the 1-hydroxyethyl radical.

*Routes for 1-hydroxyethyl radical formation*-The source of the 1-hydroxyethyl radical in yeast cultures metabolizing glucose should be its metabolite ethanol. Indeed, fermentative yeasts accumulate ethanol because glucose represses respiration and mitochondrial biogenesis through several signaling pathways (40). To produce the 1-hydroxyethyl radical, ethanol has to be oxidized by the hydroxyl radical or by a hydroxyl radical-like oxidant (Eq. 1), whose production is likely to depend on Fenton chemistry, that is, on hydrogen peroxide decomposition by redox-active transition metal ions (Eq. 2) (24, 41, 42).

 $\begin{array}{c} CH_{3}CH_{2}OH + HO^{\bullet} \longrightarrow CH_{3}C^{\bullet}HOH + H_{2}O \quad (Eq. \ 1) \\ H_{2}O_{2} + Me^{n^{+}} \longrightarrow HO^{\bullet} + H_{2}O + Me^{(n^{+}1)^{+}} \quad (Eq. \ 2) \end{array}$ 

Although intracellular levels of transition metal controlled, ions are tightly regulatory mechanisms can be altered by stressed conditions such as those likely to result from deletion of genes encoding antioxidant enzymes, including Tsa1 and Tsa2. Redox-active iron ions in cells become more accessible to chelators, and their levels can be estimated by complexation with desferrioxamine and EPR analysis (see, Experimental Procedures) (27, 28). The levels of the iron (III)-desferrioxamine complex, however, were higher in WT than in  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells (1.00  $\pm$  0.05 and 0.28  $\pm$  0.03 µg/g of cell pellet, respectively) (Fig. 3 inset, Table 1). Relevantly, parallel experiments showed that pre-incubation of  $tsal \Delta tsa2 \Delta$  cells with 2 mM desferrioxamine, or 2 mM bathocuproine before the addition of hydrogen peroxide did not prevent POBN/1hydroxyethyl radical adduct production although its yield decreased (~30%) (Fig. 3). Total iron content in WT and  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells was determined by atomic absorption spectrometry and the same trend of chelatable iron ion levels was observed. Total iron content was higher in WT than in  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells (Table 1). In contrast, total copper content was higher in  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells while total zinc content was similar. Although copper content is higher in  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells, chelators of copper I and II (1) inhibited radical formation to about 70% of control levels (Fig. 3). Taken together, these results (Fig. 3, Table 1) argue against iron and copper ion-mediated Fenton chemistry being the main route for 1-hydroxyethyl radical formation (Eqs. 1 and 2).

Since peroxiredoxins are important to detoxify organic peroxides, deletion of their genes may lead to accumulation of organic peroxides and their derived peroxyl radicals (ROO<sup>•</sup>), which can oxidize ethanol to the 1-hydroxyethyl radical ( $k \sim 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (43). However, levels of total peroxides present in WT

i6

and  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  cells were similar under basal conditions or after treatment with hydrogen peroxide (Table 1). Thus, organic peroxides and their derived radicals are unlikely to be major sources of the 1-hydroxyethyl detected in  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  cells.

ASBMB

The Journal of Biological Chemistry

i6

On the other hand, the higher content of copper in  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells compared to WT cells led us to consider the possibility of increased expression of Sod1 providing a route for ethanol oxidation to the 1-hydroxyethyl radical. In fact, deletion of the TSA1 gene has previously been shown to increase the mRNA levels of Sod1, catalase and cytochrome peroxidase among other enzymes (10, 15, 16). In addition, Sod1 displays a peroxidase activity which may oxidize ethanol to 1-hydroxyethyl radical, although this process has been considered inefficient (35, 44). These previous studies, however, were performed in the presence of bicarbonate buffer which modulates Sod1 peroxidase activity to produce the carbonate radical (35, 36, 45), which is not an efficient oxidant of alcohols (46). Thus, it became relevant to compare the ability of purified enzymes, such as bovine Sod1, catalase, cytochrome c and horseradish peroxidase, to oxidize ethanol to the 1-hydroxyethyl radical in the presence of hydrogen peroxide in phosphate buffer containing DTPA. Considerable yields of the POBN/<sup>•</sup>1-hydroxyethyl radical adduct was produced only in the presence of Sod1 (Fig. 4). This was confirmed by the 12-line spectrum produced in incubations containing [2-<sup>13</sup>C]ethanol, which is characteristic of the  $POBN/^{\bullet 13}CHOH^{13}CH_3$  radical adduct ( $a_N = 15.5$ G;  $a_{H}$ = 2.6 G;  $a_{13C}$ = 4.2 G) (24). The radical adduct detected in the presence of horseradish peroxidase is an oxidation product of the spin trap POBN as demonstrated by control experiments in the absence of ethanol (data not of shown). Production the POBN/1hydroxyethyl radical adduct by Sod1/hydrogen peroxide was shown to be ethanol- and timedependent (Fig. 4B). This indicates that ethanol oxidation to the 1-hydroxyethyl radical depends mainly on the peroxidase activity of Sod1 and not from Fenton chemistry resulting from enzyme inactivation and copper liberation from its active site (47). These results confirm that biological oxidation of ethanol to the 1hydroxyethyl radical is likely to be mediated

mainly by the hydroxyl radical and hydroxyl radical-like oxidants (24, 41, 42). Indeed, the peroxidase activity of Sod1 produces a hydroxyl-like oxidant which is able to oxidize ethanol whereas catalase, horseradish peroxidase and cytochrome c use hydrogen peroxide to oxidize substrates through ferryl states that are not efficient one-electron oxidants of ethanol (Fig. 4).

To further establish a role for Sod1 in the production of 1-hydroxyethyl radicals by the  $tsal\Delta tsa2\Delta$  strain, cells were pre-treated with 10 mM diethyldithiocarbamate, a Sod1 inhibitor and copper chelator (48), or heated to promote enzyme inactivation. Cells submitted to both failed produce POBN/<sup>•</sup>1treatments to hydroxyethyl radical adduct upon incubation with glucose, hydrogen peroxide and POBN, in contrast with untreated cells (Fig. 5). These results indicate that 1-hydroxyethyl radical formation depends on an enzymatic activity, most likely the Sod1 peroxidase activity (Fig. 4). This conclusion was reinforced by the five-fold higher level of Sod1 expression in the  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells compared to the WT cells (Fig. 6A). This higher expression was confirmed by comparing the superoxide dismutase activity of the extracts monitored by both native PAGE stain (Fig. 6B) and inhibition of cytochrome c reduction (Fig. 7A) (32-34). Likewise, the bicarbonate-dependent peroxidase activity, characteristic of the Sod1 enzyme (35, 36, 45), was higher in  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells (Fig 7A, inset). Next, we transfected WT yeast to over-express human Sod1. These cells displayed superoxide dismutase and bicarbonate-dependent peroxidase activity similar to those of the  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells (Fig. 7A). Likewise, they produced similar yields of the 1-hydroxyethyl radical adduct (Fig. 7B), further demonstrating the role of Sod1 in radical production.

Independent of the employed methodology. the increase in superoxide dismutase and bicarbonate-dependent peroxidase activity in  $tsal \Delta tsa2 \Delta$  cells compared to WT cells was roughly the same (~ two-fold) (Figs 6B and 7A). However, the increase in Sod1 contents was higher (~ five-fold) (Fig. 6A) indicating that not all the expressed enzyme is active, probably because total copper content increased less (< two-fold) (Table 1) than overall Sod1 expression (49).

Production of DNA-derived radicals and adducts- Like other alkyl radicals, the 1hydroxyethyl radical is known to attack DNA to produce DNA-derived radicals and DNA-8alkylguanine adducts (24, 50, 51). To monitor the production of DNA adducts under our experimental conditions, <sup>14</sup>C-glucose was added to the cultures and the amount of  $^{14}C$ incorporated to DNA (14C-DNA) was determined after 30 min incubation. As shown in Fig. 8A,  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells treated with hydrogen peroxide contained about three times more <sup>14</sup>C-DNA than WT cells. Relevantly, <sup>14</sup>C-DNA production in  $tsal \Delta tsa2 \Delta$  cells was inhibited by the spin-trap POBN (about 30%) indicating that a considerable fraction of <sup>14</sup>C incorporated into DNA comes from a radical metabolite of glucose, most likely, the 1-hydroxyethyl radical (Fig. 2). Attack of radicals on DNA was also indicated by parallel experiments with the antibody anti-DMPO, which reveals the amount of DNA-derived radicals that are trapped by DMPO (37). Indeed, treatment of tsa1∆tsa2∆ cells with hydrogen peroxide produced about two times as many DNA-derived radicals as WT cell treatment (Fig. 8B). Taken together, these results associate the higher production of the 1-hydroxyethyl radical by  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells (Fig. 2) with increased damage to their DNA (Fig. 8).

ASBMB

The Journal of Biological Chemistry

i6

### DISCUSSION

Our results demonstrated that deletion of both the TSA1 and TSA2 genes in S. cerevisiae significantly increases cellular resistance to toxic concentrations of hydrogen peroxide while increasing its consumption rate (Fig. 1). These results contrast with previous studies reporting that  $tsal\Delta$ ,  $tsa2\Delta$ , and  $tsal\Delta tsa2\Delta$  strains are more susceptible than the WT strain to hydrogen peroxide (14, 16). In another study employing various experimental conditions,  $tsa2\Delta$  cells were shown to be more resistant than WT (11) although to a lesser extent than reported here for the double mutant. These tolerance assays, however, were performed by spot tests, in which the solid media may affect hydrogen peroxide metabolism by the strains. In synthetic liquid media, the resistance of  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells to 1 mM hydrogen peroxide (Fig. 1) suggests that catalase,

which is induced in these cells (15, 16), is the main enzyme responsible for decomposing these toxic oxidant concentrations. In agreement, the consumption of hydrogen peroxide by cell extracts of the  $tsal \Delta$  and  $tsa2 \Delta$  strain was shown to be almost completely inhibited by azide (11). However, our results indicate that part of the hydrogen peroxide consumption by  $tsal\Delta tsa2\Delta$ cells (Fig. 1B) is also mediated by induced Sod1 (Figs. 5-7). Although catalases are efficient enzymes with specific activity values around 17,750 U/nmol (52), their levels in extracts of WT and tsa1 $\Delta$  and tsa2 $\Delta$  cells in exponential growth under fermentative conditions (high glucose concentrations) are low (11). Indeed, catalase activity values ranging from 0.38-1.3 U/mg have been reported for yeast extracts (11, 53), which corresponds to about 5 x  $10^{-5}$  nmol catalase/mg. In contrast, Sod1 is an abundant enzyme and its level in extracts of  $tsa1\Delta tsa2\Delta$ cells can be estimated as about 7 x  $10^{-1}$  nmol Sod1/mg from the data in Fig 7A (67 U/mg protein) and the specific activity reported for the bovine liver enzyme (~90 U/nmol) (54).

Thus, the higher level of Sod1 in  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells (Figs. 6 and 7) should favor the occurrence of its peroxidase activity (Fig. 4), which oxidizes the glucose metabolite ethanol to the 1-hydroxyethyl radical (Fig. 2). This radical, direct or indirectly, leads to the production of DNA-derived radicals and adducts (Fig. 8). Thus, our studies provide a pathway to account for the hypermutability of peroxiredoxin-null yeast cells, although performed with cells challenged with toxic concentrations of hydrogen peroxide (1 mM). This high concentration was probably required to make it possible to detect significant differences among the strains regarding hydrogen peroxide resistance and consumption (Fig. 1) and radical production (Figs. 2 and 8B). Indeed, the difficulties involved in the precise quantification of oxidants and radicals in cells and cell cultures are well-known (36, 41, 42, 46). In unstressed cells, it has been reported that the mutation rates of the studied strains follow the order WT≈  $tsa2\Delta < tsa1\Delta < tsa1\Delta tsa2\Delta$  (16). This trend can be considered similar to the one observed here, if the sensitivities of the methodologies available to measure mutation rates and radical production are taken into account.

Generation of the 1-hydroxyethyl radical in  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells challenged with hydrogen peroxide was attributed mainly to the peroxidase activity of the enzyme Sod1, although the participation of Fenton chemistry to a small extent  $(\sim 30\%)$  is apparent (Fig. 3). 1-Hydroxyethyl radical might be formed through hydrogen abstraction by peroxyl radicals, but no quantitative evidence is this direction was obtained (Table 1). In contrast, the major role of Sod1 was established by several lines of evidence (Figs. 2-7; Table 1). Among them, the similar properties of WT over-expressing human Sod1 and  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells in regard to the superoxide dismutase activity. bicarbonate-dependent peroxidase activity and 1-hydroxyethyl radical production were particularly convincing (Fig. 7).

The results demonstrated that increased 1-hydroxyethyl radical production by  $tsal\Delta tsa2\Delta$ cells increased damage to their DNA with formation of DNA-derived radicals and adducts. Both of these lesions can be promoted directly by the 1-hydroxyethyl radical (24, 50, 51). In fact, the inhibition of <sup>14</sup>C-DNA production by the spin-trap POBN argues for a direct participation of the 1-hydroxyethyl radical in forming DNA adducts. At this point, however, we cannot exclude the formation of DNA adducts by 1hydroxyethyl radical metabolites, such as acetaldehyde (55-57). Likewise, the formation of DNA-derived radicals may result from secondary radicals arising from processes triggered by the 1-hydroxyethyl radical, such as lipid peroxidation (42, 58). It is noteworthy that production of the 1hydroxyethyl radical close to DNA is feasible because Sod1 is mainly a cytosolic enzyme but is also found in the nucleus, peroxisomes and mitochondrial intermembrane space of eukaryotic cells (59). Here, we measured overall expression and activity of Sod1, which was augmented in  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells even in the absence of a hydrogen peroxide challenge (Fig. 6). Thus, the molecular events proposed here may also occur in unstressed cells. Relevantly, a higher yield of DNA adducts was obtained in unstressed  $tsal\Delta tsa2\Delta$  compared to unstressed WT cells, although the difference was not statistically significant (Fig. 8A). The peroxidase activity of Sod1 is increased in the presence of carbon dioxide to produce the carbonate radical, which is also able to produce DNA radicals (60, 61).

Consequently, the peroxidase activity of Sod1 may also be involved in promoting DNA mutations in peroxiredoxin-null yeast cells grown aerobically (18).

The signaling pathway responsible for the elevated levels of Sod1 in  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells is not known but probably involves Yap1 and Skn7 regulons because the SOD1, TSA1 and TSA2 genes are under their control (62). On the other hand, deletion of both TSA1 and TSA2 genes is likely to result in higher steady-state levels of hydrogen peroxide, which, in turn, activates both Yap1 and Skn7 leading to increased Sod1 expression. Another possibility is that induction of SOD1 could be a response of yeast to increased levels of copper ions (Table 1), probably mediated by Ace1 transcriptional factor (63). Other transcriptional regulators such as Hap1 might also be involved in the induction of Sod1 in  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells.

Sod1 is considered one of the most important antioxidant defenses because it of efficiently catalyzes the dismutation superoxide anion into hydrogen peroxide plus molecular oxygen (59). For instance, the sodl  $\Delta$ yeast mutant presents aerobic spontaneous mutation rates that are three- to four-fold higher than for the WT strain (63, 64). On the other hand, higher expression levels of Sod1 in mammalian cells have been frequently associated with deleterious effects (65), including increased DNA damage in cells defective for DNA repair (66-69). Although many investigators attribute these deleterious effects to Sod1 increasing cellular steady-state concentrations of hydrogen peroxide, they are most likely due to the enzyme competing with other metalloproteins for metal cofactors and to the extraneous activities of Sod1 (65). Indeed, Sod1 displays catalytic activities other than superoxide dismutation, such as superoxide oxidase, peroxynitrite synthase, thiol oxidase and peroxidase activity (35, 36, 44, 45). Among these, our studies of WT and  $tsal\Delta tsa2\Delta$ yeast cells challenged with hydrogen peroxide emphasize the importance of the peroxidase activity because the mutant cells presented increased levels of DNA damage (Fig. 8) in parallel with increased levels of 1-hydroxyethyl radical formation (Fig. 2), Sod1 expression (Fig. 6) and peroxidase activity (Fig. 7A). Other extraneous Sod1 roles, such as activation and

6

control of specific DNA repair mechanisms, were not examined here but deserve future consideration (69).

In summary, our studies examined the relative resistance of  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells to hydrogen peroxide, and provided a sequence of molecular events whereby the compensatory

ASBMB

The Journal of Biological Chemistry

Ś

response of *S. cerevisae* to deal with *TSA1* and *TSA2* gene disruption leads to hypermutability of the strain. In parallel, they present a framework to examine some of the deleterious effects that have been frequently associated with the over-expression of Sod1 in cells and animal models.

## REFERENCES

- 1. Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine* 4th Ed., Oxford University Press, Oxford, UK
- 2. Hofmann, B., Hecht, H-J., and Flohé, L. (2002) Biol Chem 383, 347-364
- 3. Wood, Z. A., Schroder, E., Robin-Harris, J., and Poole, L. B. (2003) *Trends Biochem Sci* 28, 32-40
- 4. Rhee, S. G., Chae, H. Z., and Kim, K. (2005) Free Radic Biol Med 38, 1543-1552
- 5. Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., Thomson, L., Flohé, L., and Radi, R. (2007) Subcell Biochem 44, 83-113
- Jang, H. H., Lee, K. O., Chi, Y. H., Jung, B. G., Park, S. K., Park, J. H., Lee, J. R., Lee, S. S., Moon, J. C., Yun, J. W., Choi, Y. O., Kim, W. Y., Kang, J. S., Cheong, G-W., Yun, D-J., Rhee, S. G., Cho, M. J., and Lee, S. Y. (2004) *Cell* **117**, 625-635
- 7. Moon, J. C., Hah, Y. S., Kim, W. Y., Jung, B. G, Jang, H. H, Lee, J. R., Kim, S.Y., Lee, Y. M., Jeon, M. G., Kim, C. W., Cho, M. J., and Lee, S. Y. (2005) *J Biol Chem* **280**, 28775-28784
- 8. Woo, H. A., Chae, H. Z., Hwang, S. C., Yang, K-S., Kang, S. W., Kim, K., and Rhee, S. G. (2003) *Science* **300**, 653-656
- 9. Wood, Z. A., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2003) Science 300, 650-653
- 10. Park, S. G., Cha, M. K., Jeong, W., and Kim, I-H. (2000) J Biol Chem 275, 5723-5732
- 11. Munhoz, D. C., and Netto, L. E. S. (2004) *J Biol Chem* **279**, 35219-35227
- 12. Monje-Casas, F., Michan, C., and Pueyo, C. (2004) Biochem J 383, 139-147
- Ogusucu, R., Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L. E. S., and Augusto, O. (2007) Free Radic Biol Med 42, 326-334
- 14. Wong, C-M., Zhou, Y., Ng, R. W. M., Kung, H-F., and Jin, D-Y. (2002) *J Biol Chem* **277**, 5385-5394
- 15. Demasi, A. P., Pereira, G. A., and Netto, L. E. S. (2006) FEBS J 273, 805-816
- 16. Wong, C-M., Siu, K. L., and Jin, D. Y. (2004) J Biol Chem 279, 23207-23213
- 17. Huang, M., Rio, A., Nicolas, A., and Kolodner, R. D. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 11529-11534
- Ragu, S., Faye, G., Iraqui, I., Masurel-Heneman, A., Kolodner, R. D., and Huang, M. E. (2007) Proc Natl Acad Sci USA 104, 9747-9752
- 19. Iraqui, I., Faye, G., Ragu, S., Masurel-Heneman, A., Kolodner, R. D., and Huang, M. E. (2008) *Cancer Res* 68, 1055-1063
- 20. Sherman, F. (1991) Meth Enzymol 194, 3-19
- 21. Claiborne, A. (1985) Catalase activity. In: Greenwald, R. A., editor. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research CRC Press, Boca Raton, FL
- 22. Rabizadeh, S., Gralla, E. B., Borchelt, D.R., Gwinn, R., Valentine, J. S., Sisodia, S., Wong, P., Lee, M., Hahn, H., and Bredesen, D.E. (1995) Proc Natl Acad Sci U S A 92,3024-3028
- 23. Wolff, S. P. (1994) Meth Enzymol 233, 182-189
- 24. Nakao, L. S., and Augusto, O. (1998) Chem Res Toxicol 11, 888-894; 1998.

- 25. Roe, J. A., Wiedau-Pazos, M., Moy, V. N., Goto, J. J., Gralla, E. B., and Valentine, J. S. (2002) *Free Radic Biol Med* **32**, 169-174
- 26. Duling, D. R., (1994) J Magn Res 104, 105-110.
- 27. Srinivasan, C., Liba, A., Imlay, J. A., Valentine, J. S., and Gralla, E. B. (2000) *J Biol Chem* **275**, 29187-29192
- 28. Linares, E., Nakao, L. S., Augusto, O., and Kadiiska, M. B. (2003) *Free Radic Biol Med* **34**, 766-773
- Yegorov, D. Yu., Kozlov, A. V., Azizova, O. A., and Vladimirov, Y. A. (1993) Free Radic Biol Med 15, 565-574
- 30. Naozuka, J., and Oliveira, P. V. (2007) J Braz Chem Soc 18, 1547-1553
- 31. Salmon, J-M., Fornairon-Bonnefond, C., Mazauric, J-P, and Moutounet, M. (2000) Food Chem **71**, 59-528
- 32. Beauchamp, C., and Fridovich, I. (1971) Anal Biochem 44, 276-287
- 33. McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969) *J Biol Chem* 244, 6049-6055
- 34. Oberley, L.W., and Spitz, D.R. (1985) Assay of Superoxide Dismutase Using Nitroblue Tetrazolium. In Greenwald, R. A., editor. Handbook of Methods for Oxy Radical Research, CRC Press, Boca Raton, FL.
- 35. Zhang, H., Joseph, J., Felix, C. and Kalyanaraman, B. (2000) J Biol Chem 275, 14038-14045
- 36. Medinas, D. B., Cerchiaro, G., Trindade, D. F., and Augusto, O. (2007) *IUBMB Life* 59, 255-262
- 37. Ramirez, D. C., Gomez-Mejiba, S. E., and Mason, R. P. (2007) Nat Protoc 2, 512-522
- 38. Philippsen, P., Stotz, A., and Scherf, C. (1991) *Meth Enzymol* **194**, 169-182
- 39. Sentandreu, R., and Northcote, D. H. (1969) *Biochem J* 115, 231-240
- 40. Rolland, F., Winderickx, J., and Thevelein, J. M. (2002) *FEMS Yeast Res.* **2**, 183-201
- 41. Knecht, K.T., Thurman, R. G., and Mason, R. P. (1993) Arch Biochem Biophys 303, 339-348
- 42. Kono, H., Rusyn, I., Yin, M., Gäbele, E., Yamashina, S., Dikalova, A., Kadiiska, M.B., Connor, H. D., Mason, R.P., Segal, B. H., Bradford, B. U., Holland, S. M., and Thurman, R. G. (2000) *J Clin Invest* **106**, 867-872
- 43. Packer, J. E., Mahood, J. S., Willson, R. L., and Wolfenden, B. S. (1981) Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med **39**, 135-141
- 44. Yim, M. B., Chock, P. B., and Stadtman, E. R. (1993) J Biol Chem 268, 4099-4105
- 45. Liochev, S.I., and Fridovich, I. (2004) Proc Natl Acad Sci USA 101, 743-744
- 46. Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos, C. X. C., and De Menezes, S. L. (2002) *Free Radic Biol Med* **32**, 841-859
- 47. Ramirez, D. C., Gomez Mejiba, S. E., and Mason, R. P. (2005) Free Radic Biol Med 38:201-214
- 48. Misra, H. P. (1979) *J Biol Chem* **254**, 11623-11628
- 49. Raem T. D, Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C., and O'Halloran, T.V. (1999) *Science* **284**, 805-808
- 50. Augusto, O (1993) Free Radic Biol Med 15, 329-336
- 51. Nakao, L. S., Fonseca, E., and Augusto, O. (2002) Chem Res Toxicol 15, 1248-1253
- 52. Zamocky, M., Herzog, C., Nykyri, L. M., and Koller F. (1995) FEBS Lett 367,241-245
- 53. Izawa, S., Inoue, Y., and Kimura, A. (1996) *Biochem J* **320**, 61-67
- 54. Flohé, L., and Ötting, F. (1984) Meth Enzymol 105, 93-104.
- Matsuda, T., Matsumoto, A., Uchida, M., Kanaly, R. A., Misaki, K., Shibutani, S., Kawamoto, T., Kitagawa, K., Nakayama, K. I., Tomokuni, K., and Ichiba, M. (2007) *Carcinogenesis* 28, 2363-2366
- 56. Matter, B., Guza, R., Zhao, J., Li, Z. Z., and Jones, R. (2007) Chem Res Toxicol 20, 1379-1387
- Chen, L., Wang, M., Villalta, P. W., Luo, X., Feuer, R., Jensen, J., Hatsukami, D. K., and Hecht S. S. (2007) *Chem Res Toxicol* 20, 108-113
- 58. Seitz, H. K., and Becker, P. (2007) Alcohol Res Health 30, 38-41
- 59. Valentine, J. S., Doucette, P. A., and Potter, S. Z. (2005) Annu Rev Biochem 74, 563-593
- 60. Joffe, A., Geacintov, N. E., and Shafirovich, V. (2003) Chem Res Toxicol 16, 1528-1538

ÌĠ

- Lee, Y.A., Yun, B. H., Kim, S. K., Margolin, Y., Dedon, P. C., Geacintov, N.E., and Shafirovich, V. (2007) *Chemistry* **13**, 4571-4581
- 62. Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., and Toledano, M.B. (1999) *J Biol Chem* **274**,16040-16046
- 63. Gralla, E. B., Thiele, D. J., Silar, P., and Valentine, J. S. (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8558-8562
- 64. Gralla, E. B., and Valentine, J. S. (1991) J Bact 173, 5918-5920
- 65. Liochev, S. I., and Fridovich, I. (2007) *Free Radic Biol Med* **42**, 1465-1469
- 66. Peter, Y., Rotman, G., Lotem, J., Elson, A., Shiloh, Y., and Groner, Y. (2001) *EMBO J* 20, 1538-1546
- Karanjawala, Z. E., Murphy, N., Hinton, D. R., Hsieh, C. L., and Lieber, M. R. (2002) *Curr Biol* 12, 397-402
- 68. Karanjawala, Z. E., Hsieh, C. L., and Lieber, M. R. (2003) DNA Repair 2, 285-294
- 69. Bonatto, D. (2007) Free Radic Biol Med 43, 557-567

Acknowledgments- We thank Pedro Vitoriano de Oliveira and Juliana Naozuka (Instituto de Química, Universidade de São Paulo) for the atomic absorption experiments, Ronald P. Mason (National Institute of Environmental Health Sciences, NIH) for the anti-DMPO nitrone antibody, Edith B. Gralla (Department of Chemistry and Biochemistry, UCLA) for the yeasts with the YEp600 plasmid containing one copy of the human Sod1 gene, and D-Y Jin (University of Hong Kong, China) for the  $\Delta$ tsa1 $\Delta$ tsa2 strain.

## FOOTNOTES

61.

\*This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Projeto Milênio Redoxoma).

<sup>¶</sup>Present address: Universidade Bandeirante de São Paulo (UNIBAN)

The abbreviations used are: CFU, colony froming units; FOX, ferrous oxidation xylenol orange assay; DDC, diethyldithiocarbamate; DMPO, 5,5-dimethylpyrroline-*N*-oxide; POBN,  $\alpha$ -(4-pyridil-1-oxide)-*N*-tert-butylnitrone; Tsa1, cytosolic thioredoxin peroxidase 1; Tsa2, cytosolic thioredoxin peroxidase 2.

The Journal of Biological Chemistry

13

## Table 1

## Basal levels of desferroxamine chelatable iron ion (Fe(III-DF), total iron, copper and zinc ions, and of total peroxides in WT and $tsal\Delta tsa2\Delta$ cells

Chelatable iron ions were determined by low temperature EPR; total iron, copper and zinc ion contents were determined by atomic absorption spectrometry; and total peroxides were determined by the FOX assay (see, Experimental Procedures). The shown values are expressed as  $\mu g$  ion/g of cell pellet and nmol peroxide/g of cell pellet, and correspond to the mean  $\pm$  standard deviations obtained from three different experiments.

Strain	Fe(III)-DF (µg/g)	Iron (µg/g)	Copper (µg/g)	Zinc (µg/g)	Peroxides <sup>a</sup> (nmol/g)	
WT	$1.00\pm0.05$	$104 \pm 2$	$1.11\pm0.02$	$22\pm5$	$75\pm5$	
tsa1∆tsa2∆	$0.28\pm0.03$	$64 \pm 7$	$1.58\pm0.04$	$23 \pm 3$	$95 \pm 10$	

<sup>a</sup> Total peroxides were also determined in both cells after treatment with 1 mM hydrogen peroxide and the values obtained were  $100 \pm 11$  and  $94 \pm 8$  for nmol/g for WT and  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells, respectively.

#### **FIGURE LEGENDS**

<u>Figure 1</u>. Hydrogen peroxide resistance and consumption by WT,  $tsa1\Delta$ ,  $tsa2\Delta$  and  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  cells. (A) Survival of the cells (5 x 10<sup>7</sup> cells/mL) after treatment with 1 mM hydrogen peroxide for 30 min at 30°C. Treatment and survival monitoring was performed as described in Experimental Procedures. (B) Rate of 1 mM hydrogen peroxide consumption by the specified yeast strains (5 x 10<sup>7</sup> cells/mL) monitored by the FOX assay as described in Experimental Procedures. The values shown correspond to the mean ± standard deviations obtained from three different experiments; \*p ≤ 0.05, *t*-test.

<u>Figure 2.</u> Representative spectra of POBN radical adducts produced by WT,  $tsa1\Delta$ ,  $tsa2\Delta$  and  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  cells treated with 1 mM hydrogen peroxide. Cells (5 x 10<sup>7</sup> cells/mL) in growth medium containing 2% glucose were treated with 90 mM POBN and 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min at 30°C. Aliquots were transferred to flat cells and the EPR spectra scanned at room temperature. The fifth spectrum was obtained from incubations of  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  cells under the same conditions except for the addition of 171 mM [2-<sup>13</sup>C]ethanol together with hydrogen. The sixth spectrum is the computer simulation of the fifth considering the POBN/°CHOHCH<sub>3</sub> (a<sub>N</sub>= 15.8 G; a<sub>H</sub>= 2.6 G) and POBN/°<sup>13</sup>CHOH<sup>13</sup>CH<sub>3</sub> radical adduct (a<sub>N</sub>= 15.5 G; a<sub>H</sub>= 2.6 G; a<sub>13C</sub>= 4.2 G) in yields of 30 and 70%, respectively. Instrumental conditions: microwave power, 20 mW; modulation amplitude, 1 G; time constant, 82 ms; scan rate, 2.4 G s<sup>-1</sup>; gain, 7.1 x 10<sup>5</sup>; number of averaged scans, 4.

<u>Figure 3.</u> Effects of desferrioxamine and bathocuproine on the yields of the POBN/1-hydroxyethyl radical adduct produced by WT and  $tsal\Delta tsa2\Delta$  cells treated with 1 mM hydrogen peroxide. Cells (5 x 10<sup>7</sup> cells/mL) in growth medium were treated with 2 mM desferrioxamine or 2 mM of bathocuproine for 30 min before the addition of 2% glucose, 90 mM POBN and 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. After 30 min incubation at 30°C, aliquots were transferred to flat cells and the EPR spectra scanned at room temperature. Instrumental conditions: microwave power, 20 mW; modulation amplitude, 1 G; time constant, 82 ms; scan rate, 2.4 G s<sup>-1</sup>; gain, 7.1 x 10<sup>5</sup>; number of averaged scans, 4. The inset shows a typical low-temperature EPR spectrum of the Fe(III)-desferrioxamine complex obtained from the WT strain to determine the levels of chelatable iron content as described in Experimental Procedures. Instrumental conditions: microwave power, 20 mW; modulation amplitude, 5 G; time constant 163.84 ms; scan rate, 2.4 G s<sup>-1</sup>; gain 1.12 x 10<sup>5</sup>.

<u>Figure 4</u>. Yields of the POBN/1-hydroxyethyl radical adduct produced from diverse enzymes treated with hydrogen peroxide and ethanol after 30 min (A) and from Sod1 as a function of time (B). (A) The specified enzymes (10  $\mu$ M) were incubated with 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 90 mM POBN, 0.171 M ethanol and 0.1 mM DTPA in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4, for 30 min at 30°C. As shown in the Figure, experiments with Sod1 were performed with unlabeled and labeled ethanol ([2-<sup>13</sup>C]ethanol). Aliquots were transferred to flat cells and the EPR spectra scanned at room temperature. (B) Sod1 was incubated as in (A) in the presence of the specified concentrations of ethanol. At the specified times, aliquots were removed and treated with 10 units of catalase to stop the reaction. The samples were transferred to flat cells and the EPR spectra scanned at room temperature. Instrumental conditions: microwave power, 20 mW; modulation amplitude, 1 G; time constant, 82 ms; scan rate, 2.4 G s<sup>-1</sup>; gain, 7.1 x 10<sup>5</sup>; number of averaged scans, 4.

<u>Figure 5</u>. Effects of diethyldithiocarbamate (DDC) and heating on the yields of the POBN/1-hydroxyethyl radical adduct produced by WT and  $tsa1\Delta$   $tsa2\Delta$  cells treated with 1 mM hydrogen peroxide. Cells (5 x  $10^7$  cells/mL) in growth medium were pre-treated with 10 mM DDC for 1 h or pre-heated at 90 °C and brought to room temperature before the addition of 2% glucose, 90 mM POBN and 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. After 30 min incubation at 30°C, aliquots were transferred to flat cells and the EPR spectra scanned at room

i6

temperature. Instrumental conditions: microwave power, 20 mW; modulation amplitude, 1 G; time constant, 82 ms; scan rate, 2.4 G s<sup>-1</sup>; gain, 7.1 x  $10^5$ ; number of averaged scans, 4.

<u>Figure 6</u>. Levels of Sod1 expression and superoxide dismutase activity in cells extracts of WT and  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  strains. (A) Western blot analysis of Sod1 expression in the extracts of strains untreated or treated with 1 mM hydrogen peroxide before protein extraction. Treatment and analysis were performed as described in Experimental Procedures. (B) Superoxide dismutase activity in native PAGE of WT and  $tsa1\Delta$   $tsa2\Delta$  extracts (40 µg) obtained before and after treatment with 1 mM hydrogen peroxide (30 minutes, 30 °C). Analysis was performed as described in Experimental Procedures.

Figure 7. Superoxide dismutase and bicarbonate-dependent peroxidase activity (A) and POBN/1hydroxyethyl radical adduct production (B) in WT,  $tsal\Delta tsa2\Delta$ , and WT<sub>hSod1</sub> strains. (A) Superoxide dismutase activity was monitored as the percentage of inhibition of cytochrome c reduction by WT (**■**),  $tsal\Delta tsa2\Delta$  (•) and WT<sub>hSod1</sub> (**▲**) cell extracts as a function of total protein concentration. The inset shows the bicarbonate-dependent peroxidase activity of the specified cells monitored by DMPO oxidation. Cells were resuspended in 100 mM phosphate buffer containing 0.1 mM DTPA, pH 7.4, and incubated with 80 mM DMPO for 5 minutes before addition of 25 mM bicarbonate and 1 mM hydrogen peroxide. After 15 min incubation at 30°C, aliquots were transferred to flat cells and the EPR spectra scanned. The values shown correspond to the mean ± standard deviations obtained from three different experiments; \*p ≤ 0.05, *t*-test. (B) Representative spectra of POBN radical adducts produced by WT,  $tsal\Delta tsa2\Delta$  and WT<sub>hSod1</sub> cells treated with 1 mM hydrogen peroxide. Cells (5 x 10<sup>7</sup> cells/mL) in growth medium containing 2% glucose were treated with 90 mM POBN and 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min at at 30°C. Instrumental conditions: microwave power, 20 mW; modulation amplitude, 1 G; time constant, 82 ms; scan rate, 2.4 G s<sup>-1</sup>; gain, 7.1 x 10<sup>5</sup>; number of averaged scans, 4.

<u>Figure 8.</u> Levels of DNA-derived adducts and radicals in WT and  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  cells treated with hydrogen peroxide. (A) Incorporation of <sup>14</sup>C into the DNA of WT and  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  cells metabolizing <sup>14</sup>C-labeled glucose in the presence or absence of 1 mM hydrogen peroxide and 90 mM POBN as specified. The values shown correspond to the mean ± standard deviations obtained from three different experiments; \*p  $\leq 0.05$ , *t*-test. (B) Levels of DNA-derived radicals in WT and  $tsa1\Delta tsa2\Delta$  cells treated or not with hydrogen peroxide monitored by immuno-dot blot with the antibody anti-DMPO nitrone adduct. The positive control corresponds to purified DNA (100 ng) extracted from the WT strain treated with 50 mM DMPO, 1 mM CuCl<sub>2</sub> and 20  $\mu$ M hydrogen peroxide in phosphate buffer, pH 7.4 for 30 min at 30°C. Bars represent the spot intensity as determined using the program ImageQuant 5.1 (Molecular Dynamics). The results are representative of two independent experiments.





ASBMB

The Journal of Biological Chemistry





The Journal of Biological Chemistry



Figure 3

The Journal of Biological Chemistry



ASBMB

The Journal of Biological Chemistry

jbc



Heating Figure 5

The Journal of Biological Chemistry

## А

1 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	WT	$tsa1\Delta$ $tsa2\Delta$	WT +	$tsa1\Delta$ $tsa2\Delta$ +
Densitometry	1x	5x	1.7x	8x
B 1 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	WT	$tsa1\Delta$ $tsa2\Delta$	WT +	$tsa1\Delta$ $tsa2\Delta$ +
Densitometry	1x	1.6x	1.9x	2.5x
Figure 6				

The Journal of Biological Chemistry

jbc



A











ASBMB

The Journal of Biological Chemistry

# Livros Grátis

(<u>http://www.livrosgratis.com.br</u>)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração Baixar livros de Agronomia Baixar livros de Arquitetura Baixar livros de Artes Baixar livros de Astronomia Baixar livros de Biologia Geral Baixar livros de Ciência da Computação Baixar livros de Ciência da Informação Baixar livros de Ciência Política Baixar livros de Ciências da Saúde Baixar livros de Comunicação Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE Baixar livros de Defesa civil Baixar livros de Direito Baixar livros de Direitos humanos Baixar livros de Economia Baixar livros de Economia Doméstica Baixar livros de Educação Baixar livros de Educação - Trânsito Baixar livros de Educação Física Baixar livros de Engenharia Aeroespacial Baixar livros de Farmácia Baixar livros de Filosofia Baixar livros de Física Baixar livros de Geociências Baixar livros de Geografia Baixar livros de História Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura Baixar livros de Literatura de Cordel Baixar livros de Literatura Infantil Baixar livros de Matemática Baixar livros de Medicina Baixar livros de Medicina Veterinária Baixar livros de Meio Ambiente Baixar livros de Meteorologia Baixar Monografias e TCC Baixar livros Multidisciplinar Baixar livros de Música Baixar livros de Psicologia Baixar livros de Química Baixar livros de Saúde Coletiva Baixar livros de Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo