

AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS COMO INIBIDORES DO SISTEMA ANTIOXIDANTE DE PEROXIRREDOXINAS 2-CYS TÍPICAS (AhpC) EM BACTÉRIAS

MELINA CARDOSO DOS SANTOS

SÃO VICENTE – SP

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS COMO
INIBIDORES DO SISTEMA ANTIOXIDANTE DE
PEROXIRREDOXINAS 2-CYS TÍPICAS (AhpC) EM
BACTÉRIAS

MELINA CARDOSO DOS SANTOS
PROF. DR. MARCOS ANTONIO DE OLIVEIRA

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus do Litoral Paulista,
UNESP, para obtenção do título de
Doutora no Programa de Pós-Graduação
em Biodiversidade de Ambientes
Costeiros.

SÃO VICENTE - SP
2021

S237a Santos, Melina Cardoso dos
Avaliação de moléculas bioativas como inibidores do sistema
antioxidante de peroxirredoxinas 2-Cys típicas (AhpC) em bactérias /
Melina Cardoso dos Santos. -- São Vicente, 2021
317 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, São Vicente
Orientador: Marcos Antonio de Oliveira

1. Biologia molecular. 2. Antibióticos. 3. Peroxirredoxinas. 4.
Inibição enzimática. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Dedico este trabalho aos meus pais, Neuza e Adilson.

AGRADECIMENTOS

Aos membros da banca examinadora, por participarem da avaliação do meu trabalho, contribuindo para a qualidade da análise dos meus resultados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processos nº 2017/06263-4 e 2017/19942-7) e ao Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão (CEPID) Redoxoma (Processo nº 2013/07937-8), pelo suporte financeiro para a execução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros do Instituto de Biociências do Câmpus do Litoral Paulista (São Vicente), pela formação e pela oportunidade de cursar a pós-graduação.

À Universidade Estadual Paulista – Câmpus do Litoral Paulista, por ceder a estrutura para a execução deste trabalho, e a todos os funcionários e professores.

Ao Prof. Dr. Marcos Toyama, por permitir utilizar as facilidades do Laboratório de Biologia Molecular de Proteínas e Peptídeos, e às doutorandas Mariana e Carol, pelo imenso auxílio nos experimentos de análises estruturais, e também pela amizade e parceria.

Ao Prof. Dr. Denis Abessa e a toda a sua equipe por me permitir utilizar a estrutura do Laboratório do Núcleo de Estudos em Poluição e Ecotoxicologia Aquática, em especial à doutoranda Guacira pela amizade de longa data.

Ao Prof. Dr. João Lago e à doutoranda Deborah Sessa pelo fornecimento dos compostos naturais utilizados neste trabalho. Agradeço ainda ao Prof. Dr. João pelas muitas discussões e sugestões sempre pertinentes.

Ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi e à Dra. Ana Cauz, por me acompanharem durante os experimentos com bactérias e por todas as discussões e sugestões muito proveitosas.

Ao Prof. Dr. Luís Netto, pelas inúmeras discussões, sugestões e contribuições para este trabalho, bem como por ter disponibilizado a estrutura de seu laboratório. Agradeço também a toda equipe do Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Oxidantes e Radicais Livres. Em especial, agradeço à Dra. Renata pela amizade e apoio toda vez que eu ficava perdida no laboratório. Ao Me. Alegria pela ajuda em diversos experimentos e ao Dr. Fernando pelo auxílio com os experimentos de *western blotting*. Ao Dr. Carlos Tairum, por todos os ensinamentos desde a minha iniciação científica,

pelas incontáveis ajudas durante esses nove anos de parceria e por ser um grande profissional e amigo.

A todo o pessoal do Laboratório de Biologia Molecular Estrutural, aos que ainda permanecem e aos que já seguiram outros caminhos. Agradeço pela ajuda com os experimentos, pela constante troca de ideias e pelo companheirismo. Em especial, agradeço às mestrandas Ana, Vitória e Gabriella, pela amizade, conversas, conselhos e tardes com bolo. Ao Dr. Leonardo e Dr. Breyer por toda colaboração, ajuda e paciência de sempre. À Luciana, pela competência e organização. Às minhas co-orientadas Beatriz, Heloisa e Camila, agradeço por me auxiliarem nos experimentos, me permitirem participar do trabalho de vocês, passando um pouco do que aprendi, e por terem me ensinado tantas outras coisas.

À Prof^a Dr^a Gisele Monteiro, por ser um exemplo de profissional e uma pessoa admirável.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira, por me orientar desde o meu primeiro ano de graduação, sendo um grande exemplo de profissionalismo, competência e amor pela ciência. Você é uma grande inspiração para mim, Marcão, e tem toda a minha admiração e respeito. Muito obrigada por todo o apoio!

Aos meus pais, Neuza e Adilson, pelo apoio incondicional, por serem a minha base e o meu porto seguro, ao meu irmão Felipe e minha cunhada Cláudia, pelo companheirismo e por aturar minhas muitas visitas, e também à Penélope, Laila e Tina, por conseguirem me alegrar até nos dias mais difíceis.

Ao Daniel, por ter compartilhado grande parte dessa jornada comigo e ter estado ao meu lado nos momentos bons e ruins.

Por fim, agradeço a todos que dedicam sua vida à ciência e enfrentam tantas adversidades na busca e difusão do conhecimento.

RESUMO

O aumento da resistência aos antibióticos por microrganismos tem crescido vertiginosamente e especialistas têm alertado quanto à rápida ineficácia dos medicamentos frente a linhagens de bactérias super-resistentes. A resistência de bactérias aos antibióticos pode estar diretamente relacionada ao estresse oxidativo, pois antibióticos distintos possuem a capacidade convergente de produzir espécies reativas de oxigênio, que causam danos às macromoléculas, em especial ao DNA, acentuando as taxas de mutação o que pode contribuir para o aparecimento de linhagens super-resistentes. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio também são produzidas pelo sistema imunológico de hospedeiros para combater patógenos e estudos indicam que a inibição da expressão de enzimas antioxidantes de patógenos é capaz de gerar um aumento intracelular significativo dessas espécies, o que interfere de forma substancial na sua sobrevivência. Recentemente foi demonstrado que um composto natural denominado adenantina (Adn) é capaz de inibir a atividade peroxidásica de peroxirredoxinas (Prx) 2-Cys típicas de humanos (PrxI e PrxII), resultando na mortalidade de células tumorais, mas apresentando baixa toxicidade para células normais. As Prx 2-Cys são capazes de decompor hidroperóxidos utilizando um resíduo de cisteína (Cys_p) e sua alta reatividade sobre diferentes tipos de hidroperóxido é alcançada por interações com os resíduos de Thr/Ser e Arg, absolutamente conservados entre as Prx 2-Cys. Em conjunto, Cys_p, Thr/Ser e Arg, recebem o nome de tríade catalítica (TC). As Prx 2-Cys típicas também estão presentes em bactérias e são denominadas de AhpCs, sendo consideradas como uma das frentes de defesa oxidativas fundamentais para o patógeno. Em projeto anterior, avaliamos os efeitos da presença do resíduo de Thr ou Ser na TC de duas Prx-2 Cys típicas de levedura sobre a atividade inibitória de Adn. Demonstramos então que Adn possui maior afinidade por enzimas contendo Ser na TC e que a presença da Ser nesta posição existe essencialmente em procariotos, sobretudo em bactérias. No presente estudo, dando continuidade a este trabalho, verificamos que AhpCs contendo uma Ser na TC são mais resistentes à superoxidação e apresentariam ainda uma atividade de holdase em situações de estresse térmico mais acentuada do que AhpCs contendo uma Thr nessa posição. Uma vez que o estresse oxidativo e térmico são barreiras impostas à infecção por bactérias pelo organismo hospedeiro, a inibição desse sistema de defesa poderia constituir uma estratégia de importância no combate a esses patógenos. Nesse sentido, avaliamos a capacidade inibitória de Adn sobre AhpCs e verificamos que Adn apresenta maior afinidade por AhpC de *Escherichia coli* (EcAhpC), independente da presença de Thr ou Ser na TC (EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S}) do que para as isoformas de humanos, apresentando um valor de IC₅₀ $\approx$ 5 e 50 vezes inferior do que para PrxI e PrxII, respectivamente. Adicionalmente, observamos que Adn também inibiu a atividade de Trx de *E. coli* (EcTrx1) com maior eficiência que a Trx de humanos. Verificamos ainda que Adn mostrou-se tóxica para bactérias Gram-positivas, apresentando valores de IC₅₀ na faixa de 110-140 μ M, e para Gram-negativa (*E. coli*) quando tratadas com polimixina B nonapeptídeo (PMBN). Uma vez que PMBN também apresenta atividade antibiótica, sua utilização em associação com Adn pode representar uma potencial nova terapia antimicrobiana. Adicionalmente, realizamos uma triagem de compostos naturais oriundos da biota florística do Estado de São Paulo e identificamos uma molécula capaz de inibir a atividade peroxidásica de EcAhpC com eficiência semelhante à Adn, além de inibir também EcTrx1 com menor eficiência. Este composto representa o primeiro inibidor de Prx da classe das lactonas sesquiterpênicas, além de ser também o primeiro inibidor proveniente da biodiversidade brasileira. Por fim caracterizamos uma nova tiól proteína de *X. fastidiosa* e demonstramos que ela é capaz de proteger as células bacterianas contra o cianeto e o estresse oxidativo gerado por H₂O₂. Coletivamente os resultados obtidos neste trabalho contribuem para a descoberta de novas abordagens de combate a bactérias patogênicas.

PALAVRAS CHAVE: Peroxirredoxinas, antibióticos, inibidores, adenantina.

ABSTRACT

The increase in resistance to antibiotics by microorganisms has grown dramatically and experts have warned of the rapid ineffectiveness of drugs against super-resistant bacteria strains. The bacterial resistance to antibiotics can be directly related to oxidative stress, since different antibiotics have the convergent capacity to produce reactive oxygen species, which cause damage to macromolecules, especially to DNA, increasing mutation rates, which can contribute to appearance of super-resistant strains. Reactive oxygen and nitrogen species are also produced by the host immune system to combat pathogens and studies indicate that inhibition of the expression of pathogen antioxidant enzymes is able to generate a significant intracellular increase in these species, which significantly interferes in their survival. It has recently been demonstrated that a natural compound named adenanthin (Adn) is able to inhibit the peroxidase activity of typical 2-Cys peroxyredoxins (Prx) from humans (PrxI and PrxII), resulting in the mortality of tumor cells, but presenting low toxicity to normal cells. 2-Cys Prx are capable of decomposing hydroperoxides using a cysteine residue (Cys_p) and their high reactivity over different types of hydroperoxide is achieved by interactions with Thr/Ser and Arg residues, absolutely conserved between 2-Cys Prx. Together, Cys_p, Thr / Ser and Arg, are called catalytic triad (CT). Typical 2-Cys Prx are also present in bacteria and are named AhpC, being considered one of the fundamental oxidative defense fronts for the pathogen. In a previous project, we have evaluated the effects of the presence of the Thr or Ser residue on the TC of two yeast typical 2-Cys Prx on the inhibitory activity of Adn. We then demonstrated that Adn has higher affinity for enzymes containing Ser on TC and that the presence of Ser in this position exists essentially in prokaryotes, especially in bacteria. In the present study, continuing this work, we have found that AhpCs containing a Ser on TC are more resistant to overoxidation and would have higher holdase activity during thermal stress than AhpCs containing a Thr in that position. Since oxidative and thermal stress are barriers imposed to bacteria infection by the host organism, the inhibition of this defense system could be an important strategy in the fight against these pathogens. So, we have evaluated the inhibitory capacity of Adn over AhpCs and found that Adn has a higher affinity for AhpC of *Escherichia coli* (EcAhpC), regardless of the presence of Thr or Ser on TC (EcAhpC^{WT} and EcAhpC^{T44S}), than for human isoforms, presenting an IC₅₀ value $\approx$ 5 and 50 times lower than for PrxI and PrxII, respectively. Additionally, we observed that Adn also inhibited *E. coli* Trx activity (EcTrx1) with higher efficiency than human Trx. We also found that Adn was toxic to Gram-positive bacteria, with IC₅₀ values in the range of 110-140 μ M, and to Gram-negative (*E. coli*) when treated with polymyxin B nonapeptide (PMBN). Since PMBN also has antibiotic activity, its use in association with Adn may represent a potential new antimicrobial therapy. Additionally, we carry out a screening of natural compounds from the floristic biota of the State of São Paulo and identified a molecule capable of inhibiting the peroxidase activity of EcAhpC with similar efficiency to Adn, besides inhibiting EcTrx1 with less efficiency. This compound represents the first Prx inhibitor in the sesquiterpene lactone class, in addition to being the first inhibitor derived from Brazilian biodiversity. Finally, we have characterized a new thiol protein from *Xylella fastidiosa* and demonstrated that it is able to protect bacterial cells against cyanide and oxidative stress generated by H₂O₂. Collectively, the results obtained in this work contribute to the discovery of new approaches to combat pathogenic bacteria

KEYWORDS: Peroxyredoxins, antibiotics, inhibitors, adenanthin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação das reações de Fenton e de Harber-Weiss.	16
Figura 2: Substituição de Thr (presente em eucariotos) por Ser (presente em procariotos) na TC das Prx.	23
Figura 3: Ciclos de oxirredução envolvidos na redução de hidroperóxidos por Prx 2-Cys típicas de eucariotos e bactérias.....	25
Figura 4: Comparação entre estruturas de Trx e TrxR de bactéria e de humanos e AhpF de bactérias.	26
Figura 5: Resultados das purificações das AhpCs contendo Thr ou Ser como parte da TC.	37
Figura 6: Avaliação da inibição da atividade de AhpC contendo Thr na TC e mutantes Thr→Ser através do ensaio de oxidação de DTT.....	38
Figura 7: Avaliação da inibição da atividade de AhpC contendo Ser na TC e mutantes Ser→Thr através do ensaio de oxidação de DTT.....	39
Figura 8: Ensaio acoplado de oxidação de NADPH e resultado de expressão e purificação de EcTrx1 e EcTrxR.	42
Figura 9: Inibição da formação de dissulfeto intermolecular e atividade peroxidásica de EcAhpC ^{WT} e EcAhpC ^{T44S} por Adn.....	44
Figura 10: Ensaio de inibição do sistema redutor de Tsa1 por Adn.....	46
Figura 11: Avaliação de inibição de sistemas redutores de AhpC por Adn.	47
Figura 12: Ensaio de oxidação de NADPH com o sistema Trx de <i>S. cerevisiae</i> pré-tratado com Adn.	48
Figura 13: Superfícies moleculares de AhpC e de enzimas de sistemas redutores e quantificação de cisteínas livres em EcTrxR e ScTrxR.	50
Figura 14: Viabilidade celular de <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. typhimurium</i> após tratamento com Adn.....	52
Figura 15: Avaliação da toxicidade de EDTA combinado a ampicilina e Adn sobre <i>E. coli</i> :	54
Figura 16: Avaliação da toxicidade de Adn associada a PMBN sobre <i>E. coli</i>	56
Figura 17: Estruturas químicas de inibidores de Prx2 2-Cys típicas.....	57
Figura 18: Estrutura dos compostos naturais, isolados da biota florística de São Paulo, selecionados para o desenvolvimento do estudo.	58
Figura 19: Avaliação de inibição da atividade peroxidásica de EcAhpC ^{WT}	59
Figura 20: Avaliação de inibição da atividade peroxidásica de EcAhpC ^{T44S}	59

Figura 21: Avaliação da inibição da formação de dissulfeto intermolecular em EcAhpC.	60
Figura 22: Inibição da formação de dissulfeto intermolecular e atividade peroxidásica de EcAhpC ^{WT} e EcAhpC ^{T44S} por C-3.	62
Figura 23: Avaliação de inibição da atividade de EcTrx1.	63
Figura 24: Avaliação de inibição da atividade peroxidásica de EcTrxR.	64
Figura 25: Avaliação de inibição da atividade oxidoredutase de EcAhpF.	64
Figura 26: Viabilidade celular de <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. epidermidis</i> após tratamento com C-3.	66
Figura 27: Ensaio de oxidação NADPH para avaliação da superoxidação AhpC de <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. epidermidis</i> utilizando o sistema Trx heterólogo <i>E. coli</i> .	67
Figura 28: Estruturas químicas de inibidores de identificados para AhpC e de hidroperóxidos orgânicos.	68
Figura 29: Desenovelamento térmico de PaAhpC, SeAhpC e mutantes monitorado por fluorimetria de varredura diferencial.	69
Figura 30: Proteção comparativa de PaAhpC e SeAhpC contra a agregação da citrato sintase (CS) induzida por estresse térmico.	70
Figura 31: Envolvimento de resíduos de cisteína na atividade de sulfotransferase de GLP.	72
Figura 32: A expressão heteróloga de GLP confere alta resistência ao cianeto em <i>E. coli</i> .	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para a clonagem dos genes	30
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para as mutações Thr/Ser nos genes <i>ahpC</i>	31
Tabela 3: Velocidade inicial (v_0) de enzimas AhpCs contendo Thr ou Ser como parte da TC de diferentes espécies de bactérias tratadas (Adn+) ou não (Adn-) com o inibidor Adn	41

LISTA DE ABREVIATURAS

Adn	Adenantina
AhpC	Alquil hidroperóxido redutase subunidade C
AhpF	Alquil hidroperóxido redutase subunidade F
C-3	Composto 3
Cat	Catalase
CHP	Hidroperóxido de cumeno
Cys _P	Cisteína peroxidásica
Cys _R	Cisteína de resolução
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FF	<i>Fully folded</i> (totalmente enovelado)
IAA	2-iodoacetamida
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
LU	<i>Locally unfolded</i> (parcialmente desenovelado)
MDR	Resistente a múltiplas drogas
ME	Membrana externa
MIC	Concentração inibitória mínima
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
NADH	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo 2-fosfato reduzido
NTD	Domínio N-terminal
PMBN	Polimixina B nonapeptídeo
Prx	Peroxirredoxina
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio
Sod	Superóxido dismutase
TC	Tríade catalítica
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina redutase
Tsa 1/2	<i>Thiol-specific antioxidant 1/2</i>
UFC	Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Bactérias resistentes a múltiplos antibióticos	14
1.2 A letalidade de antibióticos é acompanhada pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)	16
1.3 Defesas oxidativas do organismo hospedeiro na infecção por patógenos	17
1.4 Peroxirredoxinas e sua importância em bactérias patogênicas	18
1.5 Inibição de Prx2-Cys típicas por Adenantina (Adn).....	22
1.6 Diferenças entre Prx 2-Cys de eucariotos e procariotos	23
1.7 Presença de Ser na TC é mais comum em Prx 2-Cys típicas bacterianas	24
1.8 Efeitos da Adn sobre o sistema redutor das Prx 2-Cys típicas	25
2. OBJETIVOS	28
3. JUSTIFICATIVA	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Reagentes	29
4.2 Meios de cultura para bactérias.....	29
4.3 Linhagens de <i>E. coli</i> para expressão de proteínas recombinantes	29
4.4 Plasmídeos de expressão e genes de proteínas alvo.....	29
4.5 Mutações sítio dirigidas	31
4.6 Expressão e purificação em bactérias de proteínas selvagens e mutantes	31
4.7 Quantificação de proteínas.....	32
4.8 Tratamento das proteínas com os compostos	32
4.9 Verificação da ligação dos compostos ao sítio ativo das AhpC por SDS-PAGE ..	33
4.10 Ensaio de oxidação de DTT	33
4.11 Análise da inibição dos compostos sobre a atividade de AhpC e sistema Trx...	33
4.12 Análise da inibição dos compostos sobre a atividade de AhpF	34
4.13 Quantificação das Cys livres de EcTrxR e ScTrxR	34
4.14 Avaliação do meio de cultura	34
4.15 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)	35
4.16 Permeabilização da membrana externa (ME) de <i>E. coli</i>	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Inibição de AhpC contendo Thr ou Ser na TC por Adn	36
5.1.1 Obtenção de AhpC selvagens e contendo a mutação Thr $\rightleftharpoons$ Ser	36
5.1.2 Avaliação da inibição de AhpC por Adn através de ensaio de oxidação de DTT	38

5.1.3 Avaliação de inibição de AhpC por Adn pelo ensaio acoplado de oxidação de NADPH	41
5.1.4 Determinação do IC ₅₀ aparente pelo ensaio acoplado de oxidação de NADPH	43
5.1.5 Avaliação de inibição de Adn sobre proteínas do sistema redutor de EcAhpC (EcTrx1, EcTrxR e EcAhpF)	46
5.1.6 Avaliação da toxicidade de Adn sobre células bacterianas.....	51
5.1.7 A influência da membrana externa de bactérias Gram-negativas sobre a toxicidade de Adn.....	52
5.2 Avaliação de compostos naturais oriundos da biota florística de São Paulo sobre AhpC e seu sistema redutor	56
5.2.1 Avaliação da atividade inibitória dos compostos naturais sobre AhpC de E. coli por meio do ensaio de oxidação de NADPH.....	56
5.2.2 Determinação do IC ₅₀ aparente de C-3 para EcAhpC ^{WT} e EcAhpC ^{T44S}	61
5.2.3 Avaliação da atividade inibitória dos compostos naturais sobre sistemas redutores de AhpC.....	63
5.2.4 Avaliação da toxicidade de C-3 sobre células bacterianas.....	65
5.3 A importância da presença de Thr ou Ser na TC das AhpC na suscetibilidade à superoxidação	66
5.4 Caracterização de uma nova enzima antioxidante presente somente em bactérias envolvidas na resistência ao estresse por cianeto e oxidativo	71
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
7. PERSPECTIVAS	75
REFERÊNCIAS	78
APÊNDICES	88

1. INTRODUÇÃO

1.1 Bactérias resistentes a múltiplos antibióticos

Os antibióticos revolucionaram a medicina humana e veterinária e são considerados um dos maiores avanços da medicina do século XX. O período que compreende os anos 1950 e 1970 foi o auge das descobertas de novas classes de antibióticos (Aminov, 2010; Strebhardt e Ullrich, 2008). Entretanto, após este período, o número de novos antibióticos se tornou muito escasso e a principal abordagem para o desenvolvimento de novos medicamentos para combater a resistência emergente e re-emergente de patógenos a antibióticos tem sido, em sua grande maioria, baseada na modificação dos antibióticos existentes, inclusive por razões econômicas (Chopra *et al.*, 2002; Docquier & Mangani, 2018; Fernandes *et al.*, 2017; Mendes, *et al.* 2014). Este decréscimo no desenvolvimento de novos fármacos ocorre devido a obstáculos econômicos e regulatórios bem como fusões empresariais que reduziram substancialmente o número de pesquisas. Das 18 maiores empresas farmacêuticas, 15 abandonaram a produção de antibióticos (Bartlett *et al.*, 2013; Piddock, 2012).

Por outro lado, as taxas de mortalidade relacionadas às infecções bacterianas resistentes a múltiplas drogas (Multi Drug Resistance - MDR) têm se tornado cada vez mais elevadas, o que constitui um grave problema de saúde em todo o mundo e a Organização Mundial da Saúde (OMS) alerta para os impactos desastrosos do aumento da resistência a antimicrobianos em um futuro próximo. A resistência de microorganismos a antibióticos de segunda e terceira geração, os quais constituem as últimas linhas de defesa contra infecções comuns, deve dobrar entre os anos de 2005 e 2030 e as mortes provocadas anualmente em todo o mundo por essas doenças passariam das centenas de milhares para dezenas de milhões até 2050 (WHO/IACG, 2019). Na União Europeia (UE), mais de 33 mil pacientes morrem por ano em decorrência de infecções ocasionadas por 16 bactérias MDR (Cassini *et al.*, 2019). Nos Estados Unidos da América (EUA), cerca de 63.000 pacientes morrem anualmente como consequência de infecções hospitalares ocasionadas por bactérias MDR (Ventola *et al.*, 2015). Os custos econômicos estimados na UE revelam que os gastos para o sistema de saúde em conjunto com a perda de produtividade dos pacientes geraram um prejuízo aproximado de 1.5 bilhão de euros por ano (ECDC / EMEA Joint Working Group, 2009; Dadgostar *et al.*, 2019). Em período similar, o custo anual do tratamento de infecções hospitalares nos EUA de apenas seis espécies de bactérias MDR foi estimado em aproximadamente

1.9 bilhão de dólares (Ventola *et al.*, 2015). Em 2013, o CDC (Centers for Disease Control and Prevention - CDC) dos EUA declarou que estamos na "era pós-antibiótica" e esta declaração está alinhada com a OMS que, em 2014, alertou que a crise de resistência aos antibióticos está se tornando alarmante uma vez que o percentual de bactérias MDR aumenta ano a ano (Michael *et al.*, 2014; Reardon, 2015). No Brasil, infelizmente, esses dados não são claros, mas a preocupação com os danos provocados pela crescente resistência de organismos antimicrobianos levou à elaboração do "Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única", com vigência de 2018 a 2022 (PAN-BR) (Ministério da Saúde, 2018). Nesse sentido, novas abordagens voltadas para o tratamento dessas das infecciosas causadas por esses agentes seriam de grande importância tanto clínica quanto financeira.

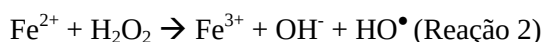
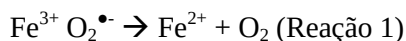
Entre os patógenos Gram-positivos, a maior ameaça para uma pandemia global é representada por bactérias como *Staphylococcus aureus* e o gênero *Enterococcus* (CDC, 2013; Rossolini, 2014). De fato, ainda na década de 1960 já foram descritos isolados de *Staphylococcus* resistentes à meticilina, denominados de MRSA (para Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Nessa época, para o tratamento das infecções causadas por este agente etiológico, foi utilizada a vancomicina. Entretanto, duas décadas mais tarde, foram identificadas linhagens resistentes à vancomicina e atualmente as MRSA representam uma grande ameaça à saúde pública mundial (Ventola *et al.*, 2015). De fato, somente nos EUA, a MRSA é responsável por mais mortes todos os anos do que AIDS, doença de Parkinson, enfisema e homicídio juntos (CDC, 2013). Apesar da resistência aos antibióticos anti-MRSA geralmente ocorrer através de mutações, existem estudos que demonstram a transferência de genes de resistência aos antibióticos linezolida (oxazolidinonas) e glicopeptídeos, aspecto de grande gravidade (Chen *et al.*, 2020; Rossolini *et al.*, 2014). Bactérias Gram-negativas também trazem preocupação porque estão se tornando resistentes a quase todos os antibióticos disponíveis (Eichenberger e Thaden, 2019; Golkar *et al.*, 2014; Rossolini *et al.*, 2014). O surgimento de bacilos Gram-negativos MDR tem tido grande impacto na medicina, e as infecções mais graves ocorrem em ambientes hospitalares sendo as mais comuns causadas por Enterobacteriaceae (principalmente *Klebsiella pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* (CDC, 2013; Feretzakis *et al.*, 2019; Rossolini *et al.*, 2014). Bactérias patogênicas Gram-negativas MDR como *Escherichia*

coli e *Neisseria gonorrhoeae* também estão se tornando cada vez mais prevalentes em ambientes hospitalares, e já foi demonstrado que diversas linhagens produzem β -lactamases capazes de inibir a ação de antibióticos β -lactâmicos (Dryden, 2018; Ventola, 2015).

1.2 A letalidade de antibióticos é acompanhada pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Diversos estudos indicam que diferentes classes de antibióticos, independentemente das suas interações fármaco-alvo, geram níveis variáveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) que contribuem significativamente para a morte celular dos patógenos (Bizzini *et al.*, 2009; Breidenstein *et al.*, 2008; Brynildsen *et al.*, 2013; Calhoun *et al.*, 2011; Davies *et al.*, 2009; Dryden, 2018; Foti *et al.*, 2012; Girgis *et al.*, 2009; Grant *et al.*, 2012; Gusarov *et al.*, 2009; Jee *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2012; Kohanski *et al.*, 2008; Ling *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2011; Shatalin *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010; Yeom *et al.*, 2010). Apesar de existir ainda grande debate sobre a relação de antibióticos, geração de EROs e letalidade em patógenos, trabalhos recentes utilizando as mais distintas abordagens reforçam as conclusões obtidas pelos diferentes grupos de pesquisa (van Acker *et al.*, 2016; Dwyer *et al.*, 2014; Ibacache-Quiroga *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2020). Neste contexto, foi demonstrado que as três principais classes de drogas bactericidas utilizam um mecanismo comum que estimula a produção de radicais hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) por meio de reações químicas de Fenton (Figura 1A). De fato, a administração de quelantes de ferro (Fe) atenua a morte por fármacos bactericidas, sugerindo que os radicais hidroxila contribuem para a morte das bactérias tratadas com antibióticos. Neste contexto é importante salientar que a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por meio da dismutação efetuada pela enzima superóxido dismutase (Sod) também pode favorecer a formação de $\text{HO}^\bullet$. Além disso, o H_2O_2 juntamente com o radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) também é capaz de produzir $\text{HO}^\bullet$ por meio da reação de Harber-Weiss (Figura 1) (Halliwell & Gutteridge, 2010).

A) Reações de Fenton:



B) Reação de Harber-Weiss:



Figura 1: Representação das reações de Fenton e de Harber-Weiss. (A) A Reações de Fenton ocorre entre uma molécula de Fe^{3+} e molécula de radical ânion superóxido e resulta na formação de Fe^{2+} que, ao

reagir com peróxido de hidrogênio, produz o radical hidroxila. **(B)** Representação da reação de Haber Weiss, originando radical hidroxila a partir da reação entre o peróxido de hidrogênio e o ânion superóxido.

Ponto de importância reside no fato que, apesar dos diferentes fármacos bactericidas (β -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas) terem diferentes alvos biológicos (proteínas de ligação à penicilina, ribossomo e topoisomerase, respectivamente), todos eles convergem em uma via comum. Essa via é baseada na produção de oxidantes através de resposta metabólica envolvendo o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (tricarboxylic acid cycle – TCA) que induz a rápida depleção de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), resultando em uma hiperativação da cadeia de transporte de elétrons, o que aumenta a produção de produtos secundários como o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Kohanski *et al.*, 2010). O $O_2^{\bullet-}$ pode atacar grupamentos ferro-enxofre (Fe-S) presentes em diversas proteínas podendo levar à disponibilização de Fe ferroso (Fe^{2+}) que participa da reação de Fenton, resultando em formação de $HO^{\bullet}$, o que auxilia na morte celular (Kohanski *et al.*, 2010). Cabe ressaltar que o H_2O_2 também é capaz de danificar grupos Fe-S levando à disponibilização de Fe^{2+} (Imlay, 2008; Jang *et al.*, 2010), o que deve maximizar este processo e levar a mais danos celulares. É importante salientar que, apesar de baixas doses de antibióticos estarem associadas ao aparecimento de bactérias resistentes em função das mutações provocadas no DNA, altas concentrações ou concentrações apropriadas de antibióticos levam a sérios danos em biomoléculas, o que impossibilita ou decresce fortemente as taxas de sobrevivência do patógeno (Dryden, 2018; Giguère *et al.*, 2007).

1.3 Defesas oxidativas do organismo hospedeiro na infecção por patógenos

Quando um patógeno invade um hospedeiro, um dos mecanismos de defesa mais estudados é denominado de explosão respiratória (respiratory burst), o qual se caracteriza pela geração de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). A geração de EROs é devida à ativação de uma multicomponente oxidase (NADPH oxidase, também denominado de fagócito oxidase), que oxida o NADPH e, no processo, reduz o oxigênio a $O_2^{\bullet-}$ (Halliwell & Gutteridge, 2015). Em neutrófilos, essa reação oxidativa é disparada pelos sinais de ativação e acompanha a fagocitose (Babior, 2004). Quando o radical $O_2^{\bullet-}$ sofre dismutação, produz

H_2O_2 , o qual é altamente difusível no organismo e capaz de desencadear mecanismos potencialmente tóxicos para as células (Gordon, 2016; Halliwell e Gutteridge, 2015; Underhill e Ozinsky, 2002). O H_2O_2 , por si só, não é capaz de destruir eficientemente o patógeno, entretanto, ao ser convertido em $HO^\bullet$, pode atingir e destruir membranas celulares, proteínas e causar mutações em ácidos nucleicos (Halliwell e Gutteridge, 2015). Outra forma de eliminar os organismos invasores é através da produção do radical óxido nítrico ($NO^\bullet$). O $NO^\bullet$ é gerado quando ocorre a oxidação da arginina na presença da molécula de oxigênio, sendo esta reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) (Fritzsche *et al.*, 2010; Prolo *et al.*, 2013). O $NO^\bullet$, por sua vez, pode levar à formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), um potente agente oxidante cujos derivados são capazes de causar danos ao DNA e oxidação lipídica (Calcerrada *et al.*, 2011; Niles *et al.*, 2006; Radi, 2018).

Se por um lado os organismos hospedeiros produzem EROs e ERNs como defesa oxidativa, os organismos patogênicos dispõem de enzimas antioxidantes capazes defendê-los dos efeitos tóxicos dessas espécies reativas e ajudá-los a superar a barreira oxidante imposta pelo hospedeiro, possibilitando assim a infecção, manutenção e crescimento. As enzimas antioxidantes utilizadas pelos patógenos para metabolizar as EROs e ERNs em produtos menos tóxicos ou atóxicos são representadas principalmente por enzimas como as superóxido dismutases (Sod), as catalases (Cat) e as peroxirredoxinas (Prx). Portanto, uma alternativa lógica seria a utilização de inibidores de enzimas antioxidantes em terapias antimicrobianas (Birben *et al.*, 2012). No entanto, os hospedeiros, incluindo os humanos, possuem enzimas extremamente semelhantes às dos patógenos, principalmente quando se trata da Sod e Cat e os inibidores acabam por ser tóxicos também para as células dos hospedeiros (Benov e Fridovich, 1994; Brennan *et al.*, 2015; Discola *et al.*, 2005; Heikkila *et al.*, 1977; Lu *et al.*, 1998; Mishra e Imlay 2012; Roberts e Hirst, 1996; Sugadev *et al.*, 2011). Neste contexto, um importante alvo seria a família das Prx, em razão de sua diversidade.

1.4 Peroxirredoxinas e sua importância em bactérias patogênicas

As Prx constituem a última grande família de peroxidases a ser descoberta. Diferentemente da Sod e Cat, estas enzimas não possuem grupos prostéticos e utilizam um resíduo de cisteína (cisteína peroxidásica - Cys_p) altamente reativa para decompor hidroperóxidos (Jacobson *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 1988; Netto *et al.*, 1996). Quando se

analisa as estruturas quaternárias destas enzimas, observa-se que a Cys_P se encontra em grande proximidade com uma Thr (ou Ser, em alguns casos) e com uma arginina (Arg), a qual é totalmente conservada em todas as Prx já descritas até o momento. Estes três resíduos de aminoácidos (Cys_P, Thr/Ser e Arg) formam a tríade catalítica (TC) e todos apresentam importância na catálise, visto que a desprotonação e a manutenção de Cys_P na forma de tiolato (S⁻) é dependente da integridade da TC (Tairum *et al.*, 2016).

Apesar de todas as Prx possuírem Cys_P, elas constituem uma família de enzimas bastante heterogênea e diversas classificações já foram propostas, sendo que a mais utilizada subdivide essas proteínas em três grandes grupos (Prx 1-Cys, Prx 2-Cys típicas e Prx 2-Cys atípicas) de acordo com a quantidade de resíduos de cisteína envolvidos no processo de redução do hidróperóxido (Wood *et al.*, 2003). As Prx 1-Cys são proteínas homodiméricas que apresentam apenas um resíduo de cisteína (Cys_P) envolvido no ciclo catalítico localizado na região N-terminal. Já as Prx 2-Cys utilizam dois resíduos de cisteína, um na região N-terminal (Cys_P) e outro na C-terminal, denominado de cisteína de resolução (Cys_R), que durante o ciclo catalítico formam um dissulfeto Cys_P - Cys_R. As Prx 2-Cys típicas apresentam-se em homodímeros e a formação do dissulfeto Cys_P - Cys_R é intermolecular, ao passo que as Prx 2-Cys atípicas apresentam-se como monômeros ou homodímeros e formam um dissulfeto Cys_P - Cys_R intramolecular (Wood *et al.*, 2003). Após sua oxidação, as Prx são geralmente reduzidas pelo sistema Trx, composto pelas enzimas tiorredoxina (Trx) e tiorredoxina redutase (TrxR), que utiliza elétrons provenientes do NADPH *via* uma molécula de FAD (flavina adenina dinucleotídeo). A redução pelo sistema Trx restaura a atividade peroxidásica das Prx, tornando-as aptas à decomposição de uma nova molécula de hidróperóxido. Entretanto, apesar das Prx 2-Cys de eucariotos serem reduzidas principalmente pelo sistema Trx, as Prx 2-Cys típicas de procariotos, denominadas AhpC (para alquil hidróperóxido redutase C), também possuem um sistema redutor adicional composto por enzimas denominadas AhpF (alquil hidróperóxido redutase F) que utilizam NADH como redutor (Jaeger *et al.*, 2006; Jönsson *et al.*, 2007).

Outra característica apresentada pelas Prx 2-Cys típicas é o processo de superoxidação de Cys_P que, após atacar a molécula de hidróperóxido e assumir sua forma de ácido sulfênico (Cys_P-SOH), pode reagir com mais uma ou duas moléculas de hidróperóxido, gerando como intermediários a cisteína ácido sulfínico (Cys_P-SO₂H) ou sulfônico (Cys_P-SO₃H) (Poole *et al.*, 2011). Nessas condições, Cys_P é incapaz de formar

o dissulfeto com Cys_R e, consequentemente, de ser reduzida por seus redutores endógenos e, portanto, a proteína perde sua atividade peroxidásica. A forma Cys_P-SO₂H pode ser reduzida eficientemente pela sulfirredoxina (Srx), uma proteína de baixo peso molecular dependente de ATP, Mg²⁺ e um Cys tiól que é capaz de restaurar a capacidade peroxidásica das Prx. Já para a forma Cys_P-SO₃H, até o momento, não foram encontrados redutores (Biteau *et al.*, 2003). Existe um consenso de que a superoxidação das Prx 2-Cys típica é facilitada pelo atraso na formação do dissulfeto entre Cys_P e Cys_R, o que deixaria Cys_P-SOH disponível por mais tempo para interagir com outras moléculas de hidroperóxido (Poole *et al.*, 2011; Wood *et al.*, 2003). Esse atraso tem sido atribuído à presença do motivo Gly-Gly-Leu-Gly e de um prolongamento na região C-terminal (contendo o motivo Tyr-Phe) o qual está localizado próximo ao sítio ativo em Prx 2-Cys típicas eucarióticas. Em seu estado reduzido, Cys_P encontra-se na extremidade do chamado Cys_P-loop a uma distância de aproximadamente 14Å de Cys_R, na conformação denominada FF (*fully folded* - totalmente enovelada). Para que ocorra a formação do dissulfeto com Cys_R, é necessário haver um desenovelamento parcial dessa região que culmina com a aproximação das duas cisteínas e, consequentemente, com a formação do dissulfeto, em uma conformação denominada LU (*locally unfolded* - parcialmente desenovelada). Entretanto, durante a transição FF-LU, a cauda C-terminal precisa sofrer um deslocamento e esse processo pode atrasar a formação do dissulfeto e favorecer a superoxidação. Tanto o motivo Gly-Gly-Leu-Gly quanto o prolongamento C-terminal não existem nas AhpC, o que as torna mais resistentes ao processo de superoxidação, sendo denominadas de proteínas “robustas”, enquanto as proteínas eucarióticas são chamadas de “sensíveis” (Poole *et al.*, 2011; Wood *et al.*, 2003). Recentemente, foi proposto que aminoácidos presentes no Cys_P-loop também teriam participação no desencadeamento de eventos de superoxidação através de interações com a cauda C-terminal (Kamariah *et al.*, 2018), mas estudos mais aprofundados são necessários para se compreender como de fato essas interações acontecem.

No que concerne à atividade das peroxidases, enquanto a Cat é capaz de decompor somente H₂O₂, embora com alta eficiência, as Prx 2-Cys típicas são capazes de decompor uma grande variedade de hidroperóxidos, dentre eles hidroperóxidos de lipídeos (Lp-OOH) e peroxinitrito (NOO-), com constantes de segunda ordem de 10⁷⁻⁸ M⁻¹s⁻¹ (Condeles *et al.*, 2020, Ogusucu *et al.*, 2007; Parsonage *et al.*, 2005; Tairum *et*

al., 2016). Também foi demonstrado que as Prx 2-Cys típicas são capazes de decompor até mesmo peróxidos de proteínas e aminoácidos com eficiência moderada ($10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$), o que revela sua grande versatilidade na decomposição de hidroperóxidos (Carvalho *et al.*, 2017; Peskin *et al.*, 2010). Adicionalmente, estas proteínas estão entre as mais abundantes em bactérias. Como exemplo, em *E. coli* as Prx estão entre as dez proteínas mais expressas (Link *et al.*, 1997).

Em bactérias patogênicas, a importância das Prx foi demonstrada em linhagens de *Helicobacter pylori* e *Helicobacter hepaticus*, agentes causadores de úlceras/gastrites estomacais e de hepatite crônica em mamíferos, respectivamente, os quais apresentam níveis elevados de hidroperóxidos de lipídeos quando o gene *ahpC* é deletado (Mehta *et al.*, 2007). Resultados similares foram descritos para *Campylobacter jejuni*, o agente etiológico de gastroenterites (Oh e Jeon, 2014). Em *Salmonella typhimurium*, patógeno responsável por moléstias gastrointestinais, febre tifóide e septicemia, foi demonstrado que linhagens deficientes de Prx apresentam alteração da morfologia celular e proliferação reduzida. O estudo também revelou que quando uma AhpC é superexpressa em células de *S. typhimurium* nocauteadas para genes envolvidos na decomposição de peróxidos ($\Delta katE$, $\Delta katG$, $\Delta katN$, $\Delta ahpC$ e $\Delta tsaA$), o patógeno recupera as características da linhagem selvagem (Hébrard *et al.*, 2009). Esses dados indicam que as Prx de *S. typhimurium* contribuem para a virulência do patógeno ao capacitá-lo a sobreviver às defesas do hospedeiro. Em *Mycobacterium tuberculosis*, o agente etiológico da tuberculose, a expressão de AhpC em isolados clínicos com a deleção de uma das isoformas de Cat ($\Delta katG$) é aumentada tanto no meio intracelular quanto no extracelular o que aparentemente é de importância para a manutenção da virulência de *M. tuberculosis* (Nieto *et al.*, 2016). No caso de *S. aureus*, o agente etiológico de diversas infecções hospitalares, AhpC juntamente com Cat possuem papéis compensatórios e são fundamentais na sobrevivência e colonização do trato respiratório (Cosgrove *et al.*, 2007). Estudos envolvendo metatranscriptoma de *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis* revelaram que *ahpC* é altamente expresso no trato respiratório, sendo que sua expressão é ao menos três vezes maior nesse ambiente quando comparado com os microrganismos crescidos em meio de cultura ($\sim 1320 \text{ reads per million} \times \sim 540 \text{ rpm}$) (Chaves-moreno *et al.*, 2016). Com base nesses dados, podemos inferir que a inibição da atividade peroxidásica das Prx de patógenos consiste em uma abordagem promissora para o tratamento das doenças causadas por eles, pois

levaria a um aumento nos níveis intracelulares de hidroperóxidos nesses organismos o que pode contribuir com a diminuição das suas taxas de sobrevivência.

1.5 Inibição de Prx2-Cys típicas por Adenantina (Adn)

Os compostos extraídos de plantas despertam um interesse especial da indústria farmacêutica em função de seu potencial para o desenvolvimento de novas drogas. Entre esses compostos naturais encontram-se os diterpenóides, uma ampla classe de metabólitos secundários com significativa atividade biológica que vem sendo investigada quanto à sua eficácia no tratamento de diversas doenças como câncer, doenças cardiovasculares e inflamatórias (Tirapelli *et al.*, 2008). Foi demonstrado que a adenantina (Adn), um diterpenóide extraído das folhas de *Isodon adenantha*, possui propriedades antitumorais. Liu e colaboradores (2012) observaram que a Adn possui a capacidade de induzir a diferenciação de células de leucemia mieloide aguda (LMA) (Liu *et al.*, 2012) através da inibição da atividade peroxidásica das isoformas citosólicas Prx1 e Prx2, as quais são evolutivamente relacionadas e compartilham homologia na sequência de aminoácidos (78% de identidade e 91% de similaridade) (Lee, *et al.*, 2007). Também foi proposto um modelo de ligação em que a Adn interagiria com outros aminoácidos na região do sítio ativo, incluindo os resíduos da TC por meio de uma interação hidrofóbica com a Thr⁴⁹ e uma interação polar com a Arg¹²⁸, sendo também estabilizada também por interações de caráter hidrofóbico com outros aminoácidos próximos ao sítio ativo da enzima (Leu⁴⁶, Phe⁵⁰, Val⁵¹, Ile¹²⁵, Pro¹⁴⁸ e Cys_P). Consequentemente, a inibição da atividade peroxidásica dessas proteínas permitiria um acúmulo de H₂O₂ intracelular em níveis suficientes para a ativação das quinases reguladoras de sinal extracelular ERK1 e ERK2, levando ao aumento da expressão de proteínas β estimuladoras de ligação CCAAT (C/EBP β), as quais conduziriam a diferenciação celular e consequente repressão do tumor (Liu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013). Adicionalmente, Hou e colaboradores observaram que a inibição de Prx1 e Prx2 por Adn foi capaz de induzir a morte de células de hepatocarcinoma (CHC) com mais eficiência do que a de células normais imortalizadas, além de inibir significativamente o crescimento de tumores xenográficos sem efeitos tóxicos significativos (Hou *et al.*, 2014). Mais recentemente, também foi demonstrado que Adn é capaz de atuar sobre células tumorais pulmonares, causando apoptose e/ou promovendo a diferenciação de células leucêmicas (Mo *et al.*, 2019), além de promover

efetivamente a morte de linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda precursora de células B (Fidyt *et al.*, 2019). Entretanto, apesar da Adn possuir importância por inibir as Prx humanas, pouco se sabe a respeito de sua atividade sobre enzimas de outros organismos.

1.6 Diferenças entre Prx 2-Cys de eucariotos e procariotos

Conforme mencionado anteriormente, uma diferença marcante entre as Prx 2-Cys típicas de procariotos e eucariotos reside na existência de um prolongamento C-terminal que insere uma α hélice nas enzimas de eucariotos e está relacionada com sua sensibilidade a superoxidação (Wood *et al.*, 2003). Outra diferença existente entre as 2-Cys típicas de eucariotos e procariotos reside na ocorrência de Thr ou Ser na TC (Figura 2A e 2B). De fato, nas Prx 2-Cys típicas identificadas em mamíferos e, de forma geral, nos eucariotos (com exceção poucos organismos, o que será abordado posteriormente) possuem uma Thr como parte da TC ao passo que algumas bactérias possuem uma Ser.

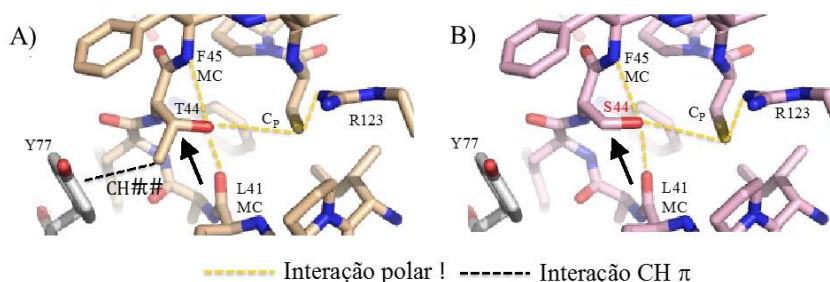


Figura 2: Substituição de Thr (presente em eucariotos) por Ser (presente em procariotos) na TC das Prx. (A) Estrutura cristalográfica de Tsa1 (1SBC) e (B) modelo teórico de Tsa1^{T44S} mostrando a rede de interações polares entre aminoácidos da TC (Cys_P, Thr/Ser e Arg). As estruturas estão representadas em sticks e coloridas em CPK (N=azul, O=vermelho e S=laranja claro). Os carbonos em Tsa1 estão representados em bege e cinza claro e de Tsa1^{T44S} em rosa e cinza claro.

Nosso grupo de pesquisa explorou estas diferenças em um trabalho anterior utilizando a Prx Tsa1 de *S. cerevisiae* como modelo biológico para a compreensão da interação de Adn com as Prx 2-Cys típicas. Com o objetivo de mimetizar as Prx 2-Cys típicas de procariotos, realizamos o truncamento do prolongamento C-terminal (do aminoácido 176 ao 196) e geramos o mutante Tsa1^{175ΔCT}. Entretanto, essa proteína mutante não apresentou diferenças na interação com Adn em relação à proteína selvagem. Adicionalmente, assim como as proteínas encontradas em mamíferos, Tsa1 possui uma Thr como parte da TC. Para avaliar os efeitos da substituição de Thr por Ser, utilizamos a proteína mutante Tsa1^{T44S}. Nossos resultados revelaram que o resíduo de Thr/Ser está relacionado à manutenção da estrutura decamérica de Tsa1, uma vez que

a Tsa1 selvagem transita entre decâmeros (pentâmeros de dímeros do tipo $[\alpha_2]_5$) quando reduzida, e dímeros, oligômeros de massa molecular intermediária e decâmeros quando oxidada, enquanto que o mutante Tsa1^{T44S} se apresenta como um decâmero constitutivo independente do estado redox (Tairum *et al.*, 2016). *S. cerevisiae* também possui uma segunda Prx 2-Cys típica denominada de Tsa2, a qual guarda grande similaridade em relação à estrutura primária com Tsa1 (86% de identidade e 96% de similaridade). No entanto, curiosamente, esta enzima difere de Tsa1, e também das enzimas de mamíferos, por possuir naturalmente uma Ser como parte da TC.

Ensaios de espectroscopia de dicroísmo circular (CD), cromatografia de exclusão molecular (SEC) e oxidação de NADPH, realizados por nosso grupo de pesquisa, revelaram que Adn é capaz de ligar-se ao sítio ativo de Tsa1 e Tsa2, provocando alterações nas estruturas secundária e quaternária, além de inibir parcialmente a atividade peroxidásica dessas proteínas. Entretanto, as análises revelaram que Adn promoveu maiores alterações na estrutura e atividade peroxidásica da mutante Tsa1^{T44S} e de Tsa2^{WT} do que de Tsa1^{WT}, indicando que a presença da Ser na TC poderia promover uma maior afinidade de Adn ao sítio ativo dessas proteínas (Apêndice B).

1.7 Presença de Ser na TC é mais comum em Prx 2-Cys típicas bacterianas

Segundo dados da base GenBank do NCBI, quase a totalidade dos organismos eucariotos sequenciados até o momento possuem Prx 2-Cys com uma Thr na TC. Por outro lado, a TC contendo uma Ser é um evento mais comum em Prx de procariotos, especialmente em bactérias (dados apresentados no Apêndice E). Dentre os organismos que possuem Ser na TC das Prx, existe uma série de bactérias Gram-positivas do gênero *Staphylococcus* como *Staphylococcus agalactiae*, *Staphylococcus castoreus*, *S. epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus gallolyticus*, *Staphylococcus equi* e *Staphylococcus pyogenes* que são agentes etiológicos de várias doenças humanas como endocardite, septicemia, periodontite, infecções agudas do trato urinário, infecções de pele, dentre outros. Também foi identificada esta mutação nos patógenos *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*. Algumas das doenças causadas por estes agentes constituem um sério problema de saúde pública uma vez ocorrem geralmente em ambiente hospitalar, podendo acometer pacientes imunocomprometidos e, em alguns casos, diversos

antibióticos não são capazes de eliminar estas bactérias pois são MDR (Egan *et al.*, 2109; Oteo *et al.*, 2015; Purrello *et al.*, 2016). Neste contexto, a presença da Ser na TC das Prx 2-Cys de determinadas espécies de bactérias colocam a Adn como uma representante promissora de um novo fármaco antimicrobiano. Adicionalmente elaboramos uma revisão sobre peroxirredoxinas de microrganismos patogênicos que foi submetido ao periódico Applied Microbiology and Biotechnology (Apêndice D).

1.8 Efeitos da Adn sobre o sistema redutor das Prx 2-Cys típicas

Soethoudt e colaboradores (2014) relataram que a Adn é capaz de se ligar em ambas as cisteínas das Prx de humanos (Cys_P e Cys_R) além de inibir também as enzimas do sistema Trx (hTrx e hTrxR). De fato, os autores demonstraram que, entre as enzimas analisadas, a hTrxR é a que sofre maior inibição pela Adn. Neste contexto, como mencionado anteriormente, o sistema redutor de 2-Cys eucarióticas difere significativamente do encontrado para a redução de AhpC. Enquanto em eucariotos o sistema é composto pela enzima Trx e pela flavoenzima TrxR e os equivalentes redutores são oriundos do NADPH (Figura 3A), em procariotos o sistema redutor é composto apenas pela flavoenzima AhpF que utiliza hidretos do NADH no processo de redução (Figura 3B).

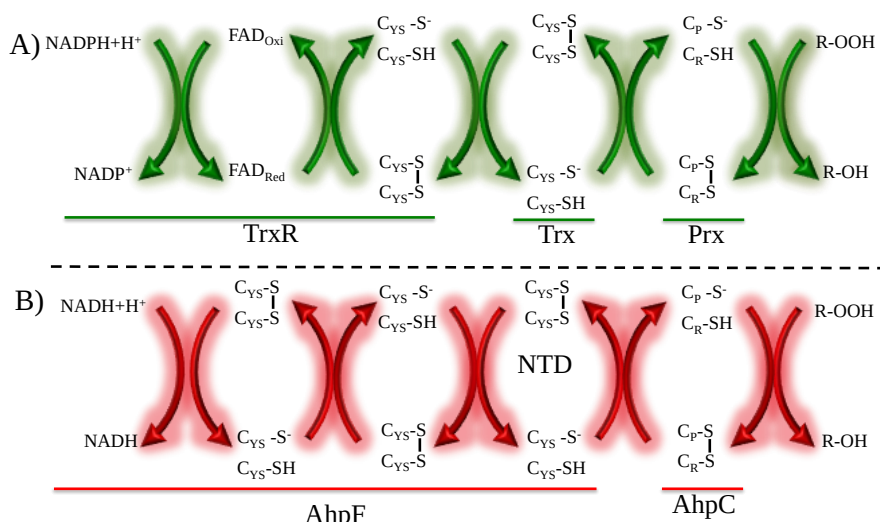


Figura 3: Ciclos de oxirredução envolvidos na redução de hidroperóxidos por Prx 2-Cys típicas de eucariotos e bactérias. A) As Prx 2-Cys típicas de células eucarióticas são reduzidas pelo sistema Trx que compreende as enzimas tiorredoxina, tiorredoxina redutase, uma flavoenzima, e NADPH. **B)** Em células procarióticas, as Prx 2-Cys típicas (AhpC) são reduzidas pela flavoenzima AhpF, que utiliza elétrons oriundos do NADH.

De fato, em eucariotos inferiores também existe o sistema redutor Trx-TrxR. No entanto, estas enzimas normalmente estão associadas a diversos processos de

oxirredução centrais como síntese de desoxirribonucleotídeos, reparação de proteínas danificadas oxidativamente, enovelamento de proteínas, metabolismo do enxofre, ativação de fatores de transcrição, entre outros (Lu e Holmgren, 2014; Vignols *et al.*, 2005). Neste contexto, quando se analisa as estruturas de TrxR de procariotos e eucariotos, é possível perceber que as enzimas possuem estruturas muito distintas (Figura 4A e 4B, respectivamente). Apesar de ambas serem homodímeros, a enzima de bactérias é menor (~70kDa) quando comparada com a de eucariotos multicelulares (~100kDa). Adicionalmente, os motivos que contém as cisteínas catalíticas diferem de forma significativa tanto em sua composição quanto na localização. Nas TrxR de eucariotos inferiores o motivo (Cys-X-X-Cys) está inserido no domínio de ligação ao NADPH ao passo que nas enzimas de eucariotos multicelulares o motivo (Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys) está inserido no domínio de ligação ao FAD e podem possuir um terceiro resíduo de Cys ou de selenocisteína (Sec) na porção C-terminal (Oliveira *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2010). Por outro lado, a enzima Trx é bastante conservada estruturalmente entre procariotos e eucariotos (Collet *et al.*, 2010) (Figura 4C e 4D).

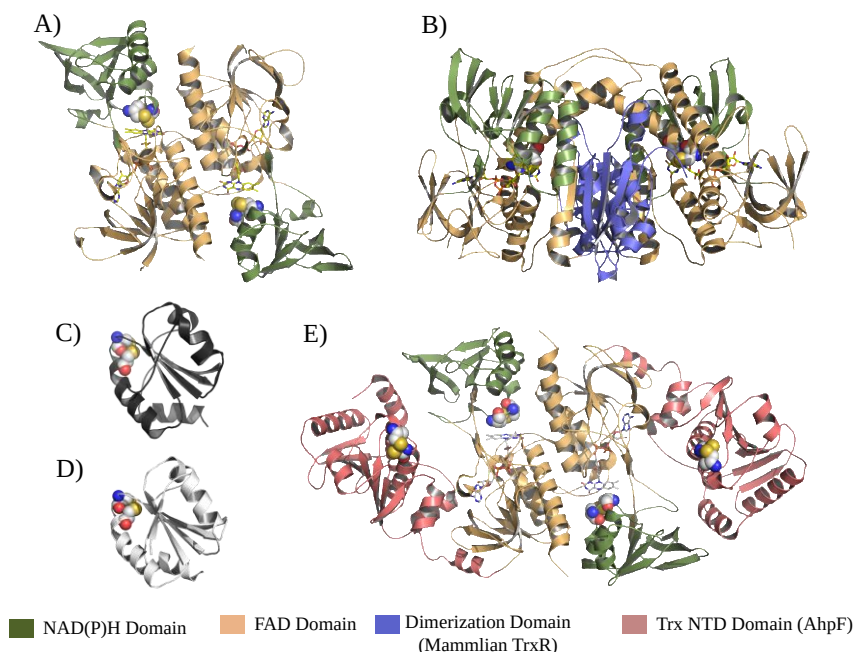


Figura 4: Comparação entre estruturas de Trx e TrxR de bactéria e de humanos e AhpF de bactérias. Todas as estruturas estão apresentadas em *cartoon* de acordo com a unidade biológica (representada por monômeros para Trx e dímeros para TrxR e AhpF). **A)** TrxR de *E. coli* (pdb: 3ITJ). **B)** TrxR1 de *H. sapiens* (pdb: 2J3N). **C)** e **D)** Trx de *E. coli* e de humanos, respectivamente. **E)** AhpF de *S. typhimurium* (pdb: 1HYU). As representações gráficas foram geradas com auxílio do *software* Pymol.

A AhpF também é uma proteína homodimérica com massa molecular aproximada de 220kDa e que possui, além de dos domínios de ligação para FAD e NADH (o que contrasta com as TrxR), um terceiro domínio denominado de NTD (para

N-terminal domain) formado por duas moléculas contíguas de Trx (Figura 4E). Essas moléculas de Trx contém duas cisteínas envolvidas na reação inicial de redução de AhpC. Dessa forma, uma vez que AhpF representa um sistema acoplado Trx-TrxR a ligação de um inibidor em um dos centros redox impossibilitaria a redução de AhpC.

Adicionalmente, trabalhos indicam que os efeitos dos antibióticos de induzir depleção do NADH, promovendo uma maior abundância de NAD^+ na célula, resultam em uma hiperativação de TCA e da cadeia de transporte de elétrons, o que aumenta a produção de produtos secundários como $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 (van Acker *et al.*, 2016; Dwyer *et al.*, 2014; Kohanski *et al.*, 2010). Nesse sentido, outros estudos demonstraram que, em condições aeróbicas, a limitação na concentração de AhpC induz AhpF a produzir H_2O_2 a partir do oxigênio molecular (O_2). Nesse processo, AhpF consome NADH e produz NAD^+ , contribuindo para a hiperativação da cadeia transportadora de elétrons e, conseqüentemente, para a produção de mais espécies reativas de oxigênio (Poole & Ellis, 1996; Niimura *et al.*, 1995). Nesse sentido, a inibição de AhpC contribuiria para morte de patógenos ao acentuar os efeitos oxidativos observados na administração de antibióticos.

Com base nos dados apresentados acima, as investigações envolvendo a atividade inibitória de Adn sobre as Prx é de grande importância e apresenta grande potencial para a caracterização de um novo fármaco antimicrobiano. Vale salientar que, até o presente momento, nenhum trabalho havia atentado para avaliar a inibição de Adn sobre as Prx 2-Cys de bactérias ou mesmo sobre os sistemas redutores bacterianos. Neste contexto, a análise dos efeitos de Adn sobre bactérias patogênicas pode ampliar o campo de utilização dessa molécula, podendo resultar em novas formas de terapias para as doenças causadas por elas. Adicionalmente, além do diterpenóide Adn, o qual pertence a família dos *ent*-cauranos, existem compostos similares que podem ser obtidos de plantas da biota brasileira (Dutra *et al.*, 2014; Nogueira *et al.*, 2016; Vandresen *et al.* 2010) o que representa uma forma bastante importante de prospecção direcionada a nossa biodiversidade, mas novamente nenhum trabalho ate o presente momento atentou para esta investigação.

2. OBJETIVOS

- i) Investigar a suscetibilidade à superoxidação de AhpCs contendo Thr ou Ser na TC;
- ii) Analisar a eficiência de Adn como um inibidor tanto das Prx 2-Cys bacterianas (AhpC), contendo Thr ou Ser como parte da TC, quanto de seu sistema redutor (sistema Trx e AhpF);
- iii) Avaliar a ação inibitória sobre AhpC e seu sistema redutor (sistema Trx e AhpF) de compostos naturais oriundos da biota florística de São Paulo.

3. JUSTIFICATIVA

A crise no desenvolvimento de novas drogas para o combate de bactérias multirresistentes tem se tornado um grave problema de saúde pública em todo o mundo. A descoberta de novos fármacos para combater infecções causadas por microrganismos tem sofrido uma queda nas últimas décadas em decorrência tanto do desinteresse da indústria farmacêutica, que considera esse investimento economicamente desvantajoso, quanto da redução do financiamento destinado às pesquisas conduzidas por instituições acadêmicas. Uma abordagem relevante para combater organismos patogênicos consiste na potencialização do estresse oxidativo, tanto o promovido pelo hospedeiro como forma de defesa à invasão quanto àquele promovido pela ação de antibióticos, através da inibição do sistema antioxidante do patógeno. Nesse caso, as Prx 2-Cys podem ser alvos de grande importância para a inibição em função de sua alta reatividade e abundância, além de possuírem características estruturais distintas entre eucariotos e procariotos. Nesse sentido, o diterpenóide Adn, descrito na literatura como um inibidor de Prx humana, possui grande potencial para ser utilizado como um fármaco antimicrobiano. Adicionalmente, a biodiversidade brasileira é capaz de oferecer uma grande quantidade de moléculas semelhantes à Adn e que podem apresentar ação inibitória sobre Prx 2-Cys bacterianas. Cabe ressaltar que, apesar de existirem estudos acerca ação de inibidores sobre proteínas Prx 2-Cys de humanos e tripanossomatídeos, não existem pesquisas dirigidas à inibição de AhpC ou de seu sistema redutor, o que torna este trabalho original e inédito dentro de um campo de pesquisa de grande importância.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nesse trabalho foram adquiridos junto a Merck Millipore, Sigma Aldrich, Thermo Scientific e GE Healthcare. Adn foi adquirida junto à ChemFaces. Os compostos oriundos da biota brasileira foram isolados e fornecidos pelo Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago da Universidade Federal do ABC (UFABC).

4.2 Meios de cultura para bactérias

Meio de cultura Luria-Bertani (LB): (1% triptona; 0,5% extrato de levedura (YE); 0,5% NaCl); meio de cultura *Super Optimal Broth* (SOC): (2% triptona; 0,5% YE; 0,058% NaCl; 0,018% KCl; [glicose] final de 20mM; pH=7.0); meio de cultura Mueller Hinton (Kasvi K25-610034); meio de cultura M9 (Alegria *et al.*, 2016); meio de cultura M9 suplementado com glicose (Dwyer *et al.*, 2014); meio de cultura M9 suplementado com aminoácidos e vitaminas (Washburn *et al.*, 2001); meio de cultura mínimo sintético (AAM) (Rudin *et al.*, 1957); ampicilina 100 µg/ml para seleção das bactérias de interesse.

4.3 Linhagens de *E. coli* para expressão de proteínas recombinantes

DH5αF' - F' (Z80dlacZ₁(lacZ)Adn5)₁(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17 (r_k^- , m_k^+); DH10B - F mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) f80dlacZ Δ Adn5 Δ lacX74 deoR recA1 endA1 ara Δ 139 D (ara, leu) 7697 galK1⁻ rpsLnupG; **XL1-Blue** - recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq Z Δ M15 Tn10 (Tet^r)]; **BL21(DE3)** - [F' , amp^r T, hsdS_b (r_B^- m_b^-), gal, dcm (DE3) (Novagen); B84 DE3 [F' , metamp^r T, hsdS_b (r_B^- m_b^-), gal, dcm (DE3)].

4.4 Plasmídeos de expressão e genes de proteínas alvo

Os genes *ahpC* de *B. subtilis* (F41923/PY79), *P. aeruginosa* (ATCC29853), *S. typhimurium* LT2 (ATCC 19585) e *E. coli* (ATCC25922), além dos genes *trxA*, *trxB* e *ahpF* da mesma linhagem de *E. coli*, foram amplificados a partir do DNA genômico extraído dessas bactérias utilizando protocolo de Chen & Kuo (1993). A amplificação dos genes foi realizada por reação de PCR utilizando oligonucleotídeos contendo sítios de ligação para as enzimas de restrição *Bam* HI e *Nde* I (Tabela 1). As reações de PCR foram realizadas em termociclador ProFlex PCR System 32 × 3 (Thermo Fisher

Scientific) utilizando a enzima Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Thermo Fisher Scientific) e os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose para extração e purificação dos fragmentos contendo apenas os genes *ahpC* (utilizando o kit GFX™ PCR and Gel Band Purification - GE Healthcare), sendo estes posteriormente digeridos com *Bam* HI e *Nde* I. A seguir, utilizando a enzima T4 DNA ligase, foi realizada a ligação dos genes em plasmídeo pET15b, também previamente digerido com *Bam* HI e *Nde* I. Após a inativação da T4 DNA ligase a 65°C por 10 minutos e diálise em membrana com poros de 0.025µm (Merck-Millipore), o produto da reação foi transformado na linhagem de *E. coli* DH5α. A confirmação da integridade dos genes foi efetuada por sequenciamento utilizando o sequenciador automático ABI 3730 DNA Analyser, utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Scientific).

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para a clonagem dos genes. As bases em sublinhado foram adicionadas aos genes, sendo que em preto estão destacados os sítios de ligação para *Bam* HI e *Nde* I e em vermelho a região de ancoragem dessas enzimas.

Oligonucleotídeos	
AhpC – <i>B. subtilis</i>	F-5' <u>CGCGATC</u> CATATGATGTCTTTAATCGGTAAAGAAGTACTT3' R-5' <u>CGCAAGCTT</u> GGATCCTTAGATTTTACCTACTAGATCAAGGCT3'
AhpC – <i>P. aeruginosa</i>	F-5' <u>CGCGATC</u> CATATGATGTCCCTGATCAACACTCAAGTCCAA3' R-5' <u>CGCAAGCTT</u> GGATCCTTAGATCTTGCCGACCAGGTCCAGG3'
AhpC – <i>S. typhimurium</i>	F-5' <u>CGCGATC</u> CATATGATGTCTTAATTAACACCAAAATCAAACC3' R-5' <u>CGCAAGCTT</u> GGATCCTTAGATTTTACCGACCAGGTCTAAGG3'
AhpC - <i>E. coli</i>	F-5' <u>CGCGATC</u> CATATGATGTCTTGATTAACACCAAAATTTAAA3' R-5' <u>CGCAAGCTT</u> GGATCCTTAGATTTTACCAACCAGGTCCAG3'
Trx1 - <i>E. coli</i>	F-5' <u>CGCGATC</u> CATATGATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACT3' R-5' <u>CGCAAGCTT</u> GGATCCTTACGCCAGGTTAGCGTCGAGGAA3'
TrxR - <i>E. coli</i>	F-5' <u>CGCGATC</u> CATATGATGGGCACGACCAAAACACAGTAAACTG3' R-5' <u>CGCAAGCTT</u> GGATCCTTATTTTGCCTCAGCTAAACCATC3'
AhpF – <i>E. coli</i>	F-5' <u>CGCGATC</u> CATATGATGCTCGACACAAATATGAAAACCTCAA3' R-5' <u>CGCAAGCTT</u> GGATCCTTATGCAGTTTTGGTGCGAATCAG3'

Os genes *ahpC* das bactérias *S. aureus* e *S. epidermidis* com códons otimizados para a expressão em *E. coli* e inseridos no vetor pUC57 foram adquiridos junto a empresa GenScript. Os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Nde* I (Thermo Fisher Scientific), sendo os produtos da digestão submetidos a eletroforese em gel de agarose para extração e purificação dos fragmentos contendo apenas os genes *ahpC* utilizando o kit GFX™ PCR and Gel Band Purification (GE Healthcare). Uma vez purificados, os genes foram ligados ao plasmídeo pET15b previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição. A reação de ligação ocorreu

overnight a 4°C utilizando a enzima T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific) e, após a inativação da enzima e diálise em membrana com poros de 0.025µm (Merck-Millipore), o produto da reação foi utilizado para transformar células da linhagem de *E. coli* DH5α.

4.5 Mutações sítio dirigidas

As mutações para obter as proteínas carregando a substituição pontual da Thr da TC por Ser (EcAhpC^{T44S}, StAhpC^{T44S} e PaAhpC^{T44S}) e de Ser por Thr (SaAhpC^{S46T}, SeAhpC^{S46T} e BsAhpC^{S44T}) foram efetuadas utilizando o kit Quick Change II (Stratagene), seguindo as orientações do fabricante. Os oligonucleotídeos utilizados estão representados na tabela 2. Uma vez que os genes *ahpC* de *S. aureus* e *S. epidermidis* tiveram os códons otimizados em sua síntese, os oligonucleotídeos para a mutação Ser/Thr foram idênticos para ambos os genes. O produto da reação de mutação foi utilizado na transformacao da linhagem de *E. coli* XL1-Blue e para a confirmação das mutações foi efetuado o sequenciamento dos genes utilizando o sequenciador automático ABI 3730 DNA Analyser, utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Scientific).

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para as mutações Thr/Ser nos genes *ahpC*. Em vermelho estão destacados os nucleotídeos alterados em relação ao gene selvagem

Oligonucleotídeos	
EcAhpC ^{T44S}	F – 5'GCTGACTTTTCTTTCGTATGC3' R – 5'GCATACGAAAGAAAAGTCAGC 3
PaAhpC ^{T44S}	F – 5'GCTGCCTTCTCCTTCAACTGC3' R – 5'GCAGTTGAAGGAGAAGGCAGC3
StAhpC ^{T44S}	F – 5' GCCGATTTTA GTTTGTTTGCC3' R – 5' GGCAAACAAA CTAAAATCGGC3'
Sa/SeAhpC ^{S46T}	F – 5'GCGGACTTCACTTTGTTTGC3' R – 5'GCAAACAAAGGTGAAGTCCGC3'
BsAhpC ^{S44T}	F – 5' GGCCAATGGA CCGTATTCTGC3' R – 5' GCAGAATACG GTCCATTGGCC3'

4.6 Expressão e purificação em bactérias de proteínas selvagens e mutantes

Linhagens de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com plasmídeos contendo os genes para a expressão de AhpC de *B. subtilis* (BsAhpC^{WT} ou BsAhpC^{S44T}), *E. coli* (EcAhpC^{WT} ou EcAhpC^{T44S}), *P. aeruginosa* (PaAhpC^{WT} ou PaAhpC^{T44S}), *S. typhimurium* (StAhpC^{WT} ou StAhpC^{T44S}), *S. aureus* (SaAhpC^{WT} ou SaAhpC^{S46T}) e *S. epidermidis* (SeAhpC^{WT} ou SeAhpC^{S46T}) ou Trx1, TrxR e AhpF de *E. coli* foram inoculadas em 30 ml de meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina e cultivadas por 16

h/37°C/250 RPM em agitador orbital. Após este período, a cultura foi transferida para 1 litro de meio LB/Ampicilina, cultivada até $OD_{600} \sim 0,6$ e, neste momento, foi adicionado IPTG na concentração final de 0,3 mM para a indução da expressão por 3h a 37°C/250 RPM. A seguir, as células foram decantadas por meio de centrifugação por 30 min/4°C/4000 RPM e ressuspensas em tampão Tris 50 mM pH = 7.4/ NaCl 500mM. O rompimento das células foi realizado por sonicação (30% amplitude) e os ácidos nucleicos foram removidos por meio de tratamento com sulfato de estreptomicina ([] final = 1%) por 20 minutos. Após este período, o extrato foi centrifugado por 45 min/4°C/12000 RPM, o precipitado descartado e os extratos proteicos livres de ácidos nucleicos coletados. Uma vez que as proteínas foram expressas em vetores que adicionam cauda de histidina (pET15b) a purificação foi feita por cromatografia de afinidade por metais (IMAC) em colunas HisTrap (GE Healthcare) em gradiente de imidazol (5mM e 300mM). A qualidade da purificação das proteínas foi constatada por SDS-PAGE em condições redutoras (*loading buffer*: 62.5 mM Tris-HCl pH = 6.8, 2.5% SDS, 0.002 % azul de bromofenol, 200mM β -mercaptoetanol, 10% glicerol). Após estes procedimentos, as proteínas foram dessalinizadas através de cromatografia de filtração em gel utilizando a coluna PD10 (GE Healthcare) e concentradas por centrifugação (4000 RPM/4°C) utilizando concentradores Ultracel YM-30 (Millipore).

4.7 Quantificação de proteínas

As proteínas purificadas foram quantificadas espectrofotometricamente, a 280 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar específico de cada uma obtido através da ferramenta ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>).

4.8 Tratamento das proteínas com os compostos

BsAhpC, EcAhpC, PaAhpC, StAhpC, SaAhpC, e SeAhpC, selvagens e mutantes, além das proteínas EcTrx1, EcTrxR e EcAhpF, na concentração de 100 μ M, foram reduzidas com 5mM de ditioneitol (DTT) por 30 minutos em temperatura ambiente. A seguir, as proteínas foram dessalinizadas em coluna PD10 (GE Healthcare), quantificadas e tratadas com 20 equivalentes molares dos compostos (iodoacetamida, Adn ou compostos 1-6) por uma hora, a temperatura ambiente. Finalmente, as proteínas tratadas foram novamente dessalinizadas para a retirada do excesso de ligante e quantificadas para a utilização nos ensaios posteriores.

4.9 Verificação da ligação dos compostos ao sítio ativo das AhpC por SDS-PAGE

Para a verificação da efetividade dos passos de redução com DTT e dessalinização durante o tratamento das AhpC com os compostos, alíquotas de 10µM das proteínas após essas etapas foram coletadas e alquiladas pela adição de *stop buffer* (Tris-HCl 50mM pH = 6.8, SDS 2%, azul de bromofenol 0.4%, glicerol 10%, NEM 50mM). A seguir, a ligação dos compostos as cisteínas das AhpC foi avaliada coletando-se alíquotas na concentração de 10µM de AhpC tratada com cada composto e oxidando-as com 50µM de H₂O₂ por 30 minutos em temperatura ambiente, sendo posteriormente alquiladas pela adição de *stop buffer*. As amostras foram submetidas à análise em SDS-PAGE não redutor corado por *comassie blue*.

4.10 Ensaio de oxidação de DTT

25 µM de EcAhpC, PaAhpC, StAhpC, SaAhpC, SeAhpC e BsAhpC, selvagens e mutantes, tratadas ou não tratadas com Adn foram adicionadas a reações contendo DTT 10mM, Hepes 50mM, Azida sódica 1mM e DTPA 0.1 mM. As reações foram iniciadas pela adição de 2mM de hidroperóxido de cumeno (CHP) e monitoradas a 310 nm em espectrofotômetro Cary 60 UV-Vis (Agilent), a 30°C, por 10 minutos (Tairum Jr. *et al.*, 2012). As velocidades de reação foram calculadas através do valor do coeficiente angular das retas com o auxílio do programa GraphPad Prism 4.

4.11 Análise da inibição dos compostos sobre a atividade de AhpC e sistema Trx

EcAhpC^{WT} ou EcAhpC^{T44S} tratadas com iodoacetamida (IAM), Adn ou com os compostos 1-6, em concentração final de 3µM, foram adicionadas a *mixes* contendo 6 µM de EcTrx1, 0,9 µM de EcTrxR, 150 µM de NADPH, em tampão 50 mM HEPES pH = 7.0, 1mM DTPA e 100 µM azida sódica, sendo então incubadas por 5 minutos a 37°C. As reações foram então iniciadas pela adição de 500 µM de H₂O₂ e monitoradas a 340nm em espectrofotômetro Cary 60 UV-Vis (Agilent), a 37°C, por 5 minutos. Para a análise da inibição dos compostos sobre a atividade de EcTrx1 e EcTrxR, essas proteínas tratadas com iodoacetamida (IAM), Adn ou com os compostos 1-6, foram adicionadas separadamente a reações utilizando as mesmas concentrações citadas anteriormente, sendo que a AhpC, nestes casos, não foi tratada com nenhum composto. Como controle negativo, foram utilizadas reações sem a adição da proteína analisada e,

como controle positivo, foram utilizadas reações em que nenhuma proteína recebeu tratamento com os compostos. As velocidades de reação foram calculadas através do valor do coeficiente angular das retas com o auxílio do programa GraphPad Prism 4.

4.12 Análise da inibição dos compostos sobre a atividade de AhpF

O efeito inibitório de IAM, Adn e compostos 1-6 sobre a atividade dissulfeto redutase de EcAhpF foi avaliada através de ensaio de redução de DTNB adaptado de Poole & Ellis, 1996. Para isso, EcAhpF na concentração final de 0.5µM e tratada com os compostos foi adicionada a reações contendo DTNB 500µM, DTPA 500µM, fosfato de sódio 100mM pH = 7.0. As reações foram iniciadas pela adição de NADH 300µM e a formação de TNB foi monitorada a 412nm em espectrofotômetro Cary 60 UV-Vis (Agilent) a 37°C por 5 minutos. Como controle positivo foram utilizadas reações em que EcAhpF não recebeu tratamento com nenhum composto e, como controle negativo, foram utilizadas reações sem a adição de EcAhpF.

4.13 Quantificação das Cys livres de EcTrxR e ScTrxR

EcTrxR e ScTrxR foram reduzidas e dessalinizadas, conforme descrito anteriormente, e adicionadas em uma concentração final de 20 µM a reações contendo 200 µM de DTNB e tampão denaturante (Tris 30mM pH = 7.0, guanidina 6M) ou não denaturante (Tris 30mM pH=7.0). As reações foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz, sendo posteriormente analisadas espectrofotometricamente a 412 nm. A quantificação do TNB formado nas reações foi realizada utilizando seu coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{412} = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.14 Avaliação do meio de cultura

Para avaliar qual seria o meio de cultura mais adequado para a determinação da concentração inibitória mínima de Adn, as bactérias *B. subtilis* (F41923/PY79), *E. coli* (ATCC25922), *P. aeruginosa* (ATCC29853), *S. typhimurium* LT2 (ATCC 19585), *S. aureus* (ATCC29213), *S. epidermidis* (ATCC12228) foram cultivadas em meio LB-água por 24 horas a 37°C. A seguir, uma colônia de cada bactéria foi inoculada nos meios de cultura Mueller Hinton, M9 (Alegria *et al.*, 2016), M9 suplementado com glicose (Dwyer *et al.*, 2014); M9 suplementado com aminoácidos e vitaminas (Washburn *et al.*, 2001) ou meio de cultura mínimo sintético (AAM) (Rudin *et al.*, 1957) e as culturas

foram incubadas a 37°C e 250RPM por 16 horas. Ao final do crescimento, as células foram quantificadas por espectrometria a 600nm.

4.15 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

B. subtilis (F41923/PY79), *E. coli* (ATCC25922), *P. aeruginosa* (ATCC29853), *S. typhimurium* LT2 (ATCC 19585), *S. aureus* (ATCC29213), *S. epidermidis* (ATCC12228) foram cultivadas em meio LB-ágar por 24 horas a 37°C. A seguir, colônias uniformes de cada uma das bactérias foram coletadas e diluídas em solução salina 0.9%. A concentração celular foi estimada através de espectrofotometria ($\lambda=600\text{nm}$) e ajustada para $\sim 10^6$ unidades formadora de colônia (UFC). Posteriormente, as células foram adicionadas ao meio de cultura Mueller Hinton contendo concentrações variáveis de Adn (500 μM , 250 μM , 125 μM , 62.5 μM , 31.2 μM e 15.6 μM) passando então a apresentar uma densidade celular de $\sim 10^5$ UFC, e as culturas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Como controle positivo foram utilizadas culturas sem a adição de nenhum composto e, como controle negativo, sem a adição de células. A concentração celular foi então estimada através de espectrofotometria ($\lambda=600\text{nm}$) (CLSI, 2015).

4.16 Permeabilização da membrana externa (ME) de *E. coli*

E. coli ATCC25922 foi cultivada em meio LB-ágar por 24 horas a 37°C. A seguir, colônias uniformes de cada uma das bactérias foram coletadas e diluídas em solução salina 0.9%. A concentração celular foi estimada através de espectrofotometria ($\lambda=600\text{nm}$) e ajustada para $\sim 10^6$ UFC. Posteriormente, as células foram adicionadas ao meio de cultura Mueller Hinton contendo concentrações crescentes de EDTA (0, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, .09 e 1 mM) ou PMBN (0, 0.15, 0.3, 0.6 ou 1.2 $\mu\text{g/ml}$) na presença ou ausência de Adn (0, 16.6, 31.2, 62.5, 125, 250 e 500 μM para EDTA e 200 μM para PMBN). Nesse estágio, as culturas passaram a apresentar uma concentração de células de 10^5 UFC, as quais foram incubadas por 24 horas, a 37°C, sendo então quantificadas espectrofotometricamente a 600nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seção de Resultados e Discussão será apresentada em quatro subseções com o objetivo de facilitar sua compreensão. A primeira subseção (5.1) discorrerá sobre os efeitos inibitórios de Adn sobre AhpC contendo Thr ou Ser na TC, bem como sobre seus sistemas redutores (Trx/TrxR e AhpF), a qual deu origem a uma solicitação de propriedade intelectual (Apêndice A) e a um manuscrito que investiga as interações moleculares entre enzimas contendo Thr ou Ser na TC (Apêndice B). A segunda subseção (5.3) aborda a triagem de compostos naturais oriundos da biota florística do estado de São Paulo na busca de novos inibidores de AhpC e de seus sistemas redutores, cujos resultados foram compilados em uma solicitação de patente (Apêndice C) e também serviu de base para a elaboração de uma revisão de peroxirredoxinas de microorganismos patogênicos (Apêndice D). A terceira subseção (5.3) reside em observações fundamentadas nas nossas descobertas e compõem um manuscrito abordando os aspectos relacionados a eventos de superoxidação em Prx 2-Cys típicas contendo Thr ou Ser na TC, assim como a diferença dessas proteínas na interação com ligantes (Apêndice E). Finalmente, a quarta e última subseção (5.4) se refere à caracterização de uma tiol proteína única de patógenos cujos resultados foram publicados em periódico de circulação internacional (Apêndice F).

5.1 Inibição de AhpC contendo Thr ou Ser na TC por Adn

5.1.1 Obtenção de AhpC selvagens e contendo a mutação Thr $\rightleftharpoons$ Ser

Uma vez que temos como ponto de partida que as Prx 2-Cys típicas de levedura que contém Thr (Tsa1) ou Ser (Tsa2) apresentaram diferenças na inibição por Adn e a substituição da Thr por Ser é rara em eucariotos mas mais frequente em bactérias, iniciamos este trabalho efetuando as clonagens gênicas de AhpCs (Prx 2-Cys típicas) de espécies bacterianas contendo Thr (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium*) ou Ser (*B. subtilis*, *S. aureus* e *S. epidermidis*) como parte da TC. Em seguida foram padronizadas as condições de expressão e purificação destas enzimas e, após padronização, foi possível obter todas as peroxidases com alto grau de pureza (>95%) e alto rendimento na expressão (14 - 25mg por litro de cultura de células) (Figura 5). Em seguida foram efetuadas as mutações sítio dirigidas para a obtenção de proteínas mutantes contendo substituições pontuais da Thr→Ser da TC de *E. coli* (EcAhpC^{T44S}), *P. aeruginosa* (PaAhpC^{T44S}) e *S. typhimurium* (StAhpC^{T44S}) e Ser→Thr de *B. subtilis* (BsAhpC^{S44T}),

S. aureus (SaAhpC^{S44T}) e *S. epidermidis* (SeAhpC^{S44T}). Após padronizadas as condições de expressão/purificação para cada proteína também foi possível obter as enzimas mutantes com alto grau de pureza (>95%) e rendimento satisfatório (10-18 mg/L de cultura) (Figura 5).

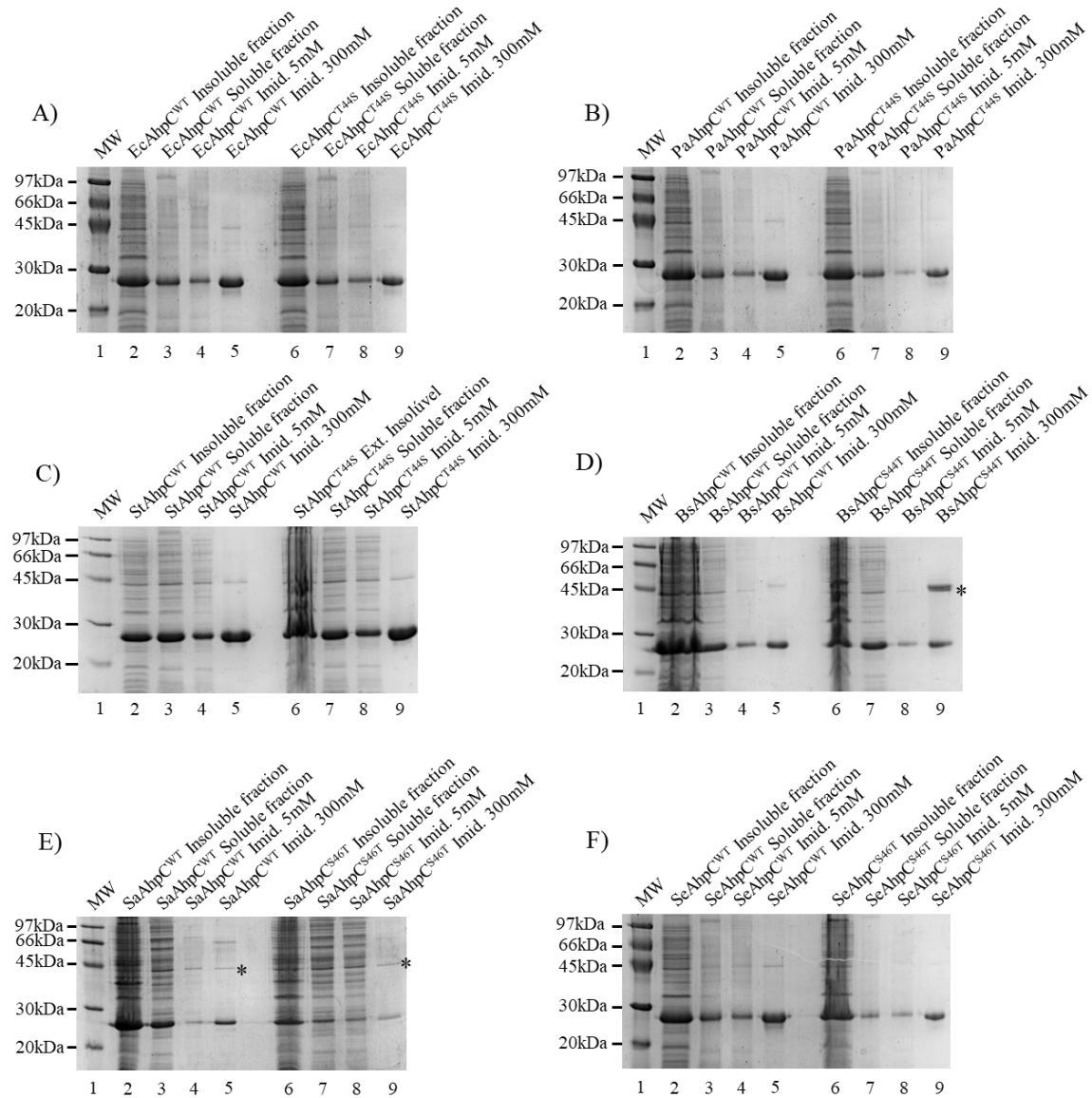


Figura 5: Resultados das purificações das AhpCs contendo Thr ou Ser como parte da TC. Em todas as figuras são apresentadas as purificações de AhpCs selvagens e mutantes por IMAC utilizando gradiente de imidazol. Em todas as figuras na lane 1 foi aplicado o marcador de massa molecular, nas lanes 2 e 6 as frações insolúveis, nas lanes 3 e 7 as frações solúveis, nas lanes 4 e 8 a frações eluídas com 5mM de imidazol, nas lanes 5 e 9 as frações eluídas com 300 mM de imidazol. **A)** AhpC selvagem de *E. coli* (*EcAhpC*^{WT}) (lanes 2-5) e mutante (*EcAhpC*^{T44S}) (lanes 6-9). **B)** AhpC selvagem de *P. aeruginosa* (*PaAhpC*^{WT}) (lanes 2-5) e mutante (*PaAhpC*^{T44S}) (lanes 6-9). **C)** AhpC selvagem de *S. typhimurium* (*SaAhpC*^{WT}) (lanes 2-5) e mutante (*StAhpC*^{T44S}) (lanes 6-9). **D)** AhpC de *B. subtilis* (*BsAhpC*^{WT}) (lanes 2-5) e mutante (*BsAhpC*^{S44T}), **E)** AhpC de *S. aureus* (*SaAhpC*^{WT}) (lanes 2-5) e mutante (*SaAhpC*^{S46T}) (lanes 6-9) e **F)** AhpC de *S. epidermidis* (*SeAhpC*^{WT}) (lanes 2-5) e mutante (*SeAhpC*^{S46T}) (lanes 6-9). Os asteriscos (*) denotam bandas referentes a dímeros das enzimas.

5.1.2 Avaliação da inibição de AhpC por Adn através de ensaio de oxidação de DTT

A metodologia para avaliação da atividade peroxidásica de AhpC testada que se mostrou inicialmente mais adequada foi a de oxidação do DTT (Tairum *et al.*, 2012). Nesse ensaio, após a redução do hidroperóxido, o dissulfeto formado entre as cisteínas de AhpC é reduzido pelo DTT que, por sua vez, assume a sua forma oxidada cíclica que pode ser monitorada espectrofotometricamente a 310 nm. Para este ensaio, foi utilizado o hidroperóxido de cumeno (CHP) em razão de sua menor redução pelo DTT e, consequentemente, menor formação de artefatos metodológicos.

Dessa forma, avaliamos a atividade inibitória de Adn sobre enzimas AhpC selvagens de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium*, as quais contêm uma Thr como parte da TC e também mutantes carreando a substituição de Thr→Ser (Figura 6). Os resultados revelaram que Adn é capaz de inibir tanto as proteínas selvagens quanto as proteínas mutantes, no entanto a inibição de proteínas contendo a substituição Thr → Ser (Figura 6) foi sutilmente maior. Curiosamente para EcAhpC e PaAhpC as mutações levaram, aparentemente, a uma maior velocidade da reação (Figuras 6A e 6D; Figuras 6B e 6E).

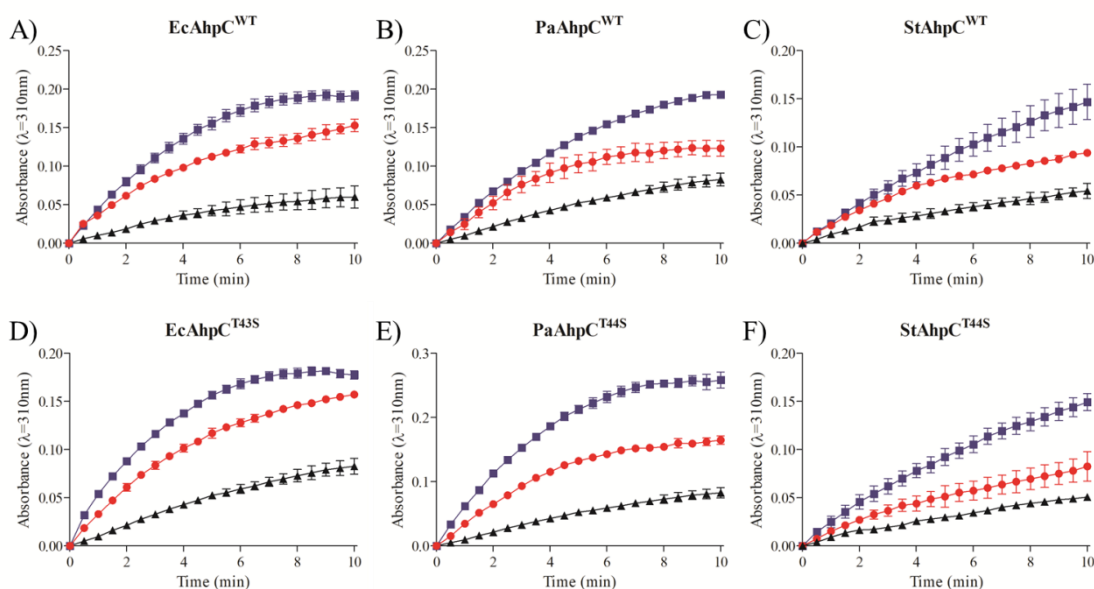


Figura 6: Avaliação da inibição da atividade de AhpC contendo Thr na TC e mutantes Thr→Ser através do ensaio de oxidação de DTT. Para os ensaios foi utilizado 25 μ M de EcAhpC^{WT} (A), PaAhpC^{WT} (B), StAhpC^{WT} (C), EcAhpC^{T44S} (D), PaAhpC^{T44S} (E) e StAhpC^{T44S} (F), tratadas (●) e não tratadas (■) com Adn. As proteínas foram incubadas com DTT (10 mM) em tampão (HEPES 50 mM, pH=7.0), azida sódica (1 mM) e DTPA (0.1 mM) e as reações foram iniciadas pela adição de CHP (2 mM) e monitoradas espectrofotometricamente a 310 nm a 30°C por 10 minutos. Como controle negativo, foram utilizadas reações sem a adição das proteínas (▲).

Também avaliamos a inibição por Adn sobre AhpCs contendo naturalmente Ser na TC bem como os mutantes contendo a substituição Ser→Thr das bactérias *B. subtilis*, *S. aureus* e *S. epidermidis*. De forma geral tanto as proteínas selvagens quanto as contendo a substituição Ser→Thr apresentaram decréscimo na atividade peroxidásica em razão do tratamento com Adn (Figura 7). Entretanto, para as AhpCs de *B. subtilis* e *S. epidermidis* selvagens, que possuem Ser na TC, foi possível detectar uma diminuição da velocidade de reação mais acentuada do que para os mutantes contendo a substituição Ser→Thr (Figuras 7A e 7D; Figuras 7B e 7E).

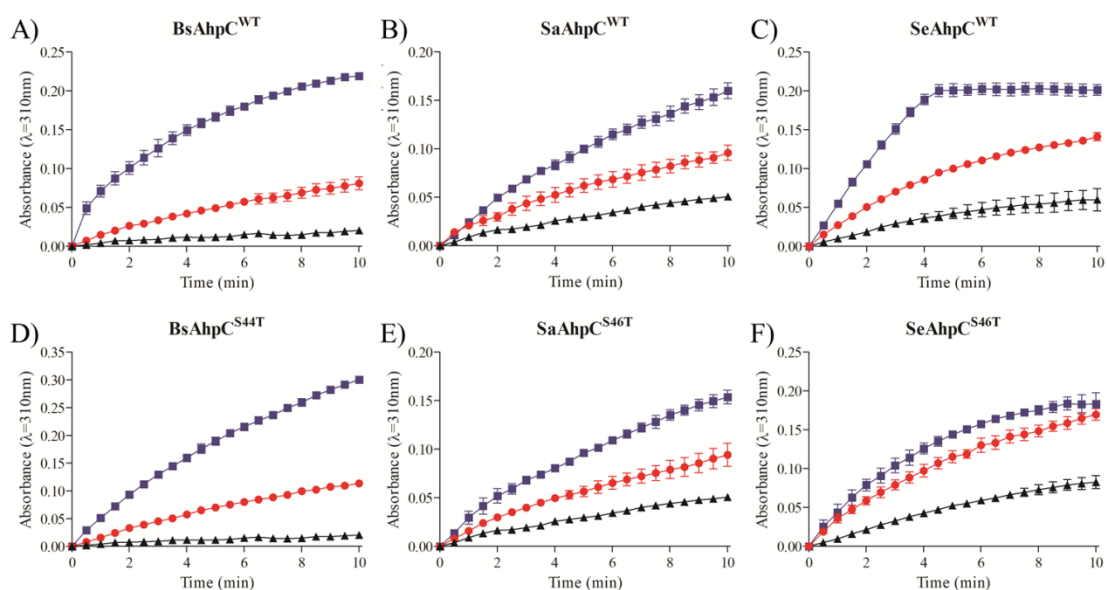


Figura 7: Avaliação da inibição da atividade de AhpC contendo Ser na TC e mutantes Ser→Thr através do ensaio de oxidação de DTT. Para os ensaios 25 μM de BsAhpC^{WT} (A), SaAhpC^{WT} (B), SeAhpC^{WT} (C), BsAhpC^{S46T} (D), SaAhpC^{S46T} (E) e SeAhpC^{S46T} (F), tratadas (●) e não tratadas (■) com Adn (20 eq.), foram incubadas com DTT (10mM) em tampão HEPES (50mM, pH=7.0), azida 1mM e DTPA (0.1) mM. As reações foram iniciadas pela adição de CHP (2mM) e monitoradas espectrofotometricamente em 310 nm/30°C/10 minutos. Como controle negativo, foram utilizadas reações sem a adição das proteínas (▲).

Para se averiguar possíveis diferenças na inibição de enzimas contendo Thr ou Ser na TC foram determinadas as velocidades iniciais (v_0) das reações com AhpC tratadas ou não com Adn (Tabela 3). As enzimas selvagens de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium*, as quais contêm naturalmente Thr como parte de TC, tiveram os menores decréscimos de v_0 (16 -37%) em razão do tratamento com Adn, enquanto que as AhpCs^{WT} de *B. subtilis*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, que possuem Ser, tiveram decréscimos de v_0 substancialmente maiores (61-84%) indicando que Adn é capaz de inibir mais eficientemente enzimas que contem Ser como parte da TC.

Em acordo com os dados obtidos para as proteínas selvagens, a substituição de Thr por Ser resultou em um decréscimo mais acentuado de v_0 das enzimas de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium* (47 -58%) e de maneira inversa aumentou a refratividade à inibição por Adn quando enzimas de *B. subtilis*, *S. aureus* e *S. epidermidis* que possuíam naturalmente Ser tiveram o resíduo mutado por Thr (24 -74%). De forma geral, estes resultados revelam que Adn é capaz de inibir AhpCs, o que torna Adn o primeiro inibidor descrito para Prx 2-Cys bacterianas. Os resultados também sugerem que as substituições naturais Thr $\rightleftharpoons$ Ser podem estar envolvidas em uma menor (Thr) ou maior (Ser) suscetibilidade da inibição por Adn.

Também foi possível constatar que as substituições de Thr por Ser nas enzimas EcAhpC e PaAhpC, elevou significativamente a v_0 das reações ($v_{0EcAhpCWT}=10.53 \pm 0.75 \mu\text{Ms}^{-1}$ / $v_{0EcAhpCT44S}=16.29 \pm 0.23 \mu\text{Ms}^{-1}$ e $v_{0PaAhpCWT}=9.36 \pm 0.13 \mu\text{Ms}^{-1}$ / $v_{0PaAhpCT43S}=18.08 \pm 0.11 \mu\text{Ms}^{-1}$), enquanto para a enzima StAhpC o aumento foi bastante discreto e dentro da margem de erro ($v_{0StAhpCWT}=8.03 \pm 0.83 \mu\text{Ms}^{-1}$ / $v_{0StAhpCT44S}= 8.63 \pm 1.23 \mu\text{Ms}^{-1}$). De maneira inversa para as enzimas SeAhpC e BsAhpC, que contêm naturalmente a Ser como parte de TC, foi observado um decréscimo da velocidade inicial quando este resíduo foi substituído por uma Thr ($v_{0SeAhpCWT}=15.88 \pm 0.78 \mu\text{Ms}^{-1}$ / $v_{0SeAhpCS46T}=11.05 \pm 1.37 \mu\text{Ms}^{-1}$ e $v_{0BsAhpCWT}=19.49 \pm 1.40 \mu\text{Ms}^{-1}$ / $v_{0BsAhpCT44S}=15.80 \pm 0.06 \mu\text{Ms}^{-1}$), enquanto que para a enzima SaAhpC não houve alteração significativa ($v_{0SaAhpCWT}=12.04 \pm 0.73 \mu\text{Ms}^{-1}$ / $v_{0StAhpCT46S}= 12.86 \pm 1.52 \mu\text{Ms}^{-1}$). Em conjunto, os resultados indicam que fatores adicionais às substituições da Thr/Ser da TC estão envolvidos em uma maior ou menor atividade de decomposição de hidroperóxidos, o que pode estar relacionado com diferenças na suscetibilidade a superoxidação, levando a implicações funcionais como atividade de chaperona ou eventos de transdução de sinal, ou mesmo maior afinidade por diferentes substratos (Lee *et al.*, 2016; Rhee, 2016). De fato, estes resultados, nos motivaram a investigações que serão apresentadas na seção 5.3, que avaliaram a suscetibilidade a superoxidação de Prx 2-Cys típicas contendo Thr ou Ser na TC.

Tabela 3: Velocidade inicial (v_0) de enzimas AhpCs contendo Thr ou Ser como parte da TC de diferentes espécies de bactérias tratadas (Adn+) ou não (Adn-) com o inibidor Adn. As enzimas selvagens analisadas são de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*, *S. aureus* e *S. epidermidis* e as enzimas mutantes contêm substituições recíprocas Thr $\rightleftharpoons$ Ser. As fontes em preto denotam enzimas com Thr como parte da TC e as em vermelho aquelas que possuem Ser.

Enzyme	v_0 ($\mu\text{M min}^{-1} \mu\text{M}_{\text{Enzyme}}^{-1}$)		
	Adn -	Adn +	Decrease ($\approx$)
EcAhpC ^{WT}	10.53 (± 0.75)	6.69 (± 0.13)	37%
EcAhpC ^{T44S}	16.29 (± 0.23)	7.16 (± 0.73)	58%
PaAhpC ^{WT}	9.36 (± 0.13)	6.52 (± 1.67)	30%
PaAhpC ^{T44S}	18.18 (± 0.11)	10.00 (± 0.68)	47%
StAhpC ^{WT}	8.03 (± 0.83)	6.77 (± 0.61)	16%
StAhpC ^{T44S}	8.63 (± 1.23)	3.83 (± 0.69)	56%
BsAhpC ^{WT}	19.49 (± 1.40)	3.21 (± 0.09)	84%
BsAhpC ^{S44T}	15.80 (± 0.06)	4.17 (± 0.06)	74%
SaAhpC ^{WT}	12.04 (± 0.73)	4.84 (± 1.62)	61%
SaAhpC ^{S46T}	12.86 (± 1.52)	4.83 (± 0.54)	63%
SeAhpC ^{WT}	15.88 (± 0.78)	5.14 (± 0.14)	68%
SeAhpC ^{S46T}	11.05 (± 1.37)	8.49 (± 1.18)	24%

5.1.3 Avaliação de inibição de AhpC por Adn pelo ensaio acoplado de oxidação de NADPH

Embora o ensaio de oxidação do DTT apresentado no tópico anterior seja bastante informativo, pois se baseia na redução das AhpCs por um agente químico (DTT) e consiste em um método de análise relativamente rápido para avaliação de inibidores, um artefato intrínseco da metodologia reside no fato que o DTT é capaz de reduzir não só as Prx, mas também o próprio hidroperóxido. Apesar deste artefato ser bastante minimizado com a utilização de um hidroperóxido orgânico (CHP) (Tairum *et al.*, 2012) ainda representa uma barreira para obtenção de dados com parâmetros cinéticos mais confiáveis pois as variações de absorbância são bastante sutis (Figuras 6 e 7).

Visando averiguar a inibição por Adn por um método com menor artefato metodológico, utilizamos também o ensaio acoplado de oxidação do NADPH. Apesar deste ensaio ser mais trabalhoso, pois envolve a expressão de três enzimas distintas (AhpC, Trx e TrxR), ele é mais confiável pois a variação de absorbância é significativamente maior que a do ensaio de oxidação do DTT e não ocorre consumo de reagentes do sistema (NADPH ou hidroperóxido) por enzimas do sistema redutor ou componentes do ensaio (e.g. DTT). Para efetuarmos este ensaio clonamos e

padronizamos a expressão e purificação de Trx e TrxR de *E. coli* (Figura 8C) e, em seguida, reconstituímos o sistema redutor *in vitro* e avaliamos a atividade peroxidásica de EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S} previamente tratadas com Adn (20 equivalentes molares) (Figuras 8A e 8B).

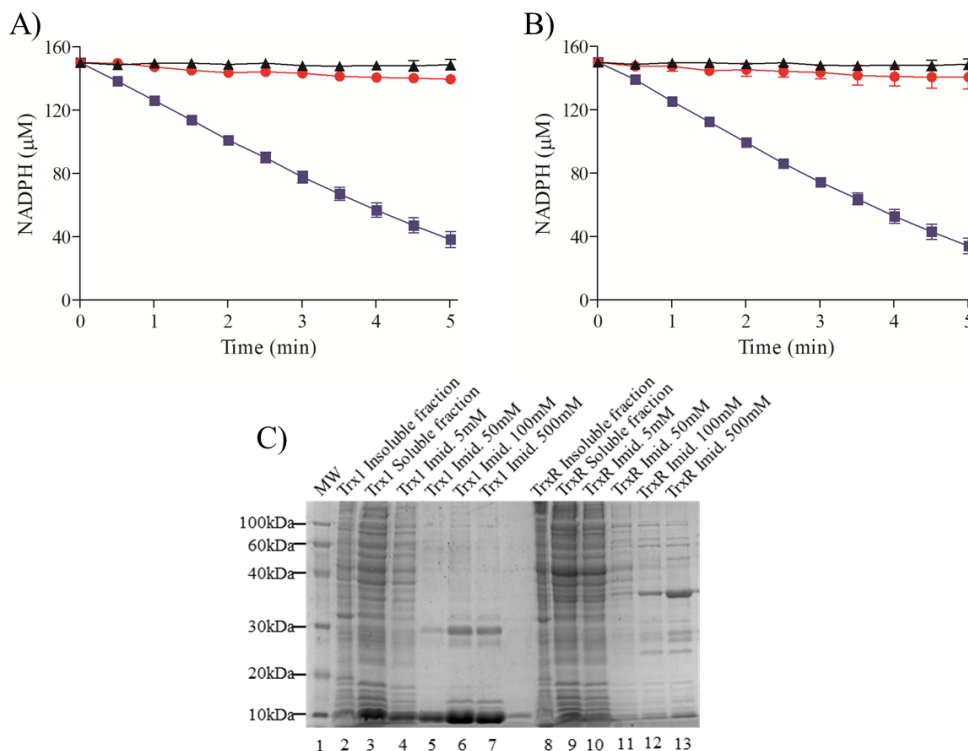


Figura 8: Ensaio acoplado de oxidação de NADPH e resultado de expressão e purificação de EcTrx1 e EcTrxR. Avaliação de inibição da atividade peroxidásica de EcAhpC por Adn: EcAhpC^{WT} (A) ou EcAhpC^{T44S} (B) reduzidas e dessalinizadas foram tratadas com 20 equivalentes molares de Adn (●) por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida as proteínas foram novamente dessalinizadas para a remoção do excesso de composto e sua atividade peroxidásica foi analisada através de ensaio de oxidação de NADPH. Para isso, 3μM das proteínas tratadas foram adicionadas a reações contendo EcTrx (6 μM), EcTrxR (0.9μM), NADPH (150 μM), HEPES (50 mM, pH=7.0), DTPA (100 μM) e azida sódica (1 mM). As reações foram incubadas a 37°C por 3 minutos antes de serem iniciadas pela adição de H₂O₂ (500 μM) e monitoradas espectrofotometricamente a 340 nm, 37°C, por 5 minutos. Como controle positivo de atividade peroxidásica foram utilizadas reações em que EcAhpC^{WT} não foi previamente tratada com Adn (■) e, como controle negativo, foram utilizadas reações sem EcAhpC^{WT} (▲). (C) SDS PAGE corado por comassie blue contendo o resultado de purificação por IMAC de EcTrx1 e EcTrxR Lane1 – Marcador de peso molecular ProteinRuler II (TransGen); Lanes 2 e 8 – Extrato insolúvel de Trx1 e TrxR; Lanes 3 e 9 – extrato solúvel de Trx1 e TrxR; Lanes 4 a 7 e 10 a 13 – Alíquotas referentes à eluição de EcTrx1 e EcTrxR, respectivamente, com 5mM, 50mM, 100mM e 500mM de imidazol.

Como pode ser observado nas figuras 8A e 8B, nas condições experimentais testadas, a Adn foi capaz de inibir eficientemente EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S}. A determinação da velocidade inicial revela que tanto para EcAhpC^{WT} ($v_{0\text{EcAhpCWT}} = 7.94 \pm 0.87 \mu\text{Ms}^{-1}$ e $v_{0_Adn\text{EcAhpCWT}} = 0.88 \pm 0.12 \mu\text{Ms}^{-1}$) quanto para EcAhpC^{T44S} ($v_{0\text{EcAhpCT44S}} = 8.20 \pm 0.16 \mu\text{Ms}^{-1}$ e $v_{0_Adn\text{EcAhpCT44S}} = 1.81 \pm 0.65 \mu\text{Ms}^{-1}$) houve forte

inibição sendo que o v_0 teve decréscimo proporcionalmente maior para EcAhpC^{WT} que EcAhpC^{T44S} (~90 e 80%). Estes resultados contrastam com os obtidos por DTT, onde uma inibição maior foi observada para as enzimas contendo Ser na TC (Figuras 6 e 7 e Tabela 3). Entretanto, é importante ressaltar que, para ambos os ensaios, foi seguido o protocolo descrito por Liu e colaboradores para Prxs humanas, que utiliza quantidades elevadas de Adn (20 equivalentes molares), o que pode representar um excesso demasiado de composto em relação à enzima bacteriana. Neste contexto, optamos por determinar o IC₅₀ aparente para EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S}, que serão utilizadas como modelos para as AhpC deste ponto em diante.

5.1.4 Determinação do IC₅₀ aparente pelo ensaio acoplado de oxidação de NADPH

Para determinar o IC₅₀ para EcAhpC e EcAhpC^{T44S}, as enzimas reduzidas e dessalinizadas foram tratadas com quantidades crescentes de Adn, representando diferentes razões estequiométricas (0.5, 1, 2.5, 5 e 10 equivalentes molares). A seguir, as proteínas tratadas foram analisadas através de ensaio de oxidação do NADPH e ensaio de oxidação em SDS-PAGE (Figura 9).

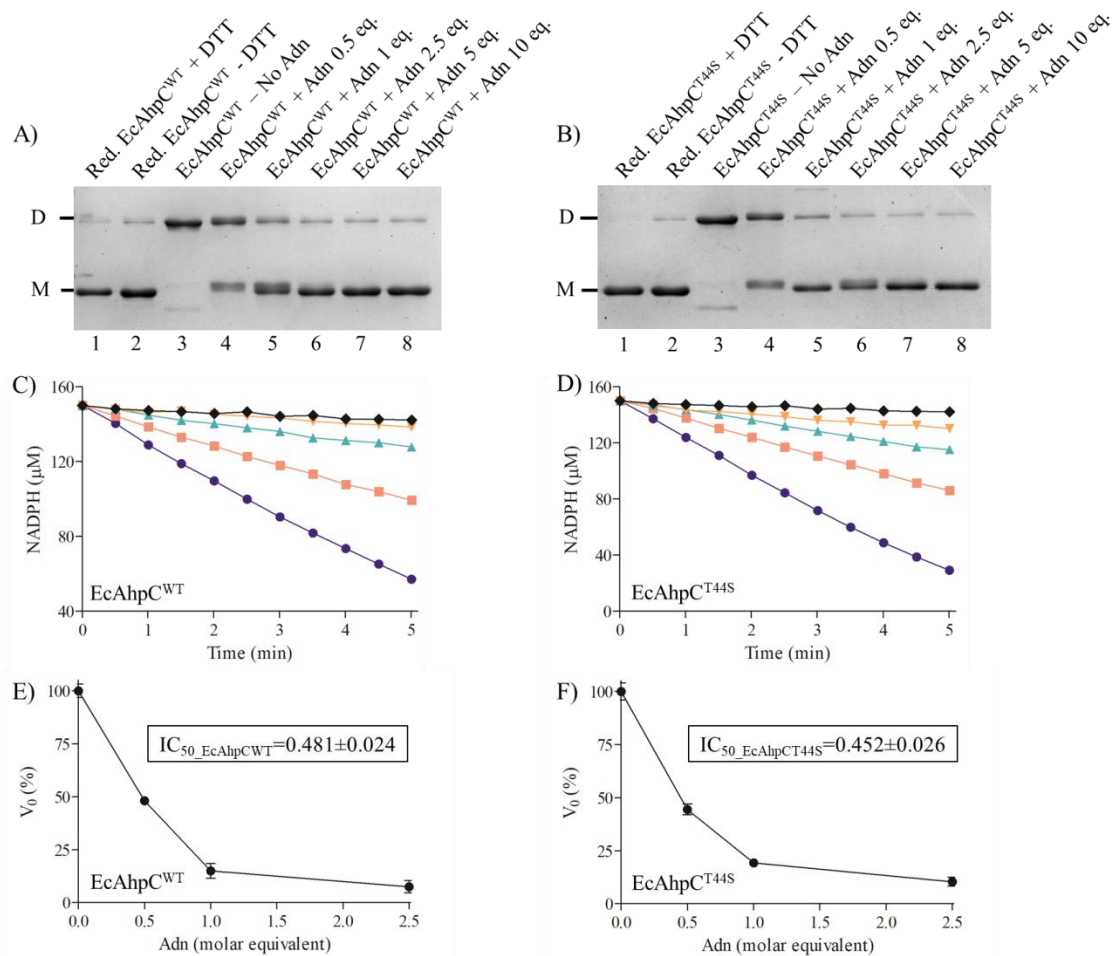


Figura 9: Inibição da formação de dissulfeto intermolecular e atividade peroxidásica de EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S} por Adn. As proteínas EcAhpC^{WT} (A) e EcAhpC^{T44S} (B) foram reduzidas com 5mM de DTT por 1 hora (lane 1) e, em seguida, dessalinizadas para a remoção do excesso de redutor (lane 2). Alíquotas contendo 10μM das enzimas reduzidas e dessalinizadas foram tratadas com concentrações variadas de Adn (0.5, 1, 2.5, 5 e 10 equivalentes molares - lanes 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente) por 1 hora e posteriormente oxidadas com 5 equivalentes molares de H₂O₂ por 30 minutos. As reações foram paralisadas com a adição de *stop buffer* (Tris 50mM pH6.8, NEM 50mM, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.1%) e analisadas em SDS-PAGE não redutor corado com *comassie blue*. A lane 3 representa a proteína reduzida/dessalinizada e posteriormente oxidada, sem tratamento com Adn. Os procedimentos foram realizados em temperatura ambiente. Inibição da atividade peroxidásica de EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S} por Adn. EcAhpC^{WT} (C) e EcAhpC^{T44S} (D) reduzidas e dessalinizadas foram tratadas com concentrações variáveis de Adn (0.5 - ■, 1 - ▲ e 2.5 - ▼ equivalentes molares) por 1 hora em temperatura ambiente e posteriormente dessalinizadas novamente. A seguir, 3μM das proteínas tratadas foram adicionadas a reações contendo EcTrx1 6μM, EcTrxR 0.9μM, NADPH 150μM, HEPES 50mM pH 7.0, DTPA 100μM e azida sódica 1mM. As reações foram incubadas a 37°C por 3 minutos antes de serem iniciadas pela adição de H₂O₂ 500μM e monitoradas espectrofotometricamente a 340nm, 37°C, por 5 minutos. Como controle positivo foram utilizadas reações em que as proteínas não foram previamente tratadas com Adn (●) e, como controle negativo, foram utilizadas reações sem a adição de AhpC (◆). As velocidades iniciais de cada reação foram calculadas, transformadas em valores de porcentagem e plotadas para o cálculo dos valores de IC₅₀ de Adn para EcAhpC^{WT} (E) e EcAhpC^{T44S} (F).

Uma vez que a ligação de Adn às cisteínas envolvidas no ciclo catalítico das Prx impede a formação do dissulfeto intermolecular, este aspecto pode ser observado através de SDS-PAGE não redutor. Dessa forma, a porção de proteína que não estiver

ligada à Adn apresenta sua forma oligomérica usual, caracterizada por dímeros unidos por dissulfeto (~44 kDa), enquanto que a porção de proteína ligada a Adn será visualizada no gel como monômeros (~22kDa) devido à sua incapacidade de formar dissulfetos. Para isso, foi separada uma alíquota de proteína após o tratamento com cada concentração de Adn, seguido por dessalinização, e adicionado 5 equivalentes molares (em relação à concentração da proteína) de H_2O_2 , sendo a reação incubada por 30 minutos a temperatura ambiente e posteriormente analisada por SDS-PAGE não redutor. Os resultados revelam que quanto maior a dose de Adn aplicada maior foi a inibição da formação de dissulfetos intermoleculares (Figuras 9A e 9B). Este método também permite avaliar o estado redox prévio ao tratamento com Adn, uma vez que as proteínas em dissulfeto impediriam a ligação de Adn.

Em seguida foram efetuados ensaios de oxidação de NADPH com enzimas tratadas com as concentrações de Adn utilizadas no ensaio em SDS-PAGE (Figuras 9C e 9D). Os resultados revelaram que mesmo doses estequiométricas de Adn (0.5 eq.) foram capazes de inibir fortemente a atividade das enzimas resultando em um IC_{50} aparente de $0.481 \pm 0.024 \mu M$ para $EcAhpC^{WT}$ e $0.452 \pm 0.026 \mu M$ para $EcAhpC^{T44S}$ (Figuras 9E e 9F), cerca de $50 \times$ menor do que o determinado para Prx2 humana e $5 \times$ menor que o determinado para Prx1 utilizando um método semelhante (Liu *et al.*, 2012). Entretanto, a metodologia de Liu e colaboradores para a obtenção do IC_{50} de Adn para Prx1 e Prx2 humanas não descreve a remoção do excesso de Adn da amostra após o tratamento com o composto. Visto que neste trabalho os autores utilizaram excessos de 2.3 a 23 equivalentes molares para atingir a inibição de metade da atividade peroxidásica, as moléculas de Adn que não se ligaram à Prx poderiam se ligar às proteínas do sistema Trx, como posteriormente foi demonstrado ser possível (Soethoudt *et al.*, 2014; Muchowicz *et al.*, 2014). Foi demonstrado ainda que TrxR humana é fortemente inibida por Adn (Soethoudt *et al.*, 2014) e, dessa forma, o IC_{50} de Adn para as Prx humanas determinado por Liu e colaboradores pode estar superestimado. De fato, esse fenômeno foi observado em Tsa1 e sistema Trx de *S. cerevisiae* durante o meu mestrado, em que foi demonstrado que a utilização de Tsa1 tratada com Adn e não dessalinizada apresentava menor atividade peroxidásica do que a proteína dessalinizada após o tratamento (Figura 10 - ◆ e ■, respectivamente), indicando possível interação do excesso de composto com o sistema redutor. No presente trabalho, tivemos o cuidado de dessalinizar todas as amostras após o tratamento com Adn e demais compostos para a

remoção do excesso de ligante, impedindo que houvesse interferência deste sobre as demais proteínas do sistema. Adicionalmente, ainda é possível observar na figura 10 que, mesmo utilizando 30 equivalentes molares de Adn no tratamento de Tsa1, a inibição promovida por esse composto é significativamente menor do que a inibição de EcAhpC após o tratamento com apenas 2.5 equivalentes molares (Figura 9). Neste contexto, os dados obtidos inicialmente indicam uma inibição por Adn bastante significativa tanto de EcAhpC^{WT} quanto de EcAhpC^{T44S} em comparação com proteínas de eucariotos.

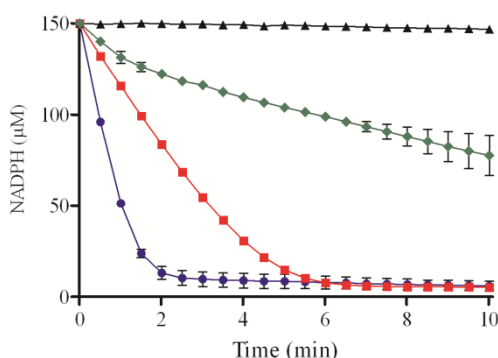


Figura 10: Ensaio de inibição do sistema redutor de Tsa1 por Adn. A inibição da atividade peroxidásica de Tsa1 por adenantina foi analisada através de ensaio de oxidação de NADPH no qual a proteína foi reduzida com 20mM de DTT por 30 minutos, dessalinizada em coluna PD-10 (GE Healthcare) para a retirada do excesso de redutor e tratada com 30 equivalentes molares de Adn por 1 hora em temperatura ambiente. A seguir, 1μM de Tsa1^{WT} tratada, com e sem excesso de Adn (◆ e ■, respectivamente), foi adicionada a 2μM de Trx1, 0.3μM de TrxR1 e 150μM de NADPH, e as reações foram então iniciadas pela adição de 150μM de H₂O₂ e monitoradas espectrofotometricamente a 340nm. Como controle, foram utilizadas reações em que Tsa1 não foi tratada com Adn (●) e sem a adição de Tsa1 (▲).

5.1.5 Avaliação de inibição de Adn sobre proteínas do sistema redutor de EcAhpC (EcTrx1, EcTrxR e EcAhpF)

Além de verificar a possibilidade de inibição de AhpCs, este trabalho também se propôs a avaliar se ocorre a inibição de enzimas do seu sistema redutor e, nesse sentido, nosso próximo passo foi avaliar se Adn é capaz de inibir as enzimas EcTrx1, EcTrxR e EcAhpF. Para tanto, as enzimas reduzidas foram tratadas com Adn, o excesso removido por gel filtração e a atividade de EcTrx1 e EcTrxR foi avaliada pelo ensaio acoplado de NADPH (Figuras 11A e 11B). No caso de EcAhpF, após a clonagem e padronização de expressão e purificação (Figura 11D), a enzima reduzida foi tratada com Adn e sua atividade foi avaliada pelo ensaio de redução de DTNB (Figura 11C).

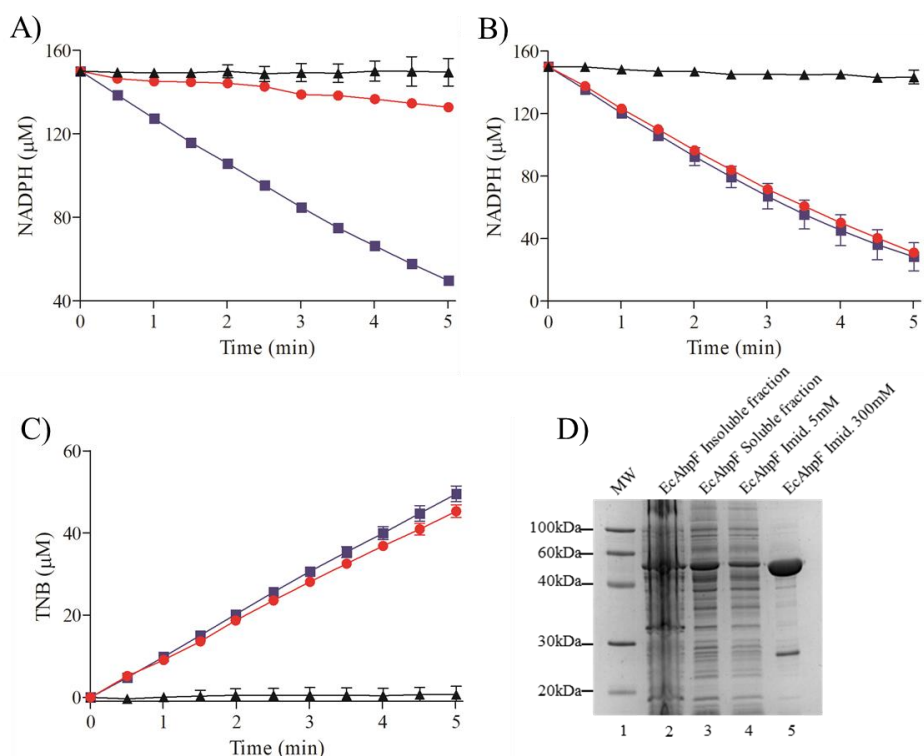


Figura 11: Avaliação de inibição de sistemas redutores de AhpC por Adn. Ensaios de inibição de EcTrx1 (A), EcTrxR (B) e EcAhpF (C). Para a realização dos ensaios as enzimas previamente reduzidas com DTT e dessalinizadas foram tratadas com 20 equivalentes molares de Adn (●) por uma hora em temperatura ambiente. A seguir, as proteínas foram novamente dessalinizadas para a remoção do excesso de composto e sua atividade peroxidásica foi analisada através de ensaio de oxidação de NADPH (EcTrx1 e EcTrxR) ou redução de DTNB (EcAhpF). Para os ensaios de oxidação de NADPH, foram utilizadas reações contendo 3μM de EcAhpC^{WT}, EcTrx 6μM, EcTrxR 0.9μM, NADPH 150μM, HEPES 50mM pH = 7.0, DTPA 100μM e azida sódica 1mM. As reações foram incubadas a 37°C por 3 minutos antes de serem iniciadas pela adição de H₂O₂ 500μM e monitoradas espectrofotometricamente a 340nm, 37°C, por 5 minutos. Para o ensaio de redução de DTNB foram utilizadas reações contendo EcAhpF 0.5 μM, DTNB 500 μM, DTPA 500 μM e fosfato de sódio 100 mM pH=7.0. As reações foram incubadas por 3 minutos antes de serem iniciadas pela adição de NADPH 300 μM. O monitoramento da formação de TNB foi realizado espectrofotometricamente a 412 nm, 37°C, por 5 minutos. Para todos os ensaios, foram utilizadas reações em que a proteínas em questão não foi previamente tratadas com adenantina (■) e, como controle negativo, foram utilizadas reações em que não foi adicionada EcAhpC^{WT} (▲). D) Expressão e purificação de EcAhpF. Na lane 1 foi aplicado o marcador molecular Protein Ruler II (TransGen); nas lanes 3-5 as alíquotas da eluição de AhpF em 5, 50, 100 e 500 mM de imidazol.

Assim como observado para as Trx de humanos e levedura, a Adn também foi capaz de inibir a atividade da enzima EcTrx1 ($v_{0\text{EcTrx1}} = 7.55 \pm 0.09 \mu\text{Ms}^{-1}$ e $v_{0_Adn\text{EcTrx1}} = 1.63 \pm 0.15 \mu\text{Ms}^{-1}$) (Figura 11A). Entretanto, assim como para EcAhpC, a inibição de Adn sobre a enzima bacteriana foi bastante superior quando comparada às enzimas de eucariotos. Muchowicz e colaboradores (2014) determinaram um IC_{50} para Trx humana de $10.9 \pm 1.6 \mu\text{M}$ utilizando reações contendo 0.25 μM da enzima, o que resulta em um excesso de ~43 equivalentes molares de Adn no tratamento de Trx. Adicionalmente, durante meu mestrado, testei a inibição de Adn sobre Trx de *S.*

cerevisiae e pude observar que 30 equivalentes molares desse composto foram capazes de inibir parcialmente a atividade peroxidásica de ScTrx1 (Figura 12). Por outro lado, o presente trabalho demonstra que 20 equivalentes molares de Adn são capazes de inibir a atividade de EcTrx1 quase que totalmente (Figura 11A). Em conjunto, esses dados indicam que EcTrx1 apresenta maior afinidade por Adn do que Trx de eucariotos e, potencialmente, apresentaria maior toxicidade para organismos procariotos.

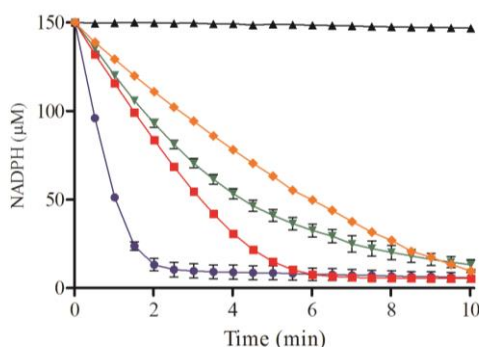


Figura 12: Ensaio de oxidação de NADPH com o sistema Trx de *S. cerevisiae* pré-tratado com Adn. ScTrx1 e ScTrxR1 reduzidas foram tratadas com 30 equivalentes molares de adenantina por uma hora, em temperatura ambiente, e posteriormente dessalinizadas para a retirada do excesso do ligante. A seguir, 2µM de ScTrx1 pré-tratada com Adn foi incubada com 1 µM de Tsa1, 0.3µM de ScTrxR1 (não tratada) e 150µM de NADPH (▼) e 0.3µM de ScTrxR1 pré-tratada com Adn foi incubada com 1 µM de Tsa1, 2µM de ScTrx1 (não-tratada) e 150µM de NADPH (◆). As reações foram iniciadas pela adição de 200µM de H₂O₂ e a oxidação do NADPH foi monitorada espectrofotometricamente a 340nm, a 30°C. Como controle positivo foram utilizadas reações em que nenhuma proteína foi tratada com Adn (●) e, como controle negativo, reações sem a adição de ScTrx1 ou ScTrxR1 (▲). Como comparativo, foi utilizada reação em que apenas Tsa1 foi tratada com Adn (■).

Entretanto, diferentemente para o observado para as TrxR de leveduras e humanos, EcTrxR não foi inibida pelo tratamento com Adn (Figura 11B). Cabe ressaltar que a enzima TrxR de humanos é uma selenoproteína em que a selenocisteína catalítica se localiza em um prolongamento C-terminal da enzima e é exposta ao solvente e acessível a Adn. Também não detectamos a inibição de EcAhpF por Adn (Figura 11C), o que também pode estar relacionada com a acessibilidade das Cys reativas. Para verificar esta possibilidade avaliamos a estrutura dessas enzimas. AhpC possui um sítio ativo bastante largo e o S_γ de Cys_P fica parcialmente acessível (Figura 13A) o que é condizente com os resultados obtidos que indicam inibição de AhpC por meio da ligação às cisteínas. Da mesma forma, a cisteína reativa de EcTrx1 se encontra na superfície da molécula quando ela se encontra no estado reduzido (Figura 13B), ou seja, apta para reduzir o dissulfeto de AhpC e, portanto, acessível à Adn. Por sua vez, a enzima EcTrxR apresenta um nível maior de complexidade. Esta enzima possui dois

domínios estruturais globulares (domínio de FAD e domínio de NADPH) que se alternam em dois estados estruturais denominados FO (oxidada) e FR (reduzida) em razão de uma torção de um domínio em relação ao outro (Oliveira *et al.*, 2010). Cabe ressaltar que nas TrxR de mamíferos, a estrutura é bastante distinta e não ocorrem alterações moleculares estruturais significativas como nas proteínas de bactérias e leveduras. Em meio líquido, TrxR de leveduras e bactérias se apresentam em equilíbrio dinâmico entre as formas FO e FR. No entanto, quando são cristalizadas, sempre se obtém o estado FO, no qual as cisteínas estão enterradas na estrutura. Entretanto, quando EcTrxR é mutada (substituição da cisteína reativa por Ser - Cys¹³⁵ → Ser) e cristalizada com a Trx também mutada (substituição da cisteína de resolução por Ser - Cys³⁵ → Ser) se obtém um complexo Trx-TrxR em que a conformação de TrxR se encontra no seu estado reduzido (FR) (Lennon *et al.*, 2000). Neste contexto, para as análises de acessibilidade utilizamos o complexo de Trx-TrxR de *E. coli* descrito por Lennon e colegas (pdb: 1F6M). Para tanto foram retiradas as cadeias de EcTrx, deixando somente as cadeias de EcTrxR. Foi possível constatar que a Cys reativa de TrxR se encontra parcialmente enterrada na estrutura proteica o que pode dificultar ou impedir o acesso de compostos como Adn (Figura 13C).

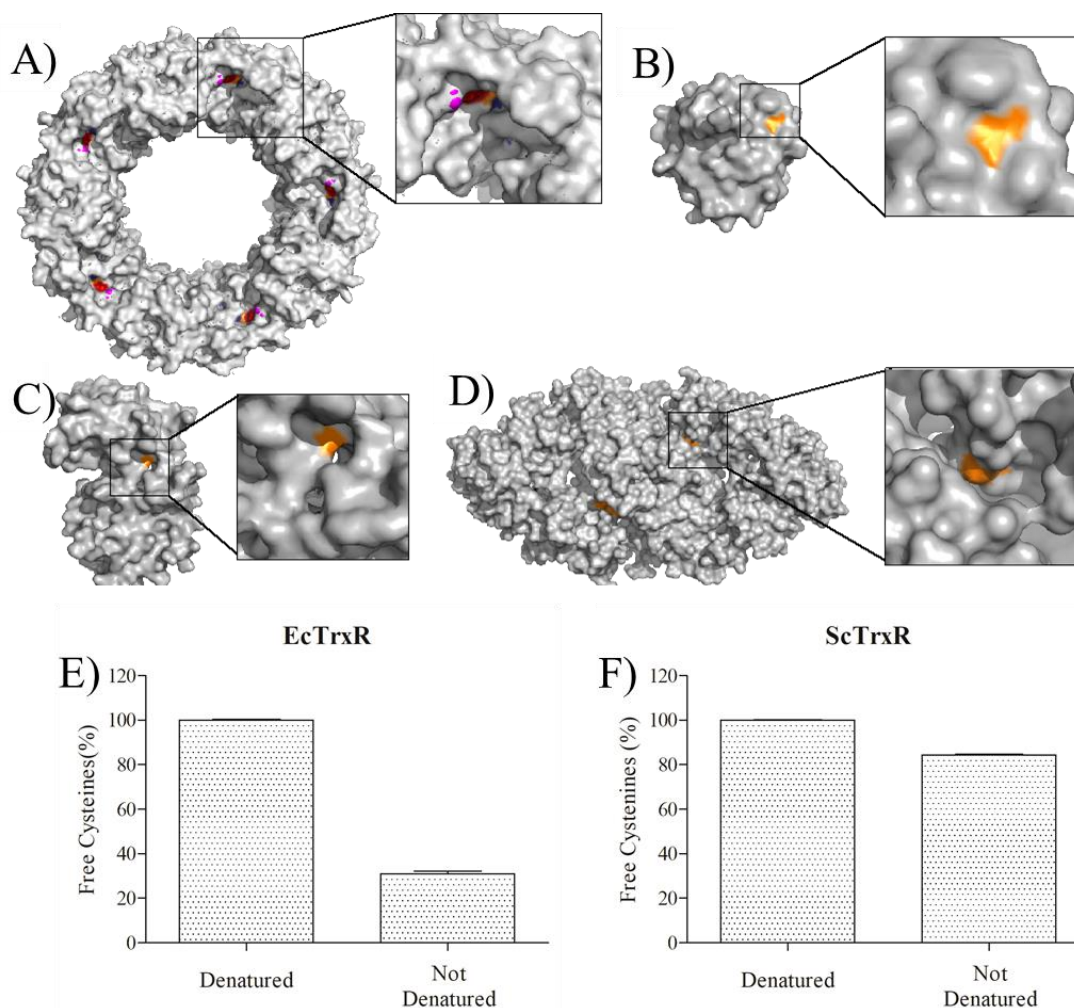


Figura 13: Superfícies moleculares de AhpC e de enzimas de sistemas redutores e quantificação de cisteínas livres em EcTrxR e ScTrxR. Superfícies moleculares de StAhpC (pdb: 4MA9) (A), EcTrx1 (pdb: 2TRX) (B), EcTrxR (pdb: 1F6M) (C) e StAhpF (pdb: 1HYU) (D). As enzimas estão representadas em cinza e as cisteínas reativas em laranja. Para EcAhpC os resíduos da TC, Thr/Ser e Arg, estão coloridos em vermelho e azul, respectivamente. A Phe que efetua uma ligação CH-- π com Thr/Ser está colorida em magenta. A magnificação da região do sítio ativo contendo a cisteínas catalíticas é demarcada em todas as figuras pelo quadrado. Para avaliar a acessibilidade de cisteínas de TrxR de *E. coli* e *S. cerevisiae* foi avaliada a quantidade de cisteínas livres das proteínas pelo método de DTNB de acordo com o que segue: 20 μ M de EcTrxR (E) reduzida e dessalinizada foi adicionada a reações contendo 200 μ M de DTNB e tampão denaturante (Tris 30mM pH7, guanidina 6M) ou não denaturante (Tris 30mM pH=7,0). As reações foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz, sendo posteriormente analisadas espectrofotometricamente a 412 nm. Como comparativo, o mesmo ensaio foi realizado para TrxR de *S. cerevisiae* (ScTrxR) (F), a qual apresentou inibição por Adn.

De forma similar, também existem complicadores para a análise estrutural de AhpF (Figura 13D). Esta enzima possui dois centros redox contendo cisteínas. Um centro fica em um domínio denominado de NTD (*N Terminal Domain*) onde ocorrem dois enovelamentos contíguos de Trx e contém um par de cisteínas envolvidas na redução de AhpC (Cys¹²⁹ e Cys¹³²). Na estrutura de AhpF, essas cisteínas ficam expostas na superfície. O segundo centro redox se encontra em um domínio

denominado de TrxR, o qual contém duas cisteínas (Cys³⁴⁵ e Cys³⁴⁸) as quais são inacessíveis na estrutura de AhpF (pdb: 1HYU).

Uma vez que o domínio que responde pela redução do DTNB (ensaio utilizado para determinação de inibição) é o TrxR, o tratamento com Adn pode não afetar estas cisteínas. Portanto os dados obtidos podem significar que Adn não é capaz de inibir as Cys do domínio de TrxR, mas não revela se o domínio NTD é inibido ou não, sendo necessárias análises adicionais para conclusões pertinentes. Outro fato que despertou curiosidade é que Adn foi capaz de inibir a TrxR de *S. cerevisiae* (Figura 12) ao passo que não é capaz de inibir a EcTrxR. Cabe ressaltar que estas enzimas pertencem à mesma classe estrutural e necessitam alternar entre os estados FR e FO. Para avaliar diferenças na acessibilidade dos resíduos de Cys de TrxR de *E. coli* e *S. cerevisiae*, foram executados experimentos envolvendo a quantificação de cisteínas livres pelo método de DTNB. Os resultados revelaram que as cisteínas de EcTrxR são muito menos acessíveis ao solvente (Figura 13E) do que as ScTrxR (Figura 13F), o que explicaria a inibição observada para a enzima de levedura.

5.1.6 Avaliação da toxicidade de Adn sobre células bacterianas

Com o objetivo de confirmar se a toxicidade de Adn sobre células bacterianas está relacionada com a presença de Ser ou Thr na TC das AhpC, avaliamos o crescimento de linhagens de *B. subtilis* (ATCC 39094), *S. aureus* (ATCC 29213) e *S. epidermidis*, que possuem Ser na TC da AhpC, e *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 29853) e *S. typhimurium* LT2 (ATCC 19585) que possuem Thr nessa posição, na presença de concentrações crescentes de Adn.

Este ensaio foi realizado utilizando o meio de cultura Mueller Hinton que é o meio mais utilizado para testes de sensibilidade a antimicrobianos (CLSI, 2015). De fato, todas as cepas foram capazes de crescer satisfatoriamente nesse meio de cultura e, dessa forma, ele foi selecionado para a realização do ensaio para avaliação da toxicidade de Adn. Uma concentração final de 10⁵ UFC de cada bactéria foi inoculada em microplacas contendo meio Mueller Hinton e concentrações crescentes de Adn e incubado a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, a densidade celular foi estimada espectrofotometricamente a 600 nm para o cálculo do valor de IC₅₀. O crescimento de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium* não foi inibido pela presença de Adn e, portanto, não foi possível calcular o IC₅₀ para essas linhagens. Entretanto, as

linhagens de *B. subtilis*, *S. aureus* e *S. epidermidis* foram sensíveis à toxicidade de Adn, apresentado IC₅₀ de 116µM, 111µM e 146µM, respectivamente (Figura 14). Estes resultados são bastante importantes pois revelam também que a Adn é capaz de aniquilar células de bactérias patogênicas.

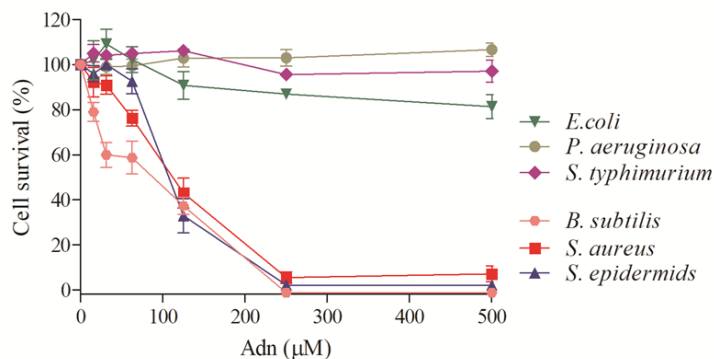


Figura 14: Viabilidade celular de *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium* após tratamento com Adn. As células de *B. subtilis* (●), *S. aureus* (■), *S. epidermidis* (▲), *E. coli* (▼), *P. aeruginosa* (●) e *S. typhimurium* (◆), em concentração de 10⁵ UFC, foram inoculadas em meio Mueller Hinton contendo concentrações crescentes de Adn e incubadas por 24 horas, a 37°C, sendo então quantificadas espectrofotometricamente a 600nm.

5.1.7 A influência da membrana externa de bactérias Gram-negativas sobre a toxicidade de Adn

Não escapou à nossa atenção que as bactérias que não apresentaram suscetibilidade ao tratamento com Adn são Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium*) ao passo que as que foram suscetíveis a Adn são Gram-positivas (*B. subtilis*, *S. aureus* e *S. epidermidis*). É bem conhecido que bactérias Gram-negativas podem ser mais resistentes ou mesmo insensíveis ao tratamento com moléculas que apresentam atividade bactericida ou bacteriostática, pois seu sistema de membranas representa uma barreira para a entrada de compostos incluindo antibióticos fornecendo uma camada extra de proteção às bactérias. (Delcour, 2009; Krishnamoorthy *et al.*, 2017; Vaara, 1992). A membrana externa (ME) de bactérias Gram-negativas é uma bicamada assimétrica composta de lipopolissacarídeos (LPS) na camada externa e glicerofosfolipídeos (PL) na interna (Nikaido, 1998). As principais características da estrutura LPS, como a presença do lipídio A e do antígeno O, são conservadas entre várias espécies. A maior parte do conhecimento atual sobre a seletividade das barreiras de permeabilidade da ME foi determinada por estudos envolvendo *E. coli*. Nesta bactéria, as atividades antibacterianas de antibióticos grandes e polares excedendo o tamanho para o transporte em porinas (> 600 Da em *E. coli*) são geralmente as mais

restritas pela ME (Krishnamoorthy *et al.*, 2017; Lakaye *et al.*, 2001; Nikaido, 1998; O'Shea e Moser, 2008). Por outro lado o caráter zwitteriônico de compostos se correlaciona com o aumento da permeabilidade através da ME, enquanto a hidrofobicidade está correlacionada com a propensão aumentada de um determinado composto ser substrato de bombas de efluxo de drogas (Krishnamoorthy *et al.*, 2017). Neste contexto, compostos como Adn o qual apresenta baixa polaridade e peso molecular de 500Da, se encaixam nas drogas as quais este tipo de bactéria são refratárias.

Para avaliar o efeito da barreira representada pela ME na toxicidade de Adn sobre bactérias Gram-negativas foram conduzidos procedimentos experimentais em *E. coli* contando com a colaboração do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Marcelo Brocchi (UNICAMP). Para tanto foram padronizadas inicialmente duas metodologias de permeabilização. A primeira utilizando soluções contendo EDTA (Ayres *et al.*, 1993; Ayres *et al.*, 1999) e a segunda utilizando polimixina B nonapeptídeo (PMBN) (Salmelin *et al.*, 2000). O EDTA possui a capacidade de quelar cátions divalentes removendo-os de seu local de ligação com LPS, o que resulta na permeabilização da membrana de bactérias Gram-negativas a antibióticos. Embora o tratamento prolongado com EDTA seja letal, um tratamento com tempo e concentração controlados pode ser usado para introduzir macromoléculas e compostos hidrofóbicos através da ME sem afetar a viabilidade celular e torna possível o tratamento com diversos antibióticos como já demonstrado em *E. coli* e *S. typhimurium* (Scudamore *et al.*, 1979; Murata, 2007; Vaara, 1992). Por sua vez, PMBN é um peptídeo cíclico derivado da polimixina B, o qual é capaz de aumentar especificamente a permeabilidade da ME de bactérias Gram-negativas e a suscetibilidade a antibióticos e, em contraste com a polimixina, não possui ação bactericida elevada (Viljanen e Vaara, 1984; Salmelin *et al.*, 2000).

Inicialmente, foi realizado um teste de viabilidade celular baseado em condições previamente estabelecidas por Murata e colegas (2007), utilizando concentrações crescentes de EDTA (400-1000 mM/ml) (Figura 15A). Adicionalmente, realizamos outro teste de viabilidade celular para o antibiótico ampicilina (2-10 µM/ml) sob as mesmas condições (Figura 15B). Os resultados revelam que concentrações de 400-1000 mM de EDTA não são capazes, por si só de aniquilar as linhagens de *E. coli* (Figura 15A). No que tange ao antibiótico ampicilina (Amp), concentrações de 2µg/ml foram

capazes de afetar levemente o crescimento celular, concentrações de 4µg/ml reduziram em mais de 50% a viabilidade celular e concentrações superiores (6-10µg/ml) inibiram totalmente o crescimento celular (Figura 15B). Neste contexto, é possível constatar que concentrações de 2 e 4µg/ml aparentam ser suficientes para afetar o crescimento celular de *E.coli*.

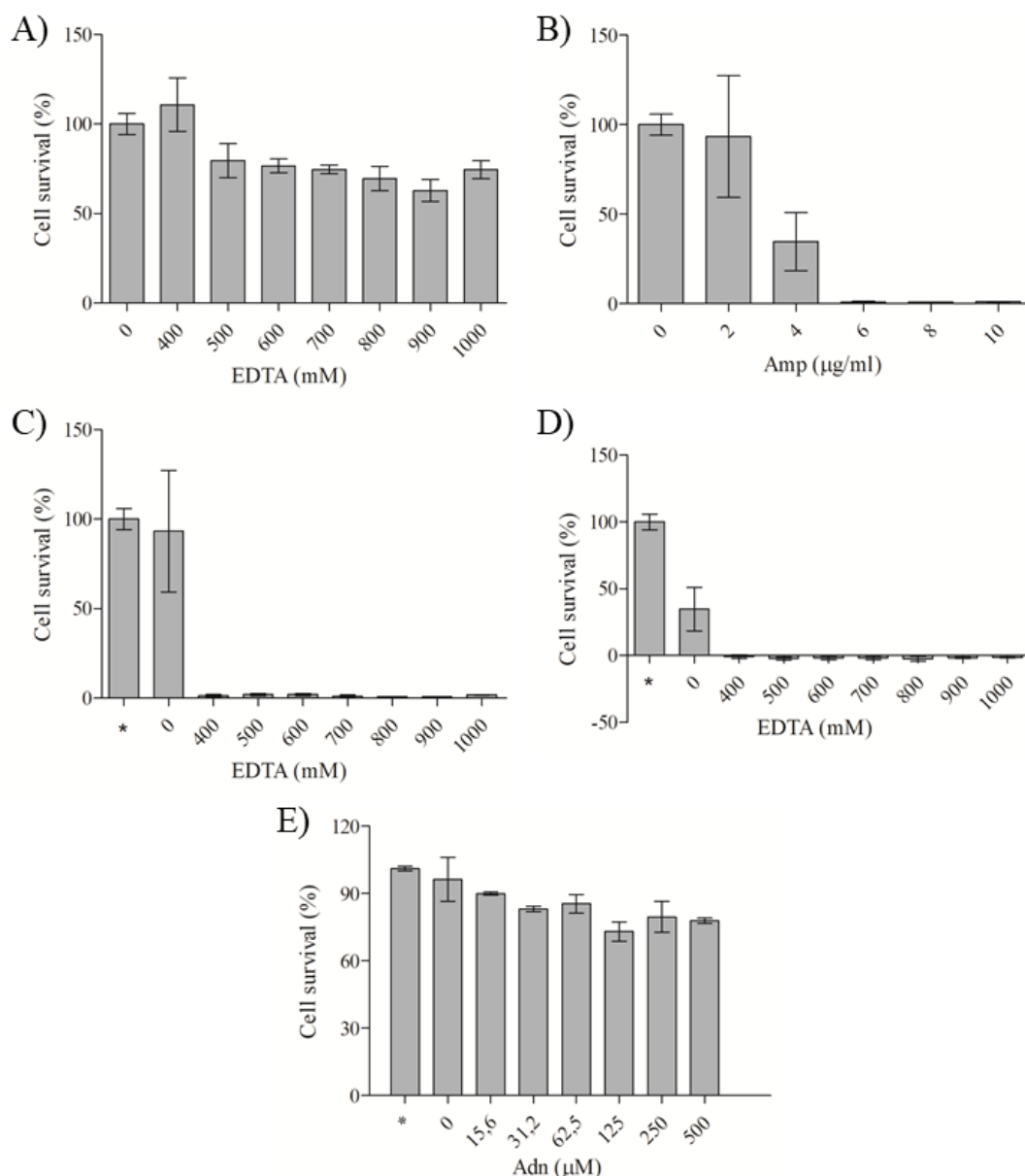


Figura 15: Avaliação da toxicidade de EDTA combinado a ampicilina e Adn sobre *E. coli*: As células de *E. coli* ATCC25922, em concentração de 10^5 UFC, foram inoculadas em meio Mueller Hinton contendo concentrações crescentes de EDTA (A), ampicilina (B), EDTA + ampicilina (C e D) ou EDTA + Adn (E) e incubadas por 24 horas, a 37°C, sendo então quantificadas espectrofotometricamente a 600nm. O asterisco (*) representa amostra que não recebeu tratamento com EDTA e nem com ampicilina/Adn, apenas para comparação.

Em seguida avaliamos o efeito sobre o crescimento celular de EDTA + Amp. Para tanto, foram adicionados 2 ou 4 µg/ml de ampicilina a meios de cultura contendo doses crescentes de EDTA (400-1000 mM) e avaliado o efeito sobre o crescimento celular (Figura 15C e 15D). Os resultados indicam que a menor concentração de EDTA utilizada (400 mM) em conjunto com a menor dose de Amp (2 µM/ml) foi capaz de inibir totalmente o crescimento celular bacteriano (Figura 15C e 15D). Com base nos resultados obtidos, realizamos experimentos submetendo *E. coli* a uma concentração fixa de EDTA (500 µM) e concentrações crescentes de Adn (15.6 µM, 31.2 µM, 62.5 µM, 125 µM, 250 µM e 500 µM). Entretanto, os resultados demonstraram que, mesmo nas concentrações mais elevadas, Adn não apresentou toxicidade sobre *E. coli* em combinação EDTA (Figura 15E).

O segundo protocolo utilizado para permeabilizar a ME envolve a utilização de PMBN, segundo Salmelin e colaboradores (2000). Primeiramente, células de *E. coli* foram inoculadas em meio de cultura contendo concentrações variáveis de PMBN (0.15, 0.3, 0.6 e 1.2 µg/ml) (Figura 16A), com o objetivo de estabelecer uma concentração do composto que não promovesse a morte celular por si só. Os resultados obtidos demonstraram que PMBN apresentou toxicidade para *E. coli* em concentrações a partir de 0.6 µg/ml e que a concentração de 0.3 µg/ml não afetou o crescimento celular, sendo esta selecionada para realizar os experimentos seguintes. A seguir, as bactérias foram submetidas a tratamento simultâneo com PMBN (0.3 µg/ml) e Adn (200 µM). Diferente dos resultados obtidos com EDTA, o tratamento com PMBN aumentou significativamente a morte celular na presença de 200 µM de Adn, indicando que PMBN foi eficiente na permeabilização da ME de *E. coli*, possibilitando a entrada de Adn na célula e aumentando sua toxicidade (Figura 16B). Vale ressaltar que as polimixinas já foram utilizadas como antibiótico, mas seu emprego clínico foi abandonado na década de 1960 por conta de sua nefrotoxicidade e da introdução de novas drogas com melhor tolerância (Vaara, 2019). Entretanto, conforme demonstrado na figura 16, a formulação de PMBN com Adn potencializa o efeito antibiótico desta molécula em concentrações reduzidas e poderia ser uma estratégia promissora para o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias Gram-negativas. Os resultados apresentados nesta seção compõem uma patente recentemente depositada no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI - BR10 20200162454, Apêndice A) e um manuscrito que

versa sobre aspectos moleculares da inibição de Prx 2-Cys típicas de microorganismos por Adn (Apêndice B).

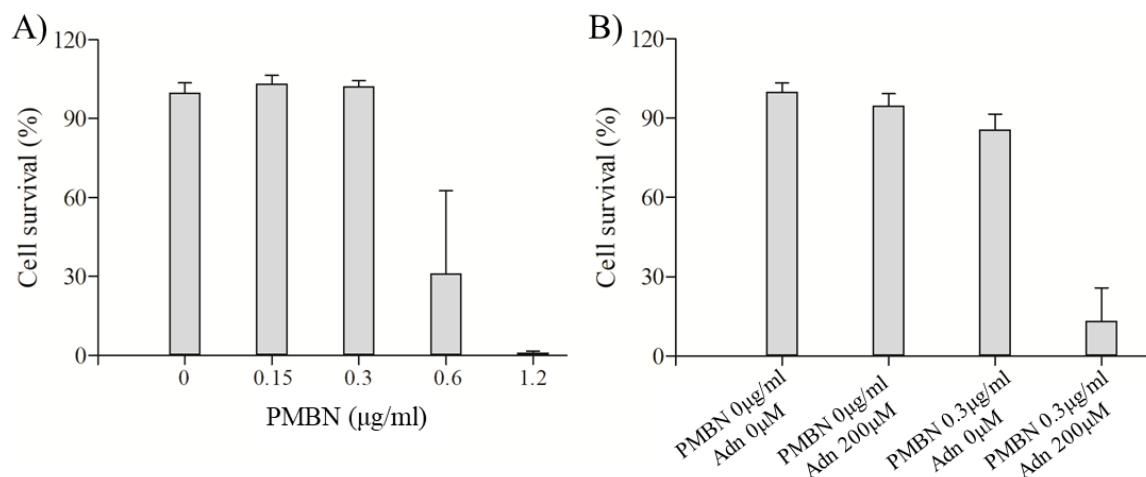


Figura 16: Avaliação da toxicidade de Adn associada a PMBN sobre *E. coli* ATCC25922, em concentração de 10^5 UFC, foram inoculadas em meio Mueller Hinton contendo concentrações crescentes de PMBN (A) ou PMBN associada a Adn (B) e incubadas por 24 horas, a 37°C, sendo então quantificadas espectrofotometricamente a 600nm.

5.2 Avaliação de compostos naturais oriundos da biota florística de São Paulo sobre AhpC e seu sistema redutor

Dentre os objetivos deste trabalho, também está a busca de novos inibidores capazes de atuar sobre Prx 2-Cys típicas através de busca racional baseada em ligantes conhecidos desta classe de enzimas. Esta parte do trabalho foi efetuada em parceria com o grupo do Prof. Dr. João H. G. Lago do Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH) da Universidade Federal do ABC, que isolou seis compostos naturais sendo eles dois *ent*-cauranos e quatro lactonas sesquiterpênicas.

5.2.1 Avaliação da atividade inibitória dos compostos naturais sobre AhpC de *E. coli* por meio do ensaio de oxidação de NADPH

Uma vez que a expressão acentuada das Prx está relacionada com doenças genéticas como o câncer, a busca por inibidores dessas proteínas se tornou um alvo para estudos recentes e até o momento foram descritas doze moléculas, entre compostos naturais, sintéticos e semi-sintéticos, que são capazes de inibir as Prx 2-Cys típicas de eucariotos (Brindisi *et al.*, 2015; Haraldsen *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2019) (Figura 17). Como é possível constatar na figura 17, todos os inibidores

identificados possuem como característica comum um esqueleto hidrofóbico volumoso. Outro ponto importante se refere ao modo de inibição. Dentre os inibidores descritos, a Adn (Figura 17A), Parcifolina AA (Figura 17J) e JD202 (Figura 17J) possuem sistemas carbonílicos α,β -insaturados que podem efetuar reações químicas do tipo adição de Michael e bloquear resíduos de cisteína, o que caracteriza um inibidor do tipo irreversível.

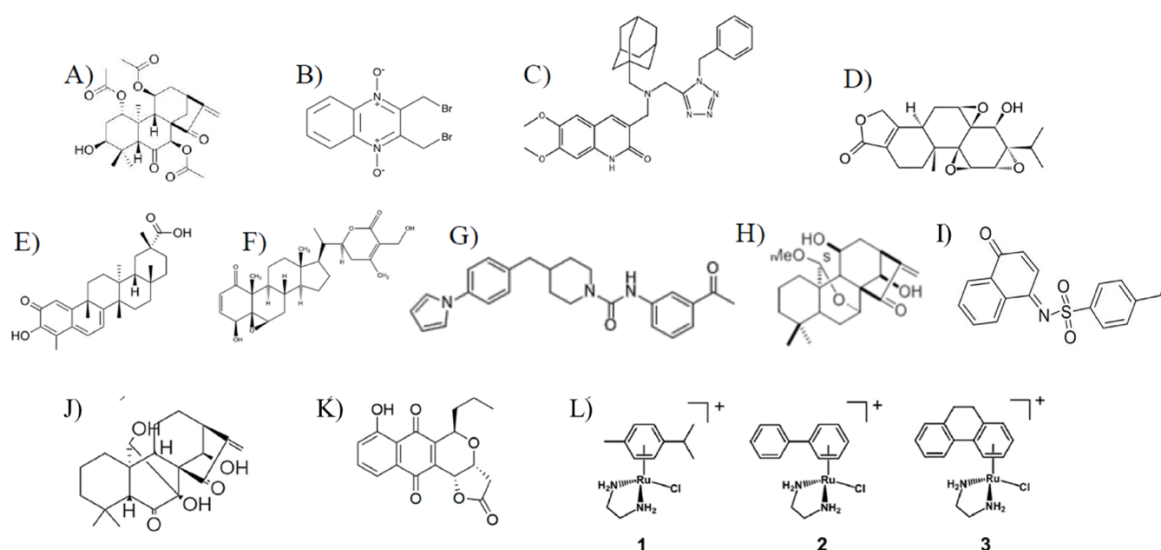


Figura 17: Estruturas químicas de inibidores de Prx2 2-Cys típicas. Adn (A), Conoidina A (B), N,N-disubstituído 3-aminometil quinolona (C), Triptolide (D), Celastrol (E), Withaferina A (F), AMRI-59 (G), JDA-202 (H), H7 (I), Parvifolina AA (J), Frenolicina B (K) e rutênios organometálicos (L).

Neste contexto os compostos naturais utilizados neste estudo fornecidos pelo Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago do CCNH da Universidade Federal do ABC (*ent*-cauranos e lactonas) de *Baccharis retusa*, *Pentacalia desiderabilis*, *Nectandra cupidata* e *Porcelia macrocarpa* (Figura 18) possuem esqueleto hidrofóbico extenso e alguns são capazes de efetuar reação de Michael com cisteínas. Apesar de possuírem anéis aromáticos em comum, os compostos apresentam estruturas distintas, o que visa auxiliar também o teste de novas moléculas. De fato, os compostos 1 (Figura 18A – ácido caurenóico) e 2 (Figura 18B - ácido 15-senecioloxi-caurenóico) são *ent*-cauranos, mas não possuem sistemas carbonílicos α,β -insaturados capazes de efetuar uma adição de Michael.

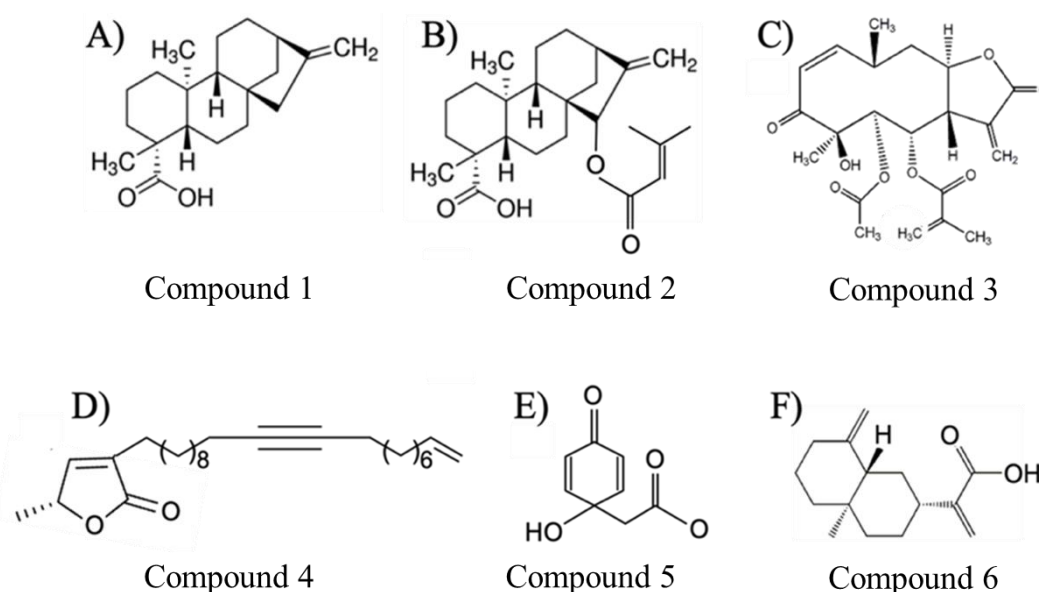


Figura 18: Estrutura dos compostos naturais, isolados da biota florística de São Paulo, selecionados para o desenvolvimento do estudo. **A)** Ácido caurenóico de *Baccharis retusa* (MW=302.7); **B)** Ácido 15-senecioloxi-caurenóico de *Baccharis retusa* (MW=400.4); **C)** Caleína C de *Calea pinnatifida* (MW=420.4); **D)** Acetogenina de *Porcelia macrocarpa* (MW=425.0); **E)** Jacaranona de *Pentacalia desiderabilis* (MW=182.1); e **F)** Ácido cóstico de *Nectandra cupidata* (MW=234.3).

Para avaliar a atividade inibitória dos compostos naturais sobre AhpC foi empregado o ensaio de oxidação do NADPH utilizando EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S} e o sistema Trx de *E. coli* tendo como controle de inibição as proteínas tratadas com Adn e com iodoacetamida, um reconhecido alquilante de cisteínas e que, portanto, tem a capacidade de abolir a atividade de Prx 2-Cys (Figuras 19 e 20). Para este ensaio, as proteínas foram tratadas com os compostos 1-6 de forma idêntica ao tratamento que receberam com Adn, sendo que o excesso de composto sempre foi removido ao final do processo para evitar sua interação com as demais proteínas do sistema. Os resultados revelaram que EcAhpC^{WT} foi inibida de forma significativa pelo composto 3 (C-3 – Caleína C) (Figura 19C) ($v_{0\text{EcAhpCWT}} = 7.94 \pm 0.87 \mu\text{Ms}^{-1}$ e $v_{0\text{C-3EcAhpCWT}} = 1.07 \pm 0.442 \mu\text{Ms}^{-1}$), enquanto que os demais compostos não foram capazes de inibir sua atividade peroxidásica (Figuras 19A, 19B e 19D-F). Os ensaios efetuados com a enzima mutada (EcAhpC^{T44S}) demonstram que ela também foi inibida por C-3 (Figura 20C) ($v_{0\text{EcAhpCT44S}} = 8.20 \pm 0.16 \mu\text{Ms}^{-1}$ e $v_{0\text{C-3EcAhpCT44S}} = 1.56 \pm 0.89 \mu\text{Ms}^{-1}$) e, assim como para enzima selvagem, os demais compostos não foram capazes de efetuar a inibição da enzima (Figuras 20A, 20B e 20D-F).

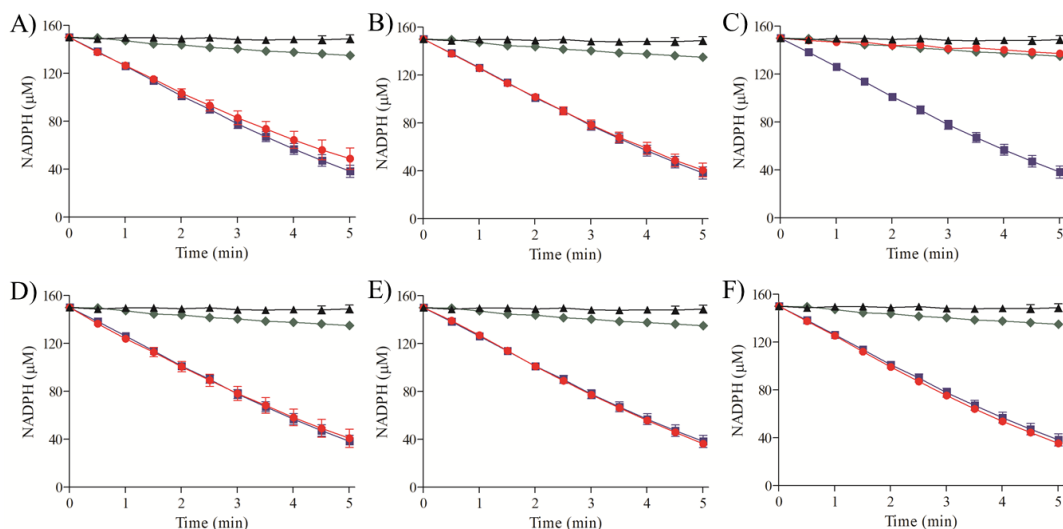


Figura 19: Avaliação de inibição da atividade peroxidásica de EcAhpC^{WT}. A enzima EcAhpC^{WT} reduzida e dessalinizada foi tratada com 20 equivalentes molares de iodoacetamida ($\blacklozenge$) ou com os compostos 1-6 ($\bullet$; A, B, C, D, E e F, respectivamente). A seguir, as proteínas tratadas foram novamente dessalinizadas para a remoção do excesso de composto e sua atividade peroxidásica foi analisada através de ensaio de oxidação de NADPH. Para isso, 3 μM das proteínas tratadas foram adicionadas a reações contendo EcTrx1 (6 μM), EcTrxR (0.9 μM), NADPH (150 μM), HEPES (50 mM, pH=7.0), DTPA (100 μM) e azida sódica (1 mM). As reações foram incubadas a 37°C por 3 minutos antes de serem iniciadas pela adição de H₂O₂ (500 μM) e monitoradas espectrofotometricamente a 340nm, 37°C, por 5 min. Como controle positivo foram utilizadas reações em que EcAhpC^{WT} não foi previamente tratada com nenhum composto ($\blacksquare$) e, como controle negativo, foram utilizadas reações sem a adição de EcAhpC^{WT} ($\blacktriangle$).

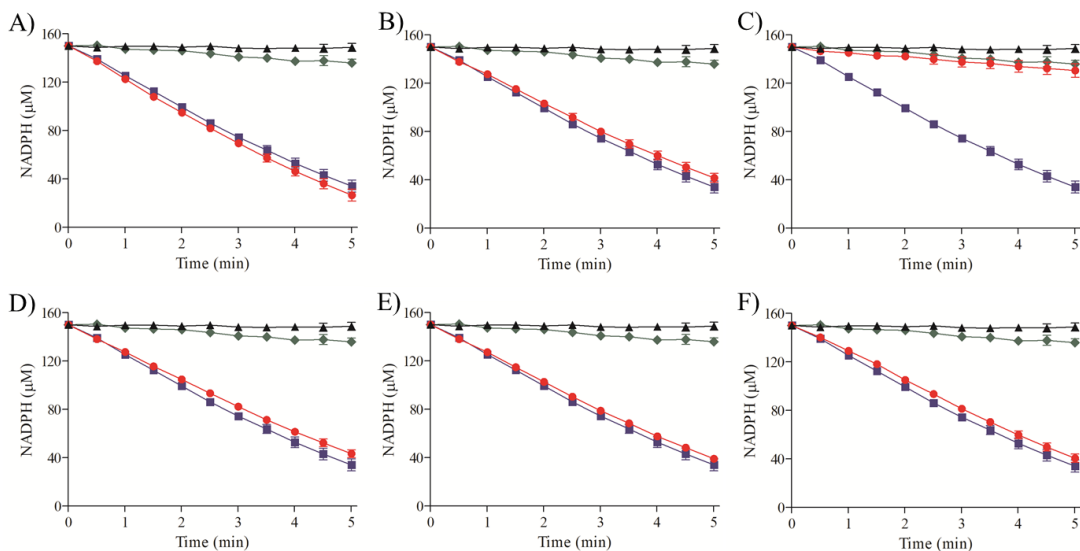


Figura 20: Avaliação de inibição da atividade peroxidásica de EcAhpC^{T44S}. EcAhpC^{T44S} reduzida e dessalinizada foi tratada com 20 equivalentes molares de iodoacetamida ($\blacklozenge$) ou um dos compostos 1-6 ($\bullet$; A, B, C, D, E e F, respectivamente). A seguir, as proteínas tratadas foram novamente dessalinizadas para a remoção do excesso de composto e sua atividade peroxidásica foi analisada através de ensaio de oxidação de NADPH. Para isso, 3 μM das proteínas tratadas foram adicionados a reações contendo EcTrx1 (6 μM), EcTrxR (0.9 μM), NADPH (150 μM), HEPES (50 mM, pH=7.0), DTPA (100 μM) e azida sódica (1 mM). As reações foram incubadas a 37°C por 3 minutos antes de serem iniciadas pela adição de H₂O₂ (500 μM) e monitoradas espectrofotometricamente a 340 nm, 37°C, por 5 minutos. Como controle positivo foram utilizadas reações em que EcAhpC^{T44S} não foi previamente tratada com nenhum composto ($\blacksquare$) e, como controle negativo, foram utilizadas reações sem a adição de EcAhpC^{T44S} ($\blacktriangle$).

Para avaliar se os compostos em questão poderiam se ligar com as cisteínas reativas de EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S}, essas proteínas tratadas com os diferentes compostos foram oxidadas com H₂O₂ e analisadas em SDS PAGE não redutor. Como controle, foram utilizadas proteínas tratadas com iodoacetamida (IAA) ou Adn (Figura 21). Os resultados revelaram que a oxidação com H₂O₂ após o tratamento com a maioria dos compostos naturais foi capaz de produzir dímeros (Figuras 21A e 21B, *lanes* 7, 8, 10-12) de forma semelhante aos da proteína reduzida e tratada somente com H₂O₂, indicando que não houve ligação desses compostos às cisteínas reativas de EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S}. A exceção foi novamente C-3, cujo tratamento levou essas proteínas a se apresentarem majoritariamente como monômeros (Figuras 21A e 21B, *lane* 9) de forma bastante similar a proteína tratada com DTT (Figura 21, *lanes* 2-3), com o agente alquilante de cisteínas IAA ou Adn. A estrutura de C-3 possui três regiões onde os carbonos podem sofrer um ataque nucleofílico pelas cisteínas de AhpC, segundo o Prof. Dr. João H. G. Lago. Entretanto, análises adicionais envolvendo espectrometria de massas ou ressonância magnética nuclear são necessárias para determinar corretamente qual região de C-3 realiza essa interação.

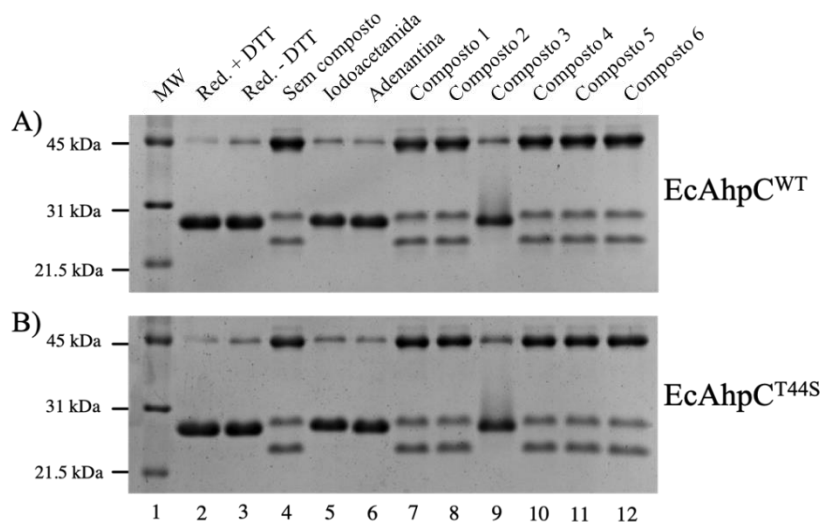


Figura 21: Avaliação da inibição da formação de dissulfeto intermolecular em EcAhpC. As enzimas EcAhpC^{T44S} (A) ou EcAhpC^{T44S} (B) foram reduzidas com 5mM de DTT por 1 hora (*lane* 2) e, em seguida, dessalinizadas para a remoção do excesso de redutor (*lane* 3). Alíquotas contendo 10µM da enzima reduzida/dessalinizada foram tratadas com 20 equivalentes molares dos compostos 1-6 por 1 hora e posteriormente oxidadas com 5 equivalentes molares de H₂O₂ por 30 minutos. As reações foram então paralisadas com a adição de *stop buffer* (50 mM de Tris pH=6.8, 50 mM de NEM, 2% de SDS, 10% de glicerol e 0.1% de azul de bromofenol) e analisadas em SDS-PAGE não redutor corado com *comassie blue*. A *lane* 1 representa o marcador de peso molecular. Na *lane* 4 foi aplicada a proteína reduzida/dessalinizada e posteriormente oxidada, sem tratamento com nenhum composto. Todo o procedimento foi realizado em temperatura ambiente.

De forma geral os resultados iniciais indicam a necessidade de um esqueleto bastante volumoso conjuntamente com o grupamento necessário para a realização da adição de Michael, uma vez que compostos sem este grupamento (Figura 18A-B) ou com esqueletos menores (Figura 18D-F) não foram efetivos em inibir EcAhpC ou ligar-se às suas cisteínas reativas. Consideramos bastante importante a identificação de C-3 como inibidor de AhpC por ser um composto natural que não pertence à classe dos diterpenoides *ent*-câuranos, mas sim de lactonas sesquiterpênicas, as quais ainda não foram descritas como inibidores para esta classe de enzimas, o que pode representar uma nova classe de compostos naturais capazes de agir como inibidores de Prx 2-Cys típicas, além de representar o primeiro composto natural oriundo da biodiversidade brasileira capaz de atuar como inibidor desta classe de enzimas.

5.2.2 Determinação do IC_{50} aparente de C-3 para EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S}

Uma vez que C-3 foi capaz de inibir a atividade peroxidásica de EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S}, bem como a formação do dissulfeto intermolecular nessas proteínas, seguimos com a determinação do IC_{50} desse composto para as enzimas EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S}. Semelhante aos ensaios realizados com Adn, as enzimas reduzidas foram tratadas com quantidades variáveis de C-3, representando diferentes razões estequiométricas (0.5, 1, 2.5, 5 e 10 equivalentes molares). A seguir, as enzimas tratadas foram submetidas ao ensaio acoplado de oxidação do NADPH e ao ensaio de oxidação em SDS-PAGE (Figura 22).

Os resultados revelaram que, semelhante ao observado para Adn, o composto C-3 é capaz de impedir a formação de dissulfetos de EcAhpC em função da concentração utilizada (Figuras 22A e 22B). Também é possível observar pelo ensaio de NADPH que, quanto maior a dose de C-3, maior a inibição da atividade peroxidásica promovida (Figuras 22C e 22D). De fato, doses estequiométricas de C-3 (0.5 eq.) foram capazes de inibir fortemente a atividade das enzimas resultando em um IC_{50} aparente de $0.553 \pm 0.061 \mu\text{M}$ para EcAhpC^{WT} e $0.460 \pm 0.025 \mu\text{M}$ para EcAhpC^{T44S} (Figuras 22E e 22F). Esses dados indicam que a capacidade inibitória de C-3 sobre AhpC é muito semelhante à de Adn e que presença da Ser na TC pode ser um fator facilitador, ainda que sutil, da ligação do composto ao sítio ativo dessas proteínas, corroborando a hipótese inicial deste trabalho.

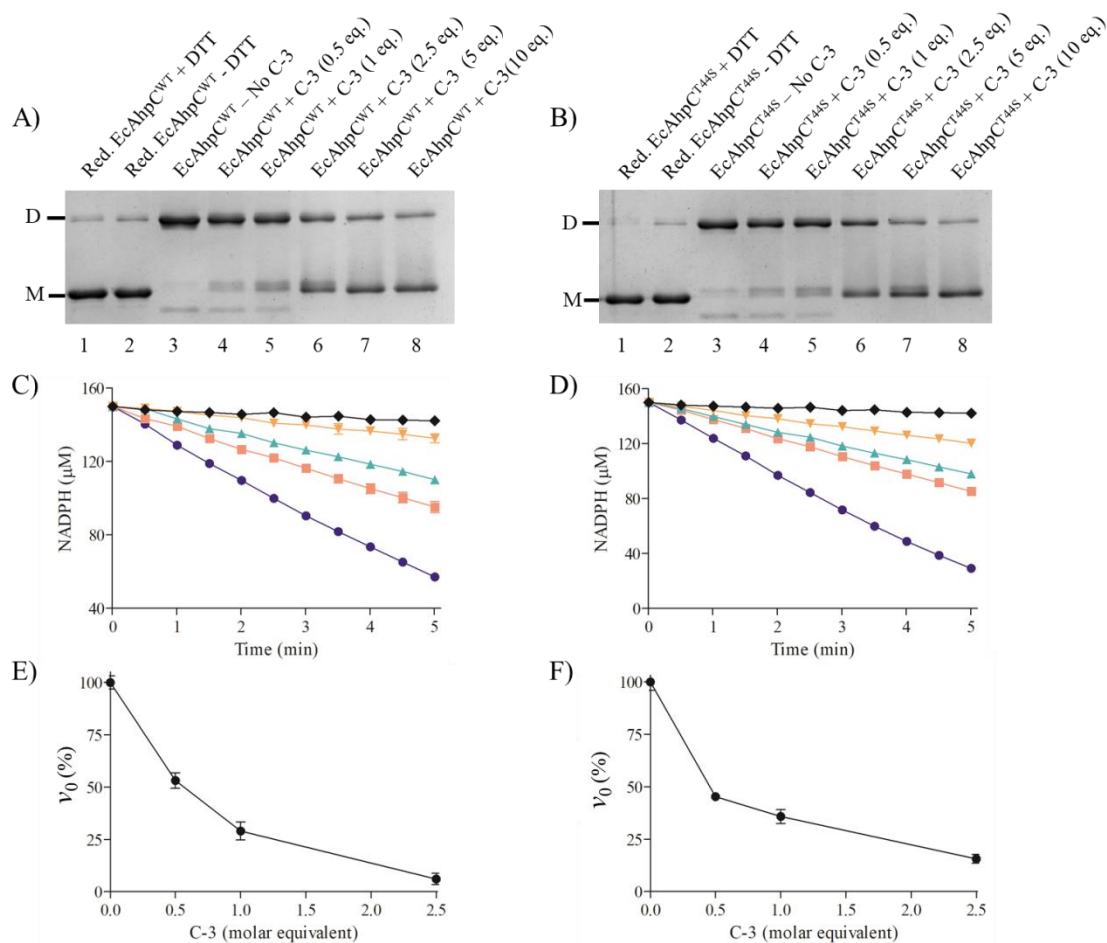


Figura 22: Inibição da formação de dissulfeto intermolecular e atividade peroxidásica de EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S} por C-3. As proteínas EcAhpC^{WT} (A) e EcAhpC^{T44S} (B) foram reduzidas com 5mM de DTT por 1 hora (lane 2) e, em seguida, dessalinizadas para a remoção do excesso de redutor (lane 3). Aliquotas contendo 10μM das enzimas reduzidas e dessalinizadas foram tratadas com concentrações variadas de C-3 (0.5, 1, 2.5, 5 e 10 equivalentes molares - lanes 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente) por 1 hora e posteriormente oxidadas com 5 equivalentes molares de H₂O₂ por 1 hora. As reações foram paralisadas com a adição de *stop buffer* (Tris 50mM pH6.8, NEM 50mM, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.1%) e analisadas em SDS-PAGE não redutor corado com *comassie blue*. A lane 3 representa a proteína reduzida/dessalinizada e posteriormente oxidada, sem tratamento com C-3. Os procedimentos foram realizados em temperatura ambiente. Inibição da atividade peroxidásica de EcAhpC^{WT} (C) e EcAhpC^{T44S} (D) por C-3: As proteínas reduzidas e dessalinizadas foram tratadas com concentrações variáveis de C-3 (0.5 - ■, 1 - ▲ e 2.5 - ▼ equivalentes molares) por 1 hora em temperatura ambiente e posteriormente dessalinizadas novamente. A seguir, 3μM das proteínas tratadas foram adicionadas a reações contendo EcTrx1 6μM, EcTrxR 0.9μM, NADPH 150μM, HEPES 50mM pH 7.0, DTPA 100μM e azida sódica 1mM. As reações foram incubadas a 37°C por 3 minutos antes de serem iniciadas pela adição de H₂O₂ 500μM e monitoradas espectrofotometricamente a 340nm, 37°C, por 5 minutos. Como controle positivo foram utilizadas reações em que as proteínas não foi previamente tratada com C-3 (●) e, como controle negativo, foram utilizadas reações sem a adição de AhpC (◆). As velocidades iniciais de cada reação foram calculadas, transformadas em valores de porcentagem e plotadas para o cálculo dos valores de IC₅₀ de C-3 para EcAhpC^{WT} (E) e EcAhpC^{T44S} (F).

5.2.3 Avaliação da atividade inibitória dos compostos naturais sobre sistemas redutores de AhpC

Para avaliar se os compostos seriam capazes de inibir as enzimas do sistema Trx (Trx e TrxR) ou AhpF de *E. coli*, essas proteínas foram tratadas de forma similar ao descrito anteriormente para AhpC e a atividade de oxidoreductase foi avaliada por ensaios de oxidação de NADPH (EcTrx1 e EcTrxR – Figuras 23 e 24, respectivamente) ou de redução de DTNB (AhpF – Figura 25). Como controles, foram utilizadas reações em que as proteínas em questão foram tratadas com IAA.

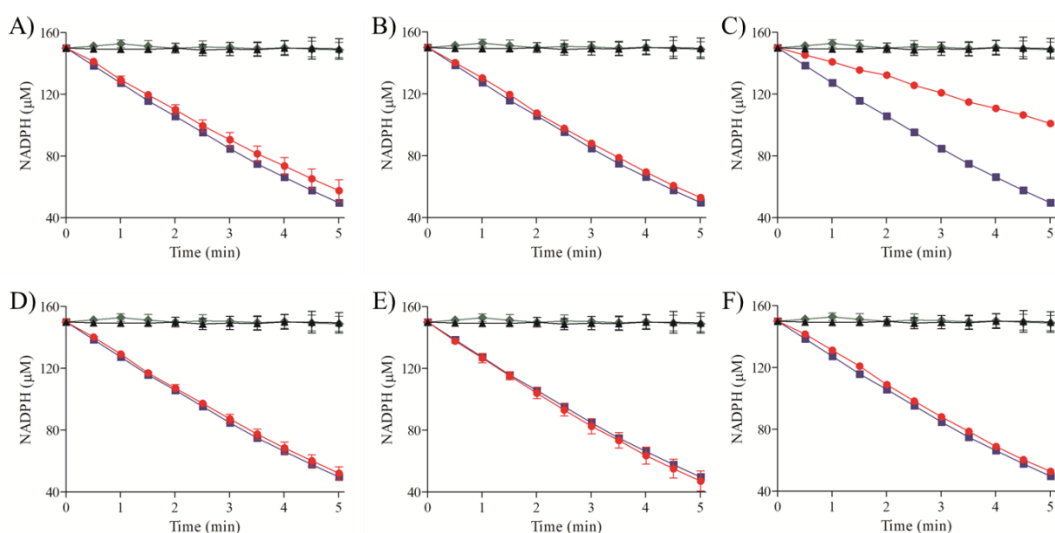


Figura 23: Avaliação de inibição da atividade de EcTrx1. A proteína EcTrx1 reduzida e dessalinizada foi tratada com 20 eq. molares de iodoacetamida (◆) ou com os compostos 1-6 (●; A, B, C, D, E e F, respectivamente). Em seguida as proteínas tratadas foram novamente dessalinizadas para a remoção do excesso de composto e sua atividade de oxidoreductase foi analisada através de ensaio de oxidação de NADPH. Para isso, 6μM das proteínas tratadas foram adicionadas a reações contendo EcAhpC^{WT} (3 μM), EcTrxR (0.9 μM), NADPH (150 μM), HEPES (50 mM, pH= 7.0), DTPA (100 μM) e azida sódica (1 mM). As reações foram incubadas a 37°C por 3 minutos antes de serem iniciadas pela adição de H₂O₂ (500 μM) e monitoradas espectrofotometricamente a 340nm, 37°C, por 5 minutos. Como controle positivo foram utilizadas reações em que EcTrx1 não foi previamente tratada com nenhum composto (■) e, como controle negativo, foram utilizadas reações sem a adição de EcTrx1 (▲).

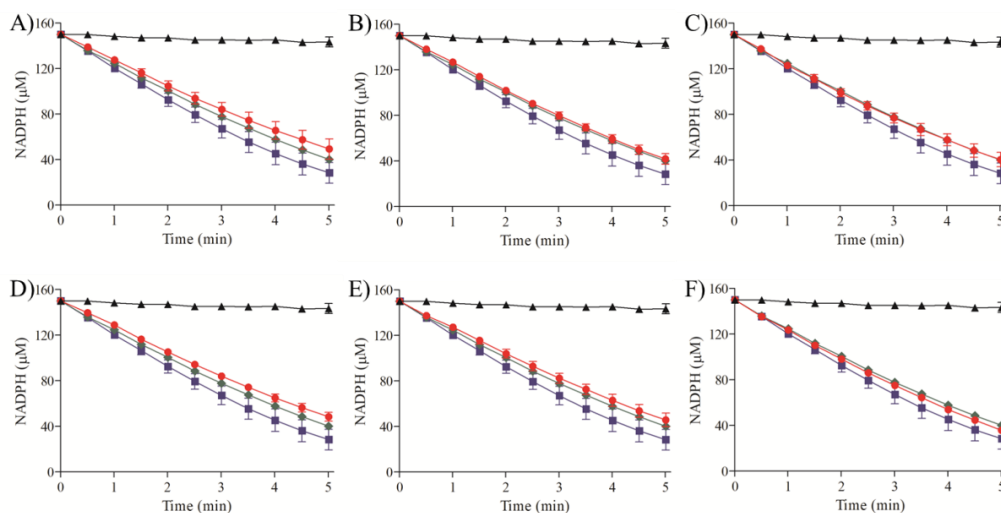


Figura 24: Avaliação de inibição da atividade peroxidásica de EcTrxR. A enzima EcTrxR reduzida e dessalinizada foi tratada com 20 equivalentes molares de iodoacetamida (◆) ou dos compostos 1-6 (●; A, B, C, D, E e F, respectivamente). Em seguida, as proteínas tratadas foram novamente dessalinizadas para a remoção do excesso de composto e a atividade de oxidoreductase foi analisada através de ensaio de oxidação de NADPH. Para isso, 0.9 µM das proteínas tratadas foram adicionados a reações contendo EcAhpC^{WT} (3 µM), EcTrx1 (6 µM), NADPH (150 µM), HEPES (50 mM, pH=7.0), DTPA (100 µM) e azida sódica (1 mM). As reações foram incubadas a 37°C por 3 minutos antes de serem iniciadas pela adição de H₂O₂ (500 µM) e monitoradas espectrofotometricamente a 340nm, 37°C, por 5 min. Como controle positivo foram utilizadas reações em que EcTrxR não foi previamente tratada com nenhum composto (■) e, como controle negativo, foram utilizadas reações sem a adição de EcTrxR (▲).

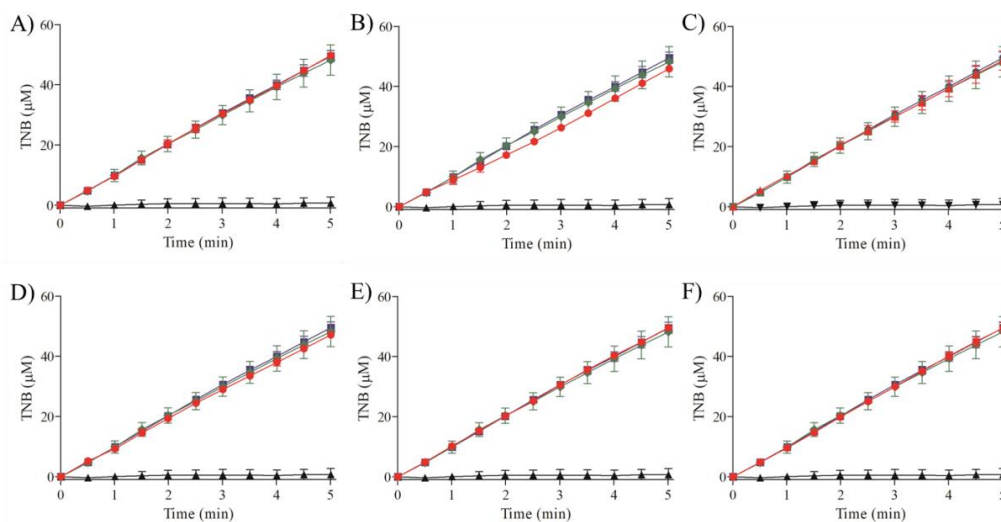


Figura 25: Avaliação de inibição da atividade oxidoreductase de EcAhpF. EcAhpF reduzida e dessalinizada foi tratada com 20 equivalentes molares de iodoacetamida (◆) ou com um dos seguintes compostos 1-6 (●; A, B, C, D, E e F, respectivamente). Em seguida, as proteínas tratadas foram novamente dessalinizadas para a remoção do excesso de composto e sua atividade de oxidoreductase foi avaliada através de ensaio de redução do DTNB. Para isso, 0.5 µM de EcAhpF após tratamento foi adicionado a reações contendo DTNB (500 µM), DTPA (500 µM) e fosfato de sódio (100 mM, pH=7.0). As reações foram incubadas por 3 minutos a 37°C para atingir a temperatura do ensaio e o experimento foi iniciado com a adição de NADH (300 µM). O monitoramento da formação de TNB foi realizado espectrofotometricamente a 412 nm, 37°C, por 5 minutos. Como controle positivo foram utilizadas reações em que EcAhpF não foi previamente tratada com nenhum composto (■) e, como controle negativo, foram utilizadas reações sem a adição de EcAhpF (▲).

Os resultados revelaram que C-3 foi o único composto capaz de inibir a atividade de EcTrx1 (Figura 23C) enquanto os demais compostos não provocaram inibição (Figuras 23A-B e 23D-F). No que concerne as enzimas EcTrxR e EcAhpF, nenhum dos compostos e nem mesmo o alquilante IAA foram capazes de inibir estas enzimas (Figuras 24 e 25). Neste contexto, os dados sugerem que estes compostos não são capazes de reagir com as enzimas e o impedimento estérico, como apontado para Adn (Figura 13), pode ser umas das razões para este fenômeno.

É importante ressaltar que a inibição efetuada por C-3 sobre EcTrx1 foi consideravelmente menor que a observada para IAA (Figura 23C). Estes resultados também nos parecem bastante importantes uma vez que este composto foi capaz de inibir fortemente AhpC. Ainda, como apresentado neste trabalho, a Adn é capaz de inibir fortemente EcTrx1, semelhante à IAA, nas mesmas condições experimentais (Figura 11A). Conjuntamente os resultados obtidos aqui sugerem uma maior especificidade de C-3 para AhpC em comparação com Adn.

5.2.4 Avaliação da toxicidade de C-3 sobre bactérias

Uma vez determinado que C-3 foi eficiente na inibição da atividade peroxidásica de EcAhpC e EcTrx1, prosseguimos com a investigação dos efeitos tóxicos deste composto sobre linhagens bacterianas contendo Thr ou Ser na TC. Para isso, submetemos células de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e *S. epidermidis* a tratamento com concentrações crescentes de C-3 e avaliamos a viabilidade celular através de espectrofotometria. Os dados obtidos indicam que C-3 apresentou toxicidade para bactérias contendo Ser na TC e Gram positivas, ao passo que as bactérias contendo Thr na TC e Gram negativas se mostraram resistentes ao tratamento com este composto (Figura 26). Em virtude da escassez de C-3, não foi possível realizar este experimento com *S. typhimurium* e *S. aureus*, tampouco proceder a permeabilização da ME das bactérias Gram negativas com PMBN, semelhante ao realizado para Adn. Entretanto, estas análises são de grande importância para uma melhor compreensão dos fenômenos envolvendo a toxicidade de C-3 sobre bactérias e serão realizadas quando este composto for disponibilizado novamente. Os resultados oriundos deste capítulo compõem uma solicitação de patente que representa o primeiro inibidor identificado de Prx 2-Cys oriundo da biota brasileira (Apêndice C).

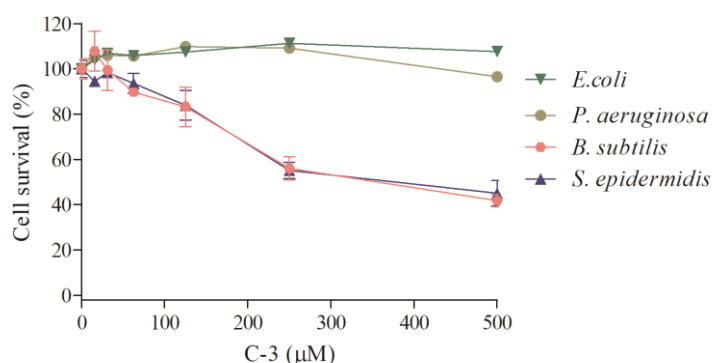


Figura 26: Viabilidade celular de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e *S. epidermidis* após tratamento com C-3. As células de *E. coli* (▼), *P. aeruginosa* (●), *B. subtilis* (●), *S. epidermidis* (▲), em concentração de 10^5 UFC, foram inoculadas em meio Mueller Hinton contendo concentrações crescentes de C-3 e incubadas por 24 horas, a 37°C, sendo então quantificadas espectrofotometricamente a 600nm.

5.3 A importância da presença de Thr ou Ser na TC das AhpC na suscetibilidade à superoxidação

Em trabalho anterior que contou com minha autoria (Tairum, Santos *et al.*, em 2016) utilizamos Tsa1 e Tsa2 de *S. cerevisiae* para demonstrar que a presença da Ser na TC é capaz de promover alterações estruturais importantes nessas proteínas. Continuamos as investigações dos efeitos da substituição Thr/Ser em Tsa1 e Tsa2 e verificamos, utilizando metodologias envolvendo ensaio acoplado de oxidação do NADPH e *western blotting* que, além de estabilizar a estrutura decamérica, a presença da Ser na TC é capaz de conferir maior resistência à perda da atividade peroxidásica dessas proteínas em função da superoxidação (Apêndice E). Além disso, utilizando técnicas de cromatografia de exclusão molecular e microscopia eletrônica de transmissão, observamos que Tsa1 e Tsa2 assumem diferentes estruturas de alto peso molecular quando submetidas ao estresse oxidativo, indicando a possibilidade de essas proteínas possuírem papéis intracelulares distintos durante esse tipo de evento (dados não apresentados).

Ao analisar o banco de dados GenBank do NCBI constatamos que a maior incidência de Ser na TC dentre as Prx 2-Cys típicas ocorre em AhpC, embora a maior parte das proteínas desse grupo ainda apresente uma Thr nessa posição (Apêndice E). Vale lembrar que as AhpC são conhecidas como proteínas robustas por apresentarem alta resistência ao processo de superoxidação (Wood *et al.*, 2003). Para avaliar possíveis diferenças na suscetibilidade à superoxidação decorrentes da presença de Ser ou Thr na TC de AhpC, foram realizados ensaios de oxidação do NADPH utilizando altas

concentrações de H_2O_2 ou o hidroperóxido de cumeno (CHP). Nas investigações utilizamos a AhpC de *P. aeruginosa* (PaAhpC), que contém uma Thr na TC, e a AhpC de *S. epidermidis* (SeAhpC), que apresenta naturalmente uma Ser nessa posição. Também foram utilizados os mutantes recíprocos contendo substituições pontuais Thr $\rightleftharpoons$ Ser da TC. Para a redução das AhpC oxidadas, foram utilizadas as enzimas Trx e TrxR de *E. coli*, com o intuito de fornecer um sistema redutor heterólogo para ambas as proteínas (Figura 27).

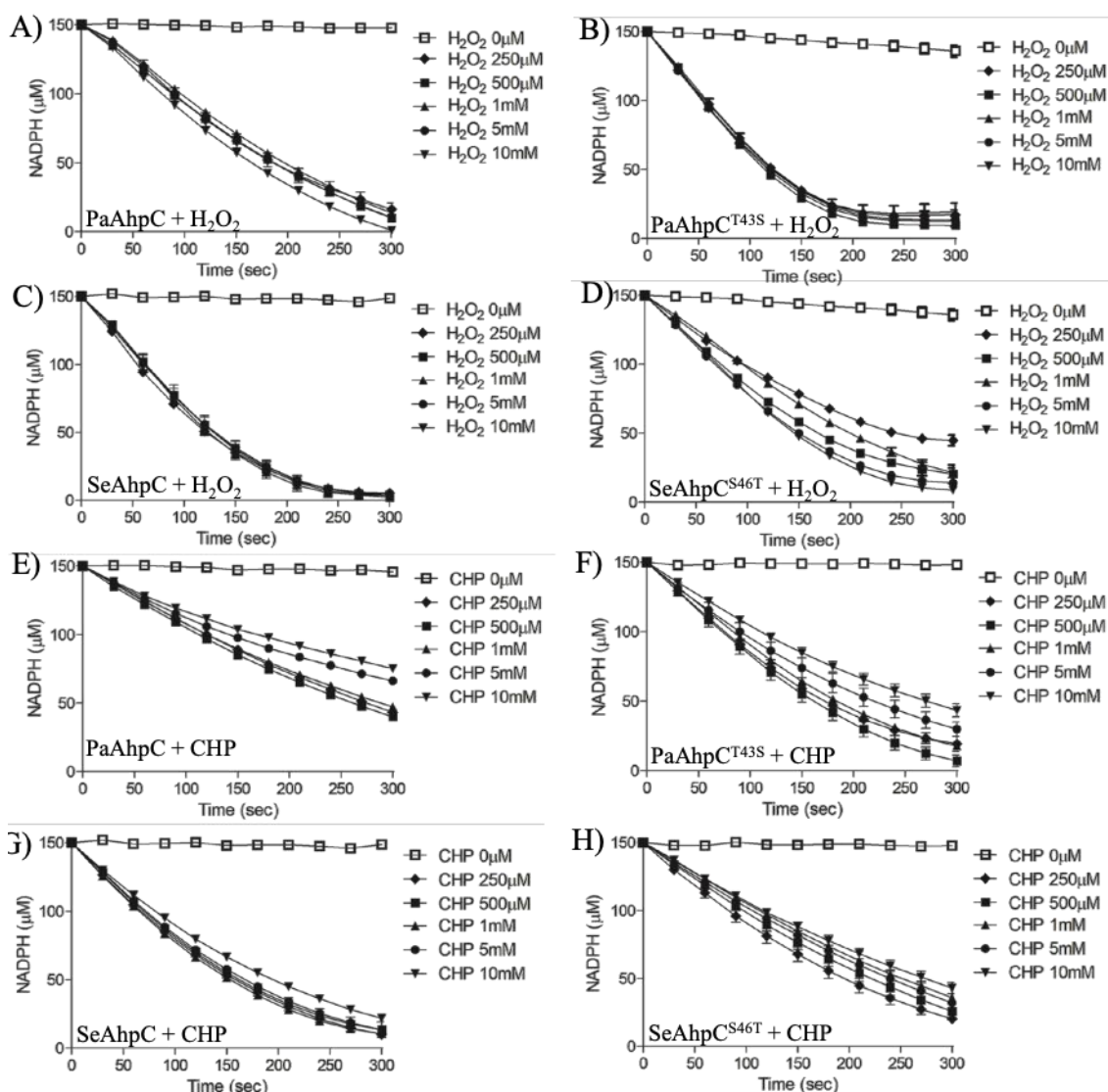


Figura 27: Ensaio de oxidação NADPH para avaliação da superoxidação AhpC de *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* utilizando o sistema Trx heterólogo *E. coli*. As reações foram executadas contendo PaAhpC (A e E), PaAhpC^{T43S} (B e F), SeAhpC (C e G) ou SeAhpC^{S46T} (D e H) (3 μM), EcTrx (6 μM), EcTrxR (0,9 μM), NADPH (150 μM), Hepes 50 mM pH =7,4, azida de sódica 1 mM e DTPA 100 μM . Os experimentos foram iniciados adicionando concentrações crescentes (0 μM , 250 μM , 500 μM , 1 mM, 5 mM e 10 mM) de peróxido de hidrogênio (A, B, C e D) ou CHP (E, F, G e H) e as reações foram incubadas por 5 min/37°C. A oxidação do NADPH foi monitorada espectrofotometricamente a 340 nm.

Os resultados revelaram aspectos importantes tanto em relação à substituição de Thr por Ser quanto na preferência por substrato. De forma geral, proteínas contendo Thr na TC (selvagens ou mutantes) reduziram o H_2O_2 de forma mais lenta (Figura 27A e 27 D), enquanto as que possuem Ser foram mais eficientes na redução desse substrato (Figura 27B e 27 C). No caso do CHP, as enzimas bacterianas contendo Thr na TC foram inibidas em concentrações mais elevadas de CHP (Figura 27E e 27 H) ao passo que as que possuem Ser se mostraram mais resistentes a perda de atividade, a qual ocorreu apenas em concentrações muito elevadas de CHP (5 e 10 mM).

A perda de atividade destas proteínas pode ser atribuída à formação de espécies hiperoxidadas de Cys_P ($\text{Cys}_P\text{-SO}_2\text{H}$ ou $\text{Cys}_P\text{SO}_3\text{H}$) (aspecto confirmado por *western blot* – Apêndice E) e indicam que substratos mais hidrofóbicos e volumosos são capazes de reagir de forma mais eficiente com Cys_P promovendo sua superoxidação. Este aspecto nos parece de importância uma vez que todos os inibidores identificados para as Prx 2-Cys típicas são bastante hidrofóbicos, sugerindo que os substratos endógenos destas proteínas possam ser hidroperóxidos de lipídeos (Figura 28). De fato, recentemente foi demonstrado que uma outra tiól peroxidase de *Xylella fastidiosa*, denominada de Ohr (para *Organic hydroperoxide resistance protein*), é capaz de decompor peróxidos de ácidos graxos de cadeia longa com altíssima eficiência catalítica ($10^8\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) quando comparado com H_2O_2 , sugerindo fortemente que os substratos preferenciais endógenos sejam ácidos graxos de cadeia longa (Alegria *et al.*, 2017). Adicionalmente, já foi demonstrado que uma Prx 1-Cys de *M. tuberculosis* também apresenta alta afinidade por peróxido de ácido araquidônico ($10^8\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), um peróxido orgânico altamente hidrofóbico (Zeida *et al.*, 2015).

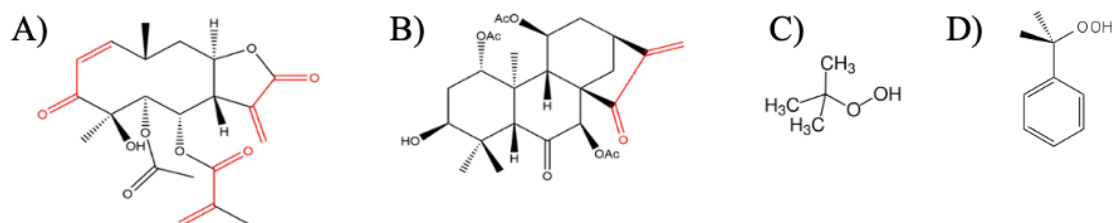


Figura 28: Estruturas químicas de inibidores identificados para AhpC e de hidroperóxidos orgânicos. CN-LS1 (A) e Adn (B). Em vermelho estão representados os grupos reativos dos compostos capazes de efetuar uma adição de Michael com tióis. Estruturas químicas do peróxido de *tert*-butil (C) e do peróxido de cumeno (D).

Em bactérias a peroxidação lipídica representa um grande obstáculo para a sobrevivência de patógenos. Hidroperóxidos de ácidos graxos podem ser gerados pela

peroxidação lipídica não enzimática do ácido *cis-vacênico* e de outros ácidos graxos monoinsaturados que estão presentes nas membranas bacterianas (Moss *et al.*, 1972). Adicionalmente, peróxidos de lipídeos também são gerados pelos hospedeiros, animais ou plantas, através de lipoxigenases como os hidroperóxidos de ácido araquidônico e linolênico, dentre outros, que possuem alta toxicidade sobre células bacterianas (Alegria *et al.*, 2017; Desbois *et al.*, 2013; Prost *et al.*, 2005). Neste contexto, os estudos realizados aqui trazem mais evidências de que substratos preferências de AhpC podem ser peróxidos derivados de ácidos graxos e a identificação destes substratos pode auxiliar na busca racional de inibidores mais eficientes para esse grupo de proteínas.

Voltando a diferenças apresentadas entre AhpCs contendo Thr ou Ser na TC, análises de fluorimetria de varredura diferencial (DSF) revelaram ainda que as proteínas contendo Ser na TC apresentavam maior estabilidade térmica do que as que continham Thr ($T_{M_PaAhpCWT} = 58.49 \pm 1.35$ °C; $T_{M_PaAhpCT44S} = 66.10 \pm 2.32$ °C; $T_{M_SeAhpCWT} = 61.25 \pm 0.50$ °C; $T_{M_SeAhpCS46T} = 52.70 \pm 0.62$ °C) (Figura 29). Esses dados nos pareceram interessantes uma vez que, para infectar determinados hospedeiros, os patógenos precisam enfrentar, além do estresse oxidativo, também o estresse térmico. Nesse sentido, já foi demonstrado que algumas AhpCs apresentam papel de holdases em eventos de estresse térmico, impedindo o desenovelamento de outras proteínas em decorrência do aumento da temperatura (Chuang *et al.*, 2006; Kamariah *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2016, Teixeira *et al.*, 2019).

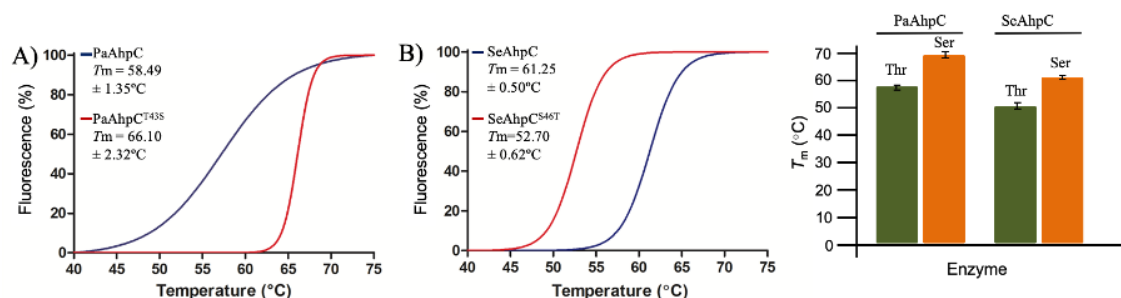


Figura 29: Desenovelamento térmico de PaAhpC, SeAhpC e mutantes monitorado por fluorimetria de varredura diferencial. Fluorimetria de varredura diferencial de PaAhpC (A, linha azul), PaAhpC^{T43S} (A, linha vermelha), SeAhpC (B, linha azul) e SeAhpC^{S46T} (B, linha vermelha). (C) Estabilidades térmicas comparativas de PaAhpC e SeAhpC contendo Thr ou Ser na TC. As proteínas foram previamente reduzidas com DTT (20 mM), dessalinizadas (PD10, GE Healthcare) e incubadas com o SYPRO Orange. A varredura por fluorescência foi realizada utilizando um gradiente de temperatura de 25°C a 95°C. A temperatura de melting T_m foi para determinar o ponto médio da desnaturação térmica foi utilizada a equação de Boltzmann.

Para avaliar se a presença da Thr ou Ser na TC poderia influenciar na atividade de holdase das AhpCs, submetemos PaAhpC e SeAhpC selvagens ao ensaio de proteção

térmica da citrato sintase (CS), de acordo com o descrito por Kamariah e colaboradores (2018). Os resultados demonstraram que $\text{SeAhpC}^{\text{WT}}$ foi mais eficaz na prevenção da agregação proteica da citrato sintase (CS) (Figura 30B) do que $\text{PaAhpC}^{\text{WT}}$ quando essas proteínas foram previamente incubadas a 37°C (Figura 30A). Quando as proteínas foram pré-incubadas a 48°C, $\text{PaAhpC}^{\text{WT}}$ manteve a mesma eficiência na prevenção da agregação de CS, enquanto $\text{SeAhpC}^{\text{WT}}$ foi capaz de praticamente abolir a agregação de CS (Figura 30B), indicando que a presença da Ser na TC pode ter um papel importante na eficiência dessas proteínas na proteção da célula durante os estresse térmico.

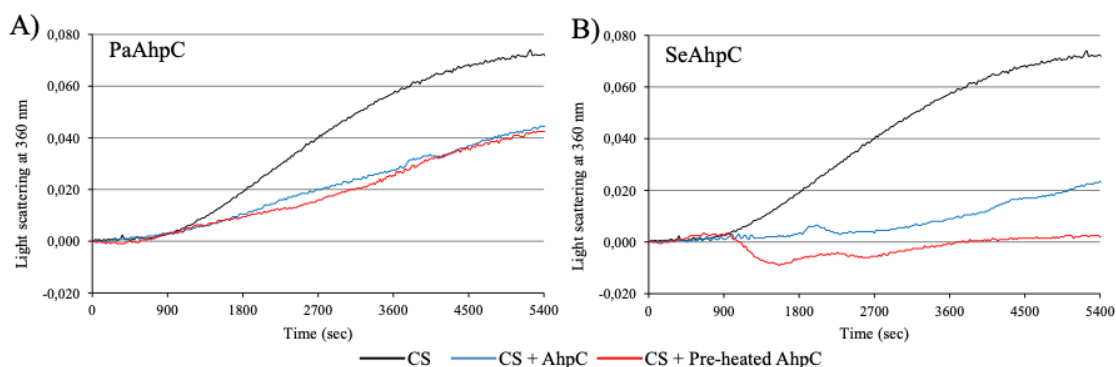


Figura 30: Proteção comparativa de PaAhpC e SeAhpC contra a agregação da citrato sintase (CS) induzida por estresse térmico. A atividade de chaperona de PaAhpC e SeAhpC foi monitorada por sua capacidade de proteger a citrato sintase (CS) da agregação induzida termicamente. A agregação de 2 μM de CS em 40 mM Hepes-KOH (pH = 7.5) foi monitorada por espalhamento de luz dinâmico ($\lambda = 360 \text{ nm}$) por 90 minutos, somente de CS ou na presença de 40 μM PaAhpC (A) ou SeAhpC (B). Os ensaios foram executados com a enzima pré-aquecida a 48°C durante 1 hora (linhas vermelhas) ou não (linhas azuis). Somente o CS foi usado como controle negativo (linhas pretas).

Concluindo esta subseção, neste trabalho foram abordadas as diferenças estruturais e funcionais entre Prx 2-Cys contendo um resíduo de Thr ou Ser na TC, sejam elas eucarióticas (Tsa1 e Tsa2) ou procarióticas (PaAhpC e SeAhpC). Nossos dados demonstraram pela primeira vez que AhpCs que contêm Ser na TC são mais resistentes à perda da atividade peroxidásica em função da superoxidação, além de sugerirem que peróxidos de lipídeos possam ser substratos importantes para estas enzimas. Demonstramos ainda que as AhpCs que possuem uma Ser na TC teriam uma atividade de chaperona mais eficiente em situação de estresse térmico. Estas características tornam a inibição de Prx de patógenos contendo Ser na TC bastante estratégica, pois levaria a inativação de uma proteína com um papel chave na defesa contra o estresse oxidativo e térmico, ambos enfrentados por esses organismos ao infectar o hospedeiro. Os resultados fazem parte de um conjunto de dados que foram compilados em um manuscrito (Apêndice E).

5.4 Caracterização de uma nova enzima antioxidante presente somente em bactérias envolvidas na resistência ao estresse por cianeto e oxidativo

Ainda durante este doutoramento, investiguei de forma ativa uma proteína hipotética identificada em *X. fastidiosa*, trabalho cuja minha contribuição se iniciou antes do doutoramento e os resultados mais relevantes serão apresentados a seguir de forma sucinta.

X. fastidiosa é um fitopatógeno pertencente à família Xanthomonadaceae, constituído por um grande grupo de bactérias Gram negativas que causam doenças em muitas culturas economicamente importantes. No genoma de *X. fastidiosa* foi encontrada uma ORF anotada como proteína do tipo glutaredoxina (glp) e análises executadas por nosso grupo revelou que o gene é altamente conservado entre os genomas de diferentes gêneros desta família. A proteína em questão é altamente expressa em *X. fastidiosa* (Smolka et al., 2002) e a análise das seqüências de proteínas GLP revelou três domínios proteicos: um semelhante ao monotiol glutaredoxinas (Grx), um *cluster* Fe-S e um domínio tiosulfato sulfurtransferase/rhodanese (Tst/Rho), que geralmente está envolvido no metabolismo do enxofre e na detoxificação de cianeto. Para caracterizar as propriedades bioquímicas das GLP, expressamos e purificamos a enzima recombinante GLP de *X. fastidiosa*. Nossos resultados revelaram que a proteína possui atividade significativa para a decomposição de cianeto, a qual é dependente de tiol (cisteína) (Figura 31A). Através de mutações sítio dirigidas, substituímos as duas cisteínas de GLP (C33 e C266) por serinas e identificamos a cisteína 266 do domínio C-terminal como a responsável pela atividade de rodansese (Figura 31B).

Esta descoberta pode ser muito importante pois alguns cultivares importantes afetados por este fitopatógeno podem produzir compostos cianogênicos em seu caule (Knowles 1976; Rajniak et al. 2015). Além disso, os vetores de *X. fastidiosa* são insetos alimentados com fluido xilema, e a produção de moléculas cianogênicas por muitas plantas é uma conhecida estratégia de defesa contra o insetos, o que pode indicar que as GLP são importantes para proteger os vetores contra este tipo de defesa do hospedeiro (Chatterjee et al., 2008; Mithöfer e Boland, 2012; Rubinstein, 1992). Em seguida efetuamos a expressão heteróloga de GLP de *X. fastidiosa* em *E. coli* e observamos que esta proteína é capaz de aumentar fortemente a resistência de *E. coli* ao cianeto (Figura 32).

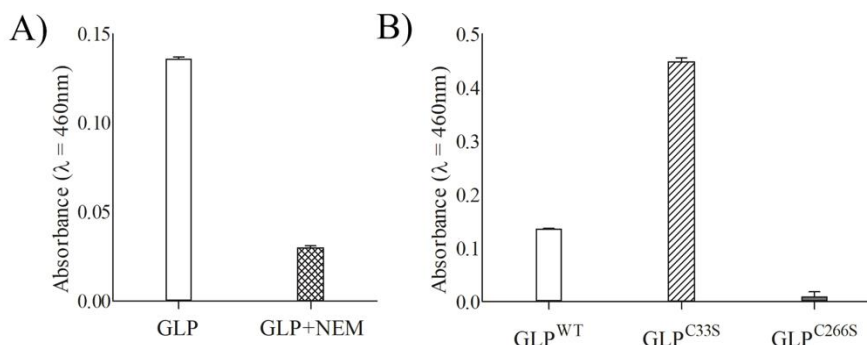


Figura 31: Envolvimento de resíduos de cisteína na atividade de sulfotransferase de GLP. (A) Os experimentos para verificar a atividade de sulfotransferase de GLP foram realizados após alquilação com NEM. Os ensaios foram realizados em 0.5 mL contendo 40 mM de fosfato de potássio pH=7.5, 50 mM de cianeto de potássio, 50 mM de tiossulfato de sódio e água ultrapura (q.s.p). As reações foram iniciadas pela adição de 1 μM de GLP com ou sem alquilação. Após 10 minutos, as reações foram interrompidas pela adição de uma solução de nitrato de formaldeído férrico. A formação de tiocianato férrico foi determinada espectrofotometricamente ($\lambda = 460\text{ nm}$). (B) Ensaio de atividade de sulfotransferase do GLP^{C33S} e GLP^{C266S} foi realizado como mencionado anteriormente, usando a enzima GLP do tipo selvagem ou GLP^{C33S} e GLP^{C266S}. Todos os ensaios foram realizados em triplicata três vezes.

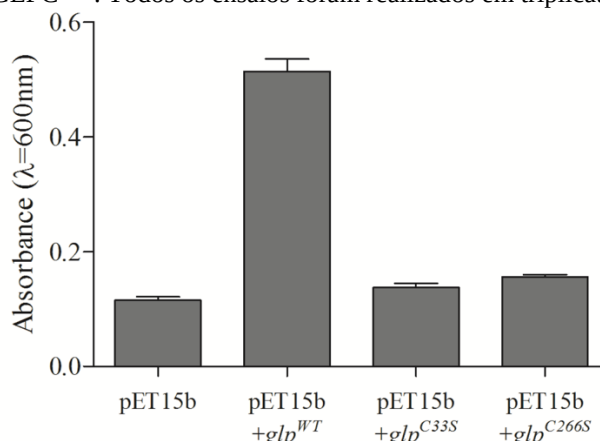


Figura 32: A expressão heteróloga de GLP confere alta resistência ao cianeto em *E. coli*. Resistência comparativa de células de *E. coli* contendo os plasmídeos pET15B, pET15b/*glp*, pET15b/*glpC33S* ou pET15b/*glpC266S*. Culturas celulares de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo vazio (pET15b) ou contendo o plasmídeo pET15b/*glp* em fase exponencial foram diluídas a $\text{OD}_{600} = 0.1$, expostas ao KCN⁺ (1.3 mM) e cultivadas a 37°C com a adição de IPTG 0.1 mM. As taxas de crescimento foram determinadas após 24 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata pelo menos três vezes com resultados similares.

Também demonstramos através da expressão heteróloga que GLP é capaz de conferir resistência ao estresse por H_2O_2 . Em conjunto estes dados revelam outra importante enzima contendo tióis que pode ter papel de grande relevância na infecção e sobrevivência de bactérias patogênicas em hospedeiros e as tornam promissores alvos para inibidores. Os resultados apresentados aqui em conjunto com resultados adicionais de análises bioquímicas e estruturais foram publicados no periódico *Applied Microbiology and Biotechnology* (Apêndice F).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho investigamos aspectos de tiol peroxidases de bactérias denominadas de AhpC (Prx 2-Cys típicas), uma vez que estas apresentam características estruturais e funcionais que as distingue de isoforma de eucariotos. Neste contexto, buscamos caracterizar diferenças ainda não identificadas de ligação com substratos e aspectos funcionais entre enzimas contendo Thr ou Ser como parte da TC por meio de abordagens envolvendo análises funcionais e estruturais. Demonstramos pela primeira vez que Adn, uma molécula inicialmente descrita como inibidora de isoformas de Prx 2-Cys típicas humanas, é capaz de inibir a atividade peroxidásica de AhpCs. A avaliação da atividade peroxidásica de AhpCs contendo Thr ou Ser na TC, realizada através de ensaios de oxidação do DTT, indicaram que proteínas contendo Ser seriam inibidas por Adn com maior eficiência do que aquelas contendo Thr. Mutações sítio dirigidas demonstraram ainda que a presença da Ser na TC promove um aumento da velocidade inicial de reação, o que até o momento não havia sido descrito na literatura. Adicionalmente, Adn apresentou valores de IC_{50} para EcAhpC bastante reduzidos em comparação com os das proteínas humanas (5-50 $\times$). Essa maior afinidade de Adn por proteínas bacterianas é bastante relevante pois a utilização desta molécula como um antibiótico poderia apresentar toxicidade para as bactérias com reações adversas reduzidas para o hospedeiro, uma vez que sua citotoxicidade é baixa para mamíferos.

Análises da toxicidade de Adn sobre células bacterianas revelaram que essa molécula é capaz de inibir eficientemente o crescimento de bactérias contendo Ser como parte da TC das AhpCs, ao passo que bactérias contendo Thr nessa posição cresceram normalmente na presença do composto. Entretanto, as bactérias resistentes à Adn pertencem à classe das Gram-negativas, enquanto as sensíveis pertencem às Gram-positivas e, dessa forma, a resistência à Adn poderia estar relacionada à presença da membrana externa nessas bactérias. De fato, após a permeabilização da membrana externa de *E. coli* com PMBN, Adn passou a apresentar elevada toxicidade também para essas bactérias, indicando que Adn pode representar um composto potencial para ser utilizada como antibiótico tanto para bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, em associação a PMBN.

Através de parcerias estabelecidas neste projeto com o grupo do Prof. Dr. João H. G. Lago, foram selecionadas moléculas da biota brasileira para triagem de inibidores e identificamos um novo composto (C-3) extraído de *Calea pinnatifida*, uma planta

costeira da Mata Atlântica, que apresentou elevada atividade inibitória sobre AhpC e Trx de *E. coli*. Diferentemente de Adn, que é um diterpenóide, C-3 pertence à classe das lactonas sesquiterpênicas, a qual nunca havia sido descrita como inibidora de Prx. Os resultados obtidos indicam que C-3 possui capacidade de inibir a atividade peroxidásica de EcAhpC em níveis semelhantes aos de Adn, sendo que doses estequiométricas são suficientes para inibir metade da velocidade inicial de reação. Nossos resultados indicam ainda uma maior seletividade deste composto para as Prx 2-Cys, uma vez que a inibição de Trx foi muito inferior ao observado para Adn. Esses dados representam um importante passo na prospecção de uma nova classe de compostos antibacterianos oriunda da biodiversidade brasileira. É importante salientar que não houveram grandes diferenças na taxas de inibição por este composto de AhpCs contendo Thr ou Ser na TC.

Adicionalmente, investigamos se a substituição de Thr por Ser poderia trazer implicações funcionais e estruturais a AhpCs no que tange aspectos como suscetibilidade a superoxidação por diferentes substratos oxidantes (peróxidos) e atividade de chaperona molecular, bem como a distribuição desta substituição entre os organismos. A análise de estruturas primárias de Prx 2-Cys depositadas no banco de dados GeneBank, revelou que a presença da Ser na TC é um evento bastante raro em proteínas eucarióticas, mas presente quase que exclusivamente em procariotos, em especial, em bactérias, sendo muitas delas patogênicas. Ainda no que concerne a ligantes, a análises de compostos que agem como inibidores de Prx 2-Cys típicas possuem como característica comum um esqueleto hidrofóbico volumoso e, neste contexto, esta característica poderia estar relacionada também à afinidade dessas proteínas aos ligantes oxidantes. Nossos resultados revelaram que, além da presença de Ser na TC aumentar a resistência a superoxidação, CHP foi capaz de promover de forma mais eficiente a superoxidação de AhpCs. De forma bastante importante, quando esta substituição ocorre em proteínas de eucariotos contendo Ser, estas se tornam significativamente resistentes a superoxidação, revelando que as diferenças estruturais entre as enzimas dos dois grupos de organismos resultam em diferenças funcionais bastante marcantes.

Finalmente, também caracterizamos funcionalmente uma tiól proteína de *X. fastidiosa* denominada de GLP. Por meio de trabalhos envolvendo a análise de todas as sequências similares presentes no GeneBank do NCBI demonstramos que estas

proteínas estão presentes apenas em bactérias, sendo muitas patogênicas para animais e plantas. Por meio de ensaios bioquímicos *in vitro* demonstramos que esta enzima é capaz de detoxificar o cianeto eficientemente e que esta atividade é mediada por um resíduo de Cys. Através de experimentos *in vivo* envolvendo a expressão heteróloga de GLP demonstramos que esta enzima é capaz de conferir resistência ao cianeto e ao H_2O_2 .

Conjuntamente os resultados obtidos nesta investigação levou a validação de tiól proteínas como as AhpCs e a GLP como novos alvos proteicos para o combate de bactérias patogênicas. Identificamos ainda dois inibidores para AhpC, sendo um deles oriundo da biodiversidade florística costeira do estado de São Paulo.

7. PERSPECTIVAS

O presente trabalho levantou diversas perspectivas para o desenrolar de novas pesquisas, dentre as quais destacamos as seguintes:

- Determinação da MIC para Adn de linhagens de bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium*) contendo Thr como parte de TC após permeabilização química.** Uma vez determinado que Adn apresenta toxicidade para *E. coli* quando utilizada em conjunto com PMBN, um próximo passo importante seria determinar a MIC para as linhagens bacterianas Gram-negativas utilizadas neste trabalho e, dessa forma, comparar com os resultados obtidos para as linhagens Gram-positivas e observar se existe relação com os dados dos ensaios enzimáticos.

- Avaliação dos efeitos da ligação de Adn sobre estrutura de AhpCs.** Através de análises por SEC e CD, seria possível avaliar se existem e quais são as alterações nas estruturas quaternária e secundária promovidas pela interação de Adn com AhpC e se a presença de uma Thr ou Ser na TC pode afetar de alguma forma a ligação de Adn a essas proteínas.

- Determinação da MIC para C-3 de *S. aureus* e linhagens de bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium*) após permeabilização da ME com PMBN.** Uma vez determinado neste trabalho que C-3 é capaz de inibir a atividade peroxidásica de EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S} com eficiência semelhante à de Adn, além de EcTrx1 com menor eficiência, e apresentou toxicidade para *B. subtilis* e *S. epidermidis*, uma próxima etapa importante seria avaliar a toxicidade deste composto

sobre *S. aureus* e linhagens Gram negativas após permeabilização da ME com PMBN, da mesma forma realizada para Adn.

•Determinação do modelo de ligação de composto de Adn e C-3 em AhpC.

Neste trabalho identificamos o primeiro inibidor de Prx 2-Cys pertencente à classe das lactonas sesquiterpênicas e nossos resultados indicam que a ligação do composto ocorre nas cisteínas reativas. Entretanto, o modo de interação ou qual resíduo de cisteína está envolvido não está determinado. Estes aspectos podem ser investigados em metodologias envolvendo espectrometria de massas para a análise de AhpCs previamente tratadas com C-3 e procedimentos de *docking* molecular do composto, podendo fornecer importantes informações sobre quais cisteínas ou outros resíduos estão envolvidos na interação para estabilidade do composto.

•Determinação da estrutura cristalográfica de AhpC de *S. typhimurium* após tratamento com Adn ou C-3. Este objetivo é bastante ambicioso uma vez que os compostos ou são muito caros (Adn) ou disponibilizados em quantidades diminutas para triagens de cristalização. Por este motivo, para aumentar as chances de se obter sucesso, será utilizada AhpC de *S.typhimurium*, pois já foram descritas mais de uma dezena de condições de cristalização. Neste contexto, seriam utilizadas condições previamente identificadas e a obtenção de complexos proteína-ligantes seria efetuada por co-cristalização ou *soaking*.

•Avaliação da atividade de holdase de Prx 2-Cys típicas contendo Thr ou Ser na TC. Uma vez que determinado que as proteínas selvagens PaAhpC e SeAhpC de bactérias conferem maior proteção de proteínas contra a denaturação térmica, é importante determinar o que ocorre para as proteínas PaAhpC^{T44S} e SeAhpC^{S46T} e também com enzimas de levedura contendo Thr ou Ser na TC (Tsa1, Tsa2, Tsa1^{T44S}, e Tsa2^{S44T}) para avaliar de forma comparativa o efeito de substituições de Thr por Ser em proteínas selvagens e mutantes de procariotos e eucariotos.

•Determinação da estrutura molecular de espécies hiperoxidadas de Prx 2-Cys típicas de procariotos e eucariotos contendo Thr/Ser. Estas abordagens são importantes pois já foram detectados diferentes tipos de complexos moleculares de alto peso molecular formado por Prx 2-Cys típicas (toroides e esféricos). Entretanto, apesar da substituição de Thr por Ser levar a alterações na estrutura quaternária de proteínas oxidadas e reduzidas, esta substituição nunca foi avaliada à luz da formação de diferentes complexos em bactérias.

•**Identificação de novos inibidores de forma racional.** Iniciamos este trabalho com a escolha de compostos feita de forma racional pelo Prof. Dr. Joao H. G. Lago, baseado principalmente no esqueleto hidrofóbico e volumoso dos compostos. Os dados obtidos neste trabalho e novos dados da literatura permitem inferir que além do esqueleto volumoso e caráter hidrofóbico dos compostos, um acceptor de Michael é importante para o estabelecimento da interação entre proteína e ligante. Desta forma, serão testados novos compostos contendo estas duas características, em variadas formas e tamanhos.

•**Avaliação das taxas de decomposição de hidroperóxidos de lipídeos de relevância biológica por AhpCs.** Apesar de estudos demonstrarem que para determinadas tiól peroxidases existem taxas de decomposição na ordem de $10^8 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (hidroperóxido de ácido oleico para Ohr e de ácido araquidônico para AhpE), nenhum estudo visou avaliar as taxas de decomposição de hidroperóxidos de lipídeos de relevância biológicas por AhpC. O maior entendimento de seus substratos biológicos pode levar à identificação de inibidores mais eficientes.

REFERÊNCIAS

- van Acker, H.; Gielis, J.; Acke, M.; Cools, F.; Cos, P.; Coenye, T. 2016. The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Induced Cell Death in *Burkholderia cepacia* Complex Bacteria. *PLoS One*, 11(7) e0159837.
- Alegria, T. G. P.; Meireles, D. A.; Cussiol, J. R. R.; Hugo, M.; Trujillo, M.; de Oliveira, M. A.; Miyamoto, S.; Queiroz, R. F.; Valadares, N. F.; Garratt, R. C.; Radi, R.; Di Mascio, P.; Augusto, O.; Netto, L. E. S. 2016. Ohr plays a central role in bacterial responses against fatty acid hydroperoxides and peroxynitrite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 114(2):E132-E141.
- Aminov, R. I. 2010. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in microbiology*, 1, 134.
- Ayres, H.; Furr, J. R.; Russell, A. D. 1993. A rapid method of evaluating permeabilizing activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Biology*, 17(4):149-151.
- Ayres, H.; Furr, J. R.; Russell, A. D. 1999. Effect of permeabilizers on antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Biology*, 28(1):13-16.
- Babior, B. M. 2004. NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology*, 16:42-47.
- Bartlett, J. G.; Gilbert, D. N. & Spellberg, B. 2013. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 56(10): 1445-1450.
- Benov, L. T. & Fridovich, I. *Escherichia coli* expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. 1994. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(41): 25310-25314.
- Birben, E.; Sahiner, U. M.; Sackesen, C.; Erzurum, S. & Kalayci, O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5(1): 9-19.
- Biteau, B.; Labarre, J. & Toledano, M. B. 2003. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature*, 425, 980-984.
- Bizzini, A.; Zhao, C.; Auffray, Y. & Hartke, A. 2009. The *Enterococcus faecalis* superoxide dismutase is essential for its tolerance to vancomycin and penicillin. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(6): 1196-1202.
- Breidenstein, E. B. M.; Khaira, B. K.; Wiegand, I.; Overhage, J.; Robert E W Hancock, R. E. W. 2008. Complex ciprofloxacin resistome revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(12):4486-4491.
- Brennan, R. E.; Kiss, K.; Baalman, R. & Samuel, J. E. 2015. Cloning, expression, and characterization of a *Coxiella burnetii* Cu/Zn Superoxide dismutase. *BMC Microbiology*, 15:99.
- Brynildsen, M. P.; Winkler, J. A.; Spina, C. S.; MacDonald, C.; Collins, J. J. 2013. Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production. *Nature Biotechnology*, 31(2):160-165.
- Calcerrada, P.; Peluffo, G. & Radi, R. 2011. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. *Current Pharmaceutical Design*, 17(35):3905-3932.
- Calhoun, L. N. & Kwon, Y. M. 2011. The ferritin-like protein Dps protects *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from the Fenton-mediated killing mechanism of bactericidal antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(3):261-265.

- Carvalho, L. A. C.; Truzzi, D. R.; 1, Fallani, T. S.; Alves, S. V.; Toledo Jr, J. C.; Augusto, O.; Netto, L. E. S.; Meotti, F. C. 2017. Urate hydroperoxide oxidizes human peroxiredoxin 1 and peroxiredoxin 2. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(21):8705-8715.
- Cassini, A.; Högberg, L. D.; Plachouras, D.; Quattrocchi, A.; Hoxha, A.; Simonsen, G. S.; Colomb-Cotin, M.; Kretzschmar, M. E.; Devleesschauwer, B.; Cecchini, M.; Ouakrim, D. A.; Oliveira, T. C.; Struelens, M. J.; Suetens, C.; Monnet, D. L. 2019. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 19: 56–66.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention, Office of Infectious Disease. 2013. Antibiotic resistance threats in the United States.
- Chaves-Moreno, D.; Wos-Oxley, M. L.; Jáuregui, R.; Medina, E.; Oxley, A. P.; Pieper, D. H. 2016. Exploring the transcriptome of *Staphylococcus aureus* in its natural niche. *Scientific Reports*, 6:33174.
- Chen, E. & Kuo, T. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acid Research*, 21(9):2260.
- Chen; Chih-Jung; Yhu-Chering Huang; Shian-Sen Shie. 2020. Evolution of Multi-Resistance to Vancomycin, Daptomycin, and Linezolid in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Causing Persistent Bacteremia. *Frontiers in microbiology*, 11: 1414.
- Chopra, I.; Hesse, L. & O'Neill, A. J. 2002. Exploiting current understanding of antibiotic action for discovery of new drugs. *Journal of Applied Microbiology*, 92(s1):4S–15S.
- Chuang, M. H.; Wu, M. S.; Lo, W. L.; Lin, J. T.; Wong, C. H.; Chiou, S. H. 2006. The antioxidant protein alkylhydroperoxide reductase of *Helicobacter pylori* switches from a peroxide reductase to a molecular chaperone function. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, 103:2552-2557.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically – Approved Standard, 10th Edition – Janeiro de 2015.
- Collet, J-F & Messens, J. 2010. Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxidant & Redox Signaling*, 13:1205-16.
- Condeles, A. L.; Gomes, F.; 2, de Oliveira, M. A.; Netto, L. E. S.; Toledo Junior, J. C. 2020. Thiol Peroxidases as Major Regulators of Intracellular Levels of Peroxynitrite in Live *Saccharomyces cerevisiae* Cells. *Antioxidants (Basel Switzerland)*, 9(5):434. doi: 10.3390/antiox9050434.
- Cosgrove, K.; Coutts, G.; Jonsson, I-M.; Tarkowski, A.; Kokai-Kun, J. F.; Mond, J. J.; Foster, S. J. 2007. Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 189:1025-35.
- Dadgostar, P. 2019. Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infect Drug Resist.*, 12:3903-3910. doi: 10.2147/IDR.S234610.
- Davies, B. W.; Kohanski, M. A.; Simmons, L. A.; Winkler, J. A.; Collins, J. J.; Walker, G. C. 2009. Hydroxyurea induces hydroxyl radical-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Molecular Cell*, 36(5):845–860.
- Delcour, A. H. 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794(5):808-16.

- Desbois, A. P.; Lawlor, K. C. 2013. Antibacterial activity of long-chain polyunsaturated fatty acids against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*. *Mar Drugs*, 11(11):4544-57.
- Discola KF, Oliveira MA, Silva GM, Barcena JA, Porras P, Padilla A, Netto LE, Guimarães BG (2005). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of glutaredoxin 2 from *Saccharomyces cerevisiae* in different oxidation states. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 61:445-7.
- Docquier, J. D. & Mangani S. 2018. An update on β -lactamase inhibitor discovery and development. *Drug Resistance Updates*, 36:13-29.
- Dryden, M. 2018. Reactive oxygen species: a novel antimicrobial. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(3):299-303.
- Dutra, L. M.; Bomfim, L. M.; Rocha, S. L. A.; Nepel, A.; 3, Soares, M. B. P.; Barison, A.; Costa, E. V.; Bezerra, D. P. 2014. *ent*-Kaurane diterpenes from the stem bark of *Annona vepretorum* (Annonaceae) and cytotoxic evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24:3315-20.
- Dwyer, D. J.; Belenky, P. A.; Yang, J. H.; MacDonald, I. C.; Martell, J. D.; Takahashi, N.; Chan, C. T. Y.; Lobritz, M. A.; Braff, D.; Schwarz, E. G.; Ye, J. D.; Pati, M.; Vercruysse, M.; Ralifo, P. S.; Allison, K. R.; Khalil, A. S.; Ting, A. Y.; Walker, G. C.; Collins, J. J. 2014. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, 111:E2100-9.
- ECDC/EMA (European Centre for Disease Prevention and Control/ European Medicines Evaluation Agency) Joint Technical Report: The bacterial challenge: time to react. 2009.
- Egan, S. A.; Shore, A. C.; O'Connell, B.; Brennan, G. I.; Coleman, D. C. 2020. Linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from hospitalized patients in Ireland: high prevalence of the MDR genes *optrA* and *poxtA* in isolates with diverse genetic backgrounds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75:1704-1711.
- Eichenberger, E. M.; Thaden, J. T. 2019. Epidemiology and mechanisms of resistance of extensively drug resistant Gram-negative bacteria. *Antibiotics*, 8(2), 37.
- Fernandes, P.; Martens, E. & Pereira, D. 2017. Nature nurtures the design of new semi-synthetic macrolide antibiotics. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 70(5):527-533.
- Feretzakis, G.; Loupelis, E.; Sakagianni, A.; Skarmoutsou, N.; Michelidou, S.; Velentza, A.; Martsoukou, M.; Valakis, K.; Petropoulou, S.; Koutalas, E. 2019. A 2-Year Single-Centre Audit on Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* Strains from an Intensive Care Unit and Other Wards in a General Public Hospital in Greece. *Antibiotics*, 8(2):62.
- Fidyt, K.; Pastorczak, A.; Goral, A.; Szczygiel, K.; Fendler, W.; Muchowicz, A.; Bartłomiejczyk, M. A.; Madzio, J.; Cyran, J.; Graczyk-Jarzynka, A.; Jansen, E.; Patkowska, E.; Lech-Maranda, E.; Pal, D.; Blair, H.; Burdzinska, A.; Pedzisz, P.; Głodkowska-Mrowka, E.; Demkow, U.; Gawle-Krawczyk, K.; Matysiak, M.; Winiarska, M.; Juszczynski, P.; Mlynarski, W.; Heidenreich, O.; Golab, J.; Firczuk, M. 2019. Targeting the thioredoxin system as a novel strategy against B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Mol Oncol.* (5):1180-1195. doi: 10.1002/1878-0261.12476. Epub 2019 Apr 5. PMID: 30861284; PMCID: PMC6487705.

- Foti, J. J.; Devadoss, B.; Winkler, J. A.; Collins, J. J.; Walker, G. C. 2012. Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science*, 336(6079):315–319.
- Fritzsche, C.; Schleicher, U. & Bogdan, C. 2010. Endothelial nitric oxide synthase limits the inflammatory response in mouse cutaneous leishmaniasis. *Immunobiology*, 215(9–10): 826–832.
- Giguère, S. P. J.; Baggot, J. D.; Walker, R. D.; Dowling, P.M. 2007. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 4^o edição. *The Canadian Veterinary Journal*, 48(7): 744.
- Girgis, H. S.; Hottes, A. K.; Tavazoie, S. 2009. Genetic architecture of intrinsic antibiotic susceptibility. *PLoS One*, 4(5):e5629.
- Golkar, Z.; Bagazra, O.; Pace, D. G. 2014. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(2):129–136.
- Gordon, S. 2016. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity*, 44(3): 463–475.
- Grant, S. S.; 1, Kaufmann, B. B.; Chand, N. S.; Haseley, N.; Hung, D. T. 2012. Eradication of bacterial persisters with antibiotic-generated hydroxyl radicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 109(30):12147–12152.
- Gusarov, I.; Shatalin, K.; Starodubtseva, M.; Nudler, E. 2009. Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science*, 325(5946):1380–1384.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. 2015. Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press*, 5a Edição, 896p.
- Heikkilä, R. E. & Cohen, G. 1977. The inactivation of copper-zinc superoxide dismutase by diethyldithiocarbamate. In: *Superoxide and Superoxide Dismutases*. London, UK: Academic Press, 367–373.
- Hébrard, M.; Viala, J. P. M.; Méresse, S.; Barras, F.; Aussel, L. 2009. Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to *Salmonella* virulence and oxidative stress resistance. *Journal of Bacteriology*, 191:4605–4614.
- Hou, J. K.; Huang, Y.; He, W.; Yan, Z. W.; Fan, L.; Liu, M. H.; Xiao, W. L.; Sun, H. D. & Chen, G. Q. 2014. Adenanthin targets peroxiredoxin I/II to kill hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death & Disease*, 5: e1400.
- Ibacache-Quiroga, C.; Oliveros, J. C.; Couce, A.; Blázquez, J. 2018. Parallel Evolution of High-Level Aminoglycoside Resistance in *Escherichia coli* Under Low and High Mutation Supply Rates. *Frontiers in Microbiology*, 9:427. doi: 10.3389/fmicb.2018.00427.
- Imlay, J. A. 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual Review of Biochemistry*, 77:755–76.
- Jacobson, F. S.; Morgan, R. W.; Christman, M. F.; Ames, B. N. 1989. An alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium* involved in the defense of DNA against oxidative damage. Purification and properties. *J Biol Chem*, 264(3):1488–96.
- Jaeger, T.; Flohé, L. 2006. The thiol-based redox networks of pathogens: unexploited targets in the search for new drugs. *Biofactors*, 27:109–20.
- Jang, S.; Imlay, J. A. 2010. Hydrogen peroxide inactivates the *Escherichia coli* Isc iron-sulphur assembly system, and OxyR induces the Suf system to compensate. *Molecular Microbiology*, 78:1448–67.

- Jee, J.; Rasouly, A.; Shamovsky, I.; Akivis, Y.; Steinman, S. R.; Mishra, B.; Nudler, E. 2016. Rates and mechanisms of bacterial mutagenesis from maximum-depth sequencing. *Nature*, 534:693-6.
- Jiang, Q., E, F.; Tian, J.; Yang, J.; Zhang, J.; Cheng, Y. 2020. Light-excited antibiotics for potentiating bacterial killing via reactive oxygen species generation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(14):16150-16158.
- Jönsson, T. J.; Ellis, H. R. & Poole, L. B. 2007. Cysteine reactivity and thiol-disulfide interchange pathways in AhpF and AhpC of the bacterial alkyl hydroperoxide reductase system. *Biochemistry*, 46: 5709-5721.
- Kamariah, N.; Eisenhaber, B.; 1, Eisenhaber, F.; Grüber, G. 2018. Molecular mechanism of the *Escherichia coli* AhpC in the function of a chaperone under heat-shock conditions. *Scientific Reports*, 8(1):14151.
- Kamariah, N.; Eisenhaber, B.; Eisenhaber, F.; Grüber, G. 2018. Active site C P-loop dynamics modulate substrate binding, catalysis, oligomerization, stability, over-oxidation and recycling of 2-Cys Peroxiredoxins. *Free Radical Biology and Medicine*, 118, 59-70.
- Kang, T. M.; Yuan, J.; Nguyen, A.; Becket, E.; Yang, H.; Miller, J. H. 2012. The aminoglycoside antibiotic kanamycin damages DNA bases in *Escherichia coli*: caffeine potentiates the DNA-damaging effects of kanamycin while suppressing cell killing by ciprofloxacin in *Escherichia coli* and *Bacillus anthracis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56:3216–3223.27.
- Kim, K.; Kim, I. H.; Lee, K. Y.; Rhee, S. G.; Stadtman, E. R. 1988. The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. *The Journal of Biological Chemistry*, 263:4704-11.
- Kohanski, M. A.; Dwyer, D. J.; Wierzbowski, F.; Cottarel, G.; Collins, J. J. 2008. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell*, 135:679–690.
- Kohanski, M. A.; Dwyer, D. J.; Collins, J. J. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8:423-35.
- Krishnamoorthy, G.; Leus, I. V.; Weeks, J. W.; Wolloscheck, D.; Rybenkov, V. V.; Zgurskaya, H. I. 2017. Synergy between Active Efflux and Outer Membrane Diffusion Defines Rules of Antibiotic Permeation into Gram-Negative Bacteria. *mBio*, 8(5). pii: e01172-17.
- Lakaye, B.; Dubus, A.; Joris, B.; Frère, J. M. 2001. Method for estimation of low outer membrane permeability to beta-lactam antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(9):2901-7.
- Lee, W.; Choi, K-S.; Riddell, J.; Ip, C.; Ghosh, D.; Park, J-H.; Park, Y. M. 2007. Human peroxiredoxin 1 and 2 are not duplicate proteins: the unique presence of CYS83 in Prx1 underscores the structural and functional differences between Prx1 and Prx2. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 22011.
- Lee, J. T.; Lee, S. S.; Mondal, S.; Tripathi, B. N.; Kim, S.; Lee, K. W.; Hong, S. H.; Bai, H. W.; Cho, J. Y.; Chung, B. Y. 2016. Enhancement of the chaperone activity of alkyl hydroperoxide reductase C from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 resulting from a point-specific mutation confers heat tolerance in *Escherichia coli*. *Molecules and Cells*, 39(8):594-602.
- Lennon, B. W.; Williams, C. H.; Ludwig, M. L. 2000. Twists in catalysis: alternating conformations of *Escherichia coli* thioredoxin reductase. *Science*, 289(5482):1190-4.

- Ling, J.; Cho, C.; Guo, L-T.; Aerni, H. R.; Rinehart, J.; Söll, D. 2012. Protein aggregation caused by aminoglycoside action is prevented by a hydrogen peroxide scavenger. *Molecular Cell*, 48:713–722.
- Link, A. J.; Robison, K.; Church, G. M. 1997. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis*, 18: 1259-1313.
- Liu, C.; Yin, Q. Q.; Zhou, H. C.; Wu, Y. L.; Pu, J. X.; Xia, L.; Liu, W.; Huang, X.; Jiang, T.; Wu, M. X.; He, L. C.; Zhao, Y. X.; Wang, X. L.; Xiao, W. L.; Chen, H. Z.; Zhao, Q.; Zhou, A. W.; Wang, L. S.; Sun, H. D.; Chen, G. Q. 2012. Adenanthin targets peroxiredoxin I and II to induce differentiation of leukemic cells. *Nature Chemical Biology*, 8(5):486-93.
- Liu, C. X.; Zhou, H. C.; Yin, Q. Q.; Wu, Y. L. & Chen, G. Q. 2013. Targeting peroxiredoxins against leukemia. *Experimental Cell Research*, 319(2): 170–176.
- Lu, X.; Roe, F.; Jesaitis, A. & Lewandowski, Z. 1998. Resistance of biofilms to the catalase inhibitor 3-amino-1,2, 4-triazole. *Biotechnology and Bioengineering*, 60(1): 135.
- Lu, J. & Holmgren, A. 2014. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology & Medicine*, 66:75-87.
- Mehta, N. S.; Benoit, S. L.; Mysore, J.; Maier, R. J. 2007. In vitro and in vivo characterization of alkyl hydroperoxide reductase mutant strains of *Helicobacter hepaticus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770:257-65.
- Mendes, R. E.; Deshpande, L. M.; Jones, R. N. 2014. Linezolid update: stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resistance Updates*, 17(1-2):1-12.
- Michael, C. A.; Dominey-Howes, D. & Labbate, M. 2014. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Frontiers in Public Health*, 2:145.
- Ministério da Saúde – Brasil. 2018. Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única.
- Mishra, S. & Imlay, J. 2012. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2): 145–160.
- Mo, Y. X.; Liu, D. L.; Gao, S. L.; Yin, X.C. 2019. Adenanthin Induces Differentiation of Acute Promyelocytic Leukemia Cells by Targeting Peroxiredoxin III. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*.(4):1083-1087. Chinese. doi: 10.19746/j.cnki.issn.1009-2137.2019.04.015. PMID: 31418361.
- Moss, C. W.; Samuels, S. B.; Weaver, R. E. 1972. Cellular fatty acid composition of selected *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol.* 24(4):596-8. PMID: 4628797; PMCID: PMC380620.
- Muchowicz, A.; Firczuk, M.; Chlebowska, J.; Nowis, D.; Stachura, J.; Barankiewicz, J.; Trzeciecka, A.; Kłossowski, S.; Ostaszewski, R.; Zagożdżon, R.; Pu, J. X.; Sun, H. D.; Golab, J. 2014. Adenanthin targets proteins involved in the regulation of disulphide bonds. *Biochemical Pharmacology*, 89(2):210-6.
- Murata, T.; Tseng, W.; Guina, T.; Miller, S. I.; Nikaido, H. 2007. PhoPQ-mediated regulation produces a more robust permeability barrier in the outer membrane of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 189(20):7213-22.
- Netto, L. E. S.; Chae, H. Z.; Kang, S. W.; Rhee, S. G.; Stadtman, E. R. 1996. Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 271:15315-21.

- Nguyen, D.; Joshi-Datar, A.; Lepine, F.; Bauerle, E.; Olakanmi, O.; Beer, K.; McKay, G.; Siehnel, R.; Schafhauser, J.; Wang, Y.; Britigan, B. E.; Singh, P. K. 2011. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science*, 334: 982–986.
- Nieto, L. M.; Mehaffy, C.; Creissen, E.; Troudt, J.; Troy, A.; Bielefeldt-Ohmann, H.; Burgos, M.; Izzo, A.; Dobos, K. M. 2016. Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* after Acquisition of Isoniazid Resistance: Individual Nature of katG Mutants and the Possible Role of AhpC. *PLoS One*, 11(11):e0166807.
- Niimura, Y.; Poole, L. B.; Massey, V. 1995. *Amphibacillus xylanus* NADH oxidase and *Salmonella typhimurium* alkyl-hydroperoxide reductase flavoprotein components show extremely high scavenging activity for both alkyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in the presence of *S. typhimurium* alkyl-hydroperoxide reductase 22-kDa protein component. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (43): 25645-25650.
- Nikaido, H.; Basina, M.; Nguyen, V.; Rosenberg, E. Y. 1998. Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those beta-lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *Journal of Bacteriology*, 180(17):4686-92.
- Niles, J. C.; Wishnok, J. S. & Tannenbaum, S. R. 2006. Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide : Biology and Chemistry*, 14(2): 109–121.
- Nogueira, M. S.; Da Costa, F. B.; Brun, R.; Kaiser, M.; Schmidt, T. J. 2016. *ent*-Pimarane and *ent*-Kaurane Diterpenes from *Aldama discolor* (Asteraceae) and Their Antiprotozoal Activity. *Molecules*, 21(9), 1237.
- Ogusucu, R.; Rettori, D.; Munhoz, D. C.; Netto, L. E. S., Augusto, O. 2007. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. *Free Radical Biology & Medicine*, 42(3):326-34. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.10.042.
- Oh, E. & Jeon, B. 2014. Role of alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) in the biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One*, 9:e87312.
- Oliveira M. A.; Netto, L. E.; Medrano, F.J.; Barbosa, J.A.; Alves, S.V.; Cussiol, J.R.; Guimarães, B.G. (2004). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an oxidized state of Ohr from *Xylella fastidiosa*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 60: 337-9.
- Oliveira, M. A.; Discola, K. F.; Alves, S. V. Medrano, F. J.; Guimarães, B. G. & Netto, L. E. 2010. Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. *Biochemistry*, 49: 3317-3326.
- O'Shea, R.; Moser, H. E. 2008. Physicochemical properties of antibacterial compounds: implications for drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(10):2871-8.
- Oteo, J.; Aracil, M. B. 2015. Molecular characterization of resistance mechanisms: methicillin resistance *Staphylococcus aureus*, extended spectrum β -lactamases and carbapenemases. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2:27–33, 2015.
- Parsonage, F.; Youngblood, D. S.; Sarma, G. N.; Wood, Z. A.; Karplus, P. A.; Poole, L. B. 2005. Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Biochemistry*, 44:10583-92.
- Peskin, A. V.; Cox, A. G.; Nagy, P.; Morgan, P. E.; Hampton, M. B.; Davies, M. J.; Winterbourn, C. C. 2010. Removal of amino acid, peptide and protein

- hydroperoxides by reaction with peroxiredoxins 2 and 3. *The Biochemical Journal*, 432, 313–21.
- Piddock, L. J. 2012. The crisis of no new antibiotics—what is the way forward? *The Lancet Infectious Diseases*, 12(3):249–253.
- Poole, L. B. & Ellis, H. R. 1996. Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. 1. Purification and enzymatic activities of overexpressed AhpF and AhpC proteins. *Biochemistry*, 35:56–64.
- Poole, L. B.; Hall, A. & Nelson, K. J. 2011. Overview of peroxiredoxins in oxidant defense and redox regulation. *Current Protocols in Toxicology*, Capítulo 7:Unidade7.9. doi: 10.1002/0471140856.tx0709s49.
- Prolo, C.; Alvarez, M. N. & Radi, R. 2013. Peroxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens. *BioFactors (Oxford, England)*, 40(2): 215–25.
- Prost, I.; Dhondt, S.; Rothe, G.; Vicente, J.; Rodriguez, M. J.; Kift, N.; Carbonne, F.; Griffiths, G.; Esquerré-Tugayé, M. T.; Rosahl, S.; Castresana, C.; Hamberg, M.; Fournier, J. 2005. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiol.*, 139(4):1902–13. doi: 10.1104/pp.105.066274. Epub 2005 Nov 18. PMID: 16299186; PMCID: PMC1310568.
- Purrello, S. M.; Garau, J.; Giamarellos, E.; Mazzei, T.; Pea, F.; Soriano, A.; Stefani, S. 2016. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of the currently available treatment options. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 7:178–186.
- Radi, R. 2018. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115:(23) 5839–5848.
- Reardon, S. 2015. Spread of antibiotic-resistance gene does not spell bacterial apocalypse — yet. *Nature*, doi: 10.1038/nature.2015.19037.
- Rhee, S. G. 2016. Overview on Peroxiredoxin. *Molecules and Cells*, 39(1):1–5.
- Roberts, B. & Hirst, R. 1996. Identification and characterisation of a superoxide dismutase and catalase from *Mycobacterium ulcerans*. *Journal of Medical Microbiology*, 45(5):383–7.
- Rossolini, G. M.; Arena, F.; Pecile, P.; Pollini, S. 2014. Update on the antibiotic resistance crisis. *Current Opinion in Pharmacology*, 18:56–60.
- Rudin, L.; Sjöström, J-A.; Lindberg, M.; Philipson, L. 1974. Factors Affecting Competence for Transformation in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 118(1): 155–164.
- Salmelin, C.; Hovinen, J.; Vilpo, J. 2000. Polymyxin permeabilization as a tool to investigate cytotoxicity of therapeutic aromatic alkylators in DNA repair-deficient *Escherichia coli* strains. *Mutation Research*, 467(2):129–38.
- Scudamore, R. A.; Beveridge, T. J.; Goldner, M. 1979. Outer-membrane penetration barriers as components of intrinsic resistance to beta-lactam and other antibiotics in *Escherichia coli* K-12. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 15(2):182–9.
- Shatalin, K.; Shatalina, E.; Mironov, A.; Nudler, E. 2011. H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science*, 334(6058):986–990.
- Soethoudt, M.; Peskin, A. V.; Dickerhof, N.; Paton, L. N.; Pace, P. E. & Winterbourn, C. C. 2014. Interaction of adenanthin with glutathione and thiol enzymes: selectivity for thioredoxin reductase and inhibition of peroxiredoxin recycling. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 77:331–9.

- Strebhardt, K. & Ullrich, A. 2008. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature reviews: Cancer*, 8(6):473–80.
- Sugadev, R.; Ponnuswamy, M. N. & Sekar, K. 2011. Structural analysis of NADPH depleted bovine liver catalase and its inhibitor complexes. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2(1):67–77.
- Tairum, C. A.; Oliveira, M. A.; Horta, B. B.; Zara, F. J.; Netto, L. E. S.. 2012. Disulfide biochemistry in 2-cys peroxiredoxin: requirement of Glu50 and Arg146 for the reduction of yeast Tsa1 by thioredoxin. *Journal of Molecular Biology*, 424:28–41.
- Tairum, C. A.; Santos, M. C.; Breyer, C. A.; Geyer, R. R.; Nieves, C. J.; Portillo-Ledesma, S.; Ferrer-Sueta, G.; Toledo Jr, J. C.; Toyama, M. H.; Augusto, O. Netto, L. E. S.; de Oliveira, M. A. 2016. Catalytic Thr or Ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms. *Scientific Reports*, 6: 33133.
- Teixeira, F.; Tse, E.; Castro, H.; Makepeace, K. A. T.; Meinen, B. A.; Borchers, C. H.; Poole, L. B.; Bardwell, J. C.; Tomás, A. M.; Southworth, D. R.; Jakob, U. 2019. Chaperone activation and client binding of a 2-cysteine peroxiredoxin. *Nature Communications*, 10: 659.
- Tirapelli, C. R.; Ambrosio, S. R.; da Costa, F. B. & de Oliveira, A. M. 2008. Diterpenes : A Therapeutic Promise for Cardiovascular Diseases. *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery*, 3(1):1-8.
- Underhill, D. M. & Ozinsky, A. 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annual Review of Immunology*, 20: 825–52.
- Vaara, M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Micobiological Reviews*, 56(3):395-411.
- Vaara, M. 2019. Polymyxin Derivatives that Sensitize Gram-Negative Bacteria to Other Antibiotics. *Molecules*, 24(2): 249.
- Vandresen, F.; Schmitt, E.; Kato, L.; de Oliveira, C. M. A.; Amado, C. A. B.; da Silva, C. C. 2010. Constituintes químicos e avaliação das atividades antibacteriana e antiedematogênica de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. e *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers., Verbenaceae Brazilian Journal of Pharmacognosy, 20(3): 317-321.
- Ventola, C. L. 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 40(4):277–83.
- Vignols, F.; Bréhélin, C.; Surdin-Kerjan, Y.; Thomas, D.; Meyer, Y. 2005. A yeast two-hybrid knockout strain to explore thioredoxin-interacting proteins in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102:16729-34.
- Viljanen, P.; Vaara, M. 1984. Susceptibility of gram-negative bacteria to polymyxin B nonapeptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 25(6):701-5.
- Wang, X.; Zhao, X.; Malik, M.; Drlica, K. 2010. Contribution of reactive oxygen species to pathways of quinolone-mediated bacterial cell death. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3):520–524.
- Washburn, R. S.; Marra, A.; Bryant, A. P.; Rosenberg, M.; Gentry, D. R. 2001. *rho* Is Not Essential for Viability or Virulence in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4):1099-1103.
- WHO/IACG – World Health Organization/ Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance. 2019. No time to wait: securing the future from drug-resistant infections (Report to the secretary-general of the united nations).
- Wood, Z. A.; Schröder, E.; Robin Harris, J. & Poole, L. B. 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(1):32–40.

- Wood, Z. A.; Poole, L. B. & Karplus, P. A. 2003. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*, 300(5619):650–653.
- Yeom, J.; Imlay, J. A.; Park, W. 2010. Iron homeostasis affects antibiotic-mediated cell death in *Pseudomonas* species. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(29):22689–22695.
- Zeida, A.; Reyes, A. M.; Lichtig, P.; Hugo, M.; Vazquez, D. S.; Santos, J.; González Flecha, F. L.; Radi, R.; Estrin, D. A.; Trujillo, M. 2015. Molecular Basis of Hydroperoxide Specificity in Peroxiredoxins: The Case of AhpE from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, 54(49):7237-47. doi: 10.1021/acs.biochem.5b00758. Epub 2015 Nov 30. PMID: 26569371

APÊNDICES

Apêndice A

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT.

Título da Invenção: Uso de diterpenoides ent-caurânos em associação a antibióticos para inibição de enzimas peroxirredoxinas de microrganismos para o combate de infecções microbianas



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 016245 4

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 63025530000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua da Reitoria, 374 - Butantã

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05508220

País: Brasil

Telefone: (11) 3091.4474

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO - UNESP

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 48031918000124

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Quirino de Andrade, 215

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 01049-010

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS

Resumo: A presente invenção descreve o uso de diterpenoides ent-caurânicos, como a adenantina (Adn), ou seus derivados em associação a antibióticos que promovem aumento do estresse oxidativo, como os β -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas, por exemplo a canamicina (Kan) e a gentamicina (Gen), e também as polimixinas, como potencializadores da atividade antimicrobiana desses fármacos. Além disso, o efeito sinérgico da utilização em conjunto dessas substâncias apresenta um elevado potencial de aplicação farmacêutica em tratamentos de diferentes infecções causadas por microrganismos, a fim de sensibilizar bactérias que apresentem resistência a esses últimos e, também, pode reduzir as quantidades administradas de antibióticos em pacientes reduzindo os efeitos colaterais.

Figura a publicar: 4

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Maria Aparecida de Souza

Numero OAB:

Numero API: 1833

CPF/CNPJ: 12184617806

Endereço: Av. Torres de Oliveira, 76 - Jaguaré

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05347020

Telefone: 11 30911580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 12

Nome: GISELE MONTEIRO

CPF: 27866400830

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua José Lopes da Silva, 235

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05376-110

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Inventor 2 de 12

Nome: ADALBERTO PESSOA JÚNIOR

CPF: 03144080888

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Aibi, 16, Apto 114

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05054-010

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Inventor 3 de 12

Nome: ANA JÚLIA FERNANDES CARDOSO DE OLIVEIRA

CPF: 09449014841

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua República do Iraque, 1745, Casa 2

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 04611-003

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Inventor 4 de 12

Nome: BRUNA DEL BUSSO ZAMPIERI

CPF: 09475807608

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Sylvia Monteiro Franco, 19

Cidade: Poços de Caldas

Estado: MG

CEP: 37718-101

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Inventor 5 de 12

Nome: CARLOS ABRUNHOSA TAIRUM JUNIOR

CPF: 32048506844

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Avenida Nossa Senhora da Assunção, 647, Apto 54D

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05359-001

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Inventor 6 de 12

Nome: CARLOS ALEXANDRE BREYER

CPF: 00972409904

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Empresário e produtor de espetáculos

Endereço: Rua Aldo Coli, 843, Casa 4

Cidade: Praia Grande

Estado: SP

CEP: 11704-760

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Inventor 7 de 12

Nome: LUIS EDUARDO SOARES NETTO

CPF: 09082264897

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Doutor Manole de Paiva Ramos, 265, Apto 51M

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05351-015

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Inventor 8 de 12

Nome: MARCOS ANTONIO DE OLIVEIRA

CPF: 11917879822

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Avenida Ariovaldo Reis, 253

Cidade: Guarujá

Estado: SP

CEP: 11421-190

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Inventor 9 de 12

Nome: MARCOS HIKARI TOYAMA

CPF: 12069390870

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua Frei Gaspar, 253, Apto 1009

Cidade: São Vicente

Estado: SP

CEP: 11310-060

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Inventor 10 de 12

Nome: MELINA CARDOSO DOS SANTOS

CPF: 33204185800

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Serra da Mantiqueira, 129

Cidade: Barueri

Estado: SP

CEP: 06413-080

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Inventor 11 de 12

Nome: ROLANDO IÉ

CPF: 23463366886

Nacionalidade: Guineense

Qualificação Física: Mestrando

Endereço: Rua Rangel Pestana, 273, Apto 11

Cidade: São Vicente

Estado: SP

CEP: 11230-120

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Inventor 12 de 12

Nome: VANESSA DA COSTA ANDRADE

CPF: 39919332844

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Avenida Padre Antonio Jose dos Santos, 78, Apto 78

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 04563-000

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU depósito Inibição de enzimas.pdf
Procuração	Procuração USP - Prof Vahan Agopyan.pdf
Procuração	Procuração Unesp-USP.pdf
Relatório Descritivo	Relatório descritivo.pdf
Reivindicação	REIVINDICAÇÕES.pdf
Desenho	FIGURAS.pdf
Resumo	RESUMO.pdf
Autorizações dos inventores	Autorizações dos inventores - Inibição de Enzimas-19.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal. O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo. Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU no campo Número de Referência na emissão do pagamento. Serviço: 200-Petição nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

[Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Física.](#)
[Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Jurídica.](#)

[illegible]



GABINETE
DO
REITOR

PROCURAÇÃO

A UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP, autarquia estadual de regime especial, criada pelo Decreto Estadual nº 6.283, de 25 de janeiro de 1934, modificado pelo Decreto-Lei nº 13.855, de 29 de fevereiro de 1944, regida por seu Estatuto baixado através da Resolução nº 3.461, de 07 de outubro de 1988, com sede à Rua da Reitoria, 374 – Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”, Butantã, São Paulo/SP, CEP 05508-220, inscrita no CNPJ/MF sob o nº 63.025.530/0001-04, neste ato representada por seu Reitor, Prof. Dr. VAHAN AGOPYAN, brasileiro, casado, portador do RG nº 4.810.600-8 SSP/SP e inscrito no CPF/MF sob o nº 839.536.208-00, domiciliado em São Paulo, com endereço funcional à Rua da Reitoria, 374 – Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”, Butantã, São Paulo/SP, CEP 05508-220, pelo presente instrumento e na melhor forma de direito, nomeia e constitui seus bastantes Procuradores LUIS GUSTAVO GOMES PRIMOS, brasileiro, solteiro, advogado, portador do RG nº 15.619.942-7 e inscrito no CPF/MF sob o nº 088.524.078-20 e na OAB/SP sob o nº 126.061, domiciliado nesta Capital, com endereço funcional na Rua da Reitoria, 374 – 2º andar – Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”, Butantã, São Paulo/SP, CEP 05508-220; e MARIA APARECIDA DE SOUZA, brasileira, solteira, agente de inovação, portadora do RG nº 20.436.777 SSP/SP, inscrita no CPF/MF sob o nº 121.846.178-06 e API nº 1833, domiciliada nesta Capital, com endereço funcional na Avenida Torres de Oliveira, 76, Jaguaré, São Paulo/SP, CEP 05347-902, a quem confere os mais amplos poderes de representação perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, o Registro Nacional de Cultivares – RNC e o Serviço Nacional de Proteção de Cultivares – SNPC, podendo, em nome da mandante, praticar todos os atos que se fizerem necessários ao registro de marcas, patentes, proteção e registro de cultivares, cumprimento de exigências, averbações de contratos de licenciamento ou transferência de tecnologia, oferecimento de oposições, recursos, cancelamentos ou revisões administrativas, bem como sua contestação, pedidos de caducidade, pagamento de anuidade, retirada de certificados, requerimento de prorrogação, alteração de sede, denominação ou titular, requerer buscas, desarquivamento, vistas de processos, promover o registro de direitos autorais, e de programas de computador, nas repartições competentes, autorizar a cópia de documentação técnica de programa de computador, podendo ainda desistir de pedidos, bem como praticar todo e qualquer outro ato que se faça necessário ao bom e fiel cumprimento desta procuração, podendo ainda agir em separado, independentemente da ordem de nomeação, ficando ratificados os atos eventualmente já praticados.

São Paulo, 20 de fevereiro de 2018.

Vahan Agopyan
Reitor

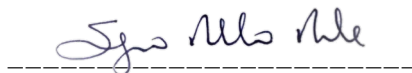




PROCURAÇÃO

Por este instrumento particular de Procuração, a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30.01.1976, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, CEP 01.049-010, São Paulo/SP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, doravante designada simplesmente UNESP, neste ato, representada por seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. SANDRO ROBERTO VALENTINI, de acordo com o Art. 34, I de seu Estatuto, ou quem legalmente o substitua, nomeia e constitui sua bastante procuradora, a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, denominada USP, autarquia estadual de regime especial, regida por seu Estatuto, aprovado pela Resolução n.º 3.461, de 07 de outubro de 1988 e pelo Regimento Geral, aprovado pela Resolução n.º 3.745, de 19 de outubro de 1990, com sede na Rua da Reitoria, 374, São Paulo - SP, inscrita no CNPJ/MF sob n.º 63.025.530/0001-04, neste ato representada por seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. VAHAN AGOPYAN, inscrito no CPF sob o n.º 839.536.208-000, outorgando-lhes poderes para representá-los perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual, tais como patentes de invenção, de modelos de utilidade, desenhos industriais, registros de marcas de produto, de serviço; coletivas ou de certificação, de indicações geográficas, direitos do autor, de software e mantê-los em vigor com amplos e ilimitados poderes para assinar petições e documentos, pagar taxas, anotar transferências, fazer prova de uso das invenções patenteadas ou das marcas registradas, apresentar oposições, recursos, réplicas, desistir, renunciar, anotar, averbar contratos de licença e transferências de tecnologia, elaborar notificações extrajudiciais, e praticar para os fins mencionados todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil, em benefício da Outorgante, ratificando os atos já praticados, especialmente para o pedido de privilégio de invenção: **"USO DE DITERPENOIDES ENTCAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS"**.

São Paulo, 15 de julho de 2020.



UNESP

Prof. Dr. SANDRO ROBERTO VALENTINI

Reitor

**USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A
ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE
MICROORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se insere no campo da Microbiologia, mais precisamente na área da Bacteriologia, e descreve o uso de diterpenoides ent-caurânicos, como a adenantina (Adn), ou seus derivados em associação a antibióticos que promovem aumento do estresse oxidativo, como os β -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas, por exemplo a canamicina (Kan) e a gentamicina (Gen), e também as polimixinas, como potencializadores da atividade antimicrobiana desses fármacos. Além disso, o efeito sinérgico da utilização em conjunto dessas substâncias apresenta um elevado potencial de aplicação farmacêutica em tratamentos de diferentes infecções causadas por microrganismos, a fim de sensibilizar bactérias que apresentem resistência a esses últimos e também pode reduzir as quantidades administradas de antibióticos em pacientes reduzindo os efeitos colaterais.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] Antibióticos revolucionaram as medicinas humana e veterinária e são considerados um dos maiores, senão o maior, avanço médico no século XX. A era dos antibióticos normalmente remete a nomes como Paul Ehrlich, Sahachiro Hata e Alexander Fleming (Strebhardt e Ullrich, 2008). Na busca de compostos químicos que fossem eficientes no tratamento da sífilis, uma doença sexualmente transmissível cujo agente etiológico é representado pela bactéria *Treponema pallidum*, o químico Paul Ehrlich sintetizou centenas de moléculas orgânicas derivadas do arsênio, as quais foram testadas pelo bacteriologista

Sahachiro Hata e levou à descoberta da molécula 606 (Aminov, 2010; Strebhardt e Ullrich, 2008). Esta molécula se mostrou eficaz no tratamento de infecções causadas por *T. pallidum* e foi lançada no mercado pela Hoechst sob o nome Salvarsan. Entretanto, a molécula era extremamente suscetível à oxidação pelo O₂ atmosférico, exibia baixa solubilidade e diversos efeitos colaterais, incluindo erupções cutâneas, danos ao fígado, náuseas e vômitos. Posteriormente, ela foi substituída pela Neosalvarsan o qual não era suscetível à oxidação e apresentava maior solubilidade e menor toxicidade, entretanto, efeitos colaterais como náuseas e vômitos continuavam comuns (Aminov, 2010).

[003] Finalmente nos anos 1940, como consequência da segunda guerra mundial, ocorreu a colaboração entre governos de países distintos e diferentes laboratórios como Merck, Pfizer e Squibb, o que viabilizou a produção e distribuição de um novo medicamento que apresentava maior eficiência/estabilidade e reduzidos efeitos colaterais que substituiu o Neosalvarsan, a Penicilina. A penicilina é uma substância com ação bactericida produzida pelo fungo *Penicillium notatum* identificada e caracterizada por Alexander Fleming (Alexander Fleming, 1929). Esta molécula é denominada de β lactâmico em razão de possuir um anel característico que recebe este nome pela sua estrutura (Aminov, 2010; Strebhardt e Ullrich, 2008).

[004] Baseados nos trabalhos pioneiros de Paul Ehrlich, Sahachiro Hata e Alexander Fleming, pesquisadores ligados a indústrias farmacêuticas e instituições de ensino e pesquisa caracterizaram as mais diferentes classes de antibióticos com distintas ações biológicas. O período

compreendido entre os anos 1950 e 1970 foi o auge das descobertas de novas classes de antibióticos (Aminov, 2010; Streibhardt e Ullrich, 2008) (Tabela 1). Entretanto, após este período o número de novos antibióticos se tornou muito escasso e a principal abordagem para o desenvolvimento de novos medicamentos para combater a resistência emergente e re-emergente de patógenos a antibióticos tem sido, em sua grande maioria, baseada na modificação dos antibióticos existentes, inclusive por razões econômicas (Chopra, Hesse e O'Neill, 2002).

Tabela 1: Principais classes de antibióticos, exemplos, processos biológicos atingidos e ação descoberta.

Classe de antibiótico	Exemplos	Alvo Biológico	Modo de ação / Descoberta
β lactâmicos	Penicilinas (ampicilina), cefalosporina (cefamicina), penema (meropenema), monolactâmicos (aztreonam)	Biossíntese de peptoglicanos (proteínas de ligação a penicilina - PBPs)	Bacteriostático ou bactericida (dependente da concentração) / 1928
Aminoglicosídeos	Gentamicina, estreptomina, espectinomina	Tradução	Bacteriostático/1943
Glicopeptídeos	Vancomicina, teicoplanina	Biossíntese de peptoglicanos	Bactericida/1950
Tetraciclina	Minociclina, Tigeciclina	Tradução	Bacteriostático/1953
Macrolídeos	Eritromicina,	Tradução	Bacteriostático ou

	azitromicina		bactericida (dependente da bactéria) / 1950
Lincosamidas	Clindamicina	Tradução	Bacteriostático ou bactericida (dependente da concentração) / 1963
Streptograminas	Synercid	Tradução	Bacteriostático/1953
Oxazolidinonas	Linezolida	Tradução	Bacteriostático/1952
Fenicolinas	cloramfenicol	Tradução	Bacteriostático/1947
Quinolonas	Ciprofloxacino	Replicação do DNA (Topoisomerase)	Bactericida/1962
Pirimidinas	Trimetoprima	Metabolismo C1	Bacteriostático/1962
Sulfonamidas	Sulfametoxazol	Metabolismo C1	Bacteriostático/1932
Rifamicinas	Rifamicinas	Transcrição	Bactericida/1957
Lipopeptídeos	Daptomicina	Membrana celular	Bactericida/1986
Peptídeos catiônicos	Colistina	Membrana celular	Bactericida/1949

Modificado de Davies e Davies (2010).

[005] De fato, o desenvolvimento de novos antibióticos pela indústria farmacêutica, experimentou e tem experimentado um vertiginoso decréscimo devido a obstáculos econômicos e regulatórios bem como fusões empresariais que reduziram substancialmente o número de pesquisas. Das 18 maiores empresas farmacêuticas, 15 abandonaram a produção de antibióticos (Bartlett, Gilbert e Spellberg, 2013; Piddock, 2012).

[006] Para a indústria farmacêutica os antibióticos não são mais considerados um investimento economicamente vantajoso, uma vez que, sua utilização ocorre somente por um curto período de tempo, e portanto, não são tão lucrativos como aqueles utilizados para o tratamento de doenças crônicas como

diabetes, transtornos psiquiátricos, asma, doenças cardíacas dentre outros (Bartlett, Gilbert e Spellberg, 2013; Gould e Bal, 2013; Piddock, 2012). Uma análise custo-benefício do Escritório de Economia da Saúde (Office of health economics - OHE) da Inglaterra calculou que o valor líquido de um novo antibiótico é de apenas 50 milhões de dólares, o que é bastante inferior a medicamentos utilizados para tratamentos de cardiopatias e doenças neuromusculares que podem alcançar 1 bilhão de dólares (Bartlett, Gilbert e Spellberg, 2013).

[007] Ainda no que concerne ao fator econômico, o valor dos antibióticos é considerado baixo pela indústria farmacêutica. O tratamento de doenças infecciosas com antibióticos mais modernos apresenta um custo variando de 1.000-3.000 dólares, enquanto quimioterápicos utilizados no tratamento de neoplasias alcançam dezenas de milhares de dólares (Bartlett, Gilbert e Spellberg, 2013; Gould e Bal, 2013; Piddock, 2012). Agravando este cenário, as pesquisas conduzidas por grupos de instituições acadêmicas também foram substancialmente reduzidas em razão da crise econômica mundial iniciada em 2007, e, que ainda traz grandes reflexos para a sociedade como um todo (Piddock, 2012). A grande necessidade de novos antibióticos reside no aparecimento crescente de bactérias resistentes a diversos antibióticos utilizados atualmente, tópico que será abordado a seguir.

Bactérias resistentes a múltiplos antibióticos

[008] As taxas de mortalidade relacionadas às infecções bacterianas resistentes a múltiplas drogas (Multi Drug Resistance - MDR) têm se tornado cada vez mais elevadas, o que constitui um grave problema de saúde em todo o mundo. Na União Europeia (UE) a cada ano, cerca de 25.000 pacientes

morrem em decorrência de infecções ocasionadas por bactérias MDR (ECDC / EMEA Joint Working Group, 2009). Nos Estados Unidos da América (EUA) cerca de 63.000 pacientes morrem anualmente como consequência de infecções hospitalares ocasionadas por bactérias MDR (Ventola, 2015). Os custos econômicos estimados na UE revelam que os gastos para o sistema de saúde, em conjunto com a perda de produtividade dos pacientes, geram um prejuízo aproximado de 1.5 bilhões de euros por ano (ECDC / EMEA Joint Working Group, 2009). Em período similar (2006), o custo anual do tratamento de infecções hospitalares nos EUA de apenas seis espécies de bactérias MDR foi estimado em aproximadamente 1.9 bilhão de dólares (Ventola, 2015).

[009] Pelos dados acima é possível perceber que a situação é altamente preocupante e, em 2013 o CDC (Centers for Disease Control and Prevention) dos EUA declarou que estamos na "era pós-antibiótica". Esta declaração está alinhada com a Organização Mundial da Saúde (OMS) que, em 2014, alertou que a crise de resistência aos antibióticos está se tornando alarmante uma vez que o percentual de bactérias MDR aumenta ano a ano (Michael, Dominey-Howes e Labbate, 2014; Reardon, 2015).

[010] Entre os patógenos Gram positivos, a maior ameaça para uma pandemia global é representada por bactérias como *Staphylococcus aureus* e o gênero *Enterococcus* (CDC, 2013; Rossolini, 2014). De fato, ainda na década de 1960 já foram descritos isolados de *Staphylococcus* resistentes a metaciclina, denominados de MRSA (para Methicillin-resistant Staphylococcus aureus). Nessa época, para o tratamento das infecções causadas por este agente etiológico, foi utilizada a vancomicina. Entretanto, duas décadas mais tarde, foram

identificadas linhagens resistentes à vancomicina e, atualmente, as MRSA representam uma grande ameaça a saúde pública mundial (Ventola, 2015). De fato, somente nos EUA, as MRSAs são responsáveis todos os anos por mais mortes do que a AIDS, doença de Parkinson, enfisema e homicídio juntos (CDC, 2013). Adicionalmente, apesar da resistência aos antibióticos anti-MRSA geralmente ocorrer através de mutações, existem estudos que demonstram a transferência de genes de resistência aos antibióticos linezolida (oxazolidinonas) e glicopeptídeos, aspecto de grande gravidade (Rossolini et al., 2014).

[011] Patógenos Gram-negativos também trazem preocupação porque estão se tornando resistentes a quase todos os antibióticos disponíveis (Golkar, Bagasra e Pace, 2014; Rossolini et al., 2014). O surgimento de bacilos Gram-negativos MDR tem tido grande impacto na medicina, e as infecções mais graves ocorrem em ambientes hospitalares sendo as mais comuns causadas por Enterobacteriaceae (principalmente *Klebsiella pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* (CDC, 2013; Rossolini et al., 2014). Bactérias patogênicas Gram-negativas MDR como *Escherichia coli* e *Neisseria gonorrhoeae* também estão se tornando cada vez mais prevalentes em ambientes hospitalares, e já foi demonstrado que diversas linhagens produzem β -lactamases capazes de inibir a ação de diversos antibióticos β -lactâmicos (Ventola, 2015).

[012] É importante deixar claro que bactérias MDR ameaçam o atendimento hospitalar tanto em países de alta renda *per capita* quanto naqueles que possuem baixa renda, afetando tanto os procedimentos terapêuticos de alta complexidade como aqueles de rotina para doenças infecciosas comuns. Uma vez que a resistência tenha se manifestado, as bactérias resistentes

podem espalhar-se nos hospitais, nas comunidades e meio ambiente. A escassez de novos antibióticos possibilita que infecções intratáveis se tornem cada vez mais comuns, o que é particularmente preocupante, pois após o aparecimento, a resistência antimicrobiana é irreversível ou caracteriza-se por uma reversão muito lenta apesar da introdução de programas de contenção e vigilância. De fato, em razão da falta de novos medicamentos e do aparecimento de linhagens multirresistentes, antibióticos que haviam sido proibidos por conta de graves efeitos colaterais, incluindo danos renais e nervosos, voltaram a ser utilizados, como a colistina, que foi banida entre os anos 1990 até meados de 2010.

Causas da Resistência e Disseminação

[013] Trabalhos recentes demonstram que um grande número de bactérias ambientais filogeneticamente distintas é capaz de utilizar antibióticos, como β lactâmicos, tetraciclinas, vancomina, dentre outros, como única fonte de carbono, o que revela um amplo reservatório de genes que codificam proteínas de resistência a antibióticos (Dantas *et al.*, 2009). Adicionalmente, existe um número crescente de evidências da transferência de genes que codificam proteínas de resistência a antibióticos para bactérias patogênicas humanas (D'Costa *et al.*, 2011; Dantas *et al.*, 2008; Forsberg *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2016).

[014] O descarte constante no meio ambiente de antibióticos, através de esgotos não tratados e que são lançados em corpos de água como rios e oceanos, representa um risco para o aparecimento de bactérias resistentes (Segura *et al.*, 2009). Atenção especial é dada às estações de tratamento de esgoto, onde ocorre grande concentração de bactérias

ambientais e oriundas do microbioma de humanos e animais em uma diminuta área, o que torna as condições particularmente adequadas para troca/alteração de material genético contendo genes de resistência e posterior propagação de bactérias (Alós, 2015; Czekalski *et al.*, 2012; Rizzo *et al.*, 2013).

[015] No que diz respeito a mutações nos genes que codificam proteínas alvo dos antibióticos, trabalhos recentes sugerem que baixas doses de antibióticos levam ao aparecimento de linhagens resistentes em razão de mutações, ponto que será discutido em maior detalhe na próxima seção. De fato, foi demonstrado o aparecimento de bactérias resistentes em concentrações de antibióticos bem abaixo da concentração mínima inibitória para crescimento, o que demonstra que o aparecimento das linhagens resistentes pode ocorrer no regime ambulatorial, onde as concentrações de antibióticos não são muito elevadas ou quando a prescrição médica não é seguida integralmente por pacientes externos aos hospitais (Gullberg *et al.*, 2011). Por estas razões, diversos países possuem a venda de antibióticos extremamente controlada. No Brasil, a restrição de venda está em vigor desde 2010 e engloba 119 antibióticos (<http://www.anvisa.gov.br/sngpc/Documentos2012/RDC%2020%202011.pdf>).

[016] Outro fator bastante relevante para o aparecimento de linhagens resistentes reside na utilização de baixas concentrações de antibióticos na ração animal, prática associada com o maior ganho de peso, de modo que os antibióticos são utilizados como promotores de crescimento (em massa) para animais, contribuindo para o aparecimento de bactérias resistentes (Giguère, Prescott e Dowling, 2007). Em razão deste grande problema para a saúde pública, diversos países têm

banido a utilização de antibióticos na ração animal, como é o caso dos países constituintes da União Europeia (UE), que proibiram sua utilização em 2006. Essa proibição levou à interrupção da utilização de antibióticos para fins de ganho de peso em bovinos no Brasil, em razão do grande volume de importações para países da UE (Millen *et al.*, 2011).

[017] Por outro lado, nos EUA 13 toneladas de antibióticos foram utilizadas em animais em 2010, principalmente como promotores de crescimento (Bartlett, Gilbert e Spellberg, 2013). Apesar de restrições introduzidas em 01/2017 pelo FDA (Food and drug admnistration), diversas moléculas que possuem propriedades antibióticas (Amprolium, Bacitracina, Bambermicina, Carbadox, Decoquinato, Fenbendazole, Lasaloacid, Monensina, Melengestrol, Ractopamina e Tiamulina) ainda são permitidas para utilização no agronegócio

(<https://www.federalregister.gov/documents/2016/12/27/2016-31083/newanimal-drugs-for-use-in-animal-feed-approval-of-new-animal-drug-applications-withdrawal-of>). É importante salientar que regulamentações não estão presentes na maioria dos países; por exemplo, a China produz aproximadamente 40 toneladas de antibióticos, dos quais 50% são utilizados na produção animal (Wang *et al.*, 2016).

[018] Outro caso emergente é representado pela aquicultura, a qual experimentou um significativo crescimento nos últimos anos. Nela, os antibióticos crescentemente utilizados como profiláticos contaminam corpos de água, o que por si só possui grande potencial para o aparecimento de linhagens resistentes a antibióticos em razão da transferência gênica, seleção e/ou mutação (Cabello, 2006; Done, Venkatesan

e Halden, 2015). Entretanto, não existe uma regulamentação clara em nenhum país que vise diminuir a utilização de antibióticos nessa área (Cabello, 2006; Done, Venkatesan e Halden, 2015).

[019] No que concerne à disseminação de linhagens resistentes a antibióticos, a globalização sem dúvida contribui de forma extremamente significativa. O maior intercâmbio entre os países por meio do comércio de animais, alimentos, bens de consumo, viagens de turismo e negócios, movimentos migratórios de fundo religioso, científico ou político (estágios no exterior, refugiados, missionários, intervenções militares), dentre outros, favorece fortemente a dispersão de bactérias super-resistentes, o que evidencia que este é um problema de dimensões globais (Alós, 2015; Kennedy e Collignon, 2010).

[020] Como pode ser observado acima, o problema com os antibióticos é mundial, bastante complexo e sua resistência engloba aspectos, genéticos, evolutivos e ambientais. De fato, outros fatores envolvendo saneamento básico, idade, nutrição, estado imunológico também influenciam na dispersão de linhagens MDR (Martínez e Baquero, 2014). Apesar de ocorrer de forma acentuada em diversos países, a ausência de um controle mais rígido para a utilização de antibióticos - seja para a saúde humana ou animal e a falta de colaboração integrada global faz com que o perigo do surgimento de bactérias MDR prospere, uma vez que em diversos países das Américas central e do sul, parte da Europa, do continente Africano e do continente Asiático, o controle dos antibióticos é bastante precário. Neste contexto, além de uma política de controle global de antibióticos é bastante importante que sejam efetuados esforços na busca de novos alvos biológicos e novas classes de antibióticos com o

objetivo de evitar epidemias ou mesmo pandemias.

A letalidade de antibióticos é acompanhada pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)

[021] Estudos recentes e independentes indicam que diferentes classes de antibióticos, independentemente das suas interações fármaco-alvo, geram níveis variáveis de EROs que contribuem decisivamente para a morte celular dos patógenos. Os trabalhos investigaram o efeito de classes de antibióticos distintas e muito utilizadas como β -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas em diversas espécies bacterianas (*Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Burkholderia cepacia*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, dentre outros) (Bizzini et al., 2009; Breidenstein et al., 2008; Calhoun e Kwon, 2011; Davies et al., 2009; Foti et al., 2012; Girgis, Hottes e Tavazoie, 2009; Grant et al., 2012; Gusarov et al., 2009; Kang et al., 2012; Kohanski et al., 2008; Ling et al., 2012; Liu et al., 2010, 2012; Nguyen et al., 2011; Shatalin et al., 2011; Wang et al., 2010; Yeom, Imlay e Park, 2010). Apesar de existir ainda grande debate sobre a relação de antibióticos, geração de EROs e letalidade em patógenos, trabalhos recentes utilizando as mais distintas abordagens confirmam os dados obtidos pelos diferentes grupos de pesquisa (Acker, Van et al., 2016; Dwyer, Belenky, Yang, MacDonald, et al., 2014). Também foi demonstrado que o aumento intracelular dos níveis de EROs é capaz de promover eficientemente a morte de patógenos (Brynildsen et al., 2013; Jee et al., 2016).

[022] Neste contexto, foi demonstrado que as três

principais classes de drogas bactericidas (β -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas) utilizam um mecanismo comum que estimula a produção de doses letais de radicais hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) por meio de reações químicas de Fenton. De fato, a administração de quelantes de ferro (Fe) atenua a morte bacteriana por fármacos, sugerindo que os radicais hidroxila contribuem para a morte celular bacteriana por antibióticos. Dessa forma, é importante salientar que a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por meio da dismutação efetuada pela enzima superóxido dismutase (Sod) também pode favorecer a formação $\text{HO}^\bullet$. Além disso, o H_2O_2 juntamente com o radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) também é capaz de produzir $\text{HO}^\bullet$ por meio da reação de Harber-Weiss (Figura 1). Ponto de importância reside no fato que, apesar dos diferentes fármacos bactericidas (β -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas) terem diferentes alvos biológicos (proteínas de ligação à penicilina, ribossomo e topoisomerase, respectivamente), todos eles convergem em uma via comum.

[023] Essa via é baseada na produção de oxidantes através de resposta metabólica envolvendo o ciclo do ácido tricarboxílico (Tricarboxylic Acid Cycle - TCA) que induz a rápida depleção de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH), resultando em uma hiperativação da cadeia de transporte de elétrons que aumenta a produção de produtos secundários como o $\text{O}_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 (Kohanski, DePristo e Collins, 2010). O $\text{O}_2^{\bullet-}$ pode atacar grupamentos ferro-enxofre (Fe-S) presentes em diversas proteínas que executam funções variadas, desde transporte de elétrons à catálise enzimática e regulação gênica. Neste contexto, em especial o $\text{O}_2^{\bullet-}$ pode levar à disponibilização de Fe ferroso dos grupos Fe-S que participa da reação de Fenton,

resultando em formação de $\text{HO}^\bullet$ que auxilia na morte celular (Figura 2) (Kohanski, DePristo e Collins, 2010).

[024] O H_2O_2 também é capaz de danificar grupos Fe-S (Imlay, 2008; Jang e Imlay, 2010), o que deve maximizar este processo e levar a mais danos celulares. A importância do H_2O_2 e do Fe^{2+} (férrico) é ressaltada pela existência de proteínas denominadas de Dps (DNA-binding protein from starved cells) que pertencem à família das ferritinas. Este grupo de proteínas é capaz de se ligar ao DNA bacteriano e sequestrar o Fe^{2+} , o que evita sua reação com H_2O_2 (reação de Fenton 1) e protege fisicamente o DNA (Haikarainen e Papageorgiou, 2010; Wolf *et al.*, 1999). De fato, bactérias Δdps (bactérias com o gene *dps* deletado) são altamente suscetíveis à morte por H_2O_2 e possuem sua virulência atenuada em macrófagos e camundongos (Halsey *et al.*, 2004; Velayudhan *et al.*, 2007).

[025] Outro ponto de grande importância dos trabalhos acima mencionados é demonstrar que, apesar de possuírem alvos biológicos distintos, os antibióticos atuam gerando EROs que possuem capacidade de danificar o DNA. Portanto, é importante perceber a relação observada previamente entre baixas doses de antibióticos e o aparecimento de bactérias resistentes (Giguère, Prescott e Dowling, 2007). Concluindo, altas concentrações ou concentrações apropriadas de antibióticos levam a sérios danos em biomoléculas em especial no DNA impossibilitando a sobrevivência do patógeno. No lado oposto, baixas concentrações de antibióticos podem produzir mutações no DNA acelerando as taxas de evolução, o que deve contribuir para o aparecimento de linhagens resistentes.

Defesas oxidativas do organismo na infecção por patógenos

[026] Quando um patógeno invade um hospedeiro ocorre

um dos mecanismos de defesa mais estudados, denominado de explosão respiratória (*respiratory burst*), o qual se caracteriza pela geração de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERN). A geração das EROs é devido à ativação de uma oxidase multicomponente (NADPH oxidase, também denominada de fagócito oxidase), que oxida o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido) e, no processo, reduz o oxigênio a $O_2^{\cdot-}$ (Halliwell e Gutteridge, 2015). Em neutrófilos, essa rápida reação oxidativa é disparada pelos sinais de ativação e acompanha a fagocitose (Babior, 2004). Quando o radical $O_2^{\cdot-}$ sofre dismutação, produz H_2O_2 , uma molécula altamente difusível no organismo capaz de desencadear mecanismos potencialmente tóxicos para as células (Gordon, 2016; Halliwell e Gutteridge, 2015; Underhill e Ozinsky, 2002). O H_2O_2 , por si só, não é capaz de destruir eficientemente o patógeno. Entretanto, grânulos azurófilos dos neutrófilos contêm a enzima mieloperoxidase (MPO), que catalisa a reação entre o H_2O_2 e íons haletos (Cl^-), produzindo ácido hipocloroso ($HOCl$), um potente agente microbicida (Klebanoff, 2005; Winterbourn e Kettle, 2013). Adicionalmente, conforme já mencionado, o H_2O_2 também é convertido $HO^{\cdot}$, por meio de reações químicas como as de Fenton e de Haber-Weiss, outro agente destrutivo muito potente podendo atingir e destruir membranas celulares, proteínas e causar mutações em ácidos nucleicos (Halliwell e Gutteridge, 2015).

[027] Outra forma de eliminar os organismos invasores é através da produção do radical óxido nítrico ($NO^{\cdot}$). O $NO^{\cdot}$ é gerado quando ocorre a oxidação da arginina na presença da molécula de oxigênio, sendo esta reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) (Fritzsche, Schleicher e Bogdan,

2010; Prolo, Alvarez e Radi, 2013). Elevadas concentrações de $\text{NO}^\bullet$ podem originar uma série de compostos reativos, as ERNs. Por exemplo, a reação $\text{NO}^\bullet$ com o radical ânion superóxido promove a liberação de peroxinitrito ($\text{ONOO}^\bullet$), um potente agente oxidante cujos derivados são capazes de causar danos ao DNA e oxidação lipídica (Calcerrada, Peluffo e Radi, 2011; Niles, Wishnok e Tannenbaum, 2006).

[028] Diante da exposição às diversas fontes de espécies reativas, os hospedeiros possuem mecanismos de defesa para evitar danos maiores provocados por estas substâncias produzidas endogenamente durante a interação hospedeiro-patógeno. Os patógenos, da mesma maneira, para se defenderem dos efeitos tóxicos destas espécies reativas, dispõem de enzimas antioxidantes capazes de ajudá-los a superar a barreira oxidante imposta pelo hospedeiro, possibilitando assim a infecção.

Proteínas antioxidantes na defesa de patógenos

[029] Para se defenderem das diferentes fontes de estresse oxidativo, os patógenos possuem diversas enzimas capazes de metabolizar as EROs e ERNs em produtos menos tóxicos ou atóxicos. Entre as mais importantes enzimas estão as superóxido dismutases (Sod) e as peroxidases como as catalases (Cat) e as peroxirredoxinas (Prx). As Sod são enzimas capazes aumentar a velocidade de dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 de $\sim 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (pH7) para $\sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Halliwell e Gutteridge, 2015). Por sua vez, a Cat converte o H_2O_2 em H_2O em taxas de $\sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e as Prx são capazes de fazer esta conversão em taxas que alcançam até $\sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. A importância destas enzimas pode ser medida pelo grande número de isoformas em bactérias patogênicas. Como exemplo, em *Salmonella entérica* são encontradas quatro

isoformas de Sod (SodA, SodB, SodC1 e SodC2), três de Cat (KatE, KatG e KatN) e três de Prx (AhpC, TsaA e Tpx) (Ammendola *et al.*, 2008; Brooks *et al.*, 2011; Fang *et al.*, 1999). Redundância similar é encontrada em outras bactérias o que revela a importância das enzimas antioxidantes (Bansal *et al.*, 2012; Mishra e Imlay, 2012).

[030] Ponto importante reside no fato que a Sod pode impedir a formação de peroxinitrito e, conseqüentemente de seus derivados, pela decomposição do $O_2^{\bullet-}$ impedindo que ele reaja com o $NO^{\bullet}$. Adicionalmente, tanto a Sod quanto as peroxidases (Cat e Prx) são fundamentais para impedir a formação do $HO^{\bullet}$ que pode ocorrer diretamente pela reação de Harber Weiss entre H_2O_2 e o $O_2^{\bullet-}$ ou mediado pelo Fe nas reações de Fenton (Figura 1). A redundância de enzimas antioxidantes é somente aparente, pois várias diferem quanto ao substrato, cofatores, regulação gênica, estabilidade dentre outros aspectos. Adicionalmente, mutantes sem enzimas antioxidantes individuais apresentam susceptibilidade aumentada de EROs (Mishra e Imlay, 2012).

[031] Diversos trabalhos revelam que o bloqueio de enzimas antioxidantes por agentes químicos é capaz de acentuar a morte celular dos patógenos quando submetidos a estresse oxidativo ou tratamento com antibióticos e, dessa forma, uma alternativa lógica seria a utilização destes inibidores de enzimas antioxidantes em terapias antimicrobianas (Birben *et al.*, 2012). No entanto, os hospedeiros, e aí se incluem os humanos, possuem enzimas extremamente semelhantes as dos patógenos, principalmente quando se trata da Sod e Cat e os inibidores acabam por ser tóxicos também às células dos hospedeiros (Benov e Fridovich, 1994; Heikkila e Cohen, 1977; Lu *et al.*, 1998; Misra e Fridovich, 1978; Roberts e Hirst,

1996; Sugadev, Ponnuswamy e Sekar, 2011). Neste contexto um importante alvo seria as Prx, uma vez que diversas destas enzimas possuem características distintas entre procariotos e eucariotos.

Peroxirredoxinas e sua importância em bactérias patogênicas

[032] As Prx foram a última grande família de peroxidases a ser descoberta. Diferentemente da Sod e Cat, estas enzimas não possuem grupos prostéticos e utilizam uma cisteína (cisteína peroxidásica, C_P) altamente reativa para decompor hidroperóxidos (Kim *et al.*, 1988; Netto *et al.*, 1996). Adicionalmente, quando se analisa as estruturas quaternárias destas enzimas, observa-se que a C_P se encontra em grande proximidade com uma Thr (ou Ser, em alguns casos) e com uma arginina (Arg), a qual é totalmente conservada em todas as Prx já descritas até o momento. Estes três resíduos de aminoácidos (C_P, Thr/Ser e Arg) formam a tríade catalítica, e a desprotonação e a manutenção de C_P na forma de tiolato são altamente dependentes da integridade de Thr/Ser e Arg (Tairum *et al.*, 2016).

[033] Apesar de todas as Prx possuírem a C_P, elas constituem uma família de enzimas bastante heterogênea e diversas classificações já foram propostas, sendo que a mais utilizada subdivide essas proteínas em três grandes grupos (Prx 1-Cys, Prx 2-Cys típicas e Prx 2-Cys atípicas) de acordo com a quantidade de resíduos de cisteína envolvidos no processo de redução do hidroperóxido (Wood *et al.*, 2003). As Prx 1-Cys são proteínas homodiméricas que apresentam apenas um resíduo de cisteína (C_P) envolvido no ciclo catalítico localizado na região N-terminal. Já as Prx 2-Cys utilizam dois resíduos de

cisteína no ciclo catalítico, um na região N-terminal (C_P) e outro na C-terminal, este último denominado de cisteína de resolução (C_R). Durante o ciclo catalítico forma-se um dissulfeto $C_P - C_R$, sendo que as Prx 2-Cys típicas apresentam-se em homodímeros e formam uma ligação dissulfeto intermolecular, e as Prx 2-Cys atípicas apresentam-se como monômeros ou homodímeros e formam uma ponte dissulfeto intramolecular (Wood, Poole e Karplus, 2003). Após sua oxidação, as Prx são geralmente reduzidas pelo sistema Trx, composto pelas enzimas tiorredoxina (Trx) e tiorredoxina redutase (TrxR), que utiliza elétrons provenientes do NADPH via uma molécula de FAD (flavina adenina dinucleotídeo). A redução pelo sistema Trx restaura a atividade peroxidásica das Prx, tornando-as aptas à decomposição de uma nova molécula de hidroperóxido. Neste contexto, a partir deste ponto iremos nos referir somente as Prx 2-Cys típicas que são alvo desta solicitação.

[034] Enquanto a Cat é capaz de decompor somente H_2O_2 com constante de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, as Prx 2-Cys apresentam constantes de $10^{7-8} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Em contraste com Cat que responde somente pela decomposição de H_2O_2 , as Prx são capazes de decompor uma grande variedade de hidroperóxidos, dentre eles hidroperóxidos de lipídeos (Lp-OOH) e peroxinitrito (NOO^-), com constantes de segunda ordem de $10^{7-8} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Ogusucu *et al.*, 2007; Perkins *et al.*, 2015; Tairum *et al.*, 2016). Também foi demonstrado que as Prx 2-Cys típicas são capazes de decompor até mesmo peróxidos de proteínas e aminoácidos com eficiência moderada ($10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), o que revela sua grande versatilidade na decomposição de hidroperóxidos (Peskin *et al.*, 2010).

[035] Adicionalmente, estas proteínas estão entre as

mais abundantes em bactérias. Como exemplo, em *Escherichia coli* as Prx estão entre as dez proteínas mais expressas (Link, Robison e Church, 1997). Em bactérias, as 2-Cys Prx típicas, são normalmente denominadas de AhpC (Alquil hidroperóxido redutase C). Assim como as Prx de eucariotos, as enzimas bacterianas são capazes de decompor com taxas extremamente elevadas tanto H_2O_2 quanto peróxidos de lipídeos. Já foi demonstrado que linhagens de *Helicobacter pylori* e *Helicobacter hepaticus*, agentes causadores de úlceras/gastrites estomacais e de hepatite crônica em mamíferos, respectivamente, apresentam níveis elevados de peróxidos de lipídeos quando o gene *ahpC* é deletado (Mehta et al., 2007). Resultados similares foram descritos para *Campylobacter jejuni*, o agente etiológico de gastroenterites (Oh e Jeon, 2014).

[036] Em *Salmonella typhimurium*, patógeno responsável por moléstias gastrointestinais, febre tifoide e septicemia, foi demonstrado que linhagens deficientes de Prx apresentam alteração da morfologia celular e proliferação reduzida no interior da célula. O estudo também revelou que quando uma AhpC é superexpressa em células de *S. typhimurium* nocauteadas para genes envolvidos na decomposição de peróxidos ($\Delta KatE$, $\Delta KatG$, $\Delta KatN$, $\Delta AhpC$ e $\Delta TSA A$), o patógeno recupera as características da linhagem selvagem (Hébrard et al., 2009). Estes dados indicam que as Prx de *Salmonella* contribuem para a virulência do patógeno ao capacitá-lo a sobreviver em ambientes hostis.

[037] Em *Mycobacterium tuberculosis*, o agente etiológico da tuberculose, a expressão de AhpC em isolados clínicos com a deleção de uma das isoformas de Cat ($\Delta katG$) é aumentada tanto no meio intracelular quanto no extracelular, o que aparentemente é de importância para a manutenção da

virulência de *M. tuberculosis* (Niето R *et al.*, 2016). No caso de *S. aureus*, o agente etiológico de diversas infecções hospitalares, AhpC juntamente com a catalase possuem papéis compensatórios e são fundamentais para a sobrevivência e colonização do trato respiratório (Cosgrove *et al.*, 2007). Estudos envolvendo metatranscriptoma de *S. aureus* e *S. epidermidis* revelaram que *ahpc* é altamente expresso no trato respiratório, sendo ao menos três vezes maior no ambiente *in vivo* quando comparado com os microrganismos crescidos em meio de cultura (*in vitro*) (~1320 reads per million × ~540 rpm) (Chaves-Moreno *et al.*, 2016).

[038] Insultos oxidativos revelam que antioxidantes bacterianos desempenham um papel na proteção de microrganismos (Melillo, Bakshi e Melendez, 2010), não somente atuando na decomposição das EROs como também são capazes de subverter vias de sinalização como os envolvidos na resposta imunológica (Baxt, Garza-Mayers e Goldberg, 2013). Neste contexto, é fundamental explorar novos paradigmas para desenvolver novos fármacos antibacterianos, e aí se incluem as 2-Cys Prx de bactérias patogênicas (Baxt, Garza-Mayers e Goldberg, 2013; Melillo, Bakshi e Melendez, 2010).

Inibição de Prx2-Cys típicas por Adenantina (Adn) e efeito em células tumorais

[039] Os compostos extraídos de plantas despertam um interesse especial da indústria farmacêutica em função de sua potencialidade para o desenvolvimento de novas drogas. Entre esses compostos naturais encontram-se os diterpenoides, uma ampla classe de metabólitos secundários com significativa atividade biológica que vem sendo investigada quanto à sua eficácia no tratamento de diversas doenças como câncer, doenças

cardiovasculares e inflamatórias (Tirapelli *et al.*, 2008). Recentemente, foi demonstrado que a adenantina (Adn), um diterpenoide da classe dos *ent*-caurânicos, extraído de *Isodon adenantha*, possui propriedades antitumorais (Liu *et al.*, 2012, 2013). Os autores observaram que a Adn possui a capacidade de induzir a diferenciação de células de Leucemia Mieloide Aguda (LMA), a forma de leucemia aguda mais comum entre adultos (Liu *et al.*, 2012). Na LMA ocorre um bloqueio da diferenciação de células sanguíneas em estágios específicos de maturação, impedindo a especialização celular e levando a proliferação descontrolada de células leucêmicas. Acredita-se que essa diferenciação seja mediada por hidroperóxidos, em especial o H_2O_2 , através da oxidação de MAP quinases como ERK1 e ERK2 que estão envolvidas na diferenciação de células hematopoiéticas e, portanto, sujeitas a regulação por peroxidases (Cassinat *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2000).

[040] Através de análises bioquímicas e de biologia molecular foi demonstrado que os alvos biológicos da Adn eram as isoformas citosólicas de 2-Cys Prx típicas: Prx1 e Prx2. Também foi demonstrado que a ligação da Adn ocorria especificamente com o Sγ de resíduos de cisteína, onde esta atuaria como um acceptor de Michael em uma reação de adição entre o C17 da Adn com cisteínas das 2-Cys Prx típicas Prx1 e Prx2 de células de LMA, originando um aduto e inibindo a atividade peroxidásica dessas enzimas (Liu *et al.*, 2012).

[041] Assim, foi proposto um modelo de ligação onde a Adn interagiria com outros aminoácidos na região do sítio ativo, incluindo os resíduos da tríade catalítica por meio de uma interação hidrofóbica com a Thr49 e uma interação polar com a Arg128, ambos pertencentes à tríade catalítica.

Consequentemente, ocorreria a inibição da atividade peroxidásica dessas proteínas, permitindo então o acúmulo de H₂O₂ intracelular (Liu *et al.*, 2012, 2013).

[042] Posteriormente, Hou e colaboradores observaram que a inibição de Prx1 e Prx2 por Adn foi capaz de induzir a morte de células de hepatocarcinoma (CHC) com mais eficiência do que em células normais imortalizadas, além de inibir significativamente o crescimento de tumores xenográficos sem efeitos tóxicos significativos (Hou *et al.*, 2014). Foi observado pelos autores que células tratadas com adenantina tiveram seus níveis de hidróperóxidos aumentados de duas a três vezes em relação às células que não receberam o tratamento, o que possibilitaria a utilização destes compostos em processos de morte celular induzida por hidróperóxidos e espécies geradas através de reações como a de Fenton e Harber-Weiss, sendo portanto, um potencial agente terapêutico para pacientes com hepatocarcinoma (Hou *et al.*, 2014). Recentemente, foi demonstrado que a administração de Adn juntamente com o antitumoral VD3 (1,25-dihydroxyvitamin D3) é capaz de aumentar significativamente a diferenciação e atividade apoptótica em células de leucemia promilelocítica aguda (APL) (Wei *et al.*, 2016).

[043] Em razão da promissora utilização da Adn como inibidor de Prx para o tratamento de neoplasias em 2011 foi solicitada a patente para o tratamento de neoplasias (CN103045715A). Também existe patente prévia (2010) para a utilização de Adn para o tratamento de esclerose múltipla em humano (CN102462677A). Entretanto, não existe até o presente momento solicitação de patente para o tratamento de doenças infecciosas incluindo aquelas causadas por bactérias. Neste

contexto, diferenças entre as 2-Cys Prx típicas de eucariotos e AhpCs de procariotos podem significar importantes características para serem exploradas na utilização de fármacos que sejam capazes de inibir essas proteínas em bactérias, potencializando o estresse oxidativo promovido pela administração de antibióticos, mas que tenham pouco ou nenhum efeito sobre as proteínas dos hospedeiros.

ESTADO DA TÉCNICA

[044] O documento CN103045715A refere-se ao conhecido uso da substância Adenantina para o tratamento de leucemia pela inibição da atividade enzimática de enzimas antioxidantes resultando no efeito da diferenciação celular nas células de leucemia. O documento ainda revela que a Adenantina é segura, não tóxica e é um forte composto em atividade farmacológica. Conforme observado, tal documento cita a utilização de adenantina (Adn) como inibidor de peroxirredoxinas de humanos e também relata que é uma molécula segura para utilização como fármaco no tratamento de leucemia. De fato, tal molécula é considerada segura desde os estudos pioneiros em células humanas (Liu et al., 2012. Nat. Chem. Biol. 2012. 5:486-93) e, posteriormente, em mamíferos contendo tumores xenográficos (Hou, JK et al. 2014. Cell Death & Disease, 5, e1400) e esse é um fator bastante favorável para a utilização do composto em terapias médicas. Entretanto, é importante ressaltar que tal documento foca em uma doença genética e não uma doença infecciosa, como as ocasionadas por bactérias patogênicas, e também não prevê sua utilização em conjunto com antibacterianos. De fato, a presente invenção demonstra que as doses utilizadas para inibir isoformas bacterianas são menores que as de enzimas humanas, o que pode estar relacionado a

diferenças estruturais existentes entre enzimas de eucariotos (e.g. mamíferos) e procariotos (bactérias) (Wood et al. 2003. *Science*, 300:650-3).

[045] O documento CN102462677A refere-se ao diterpenoide Adenantina, discorrendo sobre sua atividade farmacológica, toxicidade e segurança. Adicionalmente refere-se ao uso como aditivo em uma nova formulação medicamentosa como inibidor de NF-kB para o tratamento de Esclerose Múltipla. Entretanto, tal documento não apresenta conflito com a presente invenção por ser direcionado ao tratamento de doença genética (esclerose múltipla) e propõe sua utilização com outros agentes já utilizados no tratamento (glicocorticoides, imunoglobulinas, interferon, ciclofosfamida, dentre outros). Novamente se trata de uma doença genética, muito distinta de doenças causadas por agentes infecciosos, e, em nenhum momento, é proposto a utilização de Adenantina em conjunto com antibióticos, como na presente invenção.

[046] O documento CN108721275A refere-se ao uso da Adenantina em conjunto com Andrografolida. Quando administrados em conjunto possuem ação sinérgica contra a atividade proliferativa de células cancerígenas. Adicionalmente, é revelado que Andrografolida possui atividades antimicrobianas. Ainda, é informado que, em conjunto, permitem redução da dose administrada, proporcionando menos efeitos adversos e colaterais. Conforme observado, no documento é citado que a Andrografolida possui atividade antimicrobiana, e existem estudos publicados de sua utilização para esta finalidade Zhang et al., 2019. *Biomed Pharmacother.* 117:109065; Banerjee et al., 2017. *Acta Trop.* 176:58-67). A atividade antimicrobiana discutida é para o outro

composto (Andrografolida). Novamente, é importante ressaltar que, a utilização da Adenantina em conjunto com a Andrografolida é proposta para tratamento de doença genética e não infecciosa, como proposto na presente invenção.

[047] O documento em nome de Chuan-Xu Liu *et al.*, intitulado "ADENANTHIN TARGETS PEROXIREDOXIN I AND II TO INDUCE DIFFERENTIATION OF LEUKEMIC CELLS" relata e reforça que a adenantina induz a diferenciação de células APL sensíveis ao ácido trans-retinoico (ATRA) e resistentes a ATRA, visando diretamente o CR de Prx I e Prx II, juntamente com a inibição de suas atividades antioxidantes. Entretanto, tal documento não apresenta conflito com a presente invenção por propor a utilização da Adenantina para doença genética e não infecciosa, como na presente invenção.

[048] O documento em nome de Marta Siernicka *et al.*, intitulado "ADENANTHIN, A NEW INHIBITOR OF THIOL-DEPENDENT ANTIOXIDANT ENZYMES, IMPAIRS THE EFFECTOR FUNCTIONS OF HUMAN NATURAL KILLER CELLS", também evidencia a capacidade que Adenantina possui de inibir enzimas antioxidantes. Adicionalmente, descreve que tais ações são mediadas pela regulação de ligações dissulfeto intra ou intermolecular. Tal documento foca novamente em enzimas humanas de células NK (Natural Killers) e como mencionado, a Adenantina interfere na regulação de ligações dissulfeto com o sistema redutor representado pelas enzimas Trx e TrxR. Entretanto, existem diferenças fundamentais entre enzimas do sistema redutor de bactérias e humanos; como exemplo, a enzima TrxR de mamíferos não utiliza cisteína, mas sim selenocisteína para as atividades enzimáticas (Oliveira *et al.*, 2010. *Biochemistry*, 15:3317-26), um aminoácido muito mais reativo e presente quase que

exclusivamente em organismos com células nucleadas. Aqui ressalta-se que além de diferenças entre sistema redutor, existem diferenças fundamentais entre enzimas de bactérias e humanos, como apontado no esclarecimento ao documento 1 (Wood et al. 2003. Science, 300:650-3), o que não torna óbvio que um composto utilizado para enzimas humanas seja ativo para bactérias. De fato, foi demonstrado na presente invenção que a inibição por Adn é extremamente mais eficaz para peroxirredoxinas bacterianas quando comparadas com as humanas.

[049] Assim, conforme observado, não há no estado da técnica documentos que pudessem prever o sinergismo entre a Adenantina e o Aminoglicosídeo Canamicina, conforme sugerido pela presente invenção. Adicionalmente, a presente invenção mostra-se bastante promissora, visto que: 1) As enzimas bacterianas apresentam diferenças significativas estruturais e funcionais com as de mamíferos, o que a princípio pode explicar uma inibição acentuada das enzimas bacterianas; 2) Os compostos (Adenantina e aminoglicosídeos) que são alvo da presente invenção são considerados seguros pela comunidade científica internacional; 3) Infecções hospitalares ocasionadas por bactérias super-resistentes sendo muitas delas Gram+ levam a um elevado número de comorbidades, óbitos, despesas hospitalares e reflexos de grande monta financeira, uma vez que, somente nos EUA e Europa ocidental são gastos bilhões de dólares anuais em decorrência de infecções de origem bacterianas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[050] Para obter uma total e completa visualização do objetivo desta invenção, são apresentadas as figuras as quais se faz referências, conforme segue.

[051] A Figura 1 apresenta as reações de Fenton (A) e Haber-Weiss (B), onde em (A) a interação entre uma molécula de Fe^{3+} com uma de ânion superóxido resulta na liberação de Fe^{2+} que, ao reagir com peróxido de hidrogênio, produz o radical hidroxila; enquanto que em (B), a hidroxila é originada a partir da reação entre peróxido de hidrogênio e ânion superóxido.

[052] A Figura 2 apresenta o mecanismo comum de morte celular induzida por antibióticos, onde em (1) as interações primárias fármaco-alvo biológico (aminoglicosídeos com ribossomos, quinolonas com topoisomerase e β -lactâmicos com proteínas ligadas à penicilina (PBPs) da parede celular) estimulam a oxidação do NADH através da cadeia transportadora de elétrons, que é dependente do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA); em (2) a hiperativação da cadeia transportadora de elétrons estimula a formação do radical ânion superóxido (O_2^-), o qual danifica grupamentos Fe-S (3), tornando o ferro ferroso disponível para oxidação pela reação de Fenton (4), que produz radical hidroxila (OH^-), danificando DNA, lipídios e proteínas (5), o que contribui para a morte celular induzida por antibióticos. Figura modificada de Kohanski et al. (2010).

[053] A Figura 3 mostra as diferenças que a porção C-terminal, presente somente em proteínas de eucariotos como o homem, alteram o microambiente do sítio ativo em torno da cisteína catalítica. A Superfície molecular de decâmeros de 2-Cys Prx típicas de eucarioto e procarioto são representados por (A) e (B), respectivamente. As estruturas estão coloridas em cinza, os aminoácidos da tríade catalítica estão coloridos em laranja (C_P), azul (Arg) e vermelho (Thr/Ser) e a cauda C-terminal presente somente em eucariotos, em verde escuro.

[054] A Figura 4 mostra graficamente a inibição da formação de dissulfeto intermolecular e da atividade peroxidásica de EcAhpC e SaAhpC por Adn. As proteínas EcAhpC **(A)** e SaAhpC **(B)** foram reduzidas com 5mM de DTT por 1 hora (lane 1) e, em seguida, dessalinizadas para a remoção do excesso de redutor (lane 2). Aliquotas contendo 10µM das enzimas reduzidas e dessalinizadas foram tratadas com concentrações variadas de Adn (0.5, 1, 2.5, 5 e 10 equivalentes molares - lanes 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente) por 1 hora e posteriormente oxidadas com 5 equivalentes molares de H₂O₂ por 30 minutos. As reações foram paralisadas com a adição de *stop buffer* (Tris 50mM pH 6,8, NEM 50mM, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.1%) e analisadas em SDS-PAGE não redutor corado com *coomassie blue*. A lane 3 representa a proteína reduzida/dessalinizada e posteriormente oxidada, sem tratamento com Adn. Os procedimentos foram realizados em temperatura ambiente. Os ensaios foram feitos em triplicata e com repetições independentes. Inibição da atividade peroxidásica de EcAhpC e SaAhpC por Adn. EcAhpC **(C)** e SaAhpC **(D)** reduzidas e dessalinizadas foram tratadas com concentrações variáveis de Adn (0.5 - ■, 1 - ▲ e 2.5 - ▼ equivalentes molares) por 1 hora em temperatura ambiente e, posteriormente, dessalinizadas novamente. A seguir, 3µM das proteínas tratadas foram adicionadas a reações contendo EcTrx 6µM, EcTrxR 0,9µM, NADPH 150µM, HEPES 50mM pH 7,0, DTPA 100µM e azida sódica 1mM. As reações foram incubadas a 37°C por 3 minutos antes de serem iniciadas pela adição de H₂O₂ 500µM e monitoradas espectrofotometricamente a 340nm, 37°C, por 5 minutos. Como controle positivo foram utilizadas reações em que as proteínas não foram previamente tratadas com Adn (●) e, como controle

negativo, foram utilizadas reações sem a adição de AhpC(♦). As velocidades iniciais de cada reação foram calculadas, transformadas em valores de porcentagem e plotadas para o cálculo dos valores de IC₅₀ de Adn para EcAhpC **(E)** e SaAhpC **(F)**. Os ensaios foram feitos em triplicata e com repetições independentes.

[055] A Figura 5 mostra imagens da avaliação da inibição do crescimento de bactérias Gram + (*B. subtilis*, *S. aureus* e *S. epidermidis*) e avaliação da atividade bactericida/bacteriostática de Adn. **(A)** Viabilidade celular de *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium* após tratamento com Adn. As células de *B. subtilis* F41923-PY79 (●), *S. aureus* ATCC 25923 (■), *S. epidermidis* ATCC 12228 (▲), *E. coli* ATCC 35218 (▼), *P. aeruginosa* ATCC29853 (◆) e *S. typhimurium* ATCC 700720 (●), em concentração de 10⁵ UFC, foram inoculadas em meio Mueller Hinton contendo concentrações crescentes de Adn e incubadas por 24 horas, a 37°C, sendo então quantificadas espectrofotometricamente a 600nm. Células de *S.aureus* **(B)** e *S. epidermidis* **(C)** foram incubadas em meio de cultura LB sem Adn (figuras à esquerda) ou contendo Adn 750µM (figuras à direita) por 24 horas a 37°C. A seguir, as células não tratadas foram diluídas 10.000 e 100.000 vezes e inoculadas em meio de cultura LB-ágar, sem Adn. As células tratadas foram inoculadas no mesmo meio de cultura sem diluição ou diluídas 100 vezes. Após 16 horas de incubação a 37°C, foi possível observar que as células que não receberam o tratamento com Adn foram capazes de formar colônias abundantes (figuras à esquerda), enquanto as células tratadas com Adn apresentaram formação de colônias reduzida (figuras à direita). Este ensaio foi realizado em duplicata.

[056] A Figura 6 mostra graficamente o teste de toxicidade de canamicina em combinação com adenantina sobre células de bactérias patogênicas de *S. aureus* e *S. epidermidis*. *S. aureus* e *S. epidermidis* foram cultivadas por 6 horas em meio LB e, posteriormente, diluídas no mesmo meio de cultura até $OD_{600}=0.01$. As células foram então tratadas com 1,5 µg/ml de canamicina (Kan) e 200µM adenantina (Adn) separadamente (colunas 2 e 3), ou simultaneamente (coluna 4) por 24 horas, a 37°C e sem agitação. Após o período de incubação, a densidade celular foi quantificada por espectrofotometria a 600nm. Os ensaios foram feitos em triplicata e com repetições independentes.

[057] A Figura 7 mostra graficamente a avaliação da toxicidade de gentamicina associada a Adn sobre *S. aureus*. Células de *S. aureus* (ATCC 25923) em concentração de 10^5 UFC foram inoculadas em meio Mueller Hinton contendo apenas gentamicina 50ng/ml, ou associada Adn (60µM) e incubadas por 24 horas, a 37°C, sendo então quantificadas espectrofotometricamente a 600nm. Os ensaios foram feitos em triplicata e com repetições independentes.

[058] A Figura 8 mostra graficamente a avaliação da toxicidade de polimixina B (PMNB) associada à adenantina (Adn) sobre células da bactéria Gram- *E. coli*. Células de *E. coli* (ATCC25922) em concentração de 10^5 UFCs foram inoculadas em meio Mueller Hinton contendo apenas PMNB (0,2µg/ml em **A**; 0,3 µg/ml em **B**), apenas Adn 200µM ou a associação dessas duas moléculas e incubadas por 24 horas, a 37°C, sendo então quantificadas espectrofotometricamente a 600nm. Os ensaios foram feitos em triplicata e com repetições independentes.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[059] A presente invenção refere-se ao uso de diterpenoides *ent*-caurânicos, como a adenantina (Adn), seus derivados em associação a antibióticos que promovem aumento do estresse oxidativo, como os β -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas, por exemplo a canamicina (Kan), como potencializadores da atividade antimicrobiana desses fármacos.

[060] A adenantina (Adn) extraída de *Isodon adenanthus*, também conhecida como *Rabdosia adenantha* (Cat. No: CFN99215) oriundo da flora da China, que possui a propriedade antitumoral através da inibição de peroxirredoxinas 2-Cys típicas de humanos. Uma vez que, existem diferenças significativas no ambiente de ligação de substratos (sítios ativos) entre 2-Cys Prx típicas de eucariotos e procariotos (Figura 3), avaliamos a capacidade inibitória sobre enzimas 2-Cys Prx (AhpC) de bactérias Gram- e Gram+. Através de dois ensaios enzimáticos distintos (oxidação DTT - Tabela 2; oxidação de NADPH - Figura 4) foi demonstrado que Adn é capaz de inibir de forma acentuada as enzimas de ambas as classes bacterianas. Também demonstramos que Adn é capaz de aniquilar linhagens de bactérias patogênicas Gram+ de forma isolada (Figura 5) e de Gram + e Gram-, potencializando a ação de antibacterianos conhecidos (Figuras 6,7 e 8). De forma clara, foi demonstramos que a Adn é capaz de inibir de forma mais eficiente as 2-Cys Prx bacterianas, quando comprado com as de humanos, e potencializar a ação de antibacterianos de forma acentuada. A descrição detalhada da invenção é apresentada a seguir.

Diferenças entre 2-Cys Prx de eucariotos e procariotos

[061] Uma diferença marcante entre as 2-Cys Prx típicas de procariotos e eucariotos reside na existência de um

prolongamento C-terminal que insere uma α hélice nas enzimas de eucariotos que se projeta para o interior do sítio ativo alterando de forma substancial o microambiente catalítico (Figura 3A e 3B). Já foi postulado que a ausência dessa região está relacionada com uma maior resistência de 2-Cys Prx típicas à inativação por altas doses de hidroperóxidos, enquanto que, nas representantes de eucariotos este prolongamento favorece a superoxidação de C_P da enzima em C_P-SO_2H , impedindo a formação de dissulfeto e levando à sua inativação (Wood, Poole e Karplus, 2003). Esta diferença parece bastante relevante, uma vez que para patógenos é importante possuir uma enzima altamente resistente à inativação por superoxidação para garantir a sua sobrevivência no hospedeiro.

[062] Na presente invenção, explorou-se se Adn é capaz de inibir de forma eficiente e diferencial as 2-Cys Prx bacterianas (AhpCs). Para tanto, foram testadas individualmente por meio do ensaio de oxidação do DTT, um ensaio pouco rápido e simples para avaliar a atividade de peroxirredoxinas. Como alvos de inibição foram utilizadas as 2-Cys Prx bacterianas, denominadas de AhpC, das seguintes bactérias de linhagens patogênicas Gram-: *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 29853) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 700720); ou Gram+: *Bacillus subtilis* (F41923-PY79), *S. aureus* (ATCC 25923) e *S. epidermidis* (ATCC 12228). Os resultados demonstraram que Adn é capaz de inibir, eficientemente, com taxas de inibição da velocidade inicial (v_0) da reação de $\sim 40-80\%$ (Tabela 2).

Tabela 2: Velocidade inicial (v_0) de enzimas AhpCs de espécies de bactérias Gram- (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium*) e Gram+ (*B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* e

Staphylococcus epidermidis) tratadas (Adn+) ou não (Adn-) com Adenantina.

	Velocidade inicial (v0) de reação (μM/s)	
	Adn-	Adn+
EcAhpC	10.53 (±0.75)	6.69 (±0.13)
PaAhpC	9.36 (±0.13)	6.52 (±1.67)
StAhpC	8.03 (±0.83)	6.77 (±0.61)
BsAhpC	19.49 (±0.06)	3.21 (±0.06)
SaAhpC	12.04 (±0.73)	4.84 (±1.62)
SeAhpC	15.88 (±0.78)	5.14 (±0.14)

O inibidor Adn é capaz de inibir a atividade de AhpCs ao se ligar a cisteínas e apresenta alta atividade inibitória

[063] Uma vez que a ligação de Adn ao sítio ativo das Prx impede a formação do dissulfeto intermolecular, o sucesso desse tratamento pode ser observado através de SDS-PAGE não redutor. Dessa forma, a porção de proteína que não estiver ligada a Adn apresenta sua forma oligomérica usual, caracterizada por dímeros unidos por dissulfeto (~44 kDa), enquanto a porção de proteína ligada a Adn será visualizada no gel como monômeros (~22kDa), devido à sua incapacidade de formar o dissulfeto. Para isso, foi separada uma alíquota de proteína após o tratamento com cada concentração de Adn (0.5-10 equivalentes molares) e adicionados 5 equivalentes molares (em relação à concentração da proteína) de H₂O₂, sendo a reação incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, analisada por SDS-PAGE não redutor. As proteínas avaliadas foram a AhpC de *E. coli* (EcAhpC) (Gram-) e *S. epidermidis* (SeAhpC) (Gram-). Os resultados revelam que, quanto maior a dose de Adn aplicada maior foi a inibição da formação de dissulfetos intermoleculares (Figuras 4A e 4B) e,

portanto, demonstram que Adn é capaz de inibir as AhpCs bacterianas por meio do bloqueio das cisteínas.

[064] Com a finalidade de determinar o IC₅₀ de Adn foram efetuados ensaios de oxidação de NADPH com enzimas tratadas com as concentrações de Adn e enzimas utilizadas no ensaio em SDS-PAGE. Os resultados revelaram que mesmo doses estequiométricas de Adn (0.5 eq.) foram capazes de inibir fortemente a atividade das enzimas (Figuras 4C e 4D). O cálculo da concentração inibitória mínima aparente (IC₅₀) revelou IC₅₀ de 0,481 ± 0,024 µM para EcAhpC e 1,650 ± 0,100 µM para SaAhpCT (Figuras 4E e 4F), cerca de 10-30 · menores aos determinados para Prx2 humana e até 3 · menor que o determinado para Prx1 humana utilizando o mesmo método (Liu et al., 2012). Neste contexto, os dados obtidos inicialmente indicam um IC₅₀ bastante diminuto tanto para EcAhpC quanto par SaAhpC.

Adn é capaz de agir como bactericida em linhagens de bactérias patogênicas

[065] Com o objetivo de investigar a possível atividade bactericida/bacteriostática da Adn, realizamos testes de susceptibilidade a antimicrobianos pelo método de microdiluição em meio de cultura (Eloff, 1998; NCCLS, 2003) utilizando as linhagens das bactérias Gram+ *B. subtilis* (ATCC 39094), *S. aureus* (ATCC 29213) e *S. epidermidis* (ATCC 12228), e das bactérias Gram- e *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 29853) e *S. typhimurium* (ATCC 19585), na presença de concentrações crescentes de Adn. Para isso, uma concentração final de 10⁵ UFC de cada bactéria foi inoculada em microplacas contendo meio Mueller Hinton e concentrações crescentes de Adn e incubada a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, a densidade celular foi estimada espectrofotometricamente a 600

nm para o cálculo do valor de MIC₅₀. O crescimento de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium* não foi inibido pela presença de Adn e, portanto, não foi possível calcular o MIC₅₀ para essas linhagens. Entretanto, as linhagens de *B. subtilis*, *S. aureus* e *S. epidermidis* foram sensíveis à toxicidade de Adn, apresentado IC₅₀ de 116µM, 111µM e 146µM, respectivamente (Figura 5A).

[066] A seguir, para avaliar se Adn possui efeito bactericida ou bacteriostático sobre as linhagens *S. aureus* e *S. epidermidis*, essas cepas foram pré-tratadas com 750µM de Adn por 24 horas, a 37°C, e posteriormente inoculadas em meio LB-ágar sem Adn (Figura 5B). Ao contrário do observado para o controle positivo, em que as células não receberam o pré-tratamento com Adn e foram capazes de formar colônias abundantes no meio LB-ágar sem Adn, as células tratadas com Adn apresentaram crescimento bastante reduzido após serem inoculadas em meio sem Adn, indicando o efeito bactericida deste composto.

Efeito do tratamento de linhagens de bactérias patogênicas Gram+ com Adn em associação com antibióticos

[067] Adicionalmente ao efeito bactericida isolado de Adn, sua utilização pode ser combinada com antibióticos para que promovam um aumento do estresse oxidativo, como os β-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas (Dwyer, Belenky, Yang, Macdonald, et al., 2014), o que potencializaria o efeito antimicrobiano desses fármacos. Com o objetivo de avaliar o efeito sinérgico de Adn e aminoglicosídeos, as linhagens bacterianas *S. aureus* e *S. epidermidis* foram tratadas isoladamente com 1,5µg/ml de canamicina (Kan) ou 200µM de Adn e, a seguir, simultaneamente com as mesmas concentrações de

Kan e Adn (Figura 6). Os resultados indicam que o tratamento apenas com Adn provocou morte celular de ~60% para *S. aureus* e 47% para *S. epidermidis*, enquanto o tratamento apenas com Kan provocou morte celular de ~29% para *S. aureus* e ~44% para *S. epidermidis*. Já quando essas cepas bacterianas foram tratadas simultaneamente com Adn e Kan, a morte celular atingiu ~97% para ambas as linhagens, indicando um efeito sinérgico promovido por Adn e Kan.

[068] Também avaliamos os efeitos da associação do antibiótico gentamicina sobre linhagens de *S. aureus*. Os resultados revelaram que o tratamento das células com gentamicina (50µg/ml) levou à mortalidade de ~55% das células bacterianas, ao passo que, quando combinada com Adn a morte celular foi elevada para ~90% (Figura 7). Em conjunto, os resultados demonstram que Adn combinada com antibióticos é capaz de potencializar a ação dos antibióticos.

A combinação de Adn com o antibiótico polimixina B nonapeptídeo (PMBN) é capaz de aniquilar bactérias Gram-

[069] Não escapou à nossa atenção que, apesar da Adn inibir de forma muito acentuada a atividade de AhpC de bactéria Gram- (Figuras 4C e 4E), as bactérias que não apresentaram suscetibilidade ao tratamento com Adn foram justamente as Gram- (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium*). De fato, é bem conhecido que bactérias Gram- podem ser mais resistentes ou mesmo insensíveis ao tratamento com moléculas que apresentam atividade bactericida ou bacteriostática, pois seu sistema de membranas representa uma barreira para a entrada de compostos, incluindo antibacterianos, fornecendo uma camada extra de proteção às bactérias (Delcour, 2009; Krishnamoorthy et al., 2017; Vaara, 1992). A membrana externa (ME) de bactérias Gram-

negativas é uma bicamada assimétrica composta de lipopolissacarídeos (LPS) na camada externa e glicerofosfolipídeos (PL) na interna (Nikaido, 1998). As principais características da estrutura LPS, como a presença do lipídio A e do antígeno O, são conservadas entre várias espécies. A maior parte do conhecimento atual sobre a seletividade das barreiras de permeabilidade da ME foi determinada por estudos envolvendo *E. coli*. Nesta bactéria, a atividade antibacteriana de antibióticos grandes e polares excedendo o tamanho para o transporte em porinas (> 600 Da em *E. coli*), são geralmente as mais restritas pela ME (Krishnamoorthy et al., 2017; Nikaido, 1998; O'Shea e Moser, 2008; Lakaye et al., 2001). Por outro lado, o caráter zwitteriônico de compostos se correlaciona com o aumento da permeabilidade através da ME, enquanto a hidrofobicidade está correlacionada com a propensão aumentada de um determinado composto ser substrato de bombas de efluxo de drogas (Krishnamoorthy et al., 2017). Neste contexto, compostos como Adn o qual apresenta baixa polaridade e peso molecular de 500Da, se encaixam nas drogas as quais este tipo de bactéria são refratárias (Vaara, 2019).

[070] As características da membrana de Gram- são alvo de uma classe de antibióticos denominados de polimixinas, os quais podem subjugar a barreira membrana de esta classe de bactérias (Vaara et al., 2019). Neste contexto, avaliamos a capacidade da administração de Adn em conjunto com doses subletais de polimixina B nonapeptídeo (PMBN) sobre linhagem de *E. coli*. Os resultados revelaram que a administração de 0,2µg de PMBN, Adn (200µM) ou a combinação dos dois compostos não foi capaz de alterar de forma significativa as taxas de

sobrevivência das bactérias (Figura 8A). Entretanto, quando foi aplicada a dose de 0,3µg de PMBN a sua combinação com Adn levou à redução da taxa de sobrevivência celular em ~ 90% (Figura 8B).

Diterpenoides ent-caurânicos, novos fármacos

[071] Do ponto de vista farmacológico, a avaliação da relação entre estrutura e atividade biológica de diterpenoides em geral incluindo os diterpenoides ent-caurânicos sugerem que determinadas características destas moléculas estão envolvidas em suas funções biológicas. Foi constatada a presença de um esqueleto decalínico substituído (porção hidrofóbica), capaz de interagir com lipídeos das membranas biológicas, e uma região que apresenta um grupo doador de hidrogênio (H) (porção hidrofílica), o qual é capaz de interagir com grupos aceptores de H presentes na membrana plasmática. Estas características permitem que estas moléculas sejam capazes de atravessar a membrana celular exercendo sua atividade biológica (Wang *et al.*, 2011). De fato, características como as apresentadas para este grupo de moléculas são altamente importantes para que um fármaco possa ser mais facilmente absorvido pelo organismo (Walters, 2012). Adicionalmente, é importante observar nestas estruturas a presença de um carbono (C) capaz de atuar como um doador de Michael para a reação com as cisteínas das 2-Cys-Prx (Liu *et al.*, 2012).

[072] Neste contexto, apesar de Adn ter sido utilizada para o tratamento de doenças genéticas, ela não é utilizada para o tratamento de doenças infecciosas. Neste pedido, demonstramos claramente que Adn é capaz de inibir as Prx bacterianas por meio da inativação do resíduo catalítico. Também demonstramos que as doses utilizadas (IC₅₀) para inativar

as enzimas bacterianas é significativamente menor que as determinadas para enzimas de humanos (até 30x menor) (Liu et al., 2012). Também demonstramos que possui propriedade bactericidas, em concentrações de micromolar, sobre bactérias Gram-, e, em conjunto com baixas concentrações de antibióticos é capaz de aniquilar bactérias Gram+ (Adn + Kan ou Gen) e também bactérias Gram- (Adn + polimixina nonapeptídeo), demonstrando um amplo espectro para sua utilização no tratamento de infecções ocasionadas por bactérias patogênicas. Dessa forma, o presente pedido de patente consiste em proteger o uso de Adn, seus derivados (moléculas modificadas) e diterpenoides ent-caurânicos quando associado a antibacterianos que promovem aumento do estresse oxidativo (β -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas) e também de polimixinas, uma vez que Adn e derivados são inibidores de 2-Cys Prx bacterianas (AhpCs) e agem como potencializadores da atividade antimicrobiana de fármacos antibacterianos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[073] ACKER, H. VAN *et al.* The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Induced Cell Death in Burkholderia cepacia Complex Bacteria. **PloS one**, v. 11, n. 7, p. e0159837, 2016.

[074] ALEXANDER FLEMING. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 10, p. 226-236, 1929.

[075] ALÓS, J.-I. [Antibiotic resistance: A global crisis]. **Enfermedades infecciosas y microbiología clinica**, v. 33, n. 10, p. 692-9, dez. 2015.

[076] AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic

era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in microbiology**, v. 1, p. 134, 2010.

[077] AMMENDOLA, S. *et al.* Regulatory and structural differences in the Cu,Zn-superoxide dismutases of *Salmonella enterica* and their significance for virulence. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 20, p. 13688-99, maio 2008.

[078] BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Current opinion in immunology**, v. 16, n. 1, p. 42-7, fev. 2004.

[079] BANSAL, S. *et al.* **Hyperthermophilic asparaginase mutants with enhanced substrate affinity and antineoplastic activity: structural insights on their mechanism of action**The FASEB Journal, 2012.

[080] BARTLETT, J. G.; GILBERT, D. N.; SPELLBERG, B. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 56, n. 10, p. 1445-50, maio 2013.

[081] BATISTA, R. *et al.* New oxidized ent-kaurane and ent-norkaurane derivatives from kaurenoic acid. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 3, p. 622-627, 2007.

[082] BAXT, L. A.; GARZA-MAYERS, A. C.; GOLDBERG, M. B. Bacterial subversion of host innate immune pathways. **Science (New York, N.Y.)**, v. 340, n. 6133, p. 697-701, maio 2013.

[083] BENOVA, L. T.; FRIDOVICH, I. *Escherichia coli* expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 41, p. 25310-4, out. 1994.

[084] BIRBEN, E. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, jan. 2012.

[085] BIZZINI, A. *et al.* The Enterococcus faecalis superoxide dismutase is essential for its tolerance to vancomycin and penicillin. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1196-202, dez. 2009.

[086] BREIDENSTEIN, E. B. M. *et al.* Complex ciprofloxacin resistome revealed by screening a Pseudomonas aeruginosa mutant library for altered susceptibility. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 12, p. 4486-91, dez. 2008.

[087] BROOKS, A. N. *et al.* Adaptation of cells to new environments. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v. 5, p. 544-561, 2011.

[088] BRYNILDSEN, M. P. *et al.* Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 160-5, 6 jan. 2013.

[089] CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1137-44, jul. 2006.

[090] CALCERRADA, P.; PELUFFO, G.; RADI, R. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. **Current pharmaceutical design**, v. 17, n. 35, p. 3905-32, dez. 2011.

[091] CALHOUN, L. N.; KWON, Y. M. The ferritin-like protein Dps protects Salmonella enterica serotype Enteritidis from the Fenton-mediated killing mechanism of bactericidal antibiotics. **International journal of antimicrobial agents**, v. 37, n. 3, p. 261-5, mar. 2011.

[092] CASSINAT, B. et al. New role for granulocyte colony-stimulating factor-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 in histone modification and retinoic acid receptor α recruitment to gene promoters: relevance to acute promyelocytic leukemia cell differentiation. **Molecular and cellular biology**, v. 31, n. 7, p. 1409-18, abr. 2011.

[093] CHAVES-MORENO, D. et al. Exploring the transcriptome of *Staphylococcus aureus* in its natural niche. **Scientific reports**, v. 6, p. 33174, set. 2016.

[094] CHOPRA, I.; HESSE, L.; O'NEILL, A. J. Exploiting current understanding of antibiotic action for discovery of new drugs. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. s1, p. 4S-15S, maio 2002.

[095] COSGROVE, K. et al. Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 3, p. 1025-35, fev. 2007.

[096] CZEKALSKI, N. et al. Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into lake geneva, Switzerland. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 106, 2012.

[097] D'COSTA, V. M. et al. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, n. 7365, p. 457-461, ago. 2011.

[098] DANTAS, G. et al. Bacteria subsisting on antibiotics. **Science (New York, N.Y.)**, v. 320, n. 5872, p. 100-3, abr. 2008.

[099] DAVIES, B. W. et al. Hydroxyurea induces hydroxyl radical-mediated cell death in *Escherichia coli*. **Molecular cell**, v. 36, n. 5, p. 845-60, dez. 2009.

[100] DEMASI, A. P.; PEREIRA, G. A.; NETTO, L. E. Cytosolic thioredoxin peroxidase I is essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria. **FEBS letters**, v. 509, n. 3, p. 430-4, 14 dez. 2001.

[101] DONE, H. Y.; VENKATESAN, A. K.; HALDEN, R. U. Does the Recent Growth of Aquaculture Create Antibiotic Resistance Threats Different from those Associated with Land Animal Production in Agriculture? **The AAPS journal**, v. 17, n. 3, p. 513-24, maio 2015.

[102] DUTRA, L. M. *et al.* ent-Kaurane diterpenes from the stem bark of *Annona vepretorum* (Annonaceae) and cytotoxic evaluation. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 15, p. 3315-20, ago. 2014.

[103] DWYER, D. J.; BELENKY, P. A.; YANG, J. H.; MACDONALD, I. C.; *et al.* Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. 2014.

[104] DWYER, D. J.; BELENKY, P. A.; YANG, J. H.; MACDONALD, I. C.; *et al.* Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 20, p. E2100-9, maio 2014.

[105] ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta medica**, v. 64, n. 8, p. 711-3, dez. 1998.

[106] FANG, F. C. *et al.* Virulent *Salmonella typhimurium* has two periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 13, p. 7502-7, jun. 1999.

[107] FORSBERG, K. J. *et al.* The shared antibiotic

resistome of soil bacteria and human pathogens. **Science (New York, N.Y.)**, v. 337, n. 6098, p. 1107-11, ago. 2012.

[108] FOTI, J. J. et al. Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. **Science (New York, N.Y.)**, v. 336, n. 6079, p. 315-9, abr. 2012.

[109] FRITZSCHE, C.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. Endothelial nitric oxide synthase limits the inflammatory response in mouse cutaneous leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 215, n. 9-10, p. 826-32, 2010.

[110] GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; DOWLING, P. M. **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 4. ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2007.

[111] GIRGIS, H. S.; HOTTES, A. K.; TAVAZOIE, S. Genetic architecture of intrinsic antibiotic susceptibility. **PloS one**, v. 4, n. 5, p. e5629, maio 2009.

[112] GOLKAR, Z.; BAGASRA, O.; PACE, D. G. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. **Journal of infection in developing countries**, v. 8, n. 2, p. 129-36, fev. 2014.

[113] GORDON, S. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 463-75, mar. 2016.

[114] GOULD, I. M.; BAL, A. M. New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 185-91, fev. 2013.

[115] GRANT, S. S. et al. Eradication of bacterial persisters with antibiotic-generated hydroxyl radicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 30, p. 12147-52, jul. 2012.

[116] GULLBERG, E. et al. Selection of Resistant

Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 7, p. e1002158, jul. 2011.

[117] GUSAROV, I. et al. Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. **Science (New York, N.Y.)**, v. 325, n. 5946, p. 1380-4, set. 2009.

[118] HAIKARAINEN, T.; PAPAGEORGIOU, A. C. Dps-like proteins: structural and functional insights into a versatile protein family. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 67, n. 3, p. 341-51, fev. 2010.

[119] HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 5 edition ed. Oxford: Oxford University Press, 2015.

[120] HALSEY, T. A. et al. The ferritin-like Dps protein is required for Salmonella enterica serovar Typhimurium oxidative stress resistance and virulence. **Infection and immunity**, v. 72, n. 2, p. 1155-8, fev. 2004.

[121] HÉBRARD, M. et al. Redundant Hydrogen Peroxide Scavengers Contribute to Salmonella Virulence and Oxidative Stress Resistance. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 14, p. 4605-4614, 2009.

[122] HEIKKILA, R. E.; COHEN, G. The inactivation of copper-zinc superoxide dismutase by diethyldithiocarbamate. In: Superoxide and Superoxide Dismutases. **London, UK: Academic Press**, p. 367-373, 1977.

[123] HOU, J.-K. et al. Adenanthin targets peroxiredoxin I/II to kill hepatocellular carcinoma cells. **Cell death & disease**, v. 5, p. e1400, jan. 2014.

[124] HU, X. et al. Prolonged activation of the mitogen-activated protein kinase pathway is required for

macrophage-like differentiation of a human myeloid leukemic cell line. **Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 4, p. 191-200, abr. 2000.

[125] HU, Y. *et al.* The Bacterial Mobile Resistome Transfer Network Connecting the Animal and Human Microbiomes. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, n. 22, p. 6672-6681, nov. 2016.

[126] IMLAY, J. A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. **Annual review of biochemistry**, v. 77, p. 755-76, 2008.

[127] JANG, S.; IMLAY, J. A. Hydrogen peroxide inactivates the Escherichia coli Isc iron-sulphur assembly system, and OxyR induces the Suf system to compensate. **Molecular microbiology**, v. 78, n. 6, p. 1448-67, dez. 2010.

[128] JEE, J. *et al.* Rates and mechanisms of bacterial mutagenesis from maximum-depth sequencing. **Nature**, v. 534, n. 7609, p. 693-6, jun. 2016.

[129] KANG, T. M. *et al.* The aminoglycoside antibiotic kanamycin damages DNA bases in Escherichia coli: caffeine potentiates the DNA-damaging effects of kanamycin while suppressing cell killing by ciprofloxacin in Escherichia coli and Bacillus anthracis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3216-23, jun. 2012.

[130] KENNEDY, K.; COLLIGNON, P. Colonisation with Escherichia coli resistant to "critically important" antibiotics: a high risk for international travellers. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 12, p. 1501-6, dez. 2010.

[131] KIM, K. *et al.* Asparaginase I1 of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 24, p. 11948-11953, 1988.

[132] KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of leukocyte biology**, v. 77, n. 5, p. 598-625, maio 2005.

[133] KOHANSKI, M. A. *et al.* Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. **Cell**, v. 135, n. 4, p. 679-90, nov. 2008.

[134] KOHANSKI, M. A; DEPRISTO, M. A; COLLINS, J. J. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. **Molecular cell**, v. 37, n. 3, p. 311-20, 12 fev. 2010.

[135] LING, J. *et al.* Protein aggregation caused by aminoglycoside action is prevented by a hydrogen peroxide scavenger. **Molecular cell**, v. 48, n. 5, p. 713-22, dez. 2012.

[136] LINK, A. J.; ROBISON, K.; CHURCH, G. M. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. **Electrophoresis**, v. 18, n. 8, p. 1259-313, ago. 1997.

[137] LIU, A. *et al.* Antibiotic sensitivity profiles determined with an *Escherichia coli* gene knockout collection: generating an antibiotic bar code. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 1393-403, abr. 2010.

[138] LIU, C.-X. *et al.* Adenanthin targets peroxiredoxin I and II to induce differentiation of leukemic cells. **Nature chemical biology**, v. 8, n. 5, p. 486-93, maio 2012.

[139] LIU, C. X. *et al.* Targeting peroxiredoxins

against leukemia. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 2, p. 170-176, 2013.

[140] LU *et al.* Resistance of biofilms to the catalase inhibitor 3-amino-1,2, 4-triazole. **Biotechnology and bioengineering**, v. 60, n. 1, p. 135, out. 1998.

[141] MARTÍNEZ, J. L.; BAQUERO, F. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. **Upsala journal of medical sciences**, v. 119, n. 2, p. 68-77, maio 2014.

[142] MEHTA, N. S. *et al.* In vitro and in vivo characterization of alkyl hydroperoxide reductase mutant strains of *Helicobacter hepaticus*. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1770, n. 2, p. 257-65, fev. 2007.

[143] MELILLO, A. A.; BAKSHI, C. S.; MELENDEZ, J. A. Francisella tularensis antioxidants harness reactive oxygen species to restrict macrophage signaling and cytokine production. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 36, p. 27553-60, set. 2010.

[144] MICHAEL, C. A.; DOMINEY-HOWES, D.; LABBATE, M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. **Frontiers in public health**, v. 2, p. 145, 2014.

[145] MILLEN, D. D. *et al.* Current outlook and future perspectives of beef production in Brazil. **Animal Frontiers**, v. 1, n. 2, p. 46-52, out. 2011.

[146] MISHRA, S.; IMLAY, J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 525, n. 2, p. 145-60, set. 2012.

[147] MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. Inhibition of superoxide dismutases by azide. **Archives of biochemistry and**

biophysics, v. 189, n. 2, p. 317-22, ago. 1978.

[148] MUNHOZ, D. C.; NETTO, L. E. S. Cytosolic thioredoxin peroxidase I and II are important defenses of yeast against organic hydroperoxide insult: catalases and peroxiredoxins cooperate in the decomposition of H₂O₂ by yeast. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 34, p. 35219-27, ago. 2004.

[149] NASCIMENTO, C. J. DO *et al.* Biologically active abietane and ent-kaurane diterpenoids and other constituents from *Erythroxylum suberosum*. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 2, p. 401-406, jun. 2012.

[150] NCCLS. **No Title**. [s.l: s.n.].

[151] NETTO, L. E. S. *et al.* Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 26, p. 15315-21, jun. 1996.

[152] NGUYEN, D. *et al.* Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. **Science (New York, N.Y.)**, v. 334, n. 6058, p. 982-6, 18 nov. 2011.

[153] NIETO R, L. M. *et al.* Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* after Acquisition of Isoniazid Resistance: Individual Nature of *katG* Mutants and the Possible Role of AhpC. **PloS one**, v. 11, n. 11, p. e0166807, 2016.

[154] NILES, J. C.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: structures and mechanisms of product formation. **Nitric oxide: biology and chemistry**, v. 14, n. 2, p. 109-21, mar. 2006.

[155] OGUSUCU, R. *et al.* Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxyxynitrite: rate constants by competitive kinetics. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 42, n. 3, p. 326-334, 2007.

[156] OH, E.; JEON, B. Role of alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) in the biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e87312, 2014.

[157] OTEO, J.; BELÉN ARACIL, M. [Molecular characterization of resistance mechanisms: methicillin resistance *Staphylococcus aureus*, extended spectrum β -lactamases and carbapenemases]. **Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica**, v. 33 Suppl 2, p. 27-33, jul. 2015.

[158] PARSONAGE, D. *et al.* Analysis of the Link between Enzymatic Activity and Oligomeric State in AhpC , a Bacterial Peroxiredoxin. **Biochemistry**, v. 44, n. 31, p. 10583-10592, 2005.

[159] PERKINS, A. *et al.* Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. **Trends in biochemical sciences**, v. 40, n. 8, p. 435-45, ago. 2015.

[160] PESKIN, A. V *et al.* Removal of amino acid, peptide and protein hydroperoxides by reaction with peroxiredoxins 2 and 3. **The Biochemical journal**, v. 432, n. 2, p. 313-21, 1 dez. 2010.

[161] PIDDOCK, L. J. The crisis of no new antibiotics—what is the way forward? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 249-253, mar. 2012.

[162] PROLO, C.; ALVAREZ, M. N.; RADI, R. Peroxyxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens. **BioFactors (Oxford, England)**, v.

40, n. 2, p. 215-25, 2013.

[163] PURRELLO, S. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of the currently available treatment options. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 7, p. 178-186, 2016.

[164] REARDON, S. Spread of antibiotic-resistance gene does not spell bacterial apocalypse – yet. **Nature**, dez. 2015.

[165] RIZZO, L. *et al.* Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. **The Science of the total environment**, v. 447, p. 345-60, mar. 2013.

[166] ROBERTS, B.; HIRST, R. Identification and characterisation of a superoxide dismutase and catalase from *Mycobacterium ulcerans*. **Journal of medical microbiology**, v. 45, n. 5, p. 383-7, nov. 1996.

[167] ROSSOLINI, G. M. *et al.* Update on the antibiotic resistance crisis. **Current opinion in pharmacology**, v. 18, p. 56-60, out. 2014.

[168] SEGURA, P. A. *et al.* Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters. **Environmental health perspectives**, v. 117, n. 5, p. 675-84, maio 2009.

[169] SHATALIN, K. *et al.* H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria. **Science (New York, N.Y.)**, v. 334, n. 6058, p. 986-90, 18 nov. 2011.

[170] STREBHARDT, K.; ULLRICH, A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 6, p. 473-80, 2008.

[171] SUGADEV, R.; PONNUSWAMY, M. N.; SEKAR, K.

Structural analysis of NADPH depleted bovine liver catalase and its inhibitor complexes. **International journal of biochemistry and molecular biology**, v. 2, n. 1, p. 67-77, 2011.

[172] TAIRUM, C. A et al. Disulfide biochemistry in 2-cys peroxiredoxin: requirement of Glu50 and Arg146 for the reduction of yeast Tsa1 by thioredoxin. **Journal of molecular biology**, v. 424, p. 28-41, 23 nov. 2012.

[173] TAIRUM, C. A. et al. Catalytic Thr or Ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms. **Scientific Reports**, v. 6, p. 33133, set. 2016.

[174] TIRAPELLI, C. R. et al. Diterpenes: A Therapeutic Promise for Cardiovascular Diseases. p. 1-8, 2008.

[175] UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annual review of immunology**, v. 20, p. 825-52, 2002.

[176] VAARA M. Polymyxin Derivatives that Sensitize Gram-Negative Bacteria to Other Antibiotics. **Molecules**. v. 24, n. 2, p. 249. 2019.

[177] VELAYUDHAN, J. et al. The role of ferritins in the physiology of Salmonella enterica sv. Typhimurium: a unique role for ferritin B in iron-sulphur cluster repair and virulence. **Molecular microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1495-507, mar. 2007.

[178] VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P & T: a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 40, n. 4, p. 277-83, abr. 2015.

[179] WALTERS, W. P. Going further than Lipinski's rule in drug design. **Expert opinion on drug discovery**, v. 7,

n. 2, p. 99-107, fev. 2012.

[180] WANG, L. *et al.* Recent progress in the development of natural ent-kaurane diterpenoids with anti-tumor activity. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 11, n. 10, p. 910-9, set. 2011.

[181] WANG, N. *et al.* A Comprehensive Analysis on Spread and Distribution Characteristic of Antibiotic Resistance Genes in Livestock Farms of Southeastern China. **Plos one**, v. 11, n. 7, p. e0156889, 2016.

[182] WANG, X. *et al.* Contribution of reactive oxygen species to pathways of quinolone-mediated bacterial cell death. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 520-4, mar. 2010.

[183] WEI, W. *et al.* Targeting peroxiredoxin I potentiates 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced cell differentiation in leukemia cells. **Molecular medicine reports**, v. 13, n. 3, p. 2201-7, mar. 2016.

[184] WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 6, p. 642-60, fev. 2013.

[185] WOLF, S. G. *et al.* DNA protection by stress-induced biocrystallization. **Nature**, v. 400, n. 6739, p. 83-5, jul. 1999.

[186] WOOD, Z. A. *et al.* Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends in biochemical sciences**, v. 28, n. 1, p. 32-40, jan. 2003.

[187] WOOD, Z. A.; POOLE, L. B.; KARPLUS, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. **Science**, v. 300, n. 5619, p. 650-653, 2003.

[188] YEOM, J.; IMLAY, J. A.; PARK, W. Iron homeostasis affects antibiotic-mediated cell death in *Pseudomonas* species. **The Journal of biological chemistry**, v. 2852, n. 29, p. 22689-95, jul. 2010.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de diterpenoides *ent*-caurânicos em associação a antibióticos, **caracterizado** pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para potencializar a atividade antimicrobiana desses fármacos.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que os diterpenoides *ent*-caurânicos compreendem principalmente a adenantina e seus derivados.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que os antibióticos são selecionados do grupo consistindo em β -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas, principalmente a canamicina, gentamicina e polimixinas.

4. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a associação provoca o aumento do estresse oxidativo de bactérias.

5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de a associação inibir 2-Cys Prx bacterianas.

A) Reações de Fenton:	$\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$ (Reação 1)
	$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{HO}^\bullet$ (Reação 2)
B) Reação de Haber-Weiss:	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{O}_2 + \text{HO}^\bullet + \text{OH}^-$

Figura 1

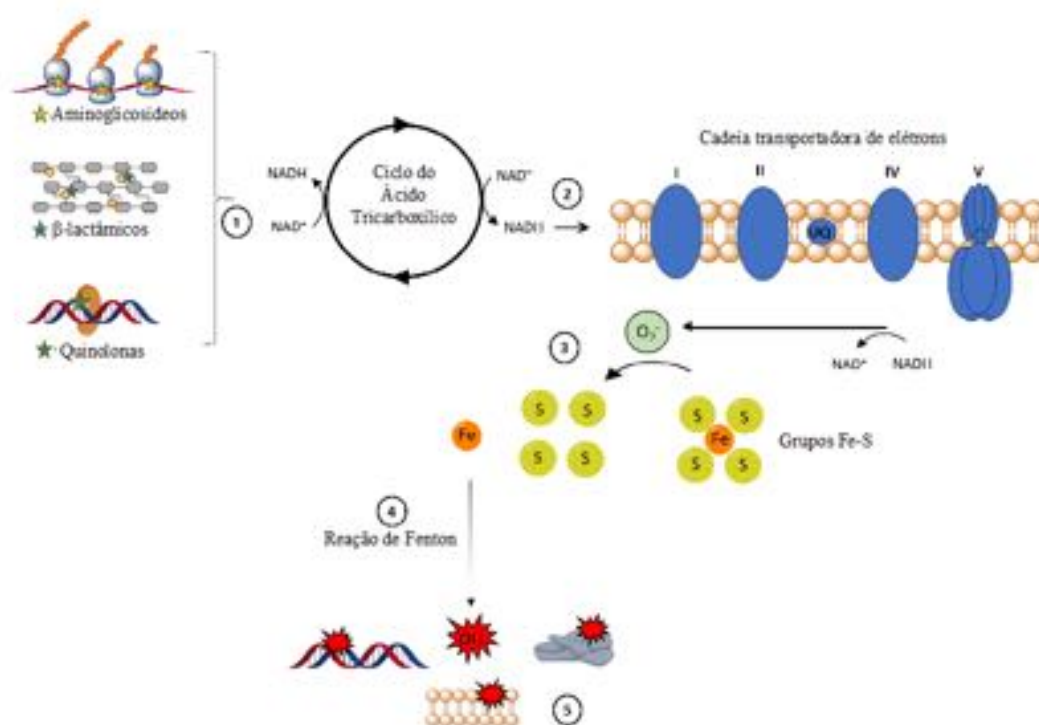


Figura 2

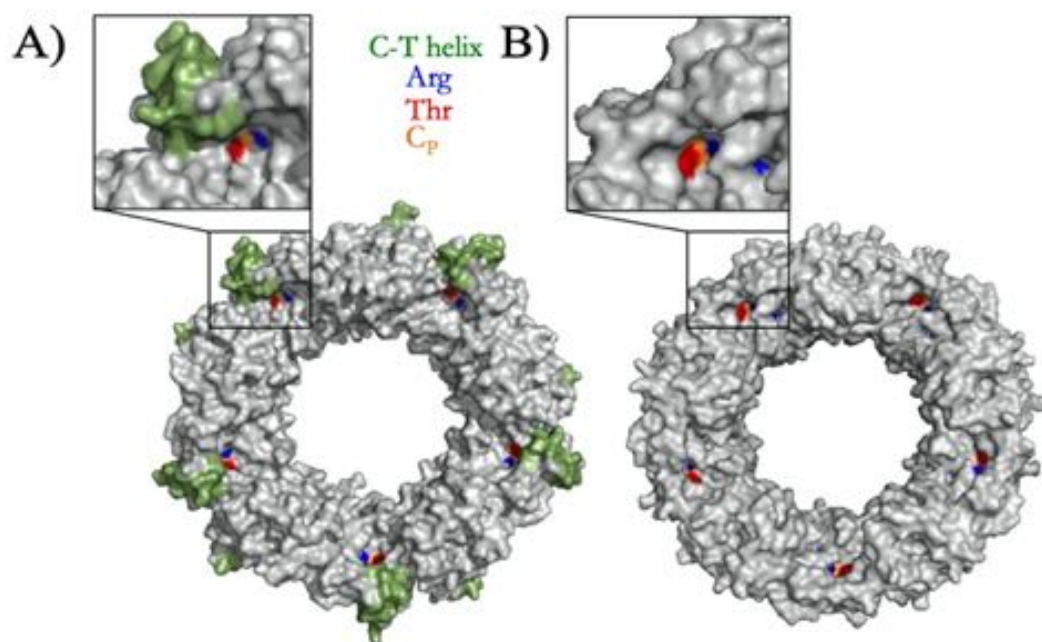


Figura 3

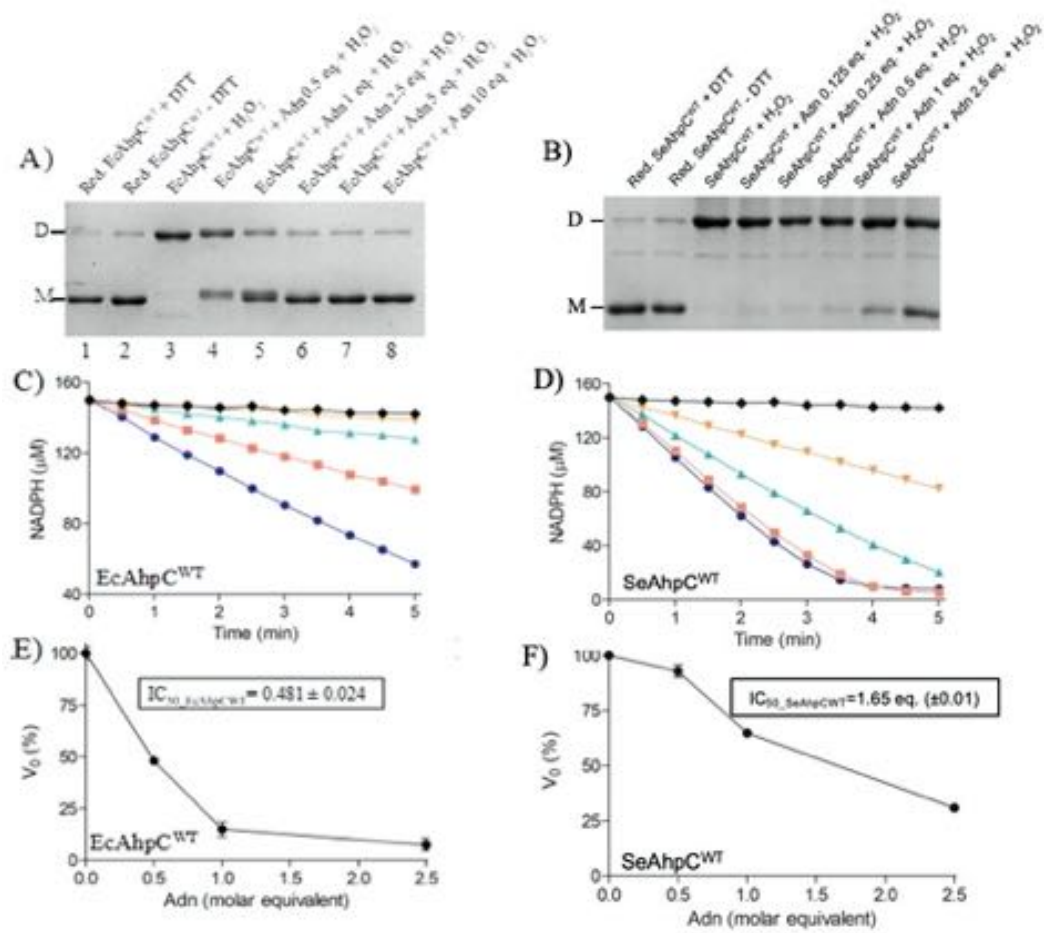


Figura 4

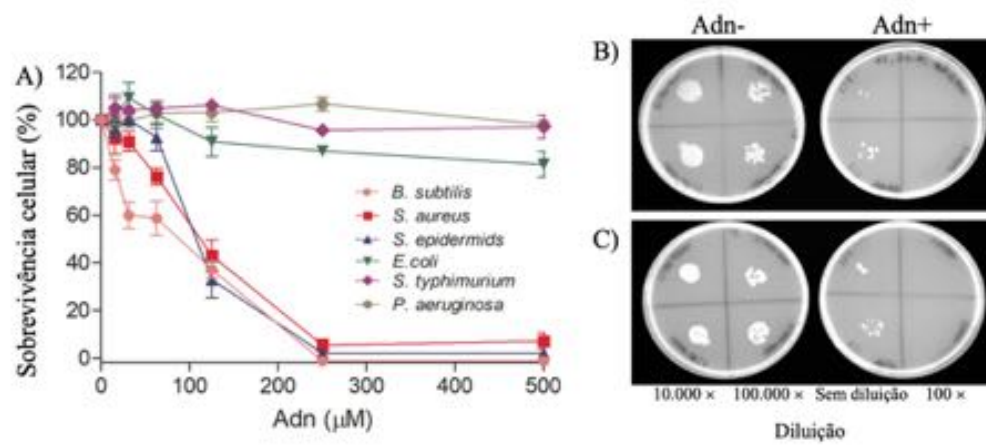


Figura 5

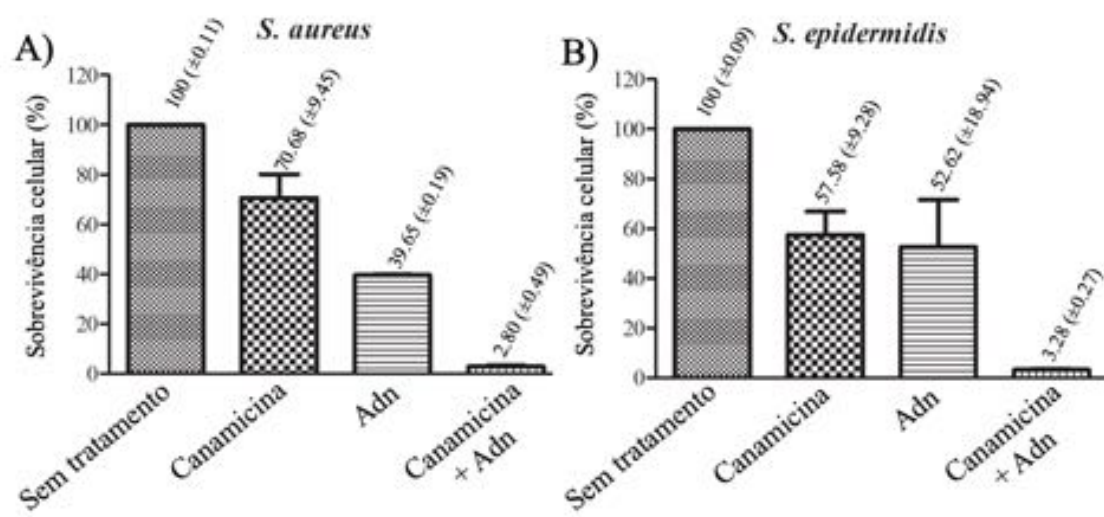


Figura 6

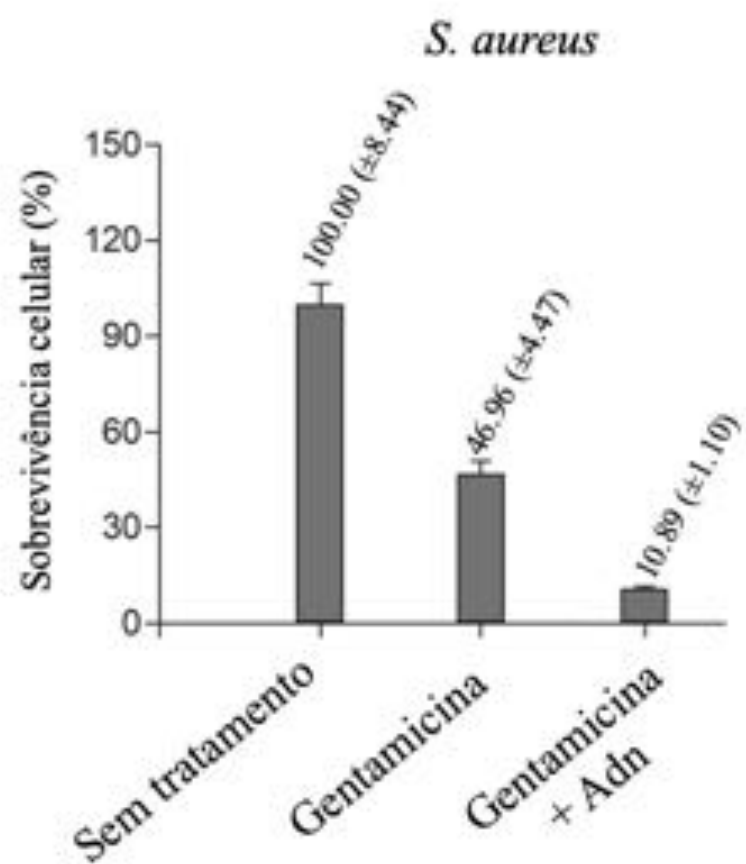


Figura 7

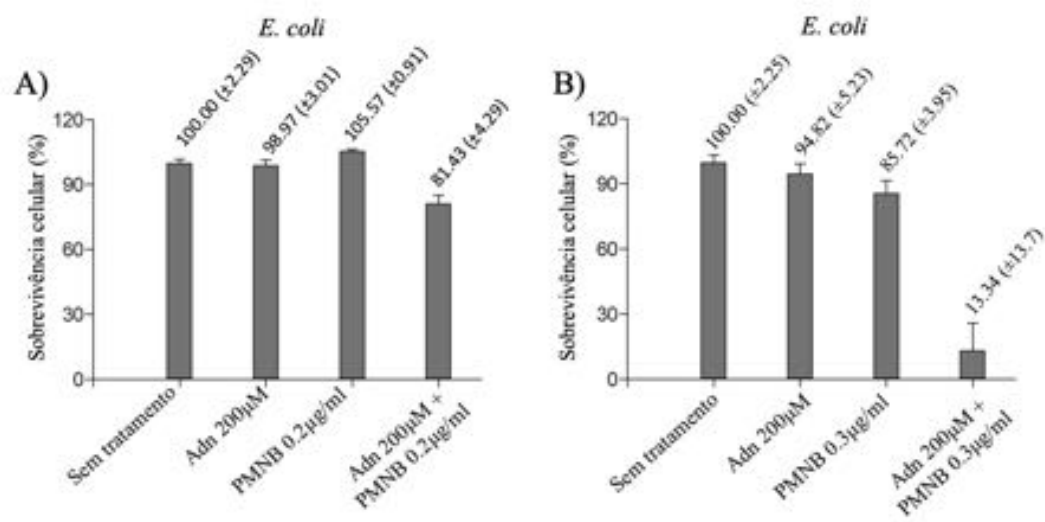


Figura 8

RESUMO**USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂÑOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICROORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS**

A presente invenção descreve o uso de diterpenoides ent-caurânicos, como a adenantina (Adn), ou seus derivados em associação a antibióticos que promovem aumento do estresse oxidativo, como os β -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas, por exemplo a canamicina (Kan) e a gentamicina (Gen), e também as polimixinas, como potencializadores da atividade antimicrobiana desses fármacos. Além disso, o efeito sinérgico da utilização em conjunto dessas substâncias apresenta um elevado potencial de aplicação farmacêutica em tratamentos de diferentes infecções causadas por microrganismos, a fim de sensibilizar bactérias que apresentem resistência a esses últimos e, também, pode reduzir as quantidades administradas de antibióticos em pacientes reduzindo os efeitos colaterais.

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, GISELE MONTEIRO, brasileira, divorciada, professora universitária, portadora do RG nº 25963442-6, CPF nº 278.664.008-30, residente e domiciliada à Rua José Lopes da Silva, 235, São Paulo – SP, CEP 05376-110, abaixo assinado, na qualidade de inventora e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N° 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob nº 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositarem, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título **“USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS”** e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

São Paulo, 09 de julho de 2020.



GISELE MONTEIRO

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, ADALBERTO PESSOA JÚNIOR, brasileiro, casado, professor universitário, portador do RG nº 1195328-8, CPF nº 031.440.808-88, residente e domiciliado(a) à Rua Aibi, 16, Apto. 114, São Paulo – SP, CEP 05054-010, abaixo assinado, na qualidade de inventor e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N° 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob nº 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositarem, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título **“USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS”** e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

São Paulo, 09 de julho de 2020.



ADALBERTO PESSOA JUNIOR

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, ANA JULIA FERNANDES CARDOSO DE OLIVEIRA, brasileira, divorciada, professora universitária, portadora do RG nº 14944269-5, CPF nº 094.490.148-41, residente e domiciliado(a) à Rua República do Iraque n 1745, casa 2, São Paulo – SP, CEP 04611-003, abaixo assinado, na qualidade de inventora e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N° 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob nº 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositarem, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título “USO DE DITERPENÓIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS” e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

São Paulo, 09 de julho de 2020.

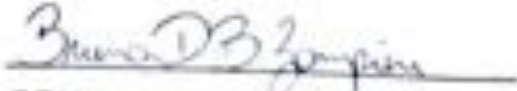


ANA JULIA FERNANDES CARDOSO DE OLIVEIRA

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, BRUNA DEL BUSSO ZAMPIERI, brasileira, casada, doutoranda, portadora do RG nº 14825528, CPF nº 094.758.076-08, residente e domiciliado(a) à Rua Sylvia Monteiro Franco, 19, Poços de Caldas – MG, CEP 37718-101, abaixo assinado, na qualidade de inventora e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial Nº 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP Nº 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob nº 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositarem, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título “USO DE DITERPENÓIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS” e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

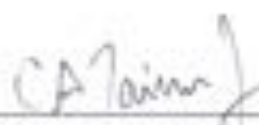
Poços de Caldas, 09 de julho de 2020.


BRUNA DEL BUSSO ZAMPIERI

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, CARLOS ABRUNHOSA TAIRUM JUNIOR, brasileiro, solteiro, biólogo, portador do RG nº 43520934-6, CPF nº 320.485.068-44, residente e domiciliado(a) à Avenida Nossa Senhora da Assunção, 647, Apto. 54D, São Paulo – SP, CEP 05359-001, abaixo assinado, na qualidade de inventor e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N° 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob nº 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositarem, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título "USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS" e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

São Paulo, 09 de julho de 2020.

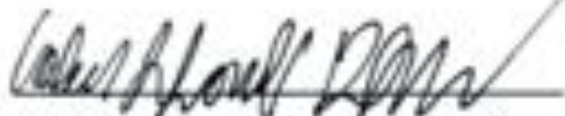


CARLOS ABRUNHOSA TAIRUM JUNIOR

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, CARLOS ALEXANDRE BREYER, brasileiro, solteiro, empresário, portador do RG nº 58537344-5, CPF nº 009.724.099-04, residente e domiciliado(a) à Rua Aldo Coli, 843 – Casa4, Praia Grande – SP, CEP 11704-760, abaixo assinado, na qualidade de inventor e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N° 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob nº 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositarem, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título “USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS” e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

Praia Grande, 09 de Julho de 2020.

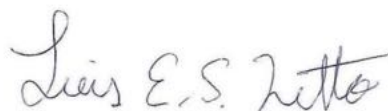


CARLOS ALEXANDRE BREYER

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, LUIS EDUARDO SOARES NETTO brasileiro, casado, professor universitário, portador do RG nº 11584521, CPF nº 090.822.648-97, residente e domiciliado(a) à Rua Doutor Manole de Paiva Ramos, 265, Apto. 51M, São Paulo – SP, CEP 05351-015, abaixo assinado, na qualidade de inventor e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N° 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob nº 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositar, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título **“USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS”** e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

São Paulo, 09 de julho de 2020.



LUIS EDUARDO SOARES NETTO

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, MARCOS ANTONIO DE OLIVEIRA, brasileiro, casado, professor universitário, portador do RG nº 16969416-1, CPF nº 119.178.798-22, residente e domiciliado(a) à Avenida Ariovaldo Reis, 253, Guarujá – SP, CEP 11421-190, abaixo assinado, na qualidade de inventor e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N° 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob nº 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositar, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título **“USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS”** e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

Guarujá, 09 de Julho de 2020.

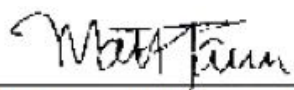


MARCOS ANTONIO DE OLIVEIRA

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, MARCOS HIKARI TOYAMA, brasileiro, casado, biólogo, portador do RG nº 17663205-0, CPF nº 120.693.908-70, residente e domiciliado (a) à Rua Frei Gaspar 253 apto 1009, Centro, São Vicente, CEP 11310-060, abaixo assinado, na qualidade de inventor e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N° 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob nº 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositar, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título **“USO DE DITERPENOIDES ENCAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS”** e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supramencionado.

São Vicente, 09 de julho de 2020.



MARCOS HIKARI TOYAMA

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, MELINA CARDOSO DOS SANTOS, brasileira, divorciada, doutoranda, portadora do RG nº 34498656-1, CPF nº 332.041.858-00, residente e domiciliado(a) à Rua Serra da Mantiqueira, 129, Barueri – SP, CEP 06413-080, abaixo assinado, na qualidade de inventora e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N° 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob nº 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositar, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título “**USO DE DITERPENÓIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS**” e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

Barueri, 09 de Julho de 2020.


MELINA CARDOSO DOS SANTOS

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, ROLANDO IÉ, guineense, solteiro, mestrando, portador do RG nº v719120-C, CPF nº 234.633.668-86, residente e domiciliado(a) à Rua Rangel Pestana, 273, Apto. 11, São Vicente – SP, CEP 11230-120, abaixo assinado, na qualidade de inventor e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N°7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob nº 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADEESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositar, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título “USO DE DITERPENÓIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS” e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

São Vicente, 09 de julho de 2020.

ROLANDO IÉ



AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, VANESSA DA COSTA ANDRADE, brasileira, solteira, doutoranda, portadora do RG nº 35712262-8, CPF nº 399.193.328-44, residente e domiciliado(a) à Avenida Padre Antonio Jose dos Santos, 78, Apto. 78, São Paulo – SP, CEP 04563-000, abaixo assinado, na qualidade de inventora e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N° 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob nº 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositar, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título “USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS” e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

São Paulo, 09 de julho de 2020.



VANESSA DA COSTA ANDRADE

Apêndice B

Manuscrito em preparação para ser submetido ao periódico *Antioxidants*.

Santos, M. C.; de Oliveira, A. L. P.; Tairum, C. A.; Toyama, M. H.; Netto, L. E. S.; Monteiro, G.; de Oliveira¹, M. A. Adenanthin as an Inhibitor of the Peroxiredoxin Tsa1 from Yeast.



Article

Adenanthin as an Inhibitor of the Peroxiredoxin Tsa1 from Yeast

Melina Cardoso dos Santos^{1,2}, Ana Laura Pires de Oliveira¹, Carlos A. Tairum³, Marcos Hikari Toyama¹, Luis Eduardo Soares Netto³, Gisele Monteiro^{2*} & Marcos Antonio de Oliveira^{1*}

¹ Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), São Vicente, São Paulo, Brazil, 11330-900

² Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 05508-000

³ Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 05508-090.

* Correspondence: marcos.a.oliveira@clp.unesp.br; Tel: 55-13- 3569-7148; Fax: 55-13-3569-7146 (M.A.O); smgisele@usp.br phone: 55-11-3091-3734 (G.M.)

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: 2-Cys Peroxiredoxins (2-Cys Prx) are antioxidant enzymes that play important roles in hydroperoxide decomposition, redox signaling and are involved in processes such as cancer and host-pathogen interactions. These enzymes use a very reactive Cys residue which interact with two other residues, an Arg and a Thr/Ser, in the so-called catalytic triad (CT). During the redox cycle, some 2-Cys Prx structures are able to transit between $\alpha_2(5)$ decamers (reduced) and α_2 homodimers (oxidized). Structural studies revealed that enzymes containing Ser in the CT are constitutive decamers. On the other hand, mutations of the dimer interface of the decamers are able to disrupt the decameric structure and affect the C_P reactivity. The diterpenoid adenanthin (Adn) was described as a 2-Cys Prx inhibitor and it proved effective in differentiation of leukemic human cells. However, there are no studies aiming at detailed characterization of the molecule binding to enzyme active site to date. In this work, we employed the typical 2-Cys Prx from *Saccharomyces cerevisiae* Tsa1^{WT}, mutants that affect quaternary transitions Tsa1^{T44S} and Tsa1^{Y77A} (constitutive decamers and dimers, respectively) and Tsa1^{175ΔCT} as models to investigate the molecular characteristics of Adn inhibition. Adn was able to inhibit Tsa1^{WT} and Tsa1^{175ΔCT} peroxidatic activity, but shows higher inhibition to Tsa1^{T44S} and low rates to Tsa1^{Y77A}. Using biochemical structural approaches, we show that the interference in protein structure is more pronounced to Tsa1^{T44S}, suggesting that Adn is more prone to bind this enzyme which was confirmed by Tsa2, a protein that carries the natural Thr to Ser substitution. We also demonstrated that Adn was able to bind and inhibit the oxidoreductases Trx1 and TrxR1 (Tsa1 reducing system). Using molecular docking approaches, we have shown for the first time that Adn is able to be stabilized in the Tsa1 active site pocket by several apolar and some polar interactions, indicating that apolar interactions are pivotal to the stabilization of inhibitors in active site microenvironment, which may have implications also to bulkier substrates as lipid hydroperoxides. We also show that the $\alpha_2(5)$ decameric structure of obligate homodimer is essential to adequate binding of the inhibitor molecules, since the interactions are performed with adjacent dimer in the decamer. Our results suggest that Adn inhibitory action is facilitated by Ser⁴⁴ presence in TC, probably due to avoid changes in quaternary structure.

Keywords: Tsa1, Catalytic Triad, Adenanthin, Quaternary Structure, Inhibitor.

1. Introduction

Intracellular hydroperoxides levels regulation is performed with the aid of low molecular weight molecules, such as glutathione and ascorbic acid, and of peroxidases, of which the most important are represented by the enzymes catalase (Cat), glutathione peroxidase (GPx) and peroxiredoxins (Prx). Among these enzymes, Prx stand out for aspects such as wide cellular distribution, high abundance, high reactivity over hydroperoxides and wide variety of substrates [1–7]. Despite Prx play a protective role for cells against oxidative stress, it was demonstrated their involvement in cell growth events and pathogen resistance to host defenses [8–10].

To decompose hydroperoxides, enzymes from typical 2-Cys Prx class use a cysteine residue called peroxidatic cysteine (C_P). In the reduced state, C_P is maintained as thiolate (C_P-S^-) as consequence of the active site microenvironment, being positioned at the extremity of an α helix between a Thr (which is substituted by a Ser in some Prx) and an Arg residue. C_P thiol function (SH) is fastened and polarized by a hydrogen bond of the hydroxyl group from Thr and the $SH \rightarrow S^-$ dissociation is forced by the positively charged Arg guanidine group. C_P , Thr/Ser and Arg residues are present in all Prx characterized to date and are collectively called of catalytic triad [1–5,11–13]. In this microenvironment, C_P is able to attack O-O hydroperoxide binding, forming a sulfenic acid cysteine (C_P-SOH), which subsequently forms an intermolecular disulfide with a second cysteine residue present in the adjacent monomer, called resolving cysteine (C_R).

Since C_P and C_R are too far in space (10 Å) a structural re-arrangement is necessary to disulfide formation which is achieved by the partial unfold of the C_P containing α helix. Therefore, when the protein is reduced and the active site is competent to attack the hydroperoxide molecule, it is characterized the so-called fully folded state (FF), and the state of the disulfide oxidized enzyme is known as locally unfolded (LU) [14]. When the enzyme is in reduced state, the quaternary structure is decameric while the disulfide oxidized enzyme is composed by a majority of dimers. However the attack of a second molecule of hydroperoxide results in the overoxidation of C_P in C_P-SO_2H [15]. Additionally, for the enzyme be able to decompose another hydroperoxide molecule, reduction of the disulfide intermolecular is required, a task frequently performed by a low molecular weight protein (11 kDa) named thioredoxin (Trx), which receives reducing equivalents from NADPH from thioredoxin reductase protein (TrxR). This reducing system is known as Trx system [7,16,17].

Saccharomyces cerevisiae is a biological model for several genetic and biochemical studies since several molecular systems and pathways are conserved in eukaryotes [23]. In fact, several works points the importance of this yeast as a prominent organism to drug discovery to diseases as Huntington, Parkinson and cancer [24,25]. Relative to 2-Cys Prx, *S. cerevisiae* possess two very similar cytosolic enzymes, named Tsa1 and Tsa2, evolutionarily related with the human counterparts Prx1 and Prx2. Previously, we have demonstrated that some mutations of the Tsa1 catalytic triad Thr⁴⁴, is able to affect not only the reactivity but also the oligomeric state of the enzyme [26]. In fact, the Thr⁴⁴ is located at dimer interface of the pentamer of dimers, interacting with a conserved Tyr⁷⁷ residue. In oxidation process to C_P-SOH , the C_γ of Thr⁴⁴ is in intimate contact of Tyr⁷⁷ through a CH- π hydrogen bound, which acts as a switch to promote the decamer dissociation in dimers. By mutational analysis, we have demonstrated that the mutant Tsa1^{T44S}, that lacks the C_γ , is a constitutive decamer with high reactivity. On the other hand, the mutant Tsa1^{Y77A} that is not suitable to perform CH- π interaction, is a constitutive dimer with low reactivity (Figure 1).

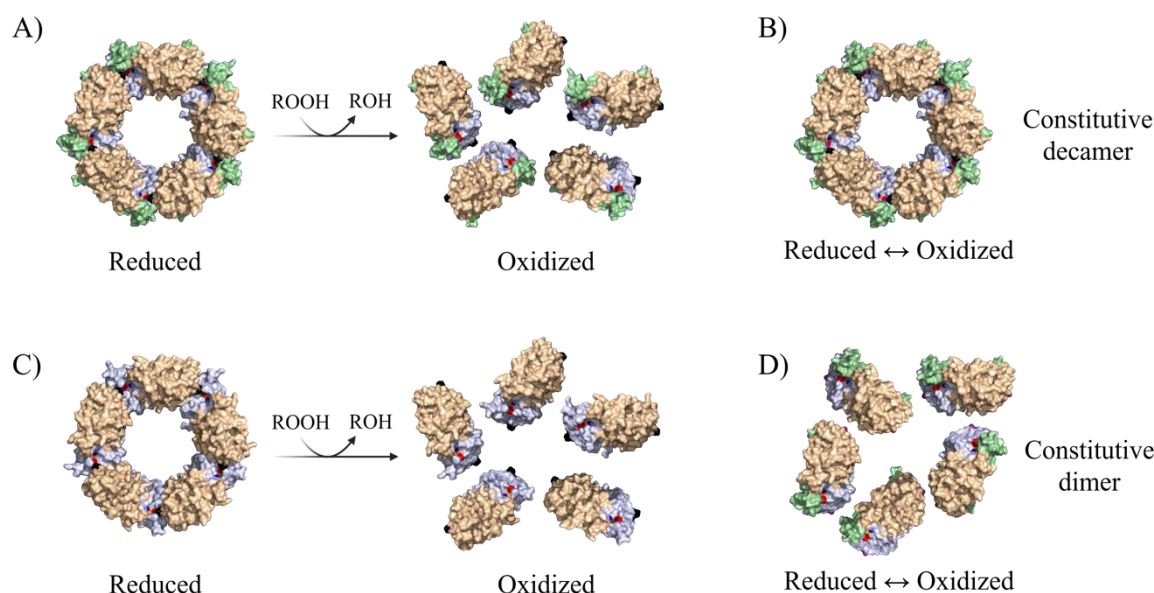


Figure 1. Structural transitions of Tsa1^{WT} and mutants. Tsa1^{WT} (A) and Tsa1^{Y77A} (C) in reduced state present their structure in decamers and when they are oxidized by disulfide, these enzymes are composed by a majority of dimers. The oligomerization state is constitutive as decamers or dimers, for Tsa1^{T44S} (B) and Tsa1^{Y77A} (D), respectively. The Prx are represented by surface and their monomers are colored in gold and blue for each dimer. The C-terminal α helix is represented in green and the amino acids of CT and Y⁷⁷ are colored as follows: Thr⁴⁴ = red/ Ser⁴⁴ = pink, Cys⁴⁷ = orange, Tyr⁷⁷ = black and Arg¹²³ = blue.

Recently, it was demonstrated that adenanthin (Adn), a diterpenoid extracted from *Isodon adenanthus* leaves, has antitumor properties [18–21]. Liu and coworkers observed that Adn has the ability to induce differentiation of AML cells through inhibition of the 2-Cys Prx isoforms Prx1 and Prx2 peroxidatic activity. The authors postulated that Adn binding would occur specifically with C_R, preventing intermolecular disulfide formation [18,19]. However, Soethoudt and coworkers demonstrated subsequently that Adn also can bind to C_P [21]. The analysis of the substrates binding in 2-Cys Prx enzymes is not a trivial task since the enzymes present intrinsic structural transitions as FF and LU and quaternary structure alternations as dimer-decamer [22]. Thus, the model of Adn binding is controversial and additional investigations are required. Additionally, a subgroup of typical 2-Cys Prx presented only in bacteria lacks the C-terminal α helix which turns the enzymes very resistant to the overoxidation and are named as robust typical 2-Cys Prx while the eukaryotic enzyme are known as sensible, revealing additional diversity of this proteins group [14].

Aiming to a better understanding the Adn binding to typical 2-Cys Prx, we use the Tsa1 enzyme, which switch in decamers to dimers, the constitutive decamers mutant Tsa1^{T44S}, the constitutive dimer mutant Tsa1^{Y77A} and the mutant Tsa1^{Y77A} which mimics the bacteria robust typical 2-Cys Prx. Our results reveal that Adn is able to inhibit the peroxidase activity over hydrogen peroxide of wild type Tsa1, Tsa1^{Y77A} and Tsa1^{Y77A} at the similar mode. On the other hand, Tsa1^{T44S} presented a significant inhibition. By structural analysis involving different techniques, we have demonstrated that Adn binding is more effective on Tsa1^{T44S}. To confirm the results, we apply the same approaches to enzyme Tsa2, a cytosolic isoform which possess a natural substitution of the catalytic triad Thr to a Ser, and these results confirmed that Adn inhibits much more efficiently enzymes containing Ser as part of the catalytic triad. Finally, by molecular docking we have shown that Adn is stabilized in the Tsa1 active site pocket by several apolar and some polar interactions, indicating that apolar interactions are pivotal to the stabilization of inhibitors in active site microenvironment, which may have implications also to bulkier substrates as lipid hydroperoxides.

2. Materials and Methods

2.1 Reagents

All the chemical compounds were purchased from Sigma-Aldrich and Adn was purchased from ChemFaces.

2.2 Protein expression and purification

The pET15b/*tsa1*, pET15b/*tsa1*^{T44S}, pET15b/*tsa1*^{175ΔCT} and pET15b/*tsa1*^{Y77A} plasmids were constructed in a previous work of our group [26]. The recombinant proteins were expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) cell line and purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using imidazole gradients. Protein quantification was spectrophotometrically performed at 280 nm and it was used the molar extinction coefficient obtained by ProtParam tool (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

2.3 Non-reducing SDS-PAGE assay

Adn binding to Tsa1^{WT} and mutants was evaluated by non-reducing SDS-PAGE oxidation assay. Proteins were reduced by 20 mM DTT for 30 minutes, at room temperature. Next, DTT excess was removed by desalting in PD-10 column (GE Healthcare) and the proteins were quantified. Following, 10 μM Tsa1^{WT} and mutants were incubated with increasing Adn concentrations (1, 5, 10, 25, 50, 100 and 300 μM) for 1 hour, at room temperature, and subsequently oxidized with 12 μM H₂O₂ for 30 minutes. In order to evaluate Adn binding against time, 10 μM reduced proteins were treated with 50 μM Adn for 1, 5, 10, 30, 60, 90 and 120 minutes before been oxidized by 12 μM H₂O₂ for 30 minutes. The reactions were stopped by stop buffer (50 mM N-ethylmaleimide in 4% SDS solution; 10% glycerol; 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8) and analyzed by non-reducing SDS-PAGE.

2.4 Circular dichroism spectroscopy (CD)

Reduced Tsa1^{WT} and mutant proteins were treated with 5 molar equivalents of Adn for 1 hour, at room temperature, been immediately analyzed by CD or treated with 1.2 molar equivalents of H₂O₂ for 30 minutes before the reading. As control, it was used proteins without Adn treatment. The CD spectra were obtained using a 0.1 cm path length cuvette containing 5 μM of protein sample in 10 mM Tris buffer (pH 7.4). The assays were carried out at 25 °C in a Jasco J-810 spectropolarimeter (Jasco Inc.). Spectra were presented as an average of eight scans recorded from 190 to 260 nm. The content of secondary structures in each protein was estimated using the CDNN 2.1 software.

2.5 Size exclusion chromatography (SEC)

Reduced Tsa1^{WT} and mutant proteins were treated with 30 molar equivalents of Adn for 1 hour, at room temperature, been immediately analyzed by SEC or treated with 1.2 molar equivalents of H₂O₂ for 30 minutes before the analysis. As control, it was used proteins without Adn treatment. SEC was performed by analytical HPLC (Jasco LC-2000 Plus) equipped with a PU 2880 Plus injector and a PDA MD 2018 detector (Jasco). The samples, at final concentration of 10 μM in 100 mM Tris-HCl at pH 7.4 and 100 mM NaCl, were separated by a system containing a Phenomenex BioSep-SEC-S3000 column (7.8× 300 mm, 5 μm, resolution range of 15 to 2000 kDa, Phenomenex, Inc., Torrance, California, USA) using a flow rate of 1.0 mL/min in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) and 100 mM NaCl. The elution profile was monitored by absorbance (λ = 280 nm). Bovine thyroglobulin (670 kDa), bovine gamma globulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa), myoglobin (17 kDa) and vitamin B12 (1.35 kDa) were used as molecular weight standards (Bio-Rad). The chromatograms were analyzed using Jasco BORWIN, version 1.50, software (Jasco).

2.6 NADPH oxidation assay

Reduced Tsa1^{WT} and mutants were treated with 30 molar equivalents of Adn for 1 hour, at room temperature, and subsequently desalted in PD-10 columns to remove Adn excess. Treated and non-treated Tsa1^{WT} and mutants (1.0 μM) were incubated with Trx1 (2 μM), TrxR1 (0.3 μM) and

NADPH (150 μ M) in 50 mM HEPES buffer (pH 7.4) containing sodium azide (1 mM) and DTPA (100 μ M), at 30 °C. Reactions were initiated by addition of 200 μ M H₂O₂ and data obtained were analyzed by non-linear regression using Michaelis-Menten equation (GraphPad Prism 5 software, GraphPad Software, Inc., San Diego). In order to evaluate Adn binding to Trx system, reduced Trx1 and TrxR1 was treated with 30 molar equivalents of Adn for one hour, at room temperature, and subsequently desalted in PD-10 columns. Then, these proteins were individually tested, as described above, using non-treated Tsa1^{WT}.

2.7 Analysis of 2-Cys Prx crystallographic structures

Analysis of crystallographic structures and figures generation were performed using PyMOL (<http://www.pymol.org>) and Chimera [27] using coordinates deposited at the protein databank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

2.8. Docking simulations

The Tsa1 crystallographic structure contained the C_P substitute by Ser (Tsa1^{C47S}) was obtained as decamer from Protein Data Bank (PDB ID: 3SBC) (Tairum et al., 2012). The water and ligand (DTT) were removed from the coordinates and the C_P mutation was reverted using PyMOL (Schrodinger LLC, 2017). The optimized Adn structure was obtained from PubChem repository (CID: 15011073). The molecular docking approaches were performed using the SwissDock server (<http://www.swissdock.ch/docking>). SwissDock is based on EADock DSS docking software which estimates the CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) energy on a grid and the most favorable binding modes are clustered in the server (Grosdidier et al., 2011). The docked Adn molecules with the minimum Full fitness score was considered for further analysis. UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004), PyMOL (www.pymol.org) and LigPlot⁺ (Laskowski et al., 2011) were used to evaluate the molecular hits and to generate molecular graphics.

3. Results

3.1 Adn is able to inhibit differentially Tsa1^{WT} and mutant enzymes

The inhibitory effect of Adn on Tsa1 peroxidatic activity was evaluated by Trx system coupled assay wherein it was monitored the NADPH oxidation. To avoid artifacts as consequence of Trx system inhibition, the Tsa1^{WT} and mutant enzymes were treated with Adn for 1 hour, at room temperature, and subsequently submitted to gel filtration to remove the excess of inhibitor prior to the assay. The results revealed a significant decrease of the activity to all enzymes tested due to Adn binding (Figure 2). However, Adn binding provided a decrease significantly higher in NADPH oxidation profile to the mutant Tsa1^{T44S} (Figure 2B) than to wild type (Figure 2A) and Tsa1^{175ΔCT} (Figure 2C). To the mutant Tsa1^{Y77A}, the enzymatic activity is naturally lower. In fact, in previous work, we have demonstrate that this dimeric mutant present a peroxidase activity almost zero [26]. However, the peroxidatic activity detected here was possible since that the time course of the experiments were significantly higher (10 min) than that used previously (140 sec).

The determination of the hydroperoxide decomposition velocity revealed that the wild type enzyme was able to decompose 1.74 μ M/s of hydrogen peroxide, while the enzyme treated with Adn presented a constant of 5.8×10^{-1} μ M/s revealing a decrease of 66% of the peroxidase activity, a number very similar to the observed to Tsa1^{Y77A} (9.3×10^{-2} to 3.0×10^{-2} μ M/s) (Table. 1). The Tsa1^{175ΔCT} mutant presented a slightly lower inhibition rate of ~60% (Figure 2C; Tab. 2). On the other hand, the velocity drop in peroxidase activity was higher for Tsa1^{T44S} mutant, reaching a decrease of 85% of initial velocity (Figure 2B, Table 1), suggesting that the substitution of the catalytic triad Thr to Ser may result in an active site more prone to Adn binding.

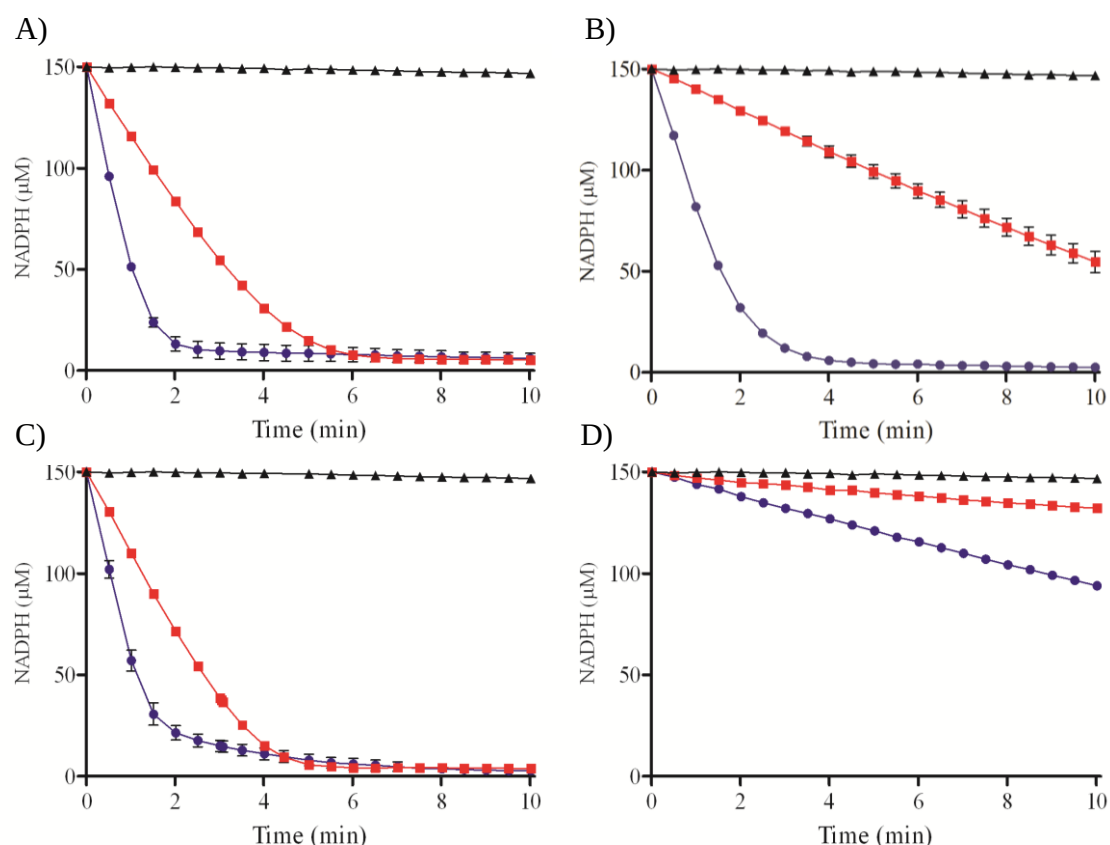


Figure 2. NADPH oxidation assay with Tsa1 treated with Adn. Reduced Tsa1^{WT} (A), Tsa1^{T44S} (B), Tsa1^{175ΔCT} (C) and Tsa1^{Y77A} (D) were treated with 30 molar equivalents for 1 hour at room temperature before being desalted to remove Adn excess. Then, the proteins (1 μM) were incubated with Trx1 (2 μM), TrxR1 (0.3 μM) and NADPH (150 μM) for 3 minutes. The reactions were started by addition of 200 μM H₂O₂ and NADPH oxidation was monitored spectrophotometrically at 340 nm at a temperature of 30 °C for 10 min. Red lines are related to reaction which Tsa1 were treated with Adn, blue lines are related to positive control which the proteins were not treated with Adn and black lines refers to negative control, which no Tsa1 was added to reactions.

Table 1. Reaction velocity containing Tsa1^{WT}, Tsa1^{T44S}, Tsa1^{175ΔCT}, Tsa1^{Y77A} Trx1 and TrxR1 pre-treated with Adn.

	Velocity (μM/s)					
	Tsa1 ^{WT}	Tsa1 ^{T44S}	Tsa1 ^{175ΔCT}	Tsa1 ^{Y77A}	Trx1	TrxR1
Adn-	1.74	1.08	1.55	9.3×10 ⁻²	1.74	1.74
Adn+	0.58	1.6×10 ⁻¹	6.1×10 ⁻¹	3.0×10 ⁻²	4.9×10 ⁻¹	3.4×10 ⁻¹

Recently, a work shows that Adn is able to inhibit thiol proteins including the 2-Cys Prx reductant system Trx and TrxR [21]. To evaluate the inhibitory effect of Adn over the Trx1 and TrxR1 from *S. cerevisiae*, these enzymes were individually treated with Adn and used in NADPH oxidation assay with Tsa1^{WT} (untreated). As previously demonstrated for human proteins, there was inhibition of Tsa1 peroxidatic activity due to blockage in its reducing system (Figure 3). In the case of *S. cerevisiae* Trx system, inhibition of peroxidatic activity was ~ 72% and 80% after Adn pre-treatment of Trx1 and TrxR1, respectively (Table 1). These data are important because, despite that the fold of thioredoxin is very conserved in several organisms, the Trx system present specie specificity [7].

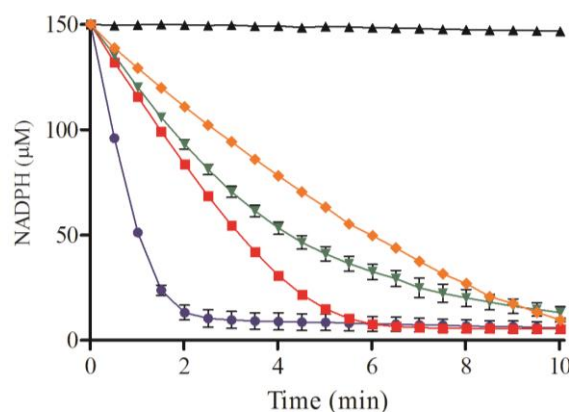


Figure 3: NADPH oxidation assay with Trx system pre-treated with Adn. Reduced Trx and TrxR1 were treated with 30 molar equivalents for 1 hour at room temperature before being desalted to remove Adn excess. Then, 2 μM of Adn pre-treated Trx1 was incubated with 1 μM Tsa1^{WT}, 0.3 μM non-treated TrxR1, 150 μM NADPH (green line) and 0.3 μM of Adn pre-treated TrxR1 was incubated with 1 μM Tsa1^{WT}, 2 μM non-treated Trx1, 150 μM NADPH (orange line). The reactions were started with addition of 200 μM H₂O₂ and NADPH oxidation was monitored spectrophotometrically at 340 nm at a temperature of 30 °C. As positive control, it was used the proteins without Adn treatment (blue line) and, as negative control, no Trx1 or TrxR1 was added to reactions (black line). As comparative, it was used a sample which only Tsa1^{WT} was treated with Adn (red line).

Additionally, TrxR from lower eukaryotes and bacteria are significantly distinct from their counterparts in humans. The first ones are low molecular weight with the biological unit (dimer) reaching 70kDa and their activity relies on a reactive Cys residue. On the other hand, the TrxR from higher eukaryotes possesses high molecular weight with dimers of ~100kDa and, in many cases, the reactive Cys is replaced by a selenocysteine (Sec). Bacteria also possesses a second Prx reductant system represented by the AhpF (Alkyl hydroperoxide reductase subunit F) represented by a molecule of TrxR fused to two contiguous Trx molecules that are able to reduce with high specificity the typical 2-Cys Prx from bacteria, also named AhpC (Alkyl hydroperoxide peroxidase C). If Adn is able to inhibit different reductant systems of 2-Cys Prx reduction with different extents, it may be used to treatment of diseases caused by bacteria fungi and protozoa [28–31].

3.2 Adn is able to bind to the cysteines of Tsa1^{WT} and mutants

Since Adn is able to bind the cysteines from the human 2-Cys Prx, preventing the formation of intermolecular disulfides, we performed non-reducing SDS-PAGE assays in order to evaluate its capacity to bind to Tsa1^{WT}, Tsa1^{T44S}, Tsa1^{175ΔCT} and Tsa1^{Y77A}. Despite that the wild type reduced proteins are predominantly decamers, the association among the protomers are performed by weak interactions as Van Der Waals, saline bridges and hydrophobic polar and non polar interactions, which are disrupted in the denaturing conditions of the SDS-PAGE and the protein is detected as a monomer of ~ 25kDa. On the other hand, the oxidized form of the enzyme is a ~50kDa dimer characterized by formation of one or two intermolecular disulfide bonds, which present a slower migrating band or a faster migrating band, respectively. Thus, reduced proteins were exposed to increasing amounts of Adn for one hour (Figure 4), followed by treatment with H₂O₂ to induce the disulfide formation. Since the disulfide bridge is a covalent bond, Adn binding to one Cys residue results in no disulfide formation and, thereby, a monomeric band of ~ 25kDa can be detected. On the other hand, if the C_P reacts with hydroperoxide and subsequently with the C_R, dimeric bands of ~ 50kDa containing one (slower migration) or two disulfides (faster) may be detected in the gel. Our results reveal that, to the wild type protein, Adn treatment prevented the formation of disulfides when were applied higher periods of time or concentration (lanes 7-10). Dimeric bands containing one disulfide were also observed, suggesting Adn binding to one monomer. A similar profile was observed to mutant enzymes Tsa1^{T44S}, Tsa1^{175ΔCT} and Tsa1^{Y77A}.

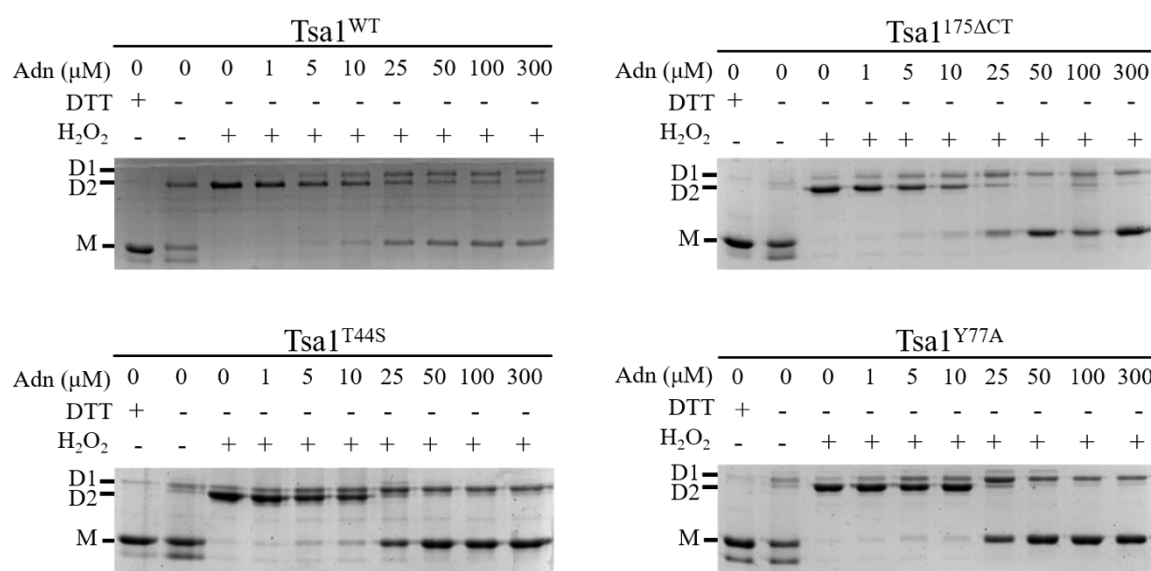


Figure 4. Non reducing SDS-PAGE of the Tsa1 oxidation after Adn treatment: Reduced Tsa1^{WT}, Tsa1^{T44S}, Tsa1^{Δ175} and Tsa1^{Y77A}, at final concentration of 10 μM, were treated with 1, 5, 10, 25, 50, 100 or 300 μM Adn for 1 hour before oxidation with 12 μM H₂O₂ for 30 minutes at room temperature. Then, the reactions were stopped by stop buffer addition and submitted to non-reducing 12% SDS-PAGE analysis. The first and second lanes represent the control with only reduced Tsa1 before and after desalting, respectively. D1 = dimer with one intermolecular disulfide; D2 = dimer with two intermolecular disulfides; M = monomer.

3.3 Thr⁴⁴ replacement by a Ser makes Tsa1 secondary structure susceptible to change by Adn binding

In order to investigate the effects of Adn binding over the secondary structure of Tsa1^{WT} and mutants, the proteins treated with this ligand were evaluated by circular dichroism spectroscopy (CD). There were no significant changes in Tsa1^{WT}, Tsa1^{Δ175} e Tsa1^{Y77A} secondary structures due to binding with Adn, only a low increase of α helix and low decrease of β sheets in approximately 2% (Figures 5A, 5C, 5D; Table 2). On the other hand, Tsa1^{T44S} showed an higher increase in the proportion of alpha-helices (20.83 to 27.7%) over beta sheets (26.54 to 19.59%) after Adn treatment (Figure 5B; Table 2).

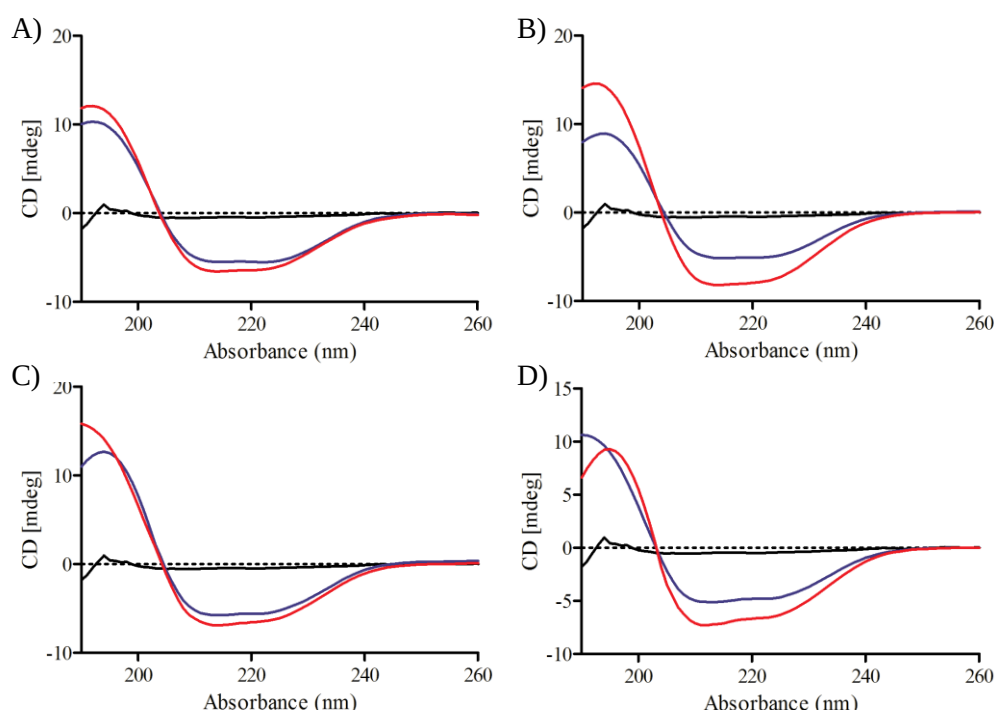


Figure 5. Circular dichroism spectroscopy (CD) of oxidized Tsa1^{WT} and mutants pre-treated with Adn: Reduced Tsa1^{WT} (A), Tsa1^{T44S} (B), Tsa1^{175ΔCT} (C) and Tsa1^{Y77A} (D) at final concentration of 5 μM, were treated with 25 μM Adn for 1 hour at room temperature (red lines). After Adn treatment, the samples were oxidized by 6 μM H₂O₂ for 30 minutes before being submitted to CD. As control, it was used the proteins without Adn treatment (blue line) and samples without any protein, only with Adn in buffer (black line).

Table 2. Comparative CD data analysis to evaluate secondary structure composition of oxidized Tsa1^{WT} and mutants before and after Adn treatment. The spectra were acquired from 190 to 260 nm and the secondary structure content was determined using CDNN 2.1 software.

	Tsa1 ^{WT}		Tsa1 ^{T44S}		Tsa1 ^{175ΔCT}		Tsa1 ^{Y77A}	
	Adn -	Adn +	Adn -	Adn +	Adn -	Adn +	Adn -	Adn +
α helix	21.09%	23.01%	20.83%	27.76%	23.13%	25.07%	21.15%	23.72%
β strand	26.30%	24.18%	26.54%	19.59%	23.22%	21.56%	26.90%	24.36%
β turn	16.42%	16.49%	16.34%	16.44%	16.26%	16.37%	16.55%	16.76%
Random coil	36.19%	36.23%	36.38%	36.22%	37.49%	37.00%	35.4%	35.07%

These data are in accord with the observed previously in activity assay, in which Adn display higher inhibitory properties over Tsa1^{T44S}, indicating that this interaction is able to promote relevant structural modifications on secondary structure and may contributes to the decreased activity of the protein. Nonetheless, it has been demonstrated that the full peroxidatic activity of 2-Cys Prx from eukaryotes and prokaryotes are related to decamer integrity of the reduced protein [26]. In fact, the disruption of the decamers as consequence of single mutations is able to decrease significantly the enzyme activity, at least in part because of the active site is located at dimer interface of the decamers. Since Adn was able to promote differences in the content of secondary structure of the proteins, it could also promote decamer disruption. To shed a light in this question, we also investigate the effects of Adn binding over Tsa1 and mutants and results are presented hereinafter.

3.4 Adn is able to provoke quaternary structural changes in Tsa1

Changes in Tsa1 quaternary structure as consequence of Adn binding were analyzed by size exclusion chromatography (SEC) (Figure 6). Without Adn treatment, Tsa1^{WT} presented an elution profile in which it is possible to observe two peaks with very similar molecular mass, possibly indicating the protein decameric structure in two different compaction degrees (Figure 6A blue line). After Adn treatment, Tsa1^{WT} elutes as a single peak (Figure 6A – red line) indicating that the presence of this ligand was able to stabilize the less compacted decamer form. On the other hand, the constitutive dimeric protein Tsa1^{Y77A} presented a slight shift when compared to Tsa1^{WT}, may indicating the Adn binding is more effective in the decameric form of the Prx (Figure 6C). In this sense, Tsa1^{T44S} presented the more significant difference than Tsa1^{Y77A} relative to Adn treatment (Figure 6B). Finally, the enzyme Tsa1^{175ΔCT} do not presented any difference in the elution profile of the protein treated or not treated with Adn (Figure 6D). Therefore, our results show that Adn is able to inhibit the peroxidatic activity of Tsa1^{T44S} by interaction with the protein and not by the disruption of the quaternary structure. A hypothesis relies in the direct interaction with the active site pocket residues since that the catalytic triad Thr to Ser substitution is the only difference in the entire protein sequence when compared with the wild type enzyme [26].

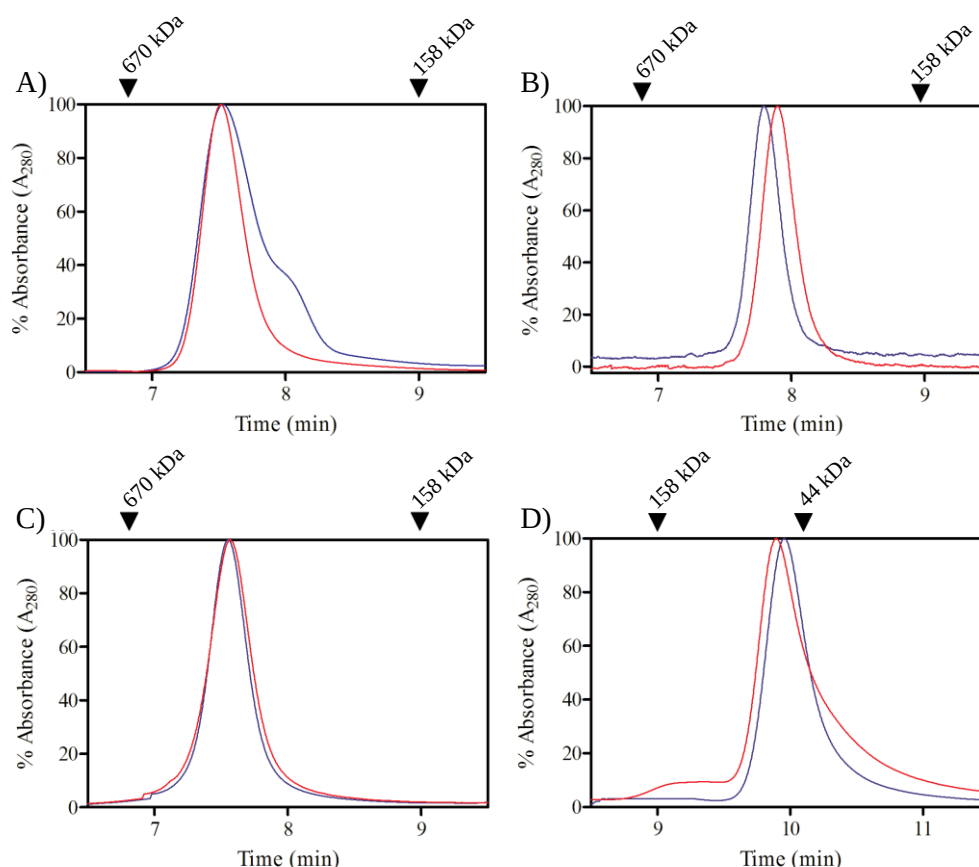


Figure 6. Size exclusion chromatography (SEC) of oxidized Tsa1^{WT} and mutants pre-treated with Adn: Reduced Tsa1^{WT} (A), Tsa1^{T44S} (B), Tsa1^{T175ΔCT} (C) and Tsa1^{Y77A} (D), at final concentration of 10 μ M, were treated with 300 μ M Adn for 1 hour, at room temperature (red lines), and oxidized by 12 μ M H₂O₂ for 30 minutes before being submitted to SEC. As control, the proteins without Adn treatment were used (blue lines). The elution profile was monitored at a wavelength of 280 nm. Bovine thyroglobulin (670 kDa), bovine gamma globulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa) and myoglobin (17 kDa) were used as molecular standards (Bio-Rad).

3.5 Analysis of Tsa2, a natural enzyme containing Ser at CT, reveals that the higher inhibition rates is associated with Thr→Ser substitution

Tsa1 possesses a homologue enzyme, named Tsa2, which shares high resemblance (~86% identity and ~96% similarity). Both are constitutive decameric enzymes by the arrangement $\alpha_2(5)$ and alignment of these structures revealed that quaternary structure is also very similar (rmsd = 1.18 Å to 1631 α atoms). A very important difference relies in that Tsa2 naturally possesses the catalytic triad Thr substituted by a Ser and the analysis of the crystallographic structure also revealed that Tsa1 is more compact than Tsa2. To investigate if the Thr to Ser natural substitution in Tsa2 is able to turn an enzyme more susceptible to Adn inhibition we performed the same analysis performed to Tsa1 and mutants. The evaluation of peroxidatic activity over hydroperoxides revealed that Tsa2 is inhibited at a slightly lower rate than Tsa1^{T44S} (Figure 7A). The velocity of decomposition without Adn pre-treatment was determined as 1.2 μ M.s⁻¹ and the Adn treatment resulted in a velocity of 0.41 μ M.s⁻¹, representing a decrease of 66%. The non-reducing SDS-PAGE of the Tsa2 treated with growing Adn concentration followed to oxidation with hydrogen peroxide also revealed that, at higher Adn concentrations, monomeric species and dimeric forms containing only one disulfide are formed. In fact, despite the higher hydrogen peroxide concentration (12 equivalents) none sample presented species containing only two disulfides (Figure 7B).

The analysis of the secondary structure by circular dichroism spectroscopy also revealed that Adn is able to interfere in the protein structure (Fig. 7C). The treatment resulted in a decrease of α

helix content (27.4 to 21.3 %) and the increase of β sheets (20.5 to 26.0 %), but no significant differences were detected in less ordered structures as β turns (16.75 to 16.37 %) and random coils (35.39 to 36.28 %). Finally, the evaluation of the quaternary structure by SEC show significant difference between the enzyme untreated and that treated with Adn (Figure 7D), with an elution profile very similar to the observed to the mutant Tsa1^{T44S} (Figure 6B). Together the data together strongly suggest that Thr to Ser substitution turn the 2-Cys Prx enzymes more susceptible to the inhibition by Adn.

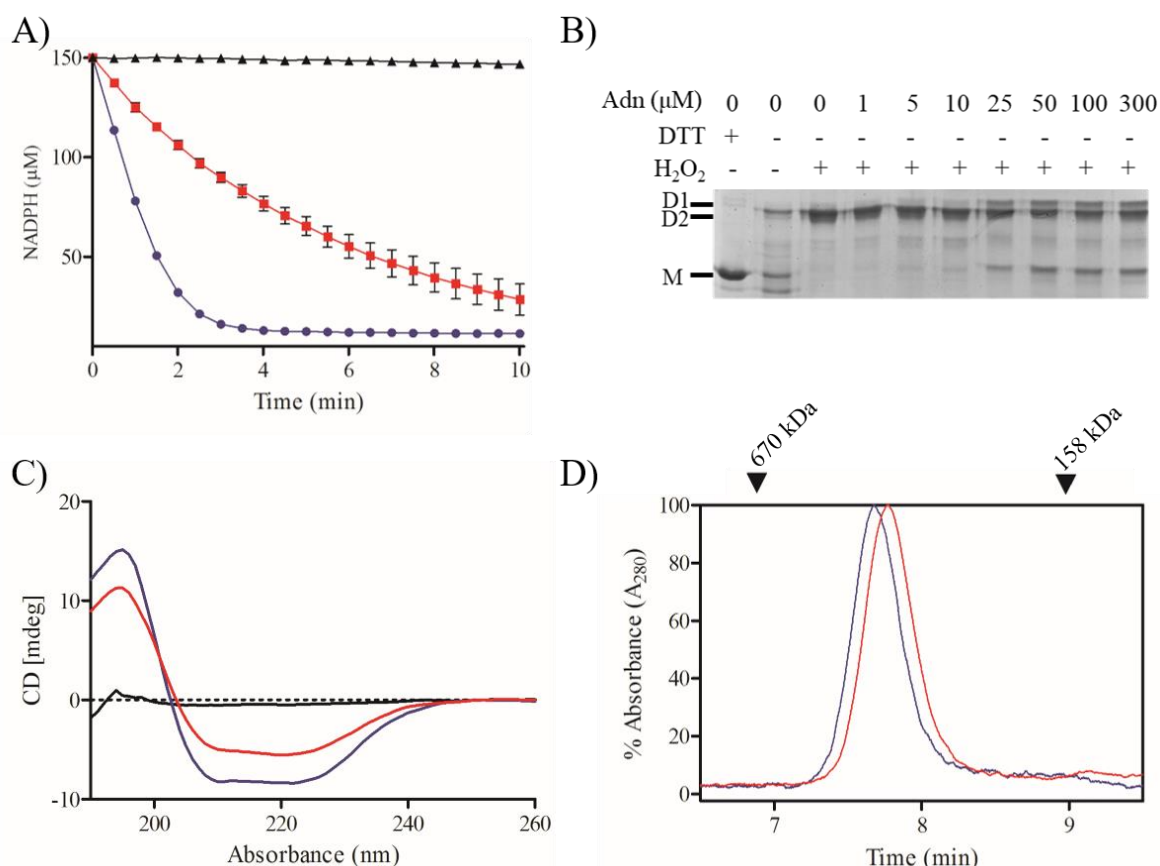


Figure 7. Functional and structural effects of Adn over Tsa2. **A)** Evaluation of peroxidatic activity by NADPH oxidation assay of Tsa2 previously non treated (blue line) and treated (red line) with Adn. The experimental conditions are the same as described before to the other enzymes. Black line refers to negative control, without Tsa2 addition. **B)** Non reducing SDS-PAGE of the Tsa2 oxidation after Adn treatment. Reduced samples of Tsa2 (10 μM) were treated with different Adn concentration (1–300 μM) for 1 hour followed by oxidation with H₂O₂ (12 μM) for 30 minutes at 25 °C. Then, the reactions were stopped by stop buffer and submitted to non-reducing 12% SDS-PAGE. The first and second lanes represent the control with only reduced Tsa2 before and after desalting, respectively. D1=dimer containing one disulfide; D2=dimer containing two disulfides and M=monomer. **C)** and **D)** Evaluation of the effect of the Adn treatment over Tsa2 secondary and quaternary structure, respectively. The experimental conditions are the same as described before to the other enzymes. Red lines refer to Tsa2 treated with Adn and blue lines refer to non treated Tsa2.

3.6 Adn Molecular docking in Tsa1 structure

In the pioneer work of Liu and colleagues, the authors attributed Adn inhibition of human 2-Cys Prx isoforms Prx1 and Prx2 by the binding of the molecule to the C_R through a Michael addition reaction [18]. Posteriorly, Soethoudt and coworkers showed that Adn is able to bind both cysteine residues involved in the catalytic cycle with reaction rates higher to the C_P (30 M⁻¹s⁻¹) than to C_R (5 M⁻¹s⁻¹) [21]. These data are in accordance with the observed in this work since that, in the active site environment of Tsa1, the C_R is too distant (>10 Å) to promote the differences detected between Tsa1 and Tsa1^{T44S}. To investigate the molecular interaction of Adn with the Tsa1 active site, we carry out

analyzes involving molecular docking. For the selection and analysis of the best solutions, three criteria were applied: first, in general, the clusters located near the cysteines (C_P and C_R) since Adn prevents the formation of dimers in SDS-PAGE (Figure 4); Second, the solutions present in dimer interface, since it has already been described that this interface is important to substrate interaction since the aminoacid of the adjacent homodimer of the decamer are important for catalysis (Figure 8A-B) (Tairum et al., 2012; Tairum et al., 2016) and third, the appropriate orientations of the reactive Adn group were selected (Figure 8C), an unsaturated $C\alpha$ - β that acts as Michael's acceptor ($C13$) to react with $S\gamma$ from C_P or C_R (Liu et al., 2012; Muchowicz et al., 2014).

The docking approaches carried out revealed that the best solutions were found majoritarily the Adn molecule very close to C_P and that the stabilizing molecular interactions come not only from the amino acids of the homodimer by also from dimer interface (adjacent homodimer) (Figure 8B and D), reaffirming the importance of decameric structure and not just the dimer, to perform the molecular analysis. Accordingly to all typical 2-Cys Prx described to date, the decameric structure is highly important in maintaining the active enzyme (Tairum et al., 2012; Nelson et al., 2018; Parsonage et al., 2005; Wood et al., 2002; Wood et al., 2003).

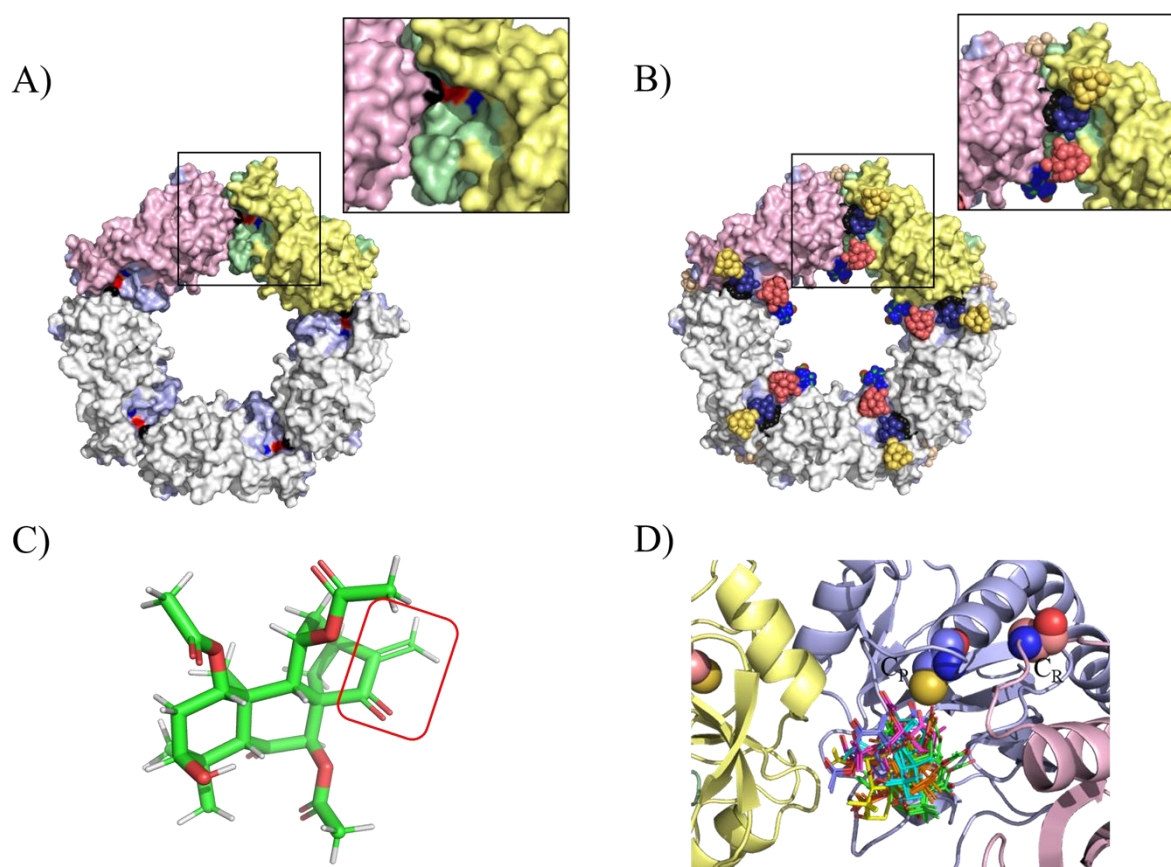


Figure 8. Representation of the distribution of Adn clusters in Ts1 and interactions between Adn and C_P . The decamers without (A) and with (B) the selected clusters are represented by surface with each monomer represented by different stains and the CT amino acids and Tyr⁷⁷ are colored as follow: Thr⁴⁴ = red, C_P = orange, Arg¹²³ = blue and Tyr⁷⁷ = black. The inserts represent a zoom on the catalytic site of the enzyme, demonstrating the interaction of the active site with Tyr⁷⁷ of the adjacent dimer, with (B) and without (A) the Adn cluster. Functional carbon group α - β unsaturated that acts as an acceptor of Michael (C). The stabilization of Adn molecules in C_P , compared to C_R , where each cluster is colored differently. Graphical representations were generated using the PyMOL program (www.pymol.org).

After selecting the favorable solutions, the hydrophobic interactions between Adn and Ts1 were analyzed using the PyMOL and LigPLOT⁺ tools. The aminoacids residues common to all solutions involved in the stabilization of Adn in the enzyme binding site, are shown in table 3. As

general tend, the data are very representetative revealing a extensive network of hydrophobic interactions with the amino acids form the active site microenvironment.

Table 3. Amino acid residues that stabilize Adn in the active site cavity of Tsa1 and mutants. The amino acids are symbolized according to the monomer they belong: no symbol = monomer with target C_P; * = monomer adjacent to the homodimer and # = monomer of the adjacent homodimer. Amino acids that perform hydrophobic interactions are represented in red.

	Amino acids residue
Tsa1 ^{WT}	Pro ⁴⁰ , Leu⁴¹ , Thr ⁴⁴ , Phe⁴⁵ , Val ⁴⁶ , Cys ⁴⁷ , Ile ¹¹⁵ , Glu¹¹⁸ , Val ¹²⁰ , Arg ¹²³ , Leu¹⁴² , Pro ¹⁴³ , Gln ^{5*} , Val^{167*} , Pro^{181*} , Glu ^{76#} and Tyr^{77#}
Tsa1 ^{T44S}	Pro ⁴⁰ , Leu ⁴¹ , Ser ⁴⁴ , Phe ⁴⁵ , Val ⁴⁶ , Cys ⁴⁷ , Ile ¹¹⁵ , Glu¹¹⁸ , Val ¹²⁰ , Arg ¹²³ , Asp ¹⁴¹ , Leu¹⁴² , Pro¹⁴³ , Gln ^{5*} , Arg ^{135*} , Gly ^{165*} , Val ^{167*} , Pro^{181*} , Thr ^{182*} , Glu ^{76#} and Tyr^{77#}
Tsa1 ^{175ΔCT}	Pro ⁴⁰ , Leu⁴¹ , Thr⁴⁴ , Phe⁴⁵ , Val ⁴⁶ , Ile ¹¹⁵ , Glu ¹¹⁸ , Val ¹²⁰ , Arg ¹²³ , Leu¹⁴² , Pro ¹⁴³ , Val ^{167*} , Thr ^{14#} , Phe ^{21#} , Glu^{76#} and Tyr^{77#}
Tsa1 ^{Y77A}	Pro⁴⁰ , Leu⁴¹ , Thr⁴⁴ , Phe⁴⁵ , Val ⁴⁶ , Cys ⁴⁷ , Glu ¹¹⁸ , Val ¹²⁰ , Arg ¹²³ , Leu¹⁴² , Pro ¹⁴³ , Gln ^{5*} , Val ^{167*} , Pro^{181*} , Thr ^{182*} and Val ^{183*}

The results obtained for Tsa1 and mutants reveal the interaction of Adn with many important amino acids residues, both from the structural and functional importance as the Thr⁴⁴, C_P and Arg¹²³ residues that encompass the catalytic triad of Tsa1 and are absolutely conserved among the Prx (Tairum et al., 2016; Flohé et al., 2011), as well as the Pro⁴⁰ residue that stabilizes Adn and is part of the P-X-X-X-(T/S)-X-X- C_P motif known as C_P-Loop (Kamariah et al., 2018) which, in its reduced form, has an essential conformational dynamics for effective reduction of hydroperoxides. In fact, point mutations of the residues motif that affect the binding to substrates, catalysis, oligomerization, stability and the hyperoxidation of Prx (Kamariah et al., 2018). In addition, there is a consensus that Pro⁴⁰ has an important role in protecting C_P, providing a hydrophobic surface, making unwanted reactions with the solvent difficult (Hall et al., 2010; Wood et al., 2003). Particularly, the hydrophobic nature of Pro, may be of importance also to interact with hydrophobic moiety of substrates. In the case of the Arg¹²³ is strongly positioned towards C_P, maintaining the stabilization of the negative thiolate charge through the interaction with two other residues: Glu⁵⁰ and Pro¹⁴³ (Zeida et al., 2014), the latter being also necessary for the stabilization of Adn in Tsa1 active site pocket. Additionally, it has already been described that Phe⁴⁵ is an important residue for the specificity of the interaction between Prx and its reducing substrate (Kamariah et al., 2018). It should be noted that all residues mentioned above that perform interactions belong to the same monomer as a homodimer.

In the dockings performed by Liu and collaborators for Prx1 of humans and Adn were detected as residues capable of interacting with the inhibitor: Leu⁴⁶, Thr⁴⁹, Phe⁵⁰, Val⁵¹, Cys⁵² (C_P), Ile¹²⁵, Arg¹²⁸, Pro¹⁴⁸ and Cys¹⁷³ (C_R) (Liu et al., 2012), which were also detected in an equivalent way in our procedures for Tsa1 (Leu⁴¹, Thr⁴⁴, Phe⁴⁵, Val⁴⁶, Cys⁴⁷ (C_P), Val¹²⁰, Arg¹²³ and Pro¹⁴³) (Table 3), except for C_R, suggesting that these residues act in a common way between the two enzymes to stabilize Adn in the active sites. In docking procedures using Prx1 and the inhibitor JDA-202, a similar compound belonging to the same class as Adn (*ent*-kaurene), Shi and collaborators (2017) identified Pro⁴⁵, Leu⁴⁶, Thr⁴⁹, Phe⁵⁰, Cys⁵² (C_P), Val⁵¹ and Pro¹⁴⁸ as stabilizing residues. Again, it is important to note that despite differences in relation to the compound and the enzymes, equivalent residues in Tsa1 were also detected in our procedures (Pro⁴⁰, Leu⁴¹, Thr⁴⁴, Phe⁴⁵, Cys⁴⁷ (C_P), Val⁴⁶ and Pro¹⁴³) (Table 3), reinforcing the reliability of our generated data.

The analysis of the crystallographic structure of Tsa1 of *S. cerevisiae* in reduced form (Tairum et al., 2012) revealed that the decamer is stabilized by several non-covalent interactions at the dimer interface, where, between these interactions, the C γ atom of the Thr⁴⁴ acts as a donor of the H bond to the ring of Tyr⁷⁷ (Figure 9C), located in the polypeptide chain of the adjacent homodimer (denoted by the symbol #), where this CH- π bond plays important contributions to the structure and function of proteins (Tairum et al., 2012; Tairum et al., 2016).

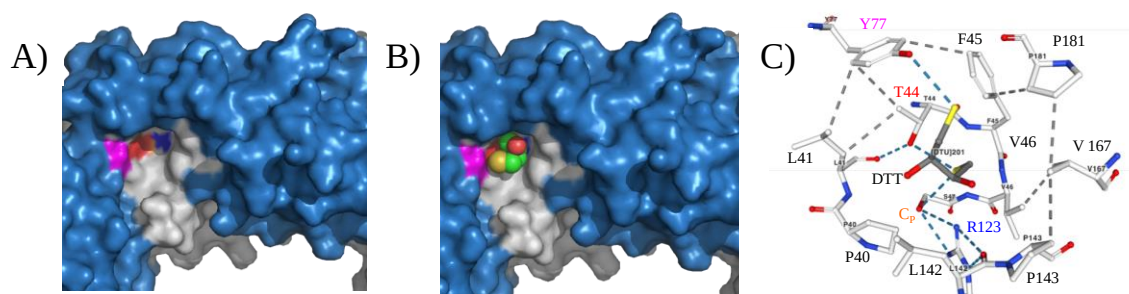


Figure 9. Molecular surface and interactions of amino acid residues in the *S. cerevisiae* Tsa1 active site (PDB = 3SBC). A-B) Structure of *S. cerevisiae* Tsa1 (PDB = 3SBC), where each monomer of the obligate homodimer is colored in white or blue. The amino acids of the CT are colored in red (Thr⁴⁴), orange (C γ) and blue (Arg¹²³). The residue of Tyr⁷⁷ that makes CH- π interaction with Thr⁴⁴ is represented in purple. A) Detail of the active Tsa1 site where the DTT molecule was omitted. B) Tsa1 with DTT molecule represented in spheres (C = green; O = red; N = blue and S = orange). C) Amino acids involved in the stabilization of the ligand (DTT) at the active site of the enzyme. The gray lines represent interactions of a nonpolar character and the light blue lines, polar interactions. The residues are represented by the one letter code. The colors of the fonts for the residues of the catalytic triad as well as of the Tyr⁷⁷ follow the colors established in the figures of A and B.

In addition, the crystallographic structure of the Tsa1 has a DTT molecule in its active site (Fig. 9A-B), which allowed us to make an analysis of the amino acids involved in ligand stabilization (Fig. 9C). In this context, the molecular interactions mostly come from the same homodimer, these being the residues Pro⁴⁰, Leu⁴¹, Phe⁴⁵, Val⁴⁶, Pro¹⁴³, Val¹⁶⁷ and Pro¹⁸¹ (* denotes that the residue comes from the adjacent monomer of the obligate homodimer), which are involved in a network of hydrophobic interactions allowing the accommodation of the ligand in the pocket of the active site, and atoms of the main chains of the Leu⁴¹ and Leu¹⁴² residues, and of the side chains of Thr⁴⁴, C γ , Arg¹²³ and the Tyr⁷⁷ of the adjacent dimer, accounting for polar interactions. In this context, our results of molecular docking of Tsa1 and mutants with Adn seem to be consistent, since all amino acids residues involved in the stabilization of the DTT ligand, crystallized together with the protein, are also involved in the simulation of binding with the inhibitor, and reproduce a similar responses in three different active sites among the analyzed tetramers. It is important to highlight the importance of the adjacent homodimer, since in addition to Tyr⁷⁷ interactions were also detected with Glu⁷⁶, indicating the importance of interactions with the adjacent dimer for substrate accommodation.

The data obtained from docking also corroborate the higher inhibitory activity of Adn with Tsa1^{T44S}, since there is a higher participation of amino acid residues to accommodate the inhibitor in its active site, in comparison with the other enzymes. For example, there is a greater interaction with residues of the adjacent monomer of the obligate homodimer, being these Arg¹³⁵*, Gly¹⁶⁵* and Thr¹⁸²*, besides Asp¹⁴¹ of the monomer of the target C γ chain. Curiously, Tsa1^{175 Δ CT}, which is more resistant to hyperoxidation and the enzyme less inhibited by Adn, did not present direct interaction with C γ , and performed interaction with only one amino acid of the adjacent monomer (Val¹⁶⁷*). On the other hand, it presented a greater number of interactions with the adjacent dimer monomer, being these Thr¹⁴*, Phe²¹*, besides Glu⁷⁶ and Tyr⁷⁷*. Finally, the enzyme Tsa1^{Y77A}, which presents itself constitutively dimeric, discarded the important interactions that occur with the adjacent dimer,

467 obtaining an incomplete result of molecular docking, emphasizing the importance of the analysis of
468 the data to be done in the dimeric interface.

469

4. Discussion

Adn was initially described as a specific inhibitor human to the Prx1 and Prx2 in acute myeloid leukemia (AML) cells [18]. Posteriorly, it was demonstrated that Adn is able to bind another thiol proteins as the 2-Cys Prx reductant system represented by Trx and TrxR [21]. Despite the works cited above, none study addressed to the efficiency of Adn binding taking into account another species than mammalian 2-Cys Prx. In this work, for the first time, it was studied the microbial Prx Tsa1 and Tsa2 from *S. cerevisiae*, using the Tsa1^{WT} an enzyme that is able to switch between dimers and decamers and mutants of the active site pocket in which the oligomerization state is constitutive as dimers (Tsa1^{Y77A}) or decamers (Tsa1^{T44S}) and a mutant lacking the C-terminal α helix (Tsa1^{175 Δ CT}), which mimics the robust bacterial 2-Cys Prx. Using different approaches, we demonstrated that Tsa1^{T44S} is more prone to Adn inactivation and subject to more significantly structural modifications when compared to the other enzymes tested (Tsa1^{WT}, Tsa1^{Y77A} and Tsa1^{175 Δ CT}). Using the enzyme Tsa2, that present the natural substitution of the catalytic triad Thr by a Ser, we show that this punctual substitution is able to turn the enzyme more susceptible to Adn interaction and inhibition. By molecular docking we have shown that Adn is stabilized in the Tsa1 active site pocket by several apolar and some polar interactions, indicating that apolar interactions are pivotal to the stabilization of inhibitors in active site microenvironment, which may have implications also to bulkier substrates as lipid hydroperoxides.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: title, Table S1: title, Video S1: title.

Author Contributions: M.A.O., G.M., L.E.S.N., A.L.P.O. M.C.S. and C.A.T. conceived and designed the experiments; M.C.S., A.L.P.O. and M.H.T., executed the experiments; M.C.S., M.H.T., A.L.P.O., G.M., M.A.O., G.T.S. and C.A.T., analyzed the data; M.C.S., A.L.P.O., C.A.T., M.H.T., L.E.S.N. G.M., and M.A.O. wrote the paper. All authors revised, edited and approved the final version of the manuscript.

Funding: The authors M.A.O., M.C.S., L.E.S.N., C.A.T., and A.L.P.O. are members of the CEPID REDOXOMA from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (grant number 2013/07937-8). This work was also supported by grants from FAPESP to M.A.O. (2007/50930-3; 2017/19942-7) and M.H.T. (2017/20291-0). M.C.S., C.A.T., and A.L.P.O. were recipients of fellowships from FAPESP (2011/13500-6; 2013/16112-2; 2017/06263-4; 2008/09132-9; 2010/00172-8; 2018/12628-8; 2019/04054-4). M.C.S. also received grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES).

Acknowledgments: In this section you can acknowledge any support given which is not covered by the author contribution or funding sections. This may include administrative and technical support, or donations in kind (e.g., materials used for experiments).

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no competing interests.

Appendix B

All appendix sections must be cited in the main text. In the appendixes, Figures, Tables, etc. should be labeled starting with 'A', e.g., Figure A1, Figure A2, etc.

References

- Jang HH, Lee KO, Chi YH, Jung BG, Park SK, Park JH, et al. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell*; 2004; 117:625–35.
- Park SG, Cha MK, Jeong W, Kim IH. Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*; 2000; 275:5723–32.
- Wood Z a, Schröder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.*; 2003; 28:32–40.
- Ghaemmghami S, Huh W-K, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, et al. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*; 2003; 425:737–41.
- Hall A, Karplus PA, Poole LB. Typical 2-Cys Peroxiredoxins: Structures, mechanisms and functions. *FEBS Lett.* 2009; 276:2469–77.
- Ogusucu R, Rettori D, Munhoz DC, Netto LE, Augusto O. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. *Free Radicals Biol. Med.*; 2007; 42:324–34.
- Tairum C A, de Oliveira M a, Horta BB, Zara FJ, Netto LES. Disulfide biochemistry in 2-cys peroxiredoxin: requirement of Glu50 and Arg146 for the reduction of yeast Tsa1 by thioredoxin. *J. Mol. Biol.*; 2012; 424:28–41.
- Jeelani G, Nozaki T. Entamoeba thiol-based redox metabolism: A potential target for drug development. *Mol. Biochem. Parasitol.*; 2016; 206:39–45.
- Angelucci F, Miele AE, Ardini M, Boumis G, Saccoccia F, Bellelli A. Typical 2-Cys peroxiredoxins in human parasites: Several physiological roles for a potential chemotherapy target. *Mol. Biochem. Parasitol.*; 2016; 206:2–12.
- Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer*; 2003; 3:276–85.
- Flohe L, Toppe S, Cozza G, Ursini F. A Comparison of Thiol Peroxidase Mechanisms. *Antioxid. Redox Signal.*; 2011; 15:763–80.
- Immenschuh S, Baumgart-Vogt E. Peroxiredoxins, Oxidative Stress, and Cell Proliferation. *Antioxid. Redox Signal.* 2005; 7:768–77.
- Kang DH, Lee DJ, Kim J, Lee JY, Kim H-W, Kwon K, et al. Vascular Injury Involves the Overoxidation of Peroxiredoxin Type II and is Recovered by the Peroxiredoxin-Activity Mimetic that Induces Reendothelialization. *Circulation*; 2013.
- Wood ZA, Poole LB, Karplus PA. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*; 2003; 300:650–3.
- Moon JC, Hah Y-S, Kim WY, Jung BG, Jang HH, Lee JR, et al. 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.*; 2005; 280:28775–84.
- Peskin A V, Cox AG, Nagy P, Morgan PE, Hampton MB, Davies MJ, et al. Removal of amino acid, peptide and protein hydroperoxides by reaction with peroxiredoxins 2 and 3. *Biochem. J.*; 2010; 432:313–21.
- Holmgren A, Lu J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 2010; 396:120–4.
- Liu C-X, Yin Q-Q, Zhou H-C, Wu Y-L, Pu J-X, Xia L, et al. Adenanthin targets peroxiredoxin I and II to induce differentiation of leukemic cells. *Nat. Chem. Biol.*; 2012; 8:486–93.
- Liu C-X, Zhou H-C, Yin Q-Q, Wu Y-L, Chen G-Q. Targeting peroxiredoxins against leukemia. *Exp. Cell Res.*; 2013; 319:170–6.
- Hou J-K, Huang Y, He W, Yan Z-W, Fan L, Liu M-H, et al. Adenanthin targets peroxiredoxin I/II to kill hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death Dis.*; 2014; 5:e1400.
- Soethoudt M, Peskin A V, Dickerhof N, Paton LN, Pace PE, Winterbourn CC. Interaction of adenanthin with glutathione and thiol enzymes: Selectivity for thioredoxin reductase and inhibition of peroxiredoxin recycling. *Free Radic. Biol. Med.*; 2014; 77C:331–9.

22. Wood ZA, Poole LB, Hantgan RR, Karplus PA. Dimers to Doughnuts: Redox-Sensitive Oligomerization of 2-Cysteine. *Biochemistry*; 2002; 41:5493–504.
23. Botstein D, Fink GR. Yeast: An experimental organism for 21st century biology. *Genetics*; 2011; 189:695–704.
24. Menacho-Márquez M, Murguía JR. Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. *Clin. Transl. Oncol.*; 2007; 9:221–8.
25. Outeiro TF, Giorgini F. Yeast as a drug discovery platform in Huntington's and Parkinson's diseases. *Biotechnol. J.*; 2006; 1:258–69.
26. Tairum-Jr CA, Santos MC, Breyer C., Geyer R, Ferrer-Sueta G, Nieves C, et al. Catalytic Thr or Ser residue modulates structural switches in 2-Cys peroxiredoxin by distinct mechanisms. *Nature Sci. Reports.*; 2016; 6:33133.
27. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 2004; 25:1605–12.
28. Parsonage D, Sheng F, Hirata K, Debnath A, McKerrow JH, Reed SL, et al. X-ray structures of thioredoxin and thioredoxin reductase from *Entamoeba histolytica* and prevailing hypothesis of the mechanism of Auranofin action. *J. Struct. Biol.*; 2016; 194:180–90.
29. Wood ZA, Poole LB, Karplus PA. Structure of intact AhpF reveals a mirrored thioredoxin-like active site and implies large domain rotations during catalysis. *Biochemistry*; 2001; 40:3900–11.
30. Oliveira MA, Discola KF, Alves S V, Medrano FJ, Guimarães BG, Netto LES. Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. *Biochemistry*; 2010; 49:3317–26.
31. Fritz-Wolf K, Urig S, Becker K. The Structure of Human Thioredoxin Reductase 1 Provides Insights into C-terminal Rearrangements During Catalysis. *J. Mol. Biol.*; 2007; 370:116–27.
32. Fujita H, Nakamura I, Tsukimori A, Sato A, Ohkusu K, Matsumoto T. Severe infective endocarditis in a healthy adult due to *Streptococcus agalactiae*. *Int. J. Infect. Dis.*; 2015; 38:43–5.
33. Czekaj T, Ciszewski M, Szewczyk EM. *Staphylococcus haemolyticus*: An emerging threat in the twilight of the antibiotics age. *Microbiol.*; 2015; 161:2061–8.
34. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.*; 2015; 13:269–84.
35. Veloso TR, Oechslin F, Que Y-A, Moreillon P, Entenza JM, Mancini S. Aspirin plus ticlopidine prevented experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus gallolyticus*. *Pathog. Dis.*; 2015; 73
36. Larru B, Gerber JS. Cutaneous bacterial infections caused by *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* in infants and children. *Pediatr. Clin. North Am.*; 2014; 61:457–78.
37. Laskowski RA, Swindells MB. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J Chem Inf Model.*; 2011; 51(10):2778-2786.
38. Pettersen, EF, Goddard, TD, Huang, CC, Couch, GS, Greenblatt, DM, Meng, EC, Ferrin, TE. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*; 2004; 25(13): 1605–1612.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Apêndice C

Termo de Revelação de Criação que será submetido ao INPI.

Inventores: Melina C. dos Santos, Thais A. Caldas, Carlos A. Tairum, Patricia Sartorelli, Deborah P. Sessa, Ana Laura P. de Oliveira, João Henrique G. Lago, Luis E. S. Netto, Marcos A. de Oliveira, Marcos H. Toyama, Rodrigo L. O. R. Cunha, Marcelo Brocchi, Luiz Felipe D. Passero, Henrique Ferreira, Ohara Augusto. “Processo de extração e isolamento da caleína C e utilização como inibidor/adjuvante de tiól proteínas em tratamentos de doenças infecciosas e genéticas.”

**Termo de revelação em fase final de elaboração para solicitação de
patente**

TERMO DE REVELAÇÃO DA CRIAÇÃO

A. TÍTULO DA CRIAÇÃO: Processo de extração e isolamento da caleína C e utilização como inibidor/adjuvante de tiól proteínas em tratamentos de doenças infecciosas e genéticas

Inventores: Melina C. dos Santos, Lhais A. Caldas, Carlos A. Tairum, Patricia Sartorelli, Deborah P. Sessa, Ana Laura P. de Oliveira, João Henrique G. Lago, Luis E. S. Netto, Marcos A. de Oliveira, Marcos H. Toyama, Rodrigo L. O. R. Cunha, Marcelo Brocchi, Luiz Felipe D. Passero, Henrique Ferreira, Ohara Augusto.

B. DESCRIÇÃO DO CAMPO DA INVENÇÃO:

O aumento da resistência aos antimicrobianos é motivo de preocupação frente a crescente ineficácia de fármacos de bactérias e fungos. Trabalhos recentes indicam que antimicrobianos distintos possuem a capacidade convergente de produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) que causam danos às macromoléculas, em especial ao DNA, auxiliando na morte do patógeno. EROs e além de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são também produzidas pelo sistema imune de hospedeiros para combater patógenos. Estudos indicam que a inibição da expressão de enzimas antioxidantes de patógenos é capaz de gerar o aumento intracelular significativo dessas espécies, o que interfere de forma substancial em sua sobrevivência. Nesse cenário, um grupo de peroxidases, denominadas peroxirredoxinas (Prx), representam alvos importantes em razão de sua diversidade, reatividade e abundância. Em bactérias, fungos, plantas, vertebrados e invertebrados sendo que em alguns organismos podem representar cerca de 1% de todas as proteínas solúveis da célula. Adicionalmente, trabalhos indicam que essas enzimas são responsáveis pela decomposição majoritária de hidroperóxidos do ambiente celular em alguns organismos. As Prx utilizam um resíduo de cisteína (cisteína de peroxidásica - C_P) para decompor o hidroperóxido e sua alta reatividade é alcançada por interações com um resíduo de Thr (ou Ser) e outro de Arg, absolutamente conservados entre as Prx, que em conjunto, recebem o nome de tríade catalítica (TC). Após decompor o peróxido, C_P se oxida e forma um dissulfeto com uma segunda cisteína (denominada de cisteína de resolução - C_R). O dissulfeto é reduzido por enzimas contendo cisteínas que diferem entre bactérias e fungos e organismos multicelulares. Em humanos Prx também estão envolvidas na progressão do câncer e já foram descritos compostos naturais capazes de inibir estas enzimas, mas nenhum para microorganismos patogênicos. A biodiversidade do Brasil representa uma grande fonte de riqueza para a prospecção e descoberta de novas compostos bioativos, entretanto até o presente momento nenhum composto foi descrito como inibidor de Prx para combate a microorganismos patogênicos. Nesta solicitação, estão descritos os métodos empregados para o isolamento de uma lactona sesquiterpênica de *Calea pinnatifida*, espécie vegetal da família Asteraceae oriunda da biota brasileira, denominada Caléina C (CalC). Em seguida por meio de experimentos *in vitro* demonstramos que CalC é capaz de inibir eficientemente e diferencialmente as Prx de bactérias contendo Thr (EcAhpC^{WT} = $0.553 \pm 0.061 \mu\text{M}$) ou Ser (EcAhpC^{T44S} = $0.460 \pm 0.025 \mu\text{M}$) na tríade catalítica. Por meio de estudos *in vivo* com bactérias demonstramos que CalC é capaz de eliminar eficientemente linhagens patogênicas de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* apresentando MIC₅₀ na ordem de $\sim 350 \mu\text{M}$ e sua administração em conjunto (adjuvante) com o antibacteriano canamicina (Kan) é capaz de potencializar a ação de Kan. No que tange a fungos, utilizando peroxirredoxina de *Saccharomyces cerevisiae* (Tsa1) comparativamente com a enzima de humanos, demonstramos que CalC possui maior atividade inibitória sobre a proteína de levedura. Ensaio *in vivo* utilizando linhagem de levedura (BY4741) revelaram um MIC₅₀ de $\sim 170 \mu\text{M}$ e sua administração em conjunto com o antifúngico G418, potencializa de forma significativa a aniquilação do fungo. Portanto nossa descoberta representa a primeira substância oriunda da biodiversidade brasileira capaz de inibir *in vitro* peroxidases dependentes de tiól (Prx) de microorganismos, aniquilar bactérias e fungos e potencializar o efeito de antifúngicos e antibacterianos. Uma vez que outros microorganismos infecciosos (como protozoários) também dependem de tióis enzimas para infecção, defesa e manutenção nos hospedeiros, solicitamos a patente do processo de isolamento e a aplicação de CalC como adjuvante para o tratamento de antimicrobianos no tratamento de infecções causadas por microorganismos. Adicionalmente, como inibidores de Prx de humanos podem ser utilizados em tratamentos de neoplasias, também é solicitada a proteção de CalC para doenças genéticas.

C. DESCRIÇÃO DO ESTADO DA TÉCNICA

Infecção por patógenos, defesas celulares e antibióticos

Compostos antimicrobianos como antibacterianos e antifúngicos revolucionaram o tratamento de doenças infecciosas e estão entre os maiores avanços na área da saúde do século XX. O período que compreende os anos 1950 e 1970 foi o auge das descobertas de novas classes de antimicrobianos (Aminov, 2010; Robbins, *et al.*, 2017; Strebhardt & Ullrich, 2008). Entretanto, após este período, o número de novos antimicrobianos se tornou muito escasso e a principal abordagem para o desenvolvimento de novos medicamentos para combater a resistência emergente e reemergente de patógenos tem sido, em sua grande maioria, baseada na modificação dos antimicrobianos existentes, inclusive por razões econômicas (Chopra *et al.*, 2002; Docquier & Mangani, 2018). O decréscimo no desenvolvimento de novos fármacos ocorre devido a obstáculos econômicos e regulatórios bem como fusões empresariais que reduziram substancialmente o número de pesquisas. Das 18 maiores empresas farmacêuticas do mundo, 15 abandonaram a produção de antibióticos (Bartlett *et al.*, 2013; Piddock, 2012).

No caso de bactérias as taxas de mortalidade relacionadas às infecções resistentes a múltiplas drogas (Multi Drug Resistance - MDR) tem se tornado cada vez mais elevadas o que constitui um grave problema de saúde em todo o mundo. Na União Européia (UE), ~ 33.000 pacientes morreram em 2015 em decorrência de infecções ocasionadas por 16 espécies de bactérias MDR (Cassini *et al.*, 2019). Nos Estados Unidos da América (EUA) cerca de 23.000 pacientes morrem anualmente como consequência de infecções hospitalares ocasionadas por bactérias MDR (Ventola *et al.*, 2015). Os custos econômicos estimados na UE revelam que os gastos para o sistema de saúde em conjunto com a perda de produtividade dos pacientes geram um prejuízo aproximado de 1.5 bilhão de euros por ano (ECDC / EMEA Joint Working Group, 2009). Em período similar o custo anual do tratamento de infecções hospitalares nos EUA de apenas seis espécies de bactérias MDR foi estimado em aproximadamente 1.9 bilhão de dólares (Ventola *et al.*, 2015). Em 2013, o CDC (Centers for Disease Control and Prevention - CDC) dos EUA declarou que estamos na "era pós-antibiótica". Esta declaração está alinhada com a Organização Mundial da Saúde (OMS) que, em 2014, alertou que a crise de resistência aos antimicrobianos está se tornando alarmante uma vez que o percentual de bactérias MDR aumenta ano a ano (Reardon, 2015; Michael *et al.*, 2014). No Brasil, infelizmente, esses dados não são claros, mas a preocupação com os danos provocados pela crescente resistência de organismos a antimicrobianos levou à elaboração do “Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única”, com vigência de 2018 a 2022 (PAN-BR) (Ministério da Saúde, 2018). Nesse sentido, novas abordagens voltadas para o tratamento de doenças infecciosas causadas por esses agentes seriam de grande importância no que tange a saúde pública.

No que tange a infecções ocasionados por fungos estudos recentes demonstram que elas possuem grande impacto e representam graves riscos para as mais diversas espécies de organismos, incluindo animais e plantas, e, portanto, para cultivos, ecossistemas e a própria biodiversidade (Fisher *et al.*, 2017). Em relação a saúde humana, infecções fúngicas de baixa gravidade atingem até 1.7 bilhões de pessoas anualmente em todo o mundo (Brown *et al.*, 2012). Entretanto, estima-se que infecções invasivas podem levar a morte de até um milhão e meio de pessoas por ano, revelando um grave problema de saúde pública (Kim *et al.*, 2016). Dentre os fungos patogênicos existem diversas leveduras, grupo que se apresenta predominantemente sob forma unicelular, que muitas vezes pertencem ao microbioma saudável, mas que em determinadas condições se comportam como agentes infecciosos de diversas doenças de importância para saúde humana e animal (Mayer *et al.*, 2016). De fato, mais de 90% das infecções fúngicas em humanos são causadas por leveduras sendo a grande maioria do gênero *Candida* (Catanheira *et al.*, 2016; Lockhart 2019; Tuner *et al.*, 2014). *Saccharomyces cerevisiae* também merece destaque como patógeno emergente. Conhecida como levedura do pão, cerveja e vinho, é amplamente distribuída na natureza e largamente utilizada na indústria de panificação, bebidas alcoólicas e biotecnologia. Esta levedura também é um modelo de estudos genéticos e bioquímicos em eucariotos em razão da facilidade de manipulação, a capacidade de utilização de diferentes *backgrounds* para o crescimento das células e similaridades bioquímicas e genéticas com células de mamíferos. Em razão

destas características cinco prêmios Nobel neste século foram concedidos a pesquisadores que a utilizaram como organismo modelo (três em fisiologia/medicina e dois em química) (Hohmann *et al.*, 2016). Em diversos organismos, incluindo humanos, esta levedura é encontrada na microbiota saudável dos tratos gastrointestinal, respiratório e nas mucosas (Muñoz *et al.*, 2005; Salonen *et al.*, 2016). No entanto, nas últimas décadas as infecções fúngicas invasivas causadas por *S. cerevisiae* em humanos, normalmente em indivíduos imunocomprometidos, aumentaram significativamente, incluindo linhagens resistentes a fármacos (Enache-Angoulvant & Hennequin, 2005; Johnson *et al.*, 2008; Strobe *et al.*, 2015).

Tabela 1: Principais classes de antibacterianos e antifúngicos, exemplos, processos biológicos atingidos e ação/descoberta.

Classe de antibacteriano	Exemplos	Alvo Biológico	Modo de ação /Descoberta
β lactâmicos	Penicilinas (ampicilina), cefalosporina (cefamicina), penema (meropenema), monolactâmicos (aztreonam)	Biossíntese de peptoglicanos (proteínas de ligação a penicilina - PBPs)	Bacteriostático ou bactericida (dependente da concentração)/1928
Aminoglicosídeos	Gentamicina, estreptomicina, espectinomicina	Tradução	Bacteriostático/1943
Glicopeptídeos	Vancomicina, teicoplanina	Biossíntese de peptoglicanos	Bactericida/1950
Tetraciclínas	Minociclina, Tigeciclina	Tradução	Bacteriostático/1953
Macrolídeos	Eritromicina, azitromicina	Tradução	Bacteriostático ou bactericida (dependente da bacteria)/1950
Lincosamidas	Clindamicina	Tradução	Bacteriostático ou bactericida (concentração)/1963
Estreptograminas	Synercid	Tradução	Bacteriostático/1953
Oxazolidinonas	Linezolida	Tradução	Bacteriostático/1952
Penicóis	cloramfenicol	Tradução	Bacteriostático/1947
Quinolonas	Ciprofloxacino	Replicação do DNA	Bactericida/1962
Pirimidinas	Trimetoprima	Metabolismo C1	Bacteriostático/1962
Sulfonamidas	Sulfametoxazol	Metabolismo C1	Bacteriostático/1932
Rifamicinas	Rifamicinas	Transcrição	Bactericida/1957
Lipopeptídeos	Daptomicina	Membrana celular	Bactericida/1986
Peptídeos catiónicos	Colistina	Membrana celular	Bactericida/1949

Classe de antibiótico fúngico	Exemplos	Alvo Biológico	Modo de ação /Descoberta
Polienos	Anfotericina B, Nistatina	Membrana celular (Se liga ao ergosterol)	Fungicida/1958
Equinocandinas	Caspofungina, Anidulafungina	Parede celular (Inibidor de 1,3- β -glucano -sintase)	Fungicida /1972
Azoles	Miconazol (Fuconazol, Voriconazol, Itraconazol, Cetoconazol, Clotrimazol e Econazol)	Membrana celular (Inibidor da lanosterol 14 α -demetilase)	Fungicida ou fungisestático/1967
Análogos de primidina	5 -fluorocitosina	Síntese de ácidos nucleicos	Fungicida /1963
Alilaminas	Terbinafina (Lamisil)	Membrana celular (Inibidor da esqualeno epoxidase)	Bactericida/1983

Modificado de Davies e Davies (2010) e Butts e Krysan (2010).

A letalidade de antibacterianos/antifúngicos é acompanhada pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Estudos recentes indicam que diferentes classes de antibacterianos e antifúngicos geram níveis variáveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) que contribuem significativamente para a morte celular dos patógenos (Bizzini *et al.*, 2009; Brynildsen *et al.*, 2013; Davies *et al.*, 2009; Foti Delattin *et al.*, 2014; Grant *et al.*, 2012; Kohanski *et al.*, 2008; Ling *et al.*, 2012; Shekhova *et al.*, 2017; Shatalin *et al.*, 2011). Dentre as EROs de maior importância biológica encontramos o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$) (Halliwell & Gutteridge, 2015). Apesar de existir ainda grande debate sobre a relação de antimicrobianos, geração de EROs e letalidade em patógenos, trabalhos recentes utilizando as mais distintas abordagens reforçam as conclusões obtidas por diferentes grupos de pesquisa. Neste contexto, foi demonstrado que as três principais classes de drogas bactericidas (β -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas) utilizam um mecanismo comum que estimula a produção de radicais hidroxila ($HO^{\bullet}$) por meio de reações químicas de Fenton (Figura 1 A) (van Acker *et al.*, 2016; Dwyer *et al.*, 2014; Ibacache-Quiroga *et al.*, 2018). No que tange fármacos antifúngicos, drogas amplamente utilizadas como a anfotericina B (AMB) e azóis (AZL) que impedem a biossíntese de ergosterol e o crescimento celular, também induzem danos oxidativos (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2010). Belenky e colaboradores demonstraram que o tratamento com AMB ou miconazol (MCZ) elevam os níveis intracelulares de EROs, o que está fortemente relacionado com a morte celular de *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Os autores demonstraram também que a adição de H_2O_2 é capaz de acentuar a morte celular. Por outro lado, a administração de quelantes de ferro (Fe) atenua a morte por fármacos microbicidas, sugerindo que os radicais hidroxila contribuem para a morte celular de patógenos.

Neste contexto é importante salientar que o H_2O_2 juntamente com o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) também é capaz de produzir $HO^{\bullet}$ por meio da reação de Harber-Weiss (Figura 1B) (Halliwell & Gutteridge, 2015). Ponto de importância reside no fato que, apesar dos diferentes fármacos bactericidas e fungicidas terem diferentes alvos biológicos, seus efeitos convergem para uma *via* comum (Belenky *et al.*, 2013; Kohanski *et al.*, 2010; Pang *et al.*, 2017). Essa *via* é baseada na produção de oxidantes através de resposta metabólica envolvendo o ciclo dos ácidos tricarbóxicos (CAT) que induz a rápida depleção de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), resultando em uma hiperativação da cadeia de transporte de elétrons que aumenta a produção de produtos secundários como o $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 (Kohanski *et al.*, 2010; Shatalin *et al.*, 2011). O $O_2^{\bullet-}$ pode atacar grupamentos ferro-enxofre (Fe-S) presente em diversas proteínas podendo levar a disponibilização de Fe ferroso (Fe^{2+}) que participa da reação de Fenton, resultando em formação de $HO^{\bullet}$ que auxilia na morte celular (Kohanski *et al.*, 2010; Shatalin *et al.*, 2011). Cabe ressaltar que o H_2O_2 , também é capaz de danificar grupos Fe-S levando a disponibilização de Fe^{2+} (Imlay, 2008; Jang *et al.*, 2010), o que deve maximizar este processo levando a mais danos celulares. É importante salientar que apesar de baixas doses de antimicrobianos estarem associadas ao aparecimento de linhagens resistentes em função das mutações provocadas no DNA que aceleram as taxas de evolução, altas concentrações ou concentrações apropriadas de antibióticos levam a sérios danos em biomoléculas que impossibilitam ou decrescem as taxas de sobrevivência do patógeno (Davies & Davies, 2010; Ter Kuile *et al.*, 2016; Kampf, 2019).

Defesas oxidativas do organismo hospedeiro na infecção por patógenos

Quando um patógeno invade um hospedeiro, animal ou planta, um dos mecanismos de defesa mais estudados é denominado de explosão respiratória (*respiratory burst*), o qual se caracteriza pela geração de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). Em mamíferos a geração de EROs é devido à ativação de uma multicomponente oxidase (NADPH oxidase, também denominado de fagócito oxidase), que oxida o NADPH e, no processo, reduz o oxigênio a $O_2^{\bullet-}$ (Halliwell & Gutteridge, 2015). Nos neutrófilos, essa reação oxidativa é disparada pelos sinais de ativação e acompanha a fagocitose (Babior, 2004). Quando o radical $O_2^{\bullet-}$ sofre dismutação, produz H_2O_2 , o qual é altamente difusível no organismo e capaz de desencadear mecanismos potencialmente tóxicos para as células (Gordon, 2016; Halliwell e Gutteridge, 2015; Underhill e Ozinsky, 2002). O H_2O_2 , por si só, não é capaz de destruir eficientemente o patógeno, entretanto, ao ser convertido em $HO^{\bullet}$, pode atingir e destruir membranas

celulares, proteínas e causar mutações em ácidos nucleicos (Halliwell e Gutteridge, 2015). Outra forma de eliminar os organismos invasores é através da produção do radical óxido nítrico (NO•). O NO• é gerado quando ocorre a oxidação da arginina na presença da molécula de oxigênio, sendo esta reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) (Fritzsche *et al.*, 2010; Prolo *et al.*, 2014). Elevadas concentrações de NO• podem levar à formação de peroxinitrito (ONOO⁻), um potente agente microbicida cujos derivados são capazes de causar danos ao DNA e oxidação lipídica (Calcerrada *et al.*, 2011; Radi, 2018).

Se por um lado os organismos hospedeiros produzem EROs e ERNs como defesa oxidativa, os organismos patogênicos dispõem de enzimas antioxidantes capazes defendê-los dos efeitos tóxicos destas espécies reativas e ajudá-los a superar a barreira oxidante imposta pelo hospedeiro, possibilitando assim a infecção, manutenção e crescimento. As enzimas antioxidantes utilizadas pelos patógenos para metabolizar as EROs e ERNs em produtos menos tóxicos ou atóxicos são representadas principalmente por superóxido dismutases (Sod) a qual é capaz de decompor o radical ânion superóxido, as catalases (Cat), glutathione peroxidases (Gpx) e as peroxirredoxinas (Prx) que respondem pela decomposição de peróxido de hidrogênio. Entretanto, peróxidos altamente tóxicos para microorganismos patogênicos como peróxidos e lipídeo (L-OOH) e peroxinitrito (ONOO⁻), são decompostos somente pelas Gpx e Prx. Adicionalmente, diversos trabalhos revelam que o bloqueio de enzimas antioxidantes por agentes químicos é capaz de acentuar a morte celular dos patógenos quando submetidos a estresse oxidativo ou tratamento com antibióticos. Portanto, uma alternativa lógica seria a utilização de inibidores de enzimas antioxidantes em terapias antimicrobianas (Birben *et al.*, 2012). No entanto, os hospedeiros, incluindo os humanos, possuem enzimas extremamente semelhantes às dos patógenos, principalmente quando se trata da Sod e Cat e os inibidores acabam por ser tóxicos também para as células dos hospedeiros (Benov e Fridovich, 1994; Brennan *et al.*, 2015; Heikkilä *et al.*, 1977; Mishra e Imlay 2012; Sugadev *et al.*, 2011). Um importante alvo seria as Prx, em razão de características discutidas a seguir.

Peroxirredoxinas: Diversidade e aspectos funcionais/estruturais

As peroxirredoxinas (Prx) são enzimas capazes de decompor uma ampla variedade de hidroperóxidos, como H₂O₂, peróxidos orgânicos e peroxinitrito (Bryk *et al.*, 2000; Chae *et al.*, 1994a; Jacobson *et al.*, 1989). Estas enzimas se destacam por possuírem um grande número de isoformas distribuídas em praticamente todos os organismos, como archaea, procariotos e eucariotos. Por exemplo, em bactérias como *Escherichia coli* podem ser encontradas até quatro isoformas (AhpC, AhpE, BCP e Tpx), em *S. cerevisiae* cinco (Tsa1, Tsa2, Ahp1, mTpx e Dot5) e em humanos seis isoformas (Prx1, Prx2, Prx3, Prx4, Prx5 e Prx6) (Barranco-Medina *et al.*, 2008; Dubbs e Mongkolsuk 2007; Nakamura *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2000; Tovar-Méndez *et al.*, 2011).

Adicionalmente à sua representatividade entre os organismos e elevado número de isoformas, em eucariotos as Prx estão presentes nos mais diversos ambientes celulares como citoplasma, mitocôndria, retículo endoplasmático, núcleo, cloroplasto, peroxissomo, associadas a membranas e citoesqueleto e até mesmo secretadas para o ambiente extracelular (König *et al.*, 2003; Salzano *et al.*, 2014; Rhee e Kil, 2017; Shichita *et al.*, 2012; Tovar-Méndez *et al.*, 2011). Ainda, estas enzimas possuem um grande número de cópias no interior das células, podendo chegar até ~ 1% das proteínas solúveis da célula e até 5% das presentes da matriz mitocondrial em mamíferos, o que torna as Prx responsáveis pela decomposição da maior parcela do H₂O₂ presente nas células, como a Prx3 de humanos que decompõe 90% do H₂O₂ gerado na mitocôndria (Cox *et al.*, 2009). Diferentemente das glutathione peroxidases (Gpx) ou catalases (Cat), as quais utilizam selenocisteína ou um grupamento prostético para a decomposição de hidroperóxidos, todas as peroxirredoxinas utilizam um resíduo de cisteína reativo, denominado de cisteína peroxidásica (C_P) (Chae *et al.*, 1994b; Epp *et al.*, 1983; Hillar *et al.*, 2000; Horta *et al.*, 2010; Kirkman *et al.*, 1999; Netto *et al.*, 1996; Parsonage *et al.*, 2005).

Com a crescente caracterização das Prx nos mais distintos organismos ficou evidente que esta família de proteínas possui diversidade funcional e estrutural, levando a diferentes propostas de classificação destas enzimas (Harper *et al.*, 2017; Hofmann *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 2011; Trivelli *et al.*, 2003). Dentre elas, a mais utilizada leva em conta aspectos estruturais e o número de cisteínas envolvidas no ciclo catalítico. Apesar da maioria das Prx apresentarem-se como homodímeros algumas Prx possuem somente a C_P, enquanto outras

apresentam um segundo resíduo capaz de formar um dissulfeto com a C_P, denominado de cisteína de resolução (C_R) (Kang *et al.*, 2005; Wood *et al.*, 2003a). Desta forma, as Prx podem ser classificadas como 1-Cys, quando apenas uma cisteína está envolvida no ciclo catalítico, ou 2-Cys, quando há a presença da C_R. As 2-Cys podem ainda ser subdivididas em 2-Cys típicas, quando o dissulfeto formado é intermolecular (cada cisteína se encontra em um dos monômeros do dímero) e 2-Cys atípicas, quando o dissulfeto formado é intramolecular (as cisteínas se encontram na mesma cadeia polipeptídica) (Chae *et al.*, 1994b; Rhee *et al.*, 2016).

Ao se analisar as estruturas terciárias/quaternárias destas enzimas, observa-se que a C_P se encontra no final de uma α hélice, o que favorece sua desprotonação, e em grande proximidade com um resíduo de arginina (Arg) e com um de treonina/serina (Thr/Ser), os quais são totalmente conservados em todas as Prx já descritas até o momento. Estes três resíduos de aminoácidos (C_P, Thr/Ser e Arg) formam a tríade catalítica e todos apresentam importância na catálise, visto que a manutenção de C_P na sua forma desprotonada (tiolato, C_P-S⁻) é altamente dependente da integridade da tríade (Flohé *et al.*, 2011; Tairum *et al.*, 2016).

A atividade peroxidásica das Prx se inicia com o ataque de C_P-S⁻ a um átomo de oxigênio do hidroperóxido ocasionando a clivagem heterolítica da ligação O-O, liberando uma molécula de água (no caso do H₂O₂) com a concomitante oxidação de C_P-S⁻ a C_P-SOH (cisteína ácido sulfênico) (Ferrer-Sueta *et al.*, 2011; Hall *et al.*, 2010). Nas 1-Cys Prx este intermediário é estável, e no caso das 2-Cys Prx a C_P-SOH se condensa com C_R-SH, levando à formação de um dissulfeto (C_P-S-S-C_R) e liberação simultânea de uma molécula de H₂O. A partir deste momento nos concentraremos nas Prx 2-Cys típicas, que representam a classe de Prx mais estudada e, normalmente, as mais abundantes na célula.

Normalmente as Prx 2-Cys típicas são consideradas como homodímeros, entretanto, diversos trabalhos demonstram que estas enzimas podem se apresentar também como decâmeros $\alpha_2(5)$, através da associação de cinco dímeros por meio da interação das interfaces dos dímeros (interface D) (Fig. 2A e 2B) (Parsonage *et al.*, 2005; Tairum *et al.*, 2012; Tairum *et al.*, 2016). De fato já foi demonstrado que as Prx 2-Cys típicas se encontram como decâmeros quando suas cisteínas estão reduzidas e aptas para decompor peróxidos, ao passo que a formação do dissulfeto resulta na dissociação dos decâmeros em dímeros (Nelson *et al.*, 2018; Parsonage *et al.*, 2005; Tairum *et al.*, 2016). Uma das possibilidades aventadas para esta associação seria de uma interação cooperativa entre os dímeros de forma a aumentar a eficiência catalítica na decomposição de hidroperóxidos (Parsonage *et al.*, 2005), entretanto existem evidências que estas transições podem estar envolvidas com a participação em vias de sinalização (Nelson *et al.*, 2018; Tairum *et al.*, 2016).

As Prx 2-Cys típicas podem ser inativadas *in vitro* e *in vivo* na presença de altas concentrações de substrato em decorrência da hiperoxidação da cisteína peroxidásica. Após o ataque ao substrato, o ácido sulfênico formado nesse resíduo (C_P-SOH) é rapidamente atacado por outra molécula de hidroperóxido, e não pela cisteína de resolução, levando à formação de cisteína ácido sulfinico (C_P-SO₂H), uma espécie que não pode ser reduzida por Trx (Rabilloud *et al.*, 2002), mas que podem ter sua atividade peroxidásica restabelecida através da ação de uma enzima denominada de sulfirredoxina (Srx) em um processo dependente de ATP e Mg²⁺ (Biteau *et al.*, 2003).

O significado fisiológico da hiperoxidação de C_P e a inativação da atividade peroxidásica não está claro, mas quando hiperoxidadas as Prx podem sofrer intensa oligomerização, formando espécies de alto peso molecular (estruturas HMW de *high molecular weight*) com massa superior a 1000 kDa (Jang *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2005). Os complexos HMW formados por Tsa1 de *Saccharomyces cerevisiae* e Prx2 de humanos se apresentam na forma de esferas em análises de microscopia eletrônica de transmissão (Fig. 2C).

Além disso, esta transição estrutural, apesar de abolir a atividade peroxidásica, confere às 2-Cys Prx a atividade de chaperona molecular (Jang *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2005). Posteriormente, outro tipo de complexo HMW com propriedade de chaperona, formado através do empilhamento de decâmeros, gerando estruturas tubulares, foi descrito para 2-Cys Prx típicas de *Schistosoma mansoni* e mitocondriais de humanos (Prx3) (Angelucci *et al.*, 2013; Angelucci *et al.*, 2016; Phillips *et al.*, 2014; Radjainia *et al.*, 2012) (Fig. 2D). Mais recentemente, foi mostrado que a hiperoxidação de Tsa1 de levedura provoca o recrutamento de chaperonas

para compartimentos onde existe a agregação proteica (Hanzén *et al.*, 2016) mas não foi investigado o grau de agregação dessa 2-Cys Prx.

De forma contrastante, as Prx 2-Cys típicas de bactérias (denominadas de AhpCs), com raras exceções (Bang *et al.*, 2012; Kuang *et al.*, 2006), são muito mais resistentes a hiperoxidação de C_P que as enzimas homólogas de eucariotos (Wood *et al.*, 2003b) e podem não formar complexos HMW. Esta característica está estruturalmente relacionada à presença de uma α -hélice C-terminal em eucariotos, a qual geralmente é inexistente em bactérias, e que aparentemente interfere na formação do dissulfeto entre C_P e C_R favorecendo a hiperoxidação de C_P em eucariotos (Perkins *et al.*, 2015; Wood *et al.*, 2003b). A análise de estruturas cristalográficas de Prx 2-Cys típicas de eucariotos e procariotos revela que a cauda C-terminal se projeta para o interior do sítio ativo onde está localizada a tríade catalítica (Fig. 2E e 2F), o que pode determinar diferenças na ligação de substratos.

Aspectos da redução das Prx 2-Cys

Quando ocorre a oxidação de C_P e subsequente formação do dissulfeto, as Prx 2-Cys típicas necessitam ser reduzidas para se tornarem aptas a decompor uma nova molécula de hidroperóxido. Esta função é comumente realizada por agentes contendo grupos tióis (SH), sendo que a tiorredoxina (Trx) representa o redutor fisiológico da maioria das Prx (Chae *et al.*, 1994; Netto *et al.*, 2016). As Trx são proteínas de baixo peso molecular (~ 12 kDa) que possuem em seus sítios ativos um motivo C-X-X-C contendo duas cisteínas vicinais utilizadas para reduzir seus alvos biológicos (Vignols *et al.*, 2005). Ao reduzir as Prx, as cisteínas das Trx se oxidam em um dissulfeto e são reduzidas pela tiorredoxina redutase (TrxR) (Miranda-Vizuite *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2010; Vignols *et al.*, 2005). As TrxR catalisam a redução do dissulfeto da Trx oxidada utilizando uma molécula de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) *via* dois centros redox: uma flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e um segundo centro contendo duas cisteínas vicinais. Neste contexto, o FAD transfere equivalentes redutores da molécula de NADPH para as cisteínas reativas, e destas para as cisteínas oxidadas de Trx. NADPH, TrxR e Trx compõem o denominado sistema Tiorredoxina (Lennon *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2010; Parsonage *et al.*, 2016).

Apesar da redução das Prx por Trx representar uma interação bastante específica, as Trx estão envolvidas em diversos outros processos biológicos como crescimento celular, inibição de apoptose, ativação de transcrição, síntese de DNA, ativação de fatores de transcrição e manutenção da viabilidade celular através da redução de enzimas de reparo (Day *et al.*, 2012; Karplus & Poole 2012; Lu & Holmgren, 2014; Vignols *et al.*, 2005). Portanto, um maior entendimento da redução das Prx por Trx é de grande importância no que concerne os processos redox envolvendo Prx e seu sistema redutor. Análises de estruturas cristalográficas revelam que apesar das Trx terem grande conservação em sua estrutura em diversos organismos a TrxR difere significativamente entre os organismos unicelulares e multicelulares. Apesar de ambas serem homodímeros, a enzima TrxR encontradas em leveduras e fungos são significativamente menores (~70kDa) quando comparadas com as de eucariotos multicelulares (~100kDa) e possuem um enovelamento tridimensional bastante distinto.

Ainda, os motivos que contêm as cisteínas catalíticas diferem de forma significativa tanto em sua composição quanto na localização nos domínios na proteína. Nas TrxR de leveduras e fungos ocorre o motivo C-X-X-C o qual está inserido no domínio de ligação ao NADPH ao passo que nas enzimas de eucariotos multicelulares é encontrado o motivo C-V-N-V-G-C, inserido no domínio de ligação ao FAD (Oliveira *et al.*, 2010). As enzimas de eucariotos multicelulares também podem possuir um terceiro resíduo de Cys ou selenocisteína (Sec), envolvido no ciclo de oxirredução, localizado na porção C-terminal da enzima (Oliveira *et al.*, 2010). Por outro lado, a enzima Trx é bastante conservada estruturalmente entre leveduras/fungos e eucariotos multicelulares (Collet e Mensens, 2010). Cabe ressaltar que o sistema redutor de Prx encontrado em *S. cerevisiae* é considerado um modelo para o estudo do sistema Prx de leveduras e fungos podendo ser utilizado para o estudo de drogas inibitórias.

O sistema redutor das AhpCs (2-Cys Prx típicas bacterianas) é representado pela enzima AhpF que também é uma proteína homodimérica, mas com massa superior às da TrxR (~220kDa). Em adição aos

domínios de ligação para FAD e NADH existe um terceiro domínio denominado de NTD (N-terminal domain) formado por duas moléculas contíguas de Trx. Portanto o ciclo de oxirredução das Prx 2-Cys típicas de eucariotos, cujas proteínas envolvidas são a Trx e TrxR (Fig. 3A), difere significativamente do de bactérias onde as duas proteínas são substituídas por AhpF (Fig. 3B). Este aspecto é importante pois a ligação de um inibidor em um dos centros redox de AhpF contendo Cys impossibilitaria a redução de AhpC (Fig. 3B).

Peroxirredoxinas e doenças infecciosas

Acredita-se que as Prx possam ter um papel de importância nos patógenos para subjugar as defesas do hospedeiro. Em bactérias as AhpCs (Prx 2-Cys típicas), assim como as enzimas de eucariotos são capazes de decompor com taxas extremamente elevadas peróxido de hidrogênio, peróxidos de lipídeos e peroxinitrito (Bryk *et al.*, 2000). A abundância destas proteínas nestes organismos também é bastante significativa. Em *E. coli*, as Prx estão entre as dez proteínas mais expressas (Link *et al.*, 1997), como também estão entre as mais expressas em *Bacillus anthracis* (Chitlaru *et al.*, 2007), *Bacillus subtilis* (Muntel *et al.*, 2014), *Helicobacter pylori* (Huang *et al.*, 2014), *Klebsiella pneumoniae* (Khan *et al.*, 2017), *Legionella pneumophila* (Aurass *et al.*, 2016), *Pseudomonas aeruginosa* (Hanna *et al.*, 2000), *Salmonella typhimurium* (Rollenhagen & Bumann, 2006), *Staphylococcus aureus* (Enany *et al.*, 2014), *Xyella fastidiosa* (Smolka *et al.*, 2002), dentre outras.

Linhagens Δ ahpC de *Helicobacter pylori* e *Helicobacter hepaticus*, os agentes causadores de úlceras/gastrites estomacais e de hepatite crônica em mamíferos, respectivamente, apresentam níveis elevados de peróxidos de lipídeos (Mehta *et al.*, 2007). Resultados similares foram descritos para *Campylobacter jejuni*, o agente etiológico de gastroenterites (Oh & Jeon, 2014). Em *S. typhimurium*, patógeno responsável por moléstias gastrointestinais, febre tifóide e septicemia, foi demonstrado que linhagens deficientes de AhpC apresentam alteração da morfologia celular e proliferação reduzida no interior da célula. O estudo também revelou que quando AhpC é superexpressa em *S. typhimurium* nocauteadas para genes envolvidos na decomposição de peróxidos (Δ katE, Δ katG, Δ katN, Δ ahpC e Δ tsaA), o patógeno recupera as características da linhagem selvagem (Hébrard *et al.*, 2009). Estes dados indicam que a 2-Cys Prx típica de *S. typhimurium* contribui para a virulência do patógeno ao capacitá-lo a sobreviver em ambientes redox hostis.

No caso de *Staphylococcus aureus* o agente etiológico de diversas infecções hospitalares do trato respiratório, AhpC juntamente com a catalase possuem papéis compensatórios para a sobrevivência e colonização do trato respiratório (Cosgrove *et al.*, 2007). Estudos envolvendo metatranscriptoma de *S. aureus* e *S. epidermidis* revelaram que *ahpC* é altamente expresso no trato respiratório, sendo que sua expressão é ao menos três vezes maior no ambiente *in vivo* quando comparado com os microrganismos crescidos em meio de cultura (*in vitro*) (1320-540, reads per million -rpm) (Chaves-Moreno *et al.*, 2016).

Em fungos, as Prx 2-Cys típicas também aparentam ter grande importância na sobrevivência em seus hospedeiros. Em *Candida albicans*, o agente etiológico da candidíase, a expressão da Prx (CaTsa1) é bastante acentuada (Choi *et al.*, 2003). Adicionalmente antifúngicos como a mulundocandina e seu derivado HMR3270 também aumentaram a expressão de CaTsa1 (Bruneau *et al.*, 2003). Estes dados estão de acordo com o observado para *Candida glabrata*, um fungo oportunista que ocasiona a candidinemia, onde o tratamento com fluconazol elevou os níveis de expressão de cgTsa1 (Rogers *et al.*, 2006). Em *Magnaporthe oryzae*, um fungo que causa prejuízos em cultivares de arroz, foi demonstrado que a peroxirredoxina MgPrx1 é fundamental para o estabelecimento do fungo no hospedeiro (Mir *et al.*, 2015). Em *Penicillium marneffei* um fungo dimórfico e agente etiológico de severas doenças reticuloendoteliais, incluindo linfadenopatia generalizada, hepatomegalia e esplenomegalia, foi detectada a alta expressão de uma isoforma de Prx tanto nas formas filamentosas quanto a de levedura (Chandler *et al.*, 2008). *S. cerevisiae* é uma levedura que merece destaque como patógeno emergente e novamente, a importância de enzimas antioxidantes em resposta às defesas do hospedeiro também foi evidenciada em trabalho envolvendo transcriptoma de linhagens virulentas de *S. cerevisiae* quando incubadas com sangue humano. Os resultados revelam grande aumento da expressão de diversos genes de enzimas antioxidantes incluindo Tsa1 e as enzimas de seu sistema redutor (Llopis *et al.* 2012).

De forma coletiva os trabalhos apresentados acima indicam que as 2-Cys Prx típicas possuem um papel importante para o estabelecimento e sobrevivência de organismos patogênicos em seus hospedeiros, portanto trabalhos que tenham como objetivo a inibição destas proteínas em patógenos podem gerar novos quimioterápicos para o combate das doenças. No entanto, uma vez que os hospedeiros também possuem esta classe de proteínas, uma estratégia racional seria a busca de inibidores específicos para este grupo de enzimas baseado em diferenças das estruturas proteicas entre patógeno e hospedeiro.

Peroxirredoxinas e doenças genéticas

Um crescente grupo de evidências apontam que células neoplásicas exibem uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs) quando comparado com células normais, o que é em parte causado pela perda no controle redox adequado incluindo disfunções mitocondriais (Chaiswing *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2018; Kamiguti *et al.*, 2005; Szatrowski *et al.*, 1991) e, para sobreviver a este estado redox, os níveis de proteínas antioxidantes são aumentados (Glasauer e Chandel, 2014; Yang *et al.*, 2013). Adicionalmente o efeito anti-cancerígeno de alguns agentes quimioterápicos correntemente utilizados no tratamento do câncer (Paclitaxel, Docetaxel e Trióxido de arsênio, por exemplo) é mediada, pelo menos em parte, por um aumento dos níveis celulares de hidroperóxidos (Alexandre *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2013). Neste contexto acredita-se que as peroxidases celulares, em especial as Prx, estão envolvidas na manutenção dos níveis intracelulares de hidroperóxidos de células tumorais no limite adequado para crescimento, mas insuficientes para causar apoptose (Stöcker *et al.*, 2018).

No que concerne as Prx, já foi demonstrado que as Prx1 e Prx2, duas formas citosólicas de Prx 2-Cys típicas de mamíferos, são capazes de eliminar o H₂O₂ intracelular gerado como resultado de estimulação dos receptores e vários trabalhos têm demonstrado que essas isoformas apresentam níveis elevados em tipos distintos de cânceres em diferentes órgãos e tecidos como esôfago, do pâncreas, tireóide, pulmão e mama (Kang *et al.*, 2005; Glasauer e Chandel, 2014; Yang *et al.*, 2013). A elevada expressão de também confere Prx1 / 2 um fenótipo mais agressivo de células cancerosas, em razão de conferir maior resistência à quimioterapia e à radioterapia (Kang *et al.*, 2005; Stöcker *et al.*, 2018). De fato diversos trabalhos utilizando RNA de interferência e knockout gênico tem demonstrado que a inativação destas enzimas interfere fortemente no estabelecimento, progressão e resistência a tratamentos por radio e quimioterapia de neoplasias (Hampton *et al.*, 2018; Immenschuh & Baumgart-Vogt, 2005; Kang *et al.*, 2013; López-Lázaro, 2007; Nicolussi *et al.*, 2017). Neste contexto, estas enzimas também são alvo para o desenvolvimento de terapias para o tratamento de neoplasias.

Inibidores de peroxirredoxinas 2-Cys típicas

As 2-Cys Prx possuem expressão acentuada em doenças genéticas e infecciosas, e trabalhos recentes buscaram por inibidores deste grupo de proteínas tanto em células de mamíferos quanto em tripanossomatídeos e até o presente momento foram descritas nove moléculas capazes de inibir as 2-Cys Prx típicas (Brindisi *et al.*, 2015; Carey *et al.*, 2015; Heraldson *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2016).

Entretanto, a utilização destas moléculas em ensaios de citotoxicidade para células humanas ou não foram efetuados (6-OMe derivativa 7, triptolide, o celastrol e withaferina A) ou a citotoxicidade é muito acentuada (conoidina A), o que inviabiliza sua utilização como quimioterápico. As únicas moléculas que apresentaram baixa toxicidade para células humanas foram a AMRI-59, JD-202 e a Adenantina (Adn), porém, somente a última está disponível comercialmente. A Adn foi descoberta como um inibidor para Prx1/Prx2, através de análises envolvendo *pull down* e cromatografia de afinidade de extrato total de células humanas NB40 (Liu *et al.*, 2012). Esta molécula é um diterpenóide extraído das folhas de *Isodon adenantha* e tem despertado interesse em função de suas propriedades antitumorais, uma vez que possui a capacidade de induzir a apoptose ou diferenciação de células tumorais linfocíticas (Liu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013). Posteriormente foi demonstrado que Adn era capaz de matar células de hepatocarcinomas xenoenertados em camundongos sem efeitos colaterais relevantes para o organismo (Hou *et al.*, 2014).

Adn se ligaria especificamente com C_R, atuando como um aceptor de Michael em uma reação de adição entre um sistema carbonílico α,β -insaturado da Adn e o Sy da C_R de Prx1 e Prx2, impedindo a formação do dissulfeto intermolecular. A Adn interagiria com outros aminoácidos na região do sítio ativo, incluindo os resíduos da tríade catalítica Thr⁴⁹ e Arg¹²⁸, sendo também estabilizada por interações de caráter hidrofóbico com outros aminoácidos do sítio ativo (Liu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013). Posteriormente, foi confirmada a formação de adutos de Michael envolvendo as C_R das Prx1 e Prx2, entretanto utilizando espectrometria de massas e proteínas mutantes foi demonstrado que Adn também é capaz de ligar as C_P (Soethoudt *et al.*, 2014). Adn também se liga às cisteínas envolvidas na catálise das enzimas Trx e TrxR, contudo possuem baixa reatividade com GSH ou cisteínas livres (Muchowicz *et al.*, 2013; Soethoudt *et al.*, 2014). Portanto, este trabalho revela a importância de avaliar potenciais inibidores não somente utilizando as 2-Cys Prx, mas também os sistemas redutores.

Substituição de Thr por Ser na tríade catalítica de Prx 2-Cys confere maior suscetibilidade a Adn

A primeira 2-Cys Prx típica caracterizada foi a Tsa1 de *S. cerevisiae* (Chae *et al.*, 1994a; Netto *et al.*, 1996). Posteriormente foi identificada uma segunda isoforma citosólica, denominada Tsa2, que compartilha grande similaridade na estrutura primária com Tsa1 (86% de identidade e 96% de similaridade) e embora apresentem as mesmas atividades bioquímicas, elas possuem funções celulares não redundantes (Diab & Kane, 2013; Munhoz *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2000). Curiosamente, estas enzimas têm como diferença fundamental a substituição natural da Thr da tríade catalítica por Ser. Apesar desta substituição ser compartilhada por outras 2-Cys Prx, pouco se sabia sobre seu papel na reatividade e estrutura das enzimas. Nosso grupo de pesquisa foi responsável pela determinação da estrutura de Tsa1, que representou a primeira 2-Cys Prx de eucariotos contendo um ligante (Tairum *et al.*, 2012). Posteriormente a estrutura cristalográfica de Tsa2 foi descrita (Nielsen *et al.*, 2016), possibilitando comparações estruturais entre 2-cys Prx com Thr ou Ser no sítio ativo.

Recentemente, demonstramos que a substituição de Thr por Ser em Tsa1 (Tsa1^{T44S}) não afeta a atividade da enzima mutante, no entanto, torna a enzima constitutivamente decamérica, independente do estado redox. A avaliação da atividade e da estrutura quaternária de Tsa2, que possui naturalmente Ser na tríade catalítica, revelou que a enzima é capaz de decompor peróxido de hidrogênio e hidroperóxido orgânico em taxas de 10⁷M⁻¹s⁻¹, no entanto assim como Tsa1^{T44S} não se dissocia em dímeros no estado oxidado (Tairum *et al.*, 2016), indicando que esta substituição confere características estruturais distintas. Posteriormente, demonstramos que a substituição de Thr por Ser da tríade catalítica também está envolvida em uma maior resistência a hiperoxidação (Breyer *et al.*, manuscrito em finalização para ser submetido ao *Scientific Reports*). Uma vez que os resultados indicam que a presença de Thr ou Ser aparenta possuir importância na afinidade pelos substratos, avaliamos se o inibidor adenantina (Adn) era capaz de inibir diferencialmente proteínas de levedura contendo Thr ou Ser. Resultados preliminares revelaram que a inibição por Adn é mais acentuada para enzimas possuindo Ser (Tsa2 e Tsa1^{T44S}) (~75-85%; $\nu_{0\text{Tsa2}} = 1.21 \mu\text{Ms}^{-1}$; $\nu_{0\text{Tsa2_Adn}} = 0.31 \mu\text{Ms}^{-1}$; $\nu_{0\text{Tsa1T44S}} = 1.08 \mu\text{Ms}^{-1}$; $\nu_{0\text{Tsa1T44S_Adn}} = 0.16 \mu\text{Ms}^{-1}$) quando comparada com Tsa1 que possui Thr na tríade catalítica (~65%; $\nu_{0\text{Tsa1}} = 1.74 \mu\text{Ms}^{-1}$; $\nu_{0\text{Tsa1_Adn}} = 0.58 \mu\text{Ms}^{-1}$). Adicionalmente, a análise de 15.034 sequências de Prx 2-Cys típicas revelou que somente 6.3% das Prx 2-Cys típicas possuem a substituição Thr → Ser, sendo majoritariamente encontrada em bactérias (> 90%) (dados não apresentados).

Busca por novos compostos inibitórios para Prx 2-Cys típicas e seus sistemas redutores

Como mencionado anteriormente, trabalhos que lidam com inibidores de Prx 2-Cys típicas são escassos. Desta forma, essa área representa uma oportunidade para investigações que explorem a ação de substâncias naturais ou sintéticas. No Brasil existe uma biodiversidade notável que se reflete no grande número de compostos bioativos oriundos das mais diversas fontes como microorganismos, animais e vegetais (Chatterjee, 2018 ; da Silva Bolzani *et al.*, 2012; Suffredini *et al.*, 2006). Dentre estes compostos a

vasta maioria é obtida de plantas que possuem uma das maiores diversidades químicas do mundo de compostos do metabolismo secundário (Dutra *et al.*, 2014; do Nascimento *et al.*, 2012; Bolzani *et al.*, 2012).

Assim como a adenantina, que pertence ao grupo dos terpenóides, outro grupo de compostos, as lactonas sesquiterpênicas, tem despertado grande interesse na comunidade científica em razão de vasto efeito biológico observado em doenças infecciosas e genéticas (Matejić *et al.*, 2016). As lactonas sesquiterpênicas são metabólitos secundários que formados a partir de três unidades de isopreno (Matejić *et al.*, 2016). Anteriormente, foi demonstrado que as lactonas sesquiterpênicas como helenalina, vernodalina e vernangulideo B possuem forte efeito anti-protozoário (Efferth *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2009). Adicionalmente diversos compostos relacionados estruturalmente exibem acentuado efeito anti-tumoral o que os coloca como compostos promissores para o tratamento de neoplasias (Wu *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2010). De fato, artemisinina, tansigargina e partenolideo são exemplos de compostos desta classe que estão em fase clínica para o tratamento de câncer (Drogosz *et al.*, 2019; Ghantous *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2016). Também já foi demonstrado que lactonas sesquiterpênicas podem ser eficientemente transportadas para o interior de células intestinais, uma característica bastante importante para um fármaco (Xu *et al.*, 2019).

Apesar dos estudos existentes não se sabe ao certo quais os substratos celulares cujo estes compostos são capazes de exercer sua atividade biológica. Neste contexto é importante salientar que assim como os *ent-*cauranos (classe da adenantina), as lactonas sesquiterpênicas possuem uma região hidrofóbica, entretanto o esqueleto é significativamente menos volumoso o que pode facilitar o transporte e interação com os substratos. Ainda, a presença de um sistema carbonílico α,β -insaturado é capaz de atuar como um doador de Michael para a reação com cisteínas (Beekman *et al.*, 1997; Puente *et al.*, 2019), a exemplo da Adn para as Prx (Liu *et al.*, 2012; Muchowicz *et al.*, 2013; Soethoudt *et al.*, 2014). Neste contexto, é muito provável que dentro do grupo de lactonas sesquiterpênicas oriundas da biodiversidade vegetal brasileira existam moléculas que possuam atividade inibitória sobre as 2-Cys Prx típicas de bactérias e ou eucariotos, mas que ainda não foram caracterizadas. Cabe ressaltar que todos os inibidores de 2-Cys Prx típicas identificados possuem uma porção hidrofóbica o que indica uma característica aparentemente fundamental para a interação com o sítio ativo e que pode ser explorada de forma racional bem como de grupos reativos a tióis.

SUMMARY:

A. TÍTULO DA CRIAÇÃO	1
B. DESCRIÇÃO DO CAMPO DA INVENÇÃO	2
C. DESCRIÇÃO DO ESTADO DA TÉCNICA	3
<i>Infecção por patógenos, defesas celulares e antibióticos</i>	3
<i>A letalidade de antibacterianos/ antifúngicos é acompanhada pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)</i>	5
<i>Defesas oxidativas do organismo hospedeiro na infecção por patógenos</i>	5
<i>Peroxirredoxinas: Diversidade e aspectos funcionais/ estruturais</i>	6
<i>Aspectos da redução das Prx 2-Cys</i>	8
<i>Peroxirredoxinas e doenças infecciosas</i>	9
<i>Peroxirredoxinas e doenças genéticas</i>	10
<i>Inibidores de peroxirredoxinas 2-Cys típicas</i>	10
<i>Substituição de Thr por Ser na tríade catalítica de 2-Cys Prx confere maior suscetibilidade a Adn</i>	11
<i>Busca por novos compostos inibitórios de Prx 2-Cys típicas e seus sistemas redutores</i>	11
<i>Sumario</i>	13
E. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS	15
<i>Figura 1: Reações de Fenton e Harber Weiss</i>	15
<i>Figura 2: Estruturas quaternárias de Prx 2-Cys típicas e diferenças no microambiente do sítio ativo de 2-Cys Prx de eucariotos e procariotos</i>	15
<i>Figura 3: Transferências redox envolvidas na redução de hidroperóxidos por Prx 2-Cys típicas de leveduras/ humanos e bactérias</i>	15
<i>Figura 4. Exemplar de Calea pinnatifida e estrutura química de Caleína C</i>	15
<i>Figura 5. Avaliação de inibição da atividade peroxidásica de EcAhpC^{WT}</i>	15
<i>Figura 6: Inibição da formação de dissulfeto intermolecular e da atividade peroxidásica de EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S} por CalC</i>	15
<i>Figura 7: Viabilidade celular de B. subtilis, S. aureus, S. epidermidis, E. coli, P. aeruginosa e S. typhimurium após tratamento com CalC</i>	16
<i>Figura 8: Ensaio de oxidação do DTT para avaliação inibitória comparativa da inibição de CalC sobre Tsa1 de S. cerevisiae e Prx2 de H. sapiens e determinação de MIC₅₀ para o composto CalC</i>	16
F. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO	17
<i>Caleína C de Calea pinnatifida como inibidor de peroxirredoxinas e de seu sistema redutor</i>	17
<i>Determinação do IC₅₀ aparente de CalC para as Prx bacterianas EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S}</i>	17
<i>A determinação da concentração inibitória mínima 50 (MIC₅₀) revela que CalC é tóxica para linhagens patogênicas de B. subtilis, S. aureus e S. epidermidis</i>	18
<i>Avaliação comparativa da inibição por CalC para as Prx 2-Cys típicas de S. cerevisiae e H. sapiens</i>	18
G. ENTIDADE TECNOLÓGICA	19
REFERÊNCIAS	20
ANEXO 1. FIGURAS	23

SUMMARY:

A. CREATION TITLE	1
B. DESCRIPTION OF THE INVENTION FIELD	2
C. DESCRIPTION OF THE TECHNIQUE STATUS	3
<i>Pathogen infection, cellular defenses and antibiotics</i>	3
<i>Antibacterial/ antifungal lethality is accompanied by the generation of reactive oxygen species (ROS)</i>	5
<i>Host oxidative defenses against pathogens</i>	5
<i>Peroxiredoxins: Diversity and functional/ structural Aspects</i>	6
<i>Aspects of 2-Cys Prx Reduction</i>	8
<i>Peroxiredoxins and infectious diseases</i>	9
<i>Peroxiredoxins and genetic diseases</i>	10
<i>2-Cys Peroxiredoxins Inhibitors</i>	10
<i>The catalytic triad Thr to Ser substitution in 2-Cys Prx enhances Adn susceptibility</i>	11
<i>Search for novel inhibitory compounds of the typical 2-Cys Prx</i>	11
<i>Summary</i>	13
E. BRIEF FIGURES DESCRIPTION	18
<i>Figure 1: Fenton and Harber Weiss reactions</i>	15
<i>Figure 2: Typical 2-Cys Prx quaternary structures and differences in the active site microenvironment among eukaryotes and prokaryotes</i>	15
<i>Figure 3: Differences in the redox transfers of the reductant system of the typical 2-Cys Prx of bacteria, fungi and humans</i>	15
<i>Figure 4. Calea pinnatifida and chemical structure of Calein C</i>	15
<i>Figure 5. Inhibition evaluation EcAhpC^{WT}</i>	15
<i>Figure 6: Inhibition of intermolecular disulfide formation and peroxidase activity of EcAhpC^{WT} and EcAhpC^{T44S} by CalC</i>	15
<i>Figure 7: Cell viability of B. subtilis, S. aureus, S. epidermidis, E. coli, P. aeruginosa and S. typhimurium after CalC treatment</i>	16
<i>Figure 8: DTT oxidation assay for comparative inhibitory evaluation of CalC inhibition over Tsa1 from S. sapevens and Prx2 from H. sapiens and CalC MIC₅₀ determination for S. cerevisiae Prx</i>	16
F. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION	17
<i>Calein C from Calea pinnatifida as an inhibitor of bacterial peroxiredoxin and its reductant system</i>	17
<i>Determination of the CalC apparent IC₅₀ for the bacterial Prx EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S}</i>	17
<i>The minimum inhibitory concentration 50 (MIC₅₀) determination reveals that CalC is toxic to B. subtilis, S. aureus and S. epidermidis pathogenic strains</i>	18
<i>Comparative evaluation of CalC inhibition for typical 2-Cys Prx from S. cerevisiae and H. sapiens</i>	18
G. TECHNOLOGICAL ENTITY	19
REFERENCES	20
ANNEX 1. FIGURES	23
E. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS:	

E. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS:

Figura 1: Reações de Fenton e Harber Weiss. (A) Reações de Fenton, em que a interação entre uma molécula de Fe^{3+} com uma de ânion superóxido resulta na liberação de Fe^{2+} que, ao interagir com peróxido de hidrogênio, produz o radical hidroxila. (B) Representação a reação de Haber Weiss, originando radical hidroxila a partir da interação entre peróxido de hidrogênio e ânion superóxido.

Figura 2: Estruturas quaternárias de Prx 2-Cys típicas e diferenças no microambiente do sítio ativo de 2-Cys Prx de eucariotos e procariotos. A) Dímero de Tsa1 de levedura representado em *cartoon*. Um monômero é colorizado em verde e o monômero adjacente em amarelo. B) Decâmero do tipo $\alpha 2(5)$, formado pela associação de cinco dímeros. A unidade dimérica superior está representada em verde e amarelo, o restante dos dímeros estão representados em vermelho e as interfaces D são denotadas pelas linhas tracejadas. C) Associação de moléculas de 2-Cys Prx típicas para a formação da espécie HMW esférica. D) Associação de decâmeros do tipo $\alpha 2(5)$ formando a estrutura HMW tubular. Superfície molecular de Prx de eucarioto (E) e de bactéria (F). As estruturas estão coloridas em cinza em laranja (C_P), azul (Arg) e vermelho (Thr/Ser) e a cauda C-terminal em verde escuro. Nas figuras estão representadas as enzimas Tsa1 de *S. cerevisiae* (PDB: 3SBC) (A, B, C, D e E) e AhpC de *S. typhimurium* (F) (PDB: 4M9A).

Figura 3: Transferências redox envolvidas na redução de hidroperóxidos por Prx 2-Cys típicas de leveduras/humanos e bactérias. A) As Prx 2-Cys típicas de células eucarióticas em geral são reduzidas pelo sistema Trx que compreende as enzimas tiorredoxina, tiorredoxina redutase e NADPH. B) Em células procarióticas, as Prx 2-Cys típicas (AhpC) são reduzidas pela flavoenzima AhpF, que possui dois centros redox contendo cisteínas, um localizado no domínio N-terminal (NTD) e outro no domínio NADH.

Figura 4: Exemplar de *Calea pinnatifida* e estrutura química de Caleína C. A) Exemplar de *Calea pinnatifida* oriunda da biota florística de matas do estado de São Paulo. B) Estrutura química da caleína C indicando os grupos que podem reagir com as cisteínas de Prx. Os quadrados em azul destacam os grupos com menor reatividade e o vermelho com maior reatividade.

Figura 5: Avaliação de inibição da atividade peroxidásica e da formação do dissulfeto de EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S}. As enzimas EcAhpC^{WT} (A) e EcAhpC^{T44S} (B) reduzidas e dessalinizadas foram tratadas com 20 equivalentes molares de iodoacetamida (◆) ou CalC (●). A seguir, as proteínas tratadas foram novamente dessalinizadas para a remoção do excesso de composto e sua atividade peroxidásica foi analisada através de ensaio de oxidação de NADPH. Para isso, 3 μM das proteínas tratadas foram adicionadas a reações contendo EcTrx (6 μM), EcTrxR (0.9 μM), NADPH (150 μM), HEPES (50 mM, pH=7.0), DTPA (100 μM) e azida sódica (1 mM). As reações foram incubadas a 37°C por 3 minutos antes de serem iniciadas pela adição de H_2O_2 (500 μM) e monitoradas espectrofotometricamente a 340nm, 37°C, por 5 min. Como controle positivo foram utilizadas reações em que EcAhpC não foi previamente tratada com nenhum composto (■) e, como controle negativo, foram utilizadas reações sem a adição de EcAhpC (▲). Para a avaliação da inibição da formação do dissulfeto intermolecular, as enzimas EcAhpC^{WT} (C) ou EcAhpC^{T44S} (D) foram reduzidas com 5mM de DTT por 1 hora (lane 2) e, em seguida, dessalinizadas para a remoção do excesso de redutor (lane 3). Aliquotas contendo 10 μM da enzima reduzida/dessalinizada foram tratadas com 20 equivalentes molares dos seguintes composto: iodoacetamida, Adn, CalC e jacaranona (lanes 5, 6, 7 e 8, respectivamente) por 1 hora e posteriormente oxidadas com 5 equivalentes molares de H_2O_2 por 30 minutos. As reações foram então paralisadas com a adição de stop buffer (50 mM de Tris pH=6.8, 50 mM de NEM, 2% de SDS, 10% de glicerol e 0.1% de azul de bromofenol) e analisadas em SDS-PAGE não redutor corado com *comassie blue*. A lane 1 representa o marcador de peso molecular. Na lane 4 foi aplicada a proteína reduzida/dessalinizada e posteriormente oxidada, sem tratamento com nenhum composto. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos ao menos três vezes.

Figura 6: Inibição da formação de dissulfeto intermolecular e atividade peroxidásica de EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S} por CalC. As proteínas EcAhpC^{WT} (A) e EcAhpC^{T44S} (B) foram reduzidas com 5mM de

DTT por 1 hora (*lane* 2) e, em seguida, dessalinizadas para a remoção do excesso de redutor (*lane* 3). Aliquotas contendo 10 μ M das enzimas reduzidas e dessalinizadas foram tratadas com concentrações variadas de CalC (0.5, 1, 2.5, 5 e 10 equivalentes molares - *lanes* 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente) por 1 hora e posteriormente oxidadas com 5 equivalentes molares de H₂O₂ por 30 minutos. As reações foram interrompidas pela adição de *stop buffer* (Tris 50mM pH6.8, NEM 50mM, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.1%) e analisadas em SDS-PAGE não redutor corado com *comassie blue*. A *lane* 3 representa a proteína reduzida/dessalinizada e posteriormente oxidada, sem tratamento com CalC. Os procedimentos foram realizados em temperatura ambiente. Inibição da atividade peroxidásica de EcAhpC^{WT} (**C**) e EcAhpC^{T44S} (**D**) por CalC: As proteínas reduzidas e dessalinizadas foram tratadas com concentrações variáveis de CalC (0.5 - ■, 1 - ▲ e 2.5 - ▼ equivalentes molares) por 1 hora em temperatura ambiente e posteriormente dessalinizadas novamente. A seguir, 3 μ M das proteínas tratadas foram adicionadas a reações contendo EcTrx 6 μ M, EcTrxR 0.9 μ M, NADPH 150 μ M, HEPES 50mM pH 7.0, DTPA 100 μ M e azida sódica 1mM. As reações foram incubadas a 37°C por 3 minutos antes de serem iniciadas pela adição de H₂O₂ 500 μ M e monitoradas espectrofotometricamente a 340nm, 37°C, por 5 minutos. Como controle positivo foram utilizadas reações em que as proteínas não foram previamente tratada com CalC (●) e, como controle negativo, foram utilizadas reações sem a adição de EcAhpC (◆). As velocidades iniciais de cada reação foram calculadas, transformadas em valores de porcentagem e plotadas para o cálculo dos valores de IC₅₀ de CalC para EcAhpC^{WT} (**E**) e EcAhpC^{T44S} (**F**). Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos ao menos três vezes.

Figura 7: Viabilidade celular de *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium* após tratamento com CalC. As células de *B. subtilis* (●), *S. aureus* (■), *S. epidermidis* (▲), *E. coli* (▼), *P. aeruginosa* (●) e *S. typhimurium* (◆), em concentração de 10⁵ UFC, foram inoculadas em meio Mueller Hinton contendo concentrações crescentes de CalC e incubadas por 24 horas, a 37°C, sendo então quantificadas espectrofotometricamente a 600nm. Os experimentos foram feitos em triplicata e repetidos ao menos três vezes.

Figura 8: Toxicidade de antibacterianos associados a CalC (adjuvante) sobre bactérias Gram + e Gram -. **A)** Avaliação da toxicidade da gentamicina associada a CalC sobre *S. aureus*. Células de *S. aureus* em concentração de 10⁵ UFC foram inoculadas em meio Mueller Hinton contendo gentamicina (50ng/ml), CalC (60 μ M) ou a associação dessas duas moléculas com as mesmas concentrações utilizadas individualmente. **B)** Avaliação da toxicidade de polimixina B (PMNB) associada a CalC sobre células de *E. coli* (ATCC25922) em concentração de 10⁵ UFC foram inoculadas em meio Mueller Hinton contendo apenas PMNB (0.3 μ g), CalC (60 μ M) ou a associação das duas moléculas. As células foram incubadas por 24 horas, a 37°C com os compostos sendo então quantificadas espectrofotometricamente a 600nm. Como controle negativo foi utilizado células sem adição dos compostos. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

Figura 9: Ensaio de oxidação do DTT para avaliação inibitória comparativa da inibição de CalC sobre Tsa1 de *S. cerevisiae* e Prx2 de *H. sapiens* e determinação de MIC₅₀ para o composto CalC sobre células de levedura. **A)** A atividade peroxidásica dependente de DTT foi monitorada através da oxidação do DTT, que absorve a 310 nm e os dados foram plotados após 10 minutos de reação. Nas reações as enzimas foram previamente reduzidas com 5 mM de DTT/1h/30°C e o DTT foi removido por gel filtração utilizando a coluna PD10 (GE heathcare). Em seguida as enzimas Tsa1 e Prx2 foram tratadas com 20 equivalentes molares de Iodoacetamida (IAA), Adenantina (Adn), e 10 equivalentes de CalC (quantidade inferior em razão da disponibilidade), por uma hora e dessalinizadas para a remoção do excesso de ligante. As reações consistiram de: DTT 10 mM, CHP 2 mM em tampão HEPES 50 mM e foram executadas a 30°C. Barra azul = Prx2; vermelha = Tsa1. **B)** Para a determinação do MIC₅₀ foi utilizado meio de cultura YPG (extrato de levedura, peptona e glicerol) contendo concentrações crescentes de CalC (0, 31.25, 62.5, 125, 250 e 500 μ M). Para cada concentração foi inoculado 10⁵ UFC e as culturas foram incubadas por

13hs/30°C/250rpm em agitador orbital, após este período a densidade e absorbância a 600 nm foi registrada. Os experimentos foram realizados em triplicata.

F. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Extração e purificação caleína C de *Calea pinnatifida*

Visando a obtenção da Caleína C, folhas frescas de *C. pinnatifida* (300 g) foram secadas em estufa (40°C por 60h), moídas e extraídas com MeOH até esgotamento a temperatura ambiente. O extrato MeOH bruto, após evaporação parcial do solvente, foi re-suspendido em água e submetido a partição líquido-líquido usando hexano para eliminação do material graxo. Sequencialmente, a fase hidroalcoólica foi extraída com CH₂Cl₂. Após evaporação completa do solvente na fase orgânica foram obtidos 650 mg de material que foram submetidos à cromatografia em gel de Sephadex LH-20 (MeOH como sistema eluente). Deste processo, foi obtida uma fração enriquecida com lactonas sesquiterpênicas (236 mg). Esse material foi purificado via cromatografia em gel de sílica (misturas de CH₂Cl₂:MeOH em gradiente de polaridade como eluentes) fornecendo 215 mg de uma fração com predomínio da Caleína C. A purificação de parte de parte desse material (100 mg) via CLAE semi-preparativo (coluna C₁₈ eluída com ACN:H₂O 4:6, λ = 218 nm) forneceu 40 mg de caleína C. A identificação estrutural da Caleína C foi baseada na análise dos espectros uni e bidimensionais de RMN e do espectro de massas seguido da comparação com os dados descritos na literatura (Caldas et al., 2018).

Caleína C de *Calea pinnatifida* como inibidor de peroxirredoxinas e de seu sistema redutor

Para avaliar a atividade inibitória de CalC foi empregado o ensaio de oxidação do NADPH utilizando o sistema Trx de *E. coli* e a proteína AhpC selvagem de *E. coli* (EcAhpC^{WT}), a qual contém Thr como parte da tríade catalítica, e também a enzima mutante (EcAhpC^{T44S}) a qual possui a Thr substituída por Ser, uma substituição muito frequente em bactérias patogênicas. Como controles positivos de inibição, as proteínas foram tratadas com iodoacetamida, um reconhecido alquilante de cisteínas e que, portanto, tem a capacidade de abolir a atividade de Prx 2-Cys, ou com Adn, um *ent*-caurânio descrito por Liu e colaboradores (2012) que é capaz de inibir a atividade de enzimas de humanos. O excesso de compostos sempre foi removido ao final do processo para evitar sua interação com as demais proteínas do sistema.

Os resultados revelaram que EcAhpC^{WT} foi inibida de forma significativa pelo CalC (Fig. 5A) ($v_{0\text{EcAhpC}^{\text{WT}}} = 7.94 \pm 0.87 \mu\text{Ms}^{-1}$ e $v_{0\text{EcAhpC}^{\text{WT}} + \text{CalC}} = 1.07 \pm 0.44 \mu\text{Ms}^{-1}$). Para a enzima mutada (EcAhpC^{T44S}) demonstram que ela também foi inibida por caleína C (Figura 12C) ($v_{0\text{EcAhpC}^{\text{T44S}}} = 8.20 \pm 0.16 \mu\text{Ms}^{-1}$ e $v_{0\text{CalCEcAhpC}^{\text{T44S}}} = 1.56 \pm 0.89 \mu\text{Ms}^{-1}$) (Fig. 5B). Para avaliar se CalC poderia se ligar com as cisteínas reativas de EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S}, essas proteínas foram tratadas com CalC, oxidadas com H₂O₂ e analisadas em SDS PAGE não redutor. Como controle positivo de inibição, foram utilizadas proteínas tratadas com iodoacetamida (IAA) ou Adn e, como controle negativo, o composto jacaramona, o qual não é capaz de se ligar a cisteínas (Fig. 5). Os resultados revelaram que o tratamento com DTT leva ao aparecimento majoritário de bandas monoméricas (Fig. Fig. 5C e 5D, *lanes* 2-3). Por sua vez a oxidação com H₂O₂ produziu majoritariamente dímeros (Fig. 5C e 5D, *lane* 4 e 8). Como esperado o tratamento com o agente alquilante IAA ou o inibidor Adn interferiram fortemente na formação de dímeros em razão de bloquear as cisteínas, impedindo a formação de dissulfetos (Fig. 5C e 5D, *lanes* 5-6). De forma bastante similar o tratamento com CalC levou EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S} a se apresentarem majoritariamente como monômeros (Fig. 5C e 5D, *lanes* 5-6) revelando que a forma de inibição deste composto ocorre em razão de uma ligação covalente (adição de Michael) com os tióis proteicos de AhpC.

Determinação do IC₅₀ aparente de CalC para as Prx bacterianas EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S}

Uma vez que CalC foi capaz de inibir a atividade peroxidásica de EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S}, bem como a formação do dissulfeto intermolecular nessas proteínas, seguimos com a determinação do IC₅₀ desse composto para as enzimas EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S}. Semelhante aos ensaios realizados com Adn, as enzimas reduzidas foram tratadas com quantidades variáveis de CalC, representando diferentes razões estequiométricas (0.5, 1, 2.5, 5 e 10 equivalentes molares). Em seguida, as enzimas tratadas foram submetidas

ao ensaio acoplado de oxidação do NADPH e o resultado do tratamento com diferentes concentrações de CalC foi acompanhado em SDS-PAGE (Fig. 6).

Os resultados revelaram que o composto CalC é capaz de impedir a formação de dissulfetos de EcAhpC em função da concentração utilizada (Fig. 6A e 6B). Também é possível observar pelo ensaio de NADPH que, quanto maior a dose de CalC, maior a inibição da atividade peroxidásica promovida (Fig. 6C e 6D). De fato, doses estequiométricas de CalC (0.5 eq.) foram capazes de inibir fortemente a atividade das enzimas resultando em um IC₅₀ aparente de $0.553 \pm 0.061 \mu\text{M}$ para EcAhpC^{WT} e $0.460 \pm 0.025 \mu\text{M}$ para EcAhpC^{T44S} (Fig. 6E e 6F). Esses dados indicam que CalC é tão eficiente quanto Adn ou JDA-202, dois compostos naturais *ent*-câuranos oriundos da China, na inibição de 2-Cys Prx. Adicionalmente, a atividade inibitória de CalC foi mais acentuada sobre a enzima contendo Ser na TC (EcAhpC^{T44S}).

A determinação da concentração inibitória mínima 50 (MIC₅₀) e 25 (MIC₂₅) revela que CalC é tóxica para linhagens patogênicas de *B. subtilis*, *S. aureus* e *S. epidermidis*

Para avaliar a citotoxicidade de CalC *in vivo* sobre células bacterianas determinamos a inibição do crescimento de linhagens de *B. subtilis* (F41923-PY79), *S. aureus* (ATCC 29213) e *S. epidermidis* (ATCC12228), que possuem Ser, e *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 29853) e *S. typhimurium* (ATCC 19585) que possuem Thr, na presença de concentrações crescentes de Adn.

Para o ensaio uma concentração final de 10⁵ UFC de cada bactéria foi inoculada em microplacas contendo meio Mueller Hinton e concentrações crescentes de Adn e incubado a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, densidade celular foi estimada espectrofotometricamente a 600 nm para o cálculo do valor de IC₅₀ e IC₂₅. O crescimento de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium* não foi inibido pela presença de CalC e, portanto, não foi possível calcular o IC₅₀ para essas linhagens. Entretanto, as linhagens de *B. subtilis*, *S. aureus* e *S. epidermidis* foram sensíveis à toxicidade de CalC, apresentaram IC₂₅ na ordem de 160.7 (± 39), 11.9 (± 1.6) e 159.0 (± 26.2) μM , respectivamente (Fig. 7).

Também avaliamos a utilização de CalC como adjuvante para anti-bacterianos. Para tanto foram avaliadas *S. aureus*, como representante de bactérias Gram +, e *E. coli* representante para as Gram -. Como antibacterianos utilizamos a gentamicina (aminoglicosídeo) (Gram +) e a polimixina nonapeptídeo (peptídeo não ribossomal, NRP) (Gram -). Para tanto foram determinados os IC₅₀ para ambos os antibacterianos e as respectivas linhagens (dados não apresentados). No ensaio foram utilizadas quantidades de antibióticos muito abaixo dos IC₅₀ determinados e também baixas doses de CalC (60 μM). Como pode ser observado na figura 8A, equanto que o tratamento com baixas doses somente de gentamicina (50ng/ml) resultou em uma taxa de mortalidade de ~ 50% e CalC (60 μM) de 15%, a combinação das duas levou a aniquilação de 75%, demonstrando que CalC é capaz de acentuar significativamente a atividade antibacteriana da gentamicina sobre *S. aureus*. No caso de *E. coli* e PMBN o resultado foi bastante surpreendente, uma vez que CalC mesmo em altas doses (500 μM) não é capaz de interferir na sobrevivência de células Gram - (Fig. 7). Neste caso, baixas somente de CalC resultaram na mortalidade de somente 5% das bactérias, dentro da margem de erro do experimento (Fig. 8B). Por sua vez, PMBN em baixas doses (0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) também interferiu de maneira tênue na sobrevivência das bactérias com taxas de mortalidade foi capaz de levar a taxas de mortalidade de somente 15% (Fig. 8B). Entretanto, a combinação de PMBN +CalC levou a mortalidade de 80% das bactérias (Fig. 8B). Neste contexto, os resultados revelam que a combinação de CalC com antibióticos, em doses variando de ng- μg são capazes de afetar drasticamente a sobrevivência de bactérias patogênicas Gram + e Gram -.

Avaliação comparativa da inibição por CalC para as Prx 2-Cys típicas de *S. cerevisiae* e *H. sapiens*

Uma vez que a expressão das enzimas foi padronizada bem como estamos com compostos naturais disponíveis, optamos por iniciar a padronização de metodologias para avaliar o potencial inibitório de compostos naturais oriundos da biota brasileira. Como compostos controle para inibição utilizamos a iodoacetamida (IAA), e o inibidor Adn na mesma concentração utilizada no trabalho original (Liu *et al.*, 2012). A metodologia empregada para a avaliação de inibição foi a de oxidação do D'IT.

Nas condições testadas nossos resultados indicam que Adn possui maior potencial inibitório sobre a Tsa1 (47.7 ± 3.7 % de inibição, Fig. 9A) quando comparada com Prx2 ($28.4\% \pm 6.3$ %) (Fig. 9A), este resultado nos parece importante uma vez que a baixa citotoxicidade de Adn em células sadias de mamíferos pode permitir sua utilização para o tratamento de infecções fúngicas. Por sua CalC foi o que apresentou maior atividade inibitória para Tsa1 (45.5 ± 5.7 %) com diferença bastante significativa para Prx2 (10.3 ± 5.8 %) (Fig. 9A). Também determinamos de forma preliminar o MIC₅₀ para C3 utilizando a linhagem de levedura BY4741 em YPG. Nas condições testadas o MIC₅₀ foi de 170µM (Fig. 9B), entretanto, os ensaios necessitam ser refeitos avaliando outros meios de cultura como foi efetuado para bactérias.

G. ENTIDADE TECNOLÓGICA: Uso

REFERÊNCIAS

- Albeck *et al.* **Inorg. Chem.** 1998. 37: 1704-1712.
- Alegria TG *et al.* **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 2017 114: E132-E141.
- Alexandre J *et al.* **Int. J. Cancer.** 2006. 119: 41-48.
- Angelucci F *et al.* **J. Mol. Biol.** 2013. 425: 4556-68.
- Angelucci F *et al.* **Mol Biochem Parasitol.** 2016. 206: 2-12.
- Aurass P *et al.* **Mol Cell Proteomics.** 2016. 15: 177-200.
- Bang YJ F *et al.* **J. Biol. Chem.** 2012. 287: 42516-42524.
- Barranco-Medina S *et al.* **Biochemistry.** 2008. 47: 7196-204.
- Belenky P. *et al.* (2013). **Cell. Rep.** 3: 350-8.
- Batista R *et al.* **J. Braz. Chem. Soc.** 18: 622-627.
- Beekman AC *et al.* **J. Nat. Prod.** 1997. 60: 252-257.
- Biteau B *et al.* **Nature.** 2003. 425: 980-84.
- Brindisi M *et al.* **Sci. Rep.** 2015. 5: 9705.
- Bruneau JM. **Proteomics.** 2003. 3: 325-36.
- Bryk R *et al.* **Nature.** 2000. 407: 211-15.
- Caldas LA *et al.* **Front. Pharmacol.** 2018. 9: 1191.
- Carey KL *et al.* **Proc. Natl. Acad. Sci USA.** 2004. 101: 7433-38.
- CDC, Office of Infectious Disease Antibiotic resistance threats in the United States, 2013.
- Chae, HZ *et al.* **J Biol Chem.** 1994a. 269: 27670-78.
- Chae HZ *et al.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1994b. 91: 7022-26.
- Chandler JM *et al.* **Proteome Sci.** 2008. 6: 17.
- Chatterjee B. **Curr. Top. Med. Chem.** 2018. 30: 2555-2566.
- Chaves-Moreno D *et al.* **Sci. Rep.** 2016. 6: 33174.
- Chitlaru T *et al.* **Infect Immun.** 2007. 75: 2841-52.
- Choi W *et al.* **Yeast.** 2003. 20: 1053-60.
- CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard – tenth edition. CLSI document MA07-A10. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- Collet JF, Messens J. **Antioxid. Redox Signal.** 2010. 13: 1205-16
- Cosgrove K *et al.* **J. Bacteriol.** 2007. 189: 1025-35.
- Cox AG *et al.* **Biochem. J.** 2009. 425: 313-25.
- de Cremer K. *et al.* (2016). **Sci. Rep.** 6: 27463.
- Cunha RLOR *et al.* **An. Acad. Bras. Cien.** 2009a. 81: 393-407.
- Cunha RLOR *et al.* **Biol. Chem.** 2009b. 390: 1205-12.
- Day AM *et al.* **Mol Cell.** 2012. 45: 398 - 408.
- Diab HI, Kane PM. **J. Biol. Chem.** 2013. 288: 11366-77.
- Drogosz J, Janecka A. **J. Drug Targ.** 2019. 20: 444-452.
- Dubbs JM, Mongkolsuk S. **Subcell Biochem.** 2007. 44: 143-93.
- Dutra LM *et al.* **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 2014. 24: 3315-20.
- Dwyer DJ *et al.* **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 2014. 111: E2100- E2109.
- Effertth T *et al.* **J. Mol. Med.** 2002. 80: 42-233.
- Enache-Angoulvant A, Hennequin C. (2005). **Clin. Infect. Dis.** 41: 1559-68.
- Enany S *et al.* **World J. Microbiol. Biotechnol.** 2014. 30: 1269-83.
- El Chamy Maluf S *et al.* **Parasitol Int.** 2016. 65: 20-22.
- ECDC/EMEA. (2009). The Bacterial Challenge: Time to React.
- Epp O *et al.* **Eur. J. Biochem.** 1983. 133: 51-69.
- Ferrer-Sueta G *et al.* **Chem Res Toxicol.** 2011. 24: 434-50.
- Flohé L, Toppo S, Cozza G, Ursini F. **Antioxid. Redox Signal.** 2011. 15: 763-80.
- Gandin V. Fernandes AP. **Molecules.** 2015. 20: 12732-56.
- Ghantous A *et al.* **Drug Disc. Today.** 2010. 15: 668-678.
- Grecco SS, *et al.* **Phytomedicine.** 2017 24:62-67.
- Hall A *et al.* **J. Mol. Biol.** 2010. 402: 194-209.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. **Free Radic. Biol. Med.** 2015. 5 ed. Oxford University Press.
- Hampton *et al.* **Antioxid. Redox Signal.** 2018. 28: 591-608.
- Hanna SL *et al.* **Microbiology.** 2000. 146: 2495-508.
- Hanzén S *et al.* **Cell.** 2016. 166: 140-51.
- Harper AF *et al.* **PLoS Comput. Biol.** 2017. 13: e1005284.
- Hébrard M *et al.* **J. Bacteriol.** 2009. 191: 4605-14.
- Hillar A *et al.* **Biochemistry.** 2000. 39: 5868-75.
- Hofmann B *et al.* **Biol. Chem.** 2002. 383: 347-364.
- Horta BB, de Oliveira MA, Discola KF, Cussiol JR, Netto LE. **J. Biol. Chem.** 2010. 285: 16051-65.
- Hou JK *et al.* **Cell Death Dis.** 2014. 5: e1400.
- Huang CH, Chiou SH. **World. J. Gastroenterol.** 2014. 20: 1529-1536.
- Huang H *et al.* **Biochem. System. Eco.** 2009. 36: 867-871.
- Ilari A *et al.* **Amino Acids.** 2012. 42: 803-11.
- Iyer KS. Klee, WA. **J. Biol. Chem.** 1973. 248: 707-710.
- Ibacache-Quiroga C *et al.* **Front Microbiol.** 2018 9: 427.
- Immenschuh S. Baumgart-Vogt E. **Antioxid. Redox Signal.** 2005. 5-6:768-77.

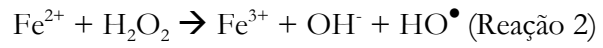
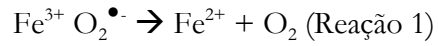
- Jacobson FS *et al.* **J. Biol. Chem.** 1989. 264: 1488-96.
- Jiang ZY, Hunt JV, Wolff SP. 1992. *Anal. Biochem.* 202. 384-389.
- Jang HH *et al.* **Cell.** 2004. 117: 625-35.
- Johnson E. *et al.* (2008). **Int. J. Antimicrob. Agents.** 32:511-4.
- Kang H *et al.* **Circulation.** 2013 128: 834-44.
- Kang SW *et al.* **Trends Mol Med.** 2005. 11: 571-78.
- Karplus PA, Poole LB. **Mol. Cell.** 2012. 45: 275-78.
- Khan A *et al.* **J. Glob. Antimicrob. Resist.** 2017. 8: 172-18.
- Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, Gaetani GF. **J. Biol. Chem.** 1999. 274: 13908-14.
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. **Nat. Rev. Microbiol.** 2010. 8: 423-35.
- König J *et al.* **J. Biol. Chem.** 2003. 278: 24409-20.
- Król E *et al.* 2015. **Front. Microbiol.** 6: 390.
- Laden BP e Porter TD. **J. Lipid. Res.** 2001. 42: 235-40.
- Lacerda LA *et al.* **Plasmid.** 2017. 90: 44-52.
- Lennon BW *et al.* **Science.** 2000. 289: 1190-94.
- Lin T *et al.* **Carcinogenesis.** 2011. 32: 154-67.
- Link AJ *et al.* **Electrophoresis.** 1997. 18: 1259-1313.
- Liu CX *et al.* **Nat. Chem. Biol.** 2012. 8: 486-93.
- Liu CX *et al.* **Exp. Cell. Res.** 2013. 319: 170-76.
- Llopis S *et al.* **BMC Genomics.** 2012. 13: 419.
- Logan ME *et al.* In Zvi Rappoport (Ed.). 2013. Chichester, UK: Wiley.
- López-Lázaro M. **Cancer Lett.** 2007. 252: 1-8.
- Lu J, Holmgren A. **Free Radic. Biol. Med.** 2014. 66: 75-87.
- Maluf SC *et al.* **Parasitol. Int.** 2016. 65: 20-22.
- Martins PM *et al.* **FEMS Microbiol Lett.** 2010. 310: 76-83.
- Matejić J *et al.* **Biotech. Biotech. Equip.** 2010. 24: 95-100.
- Mehta NS *et al.* **Biochim. Biophys. Acta.** 2007. 1770: 257-65.
- Mir AA *et al.* **Sci. Rep.** 2015. 5: 11831.
- Miranda-Vizuete A *et al.* **Eur. J. Biochem.** 1999. 261: 405-12.
- Moon JC *et al.* **J. Biol. Chem.** 2005. 280: 28775-28784.
- Morais MA *et al.* **J. Biol. Chem.** 2015. 290: 8582-90.
- Morão LG *et al.* 2016. *Ciência e Tecnologia.* 8.
- Muchowicz A *et al.* **Biochem. Pharmacol.** 2014 89: 210-6.
- Munhoz DC, Netto LE. **J. Biol. Chem.** 2004. 279: 35219-27.
- Muñoz P. *et al.* **Clin. Infect. Dis.** 2005. 40: 1625-34.
- Muntel J *et al.* **Mol. Cell Prot.** 2014. 13: 1008-19.
- Nakamura T *et al.* **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 2008. 105: 6238-42.
- do Nascimento, CJ *et al.* **Phytochem. Lett.** 2012. 5: 401-06.
- NCCLS. **Approved Standard—Sixth Edition.** NCCLS document M7-A6.
- Nelson KJ *et al.* **Proteins.** 2011. 79: 947-64.
- Nelson KJ *et al.* **Antioxid. Redox Signal.** 2018. 28: 521-536.
- Netto LE *et al.* **J. Biol. Chem.** 1996. 271: 15315-21.
- Netto LE *et al.* **Free Radic. Res.** 2016. 50: 206-45.
- Netto LE, Antunes F. **Mol. Cells.** 2016. 39: 65–71.
- Nicolussi A *et al.* **Mol. Clin. Oncol.** 2017. 6: 139-153.
- Nielsen MH *et al.* **Acta Crystallogr D Struct Biol.** 2016. 72:158-67.
- Nussbaum K *et al.* **Curr. Med. Chem.** 2010. 17: 1594-17.
- Oh E, Jeon B. **PLoS One.** 2014. 9: e87312.
- Oliveira MA *et al.* **Acta Cryst. F.** 2005. 61: 387-90.
- Oliveira MA *et al.* **Biochemistry.** 2010. 49: 3317-26.
- Oliveira MA *et al.* **Acta Crystallogr. F.** 2007. 63: 665-68.
- Ostrosky-Zeichner L. *et al.* 2010. **Nat. Rev. Drug Discov.** 9: 719-27.
- Pang CN *et al.* **Sci. Rep.** 2017. 7: 40232.
- Park SG *et al.* **J. Biol. Chem.** 2000. 275: 5723-5732.
- Parsonage D *et al.* **Biochemistry.** 2005. 44: 10583-92.
- Parsonage D *et al.* **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 2008 105: 8209-14.
- Parsonage D *et al.* **J. Struct. Biol.** 2016. 194: 180-190.
- Perez-Martin J. (Ed.). **Programmed cell death in protozoa.** 2008. Springer Science & Business Media.
- Perkins A *et al.* **Trends. Biochem. Sci.** 2015. 40: 435-45.
- Peskin AV, Winterbourn CC. **Free Radic. Biol. Med.** 2001. 30: 572-79.
- Peskin AV, Winterbourn CC. **Free Radic. Biol. Med.** 2006. 40: 45-53.
- Peskin AV *et al.* **J. Biol. Chem.** 2007. 282: 11885-92.
- Phillips AJ *et al.* **Biomacromolecules.** 2014. 15: 1871-81.
- Piován L *et al.* **Bioorg. Med. Chem.** 2011. 19: 2009-14.
- Portillo-Ledesma S *et al.* **Biochemistry.** 2014. 53: 6113-25.
- Puente V *et al.* **Phytomedicine.** 2019. 56: 27-34.
- Rabilloud T *et al.* **J. Biol. Chem.** 2002. 277: 19396-401.
- Radjainia M *et al.* **Structure.** 2015. 23: 912–20.
- Ren Y *et al.* **Curr. Med. Chem.** 2016. 23: 2397-2420.
- Rhee SG. **Mol. Cells.** 2016. 39: 1-5.

- Rhee SG, Kil IS. **Annu. Rev. Biochem.** 2017. 86: 749-775.
- Rocha JBT, Nogueira CW. **PATAI's Chemistry of Functional Group.** 2011.1-81.
- Rogers PD *et al.* **J. Antimicrob. Chemother.** 2006. 58: 434-38.
- Rollenhagen C, Bumann D. **Infect. Immun.** 2006. 74: 1649-46.
- Salerno Pimentel IA *et al.* **PLoS One.** 2012. 7:e48780.
- Salonen JH *et al.* **J. Hosp. Infect.** 2000. 45: 293-301.
- Salzano S *et al.* **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 2014. 111: 12157-62.
- Sato A *et al.* **Int. J. Nanomedicine.** 2013. 8: 3151-60.
- Shi XJ *et al.* **Antioxid. Redox Signal.** 2017. 27: 73-92.
- Schmidt T *et al.* **Molecules.** 2009. 14: 2062-2076.
- Shichita T *et al.* **Nat. Med.** 2012. 18: 911-17.
- Silva IC, Ferreira H. **Bio-Protocol.** 2013. 3: e861.
- da Silva Bolzani V *et al.* **Pure App. Chem.** 2012. 9: 1837-1846.
- Smolka MB *et al.* **Proteomics.** 2003. 3: 224-37.
- Soethoudt M *et al.* **Free Radic. Biol. Med.** 2014. 77: 331-39.
- Stöcker S *et al.* **Nat Chem Biol.** 2018. 14: 148-155.
- Suffredini IB *et al.* **Anti. Age. Med. Chem.** 2006. 4: 367-375.
- Tairum CA *et al.* **J. Mol. Biol.** 2012. 424: 28-41.
- Tairum CA *et al.* **Sci. Rep.** 2016. 6:33133.
- Teixeira F *et al.* **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 2015. 112: E616-24.
- Thurman *et al.* **Eur. J. Biochem.** 1972. 25: 420-30.
- Tovar-Méndez A *et al.* **Plant. Physiol.** 2011. 156: 1535-47.
- Trivelli X *et al.* **Biochemistry.** 2003. 42: 14139-49.
- van Acker H *et al.* **PLoS One.** 2016. 11: e0159837.
- Vignols F *et al.* **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 2005. 102: 16729-34.
- Walters WP. **Expert. Opin. Drug. Discov.** 2012. 7: 99-107.
- Wang J *et al.* **J. Tradit. Chin. Med.** 2013. 3: 156-63.
- Wei W *et al.* **Oncotarget.** 2016 7: 3873-83.
- Winterbourn CC *et al.* **Free Radic. Biol. Med.** 1999 27:322-28.
- Woo S *et al.* **Int. J. Oncol.** 2002. 21, 57-63.
- Wood Z *et al.* **Trends Biochem. Sci.** 2003a. 28: 32-40.
- Wood ZA *et al.* **Science.** 2003b. 300: 650-53.
- Wu Z *et al.* **Med. Sci. Monit.** 2019. 25: 3676-3682.
- Yang YJ *et al.* **Antioxid. Redox Signal.** 2016. 24: 453-69.
- Xu R *et al.* **Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.** 2019. 44: 295-303.
- Zhu Y *et al.* **Food Chem.** 2010.118: 228-238.

ANEXO 1. FIGURAS

Figura 1:

A) Reações de Fenton:



B) Reação de Haber-Weiss:

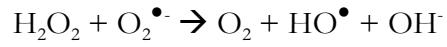


Figura 2:

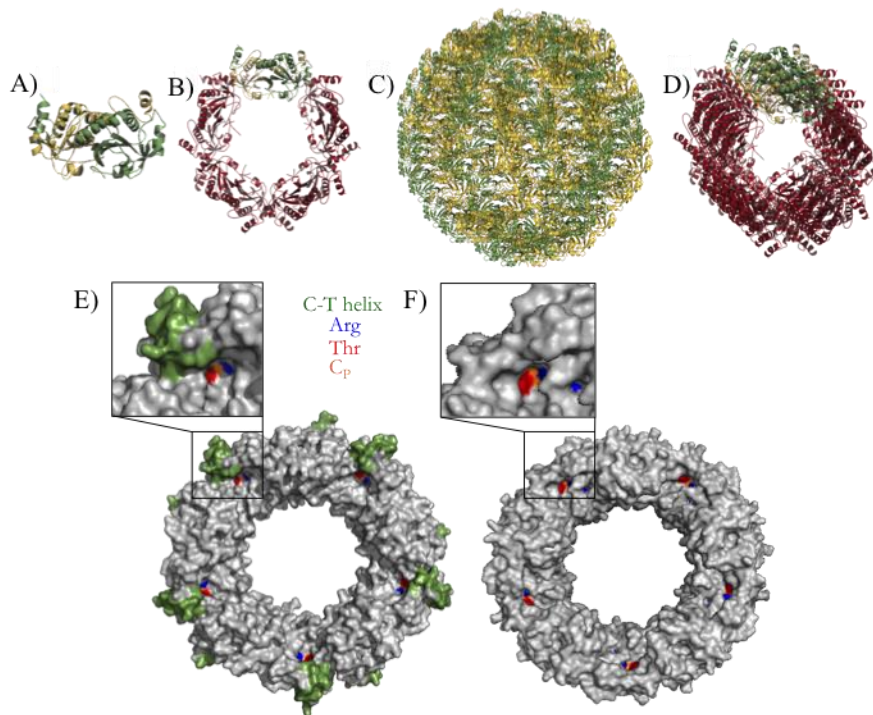


Figura 3:

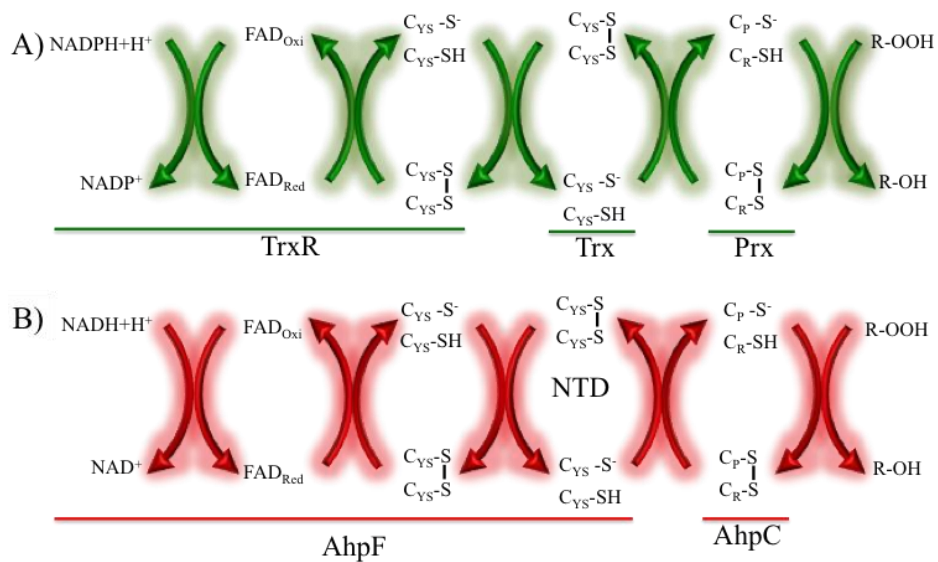


Figura 4:

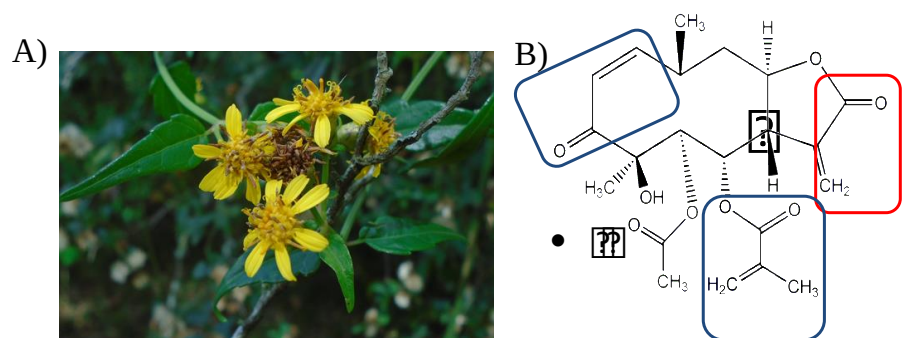


Figura 5:

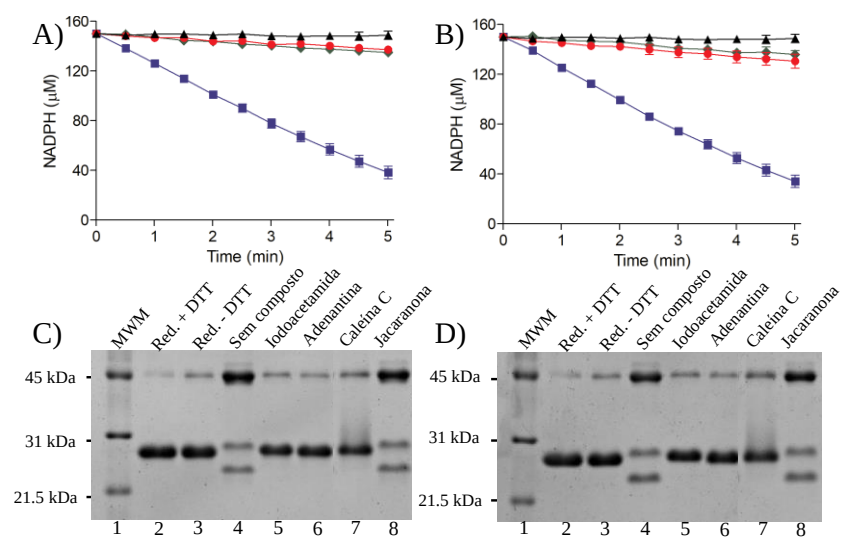


Figura 6:

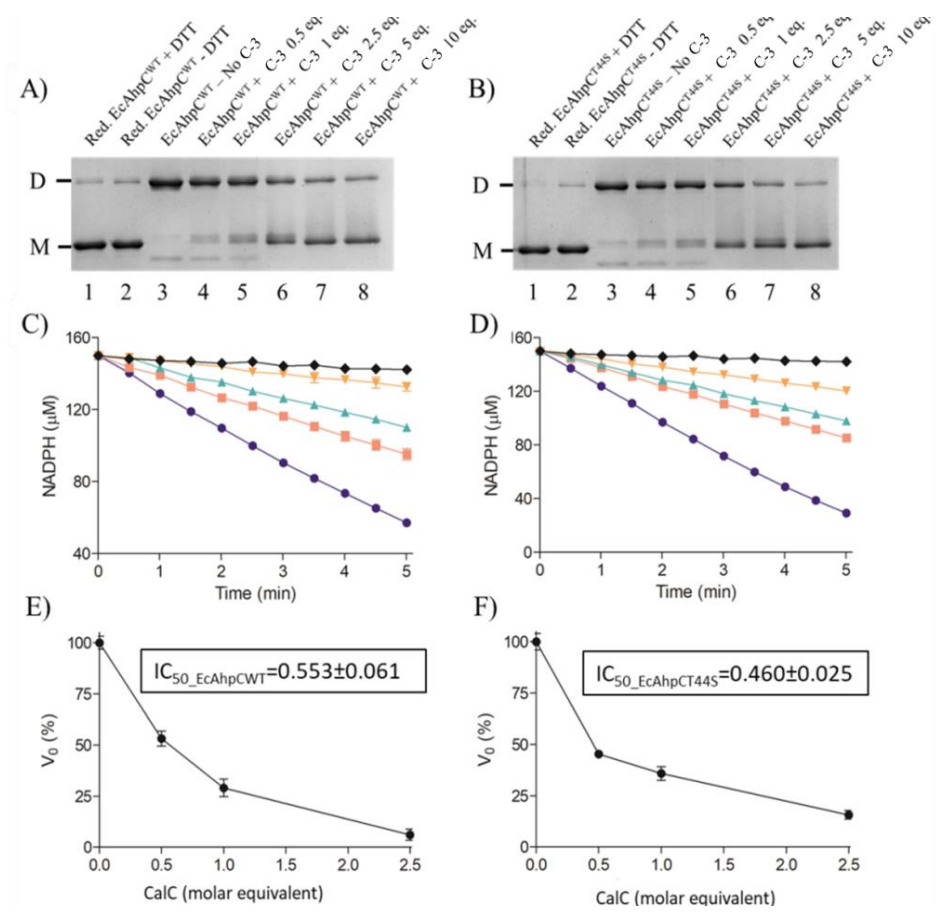


Figura 7:

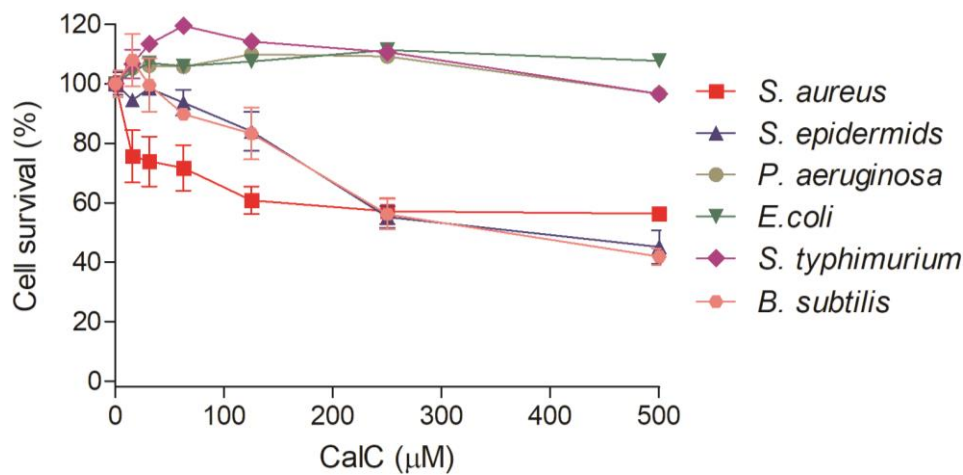


Figura 8:

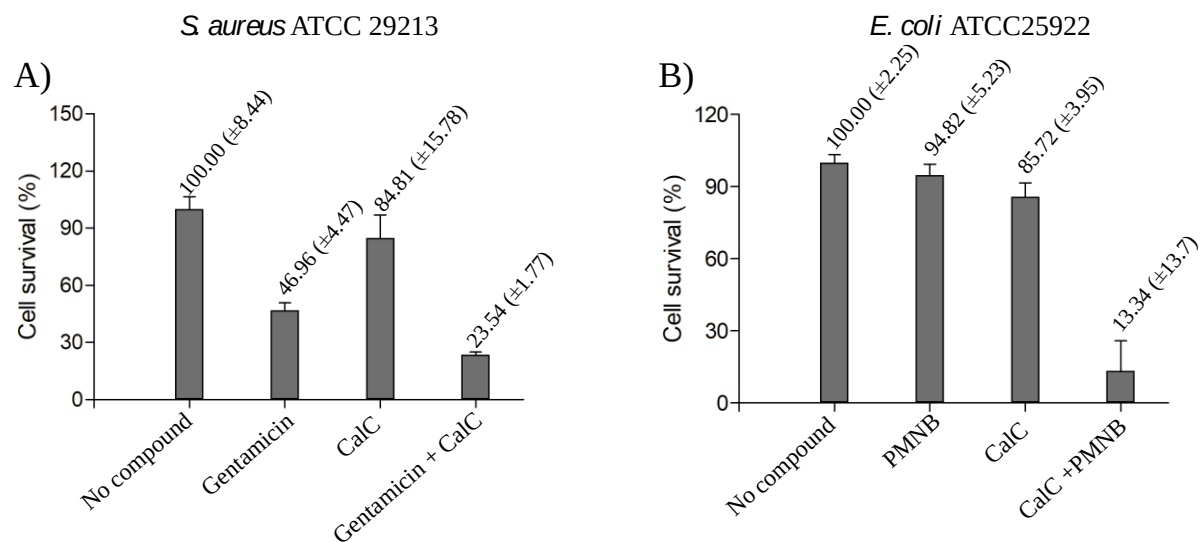
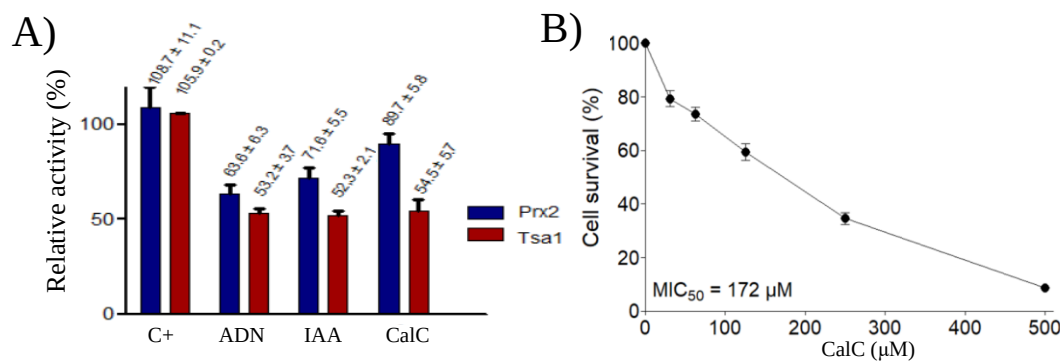


Figura 9:



Apêndice D

Manuscrito submetido ao periódico *Applied Microbiology and Biotechnology*.

de Oliveira, M.A.; Tairum, C. A.; Netto, L. E. S.; de Oliveira, A. L. P.; Aleixo-Silva, R.L.; Cabrera, V.I.M.; Breyer, C. A.; Santos, M. C. “Relevance of peroxiredoxins in pathogenic microorganisms”. Submetido ao periódico *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Applied Microbiology and Biotechnology

Relevance of peroxiredoxins in pathogenic microorganisms

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	AMAB-D-21-00158	
Full Title:	Relevance of peroxiredoxins in pathogenic microorganisms	
Article Type:	Mini-Review	
Section/Category:	Mini-Review	
Corresponding Author:	Marcos Antonio de Oliveira, Ph.D São Paulo State University - Coastal Campus São Vicente, São Paulo BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	São Paulo State University - Coastal Campus	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Marcos Antonio de Oliveira, Ph.D	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Marcos Antonio de Oliveira, Ph.D	
	Carlos A. Tairum, PhD	
	Luis Eduardo Soares Netto, PhD	
	Ana Laura Pires de Oliveira, MsC	
	Rogerio Luis Aleixo-Silva, MsC	
	Vitoria Isabela Montanhero Cabrera, MsC	
	Carlos A. Breyer, PhD	
	Melina Cardoso dos Santos, PhD	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2013/07937-8)	Prof Marcos Antonio de Oliveira Prof Luis Eduardo Soares Netto
	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2017/19942-7)	Prof Marcos Antonio de Oliveira
	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (16/15849-0)	Dr. Carlos A. Tairum
	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (19/04054-4)	Ms. Ana Laura Pires de Oliveira
	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (20/00845-4)	Mr Rogerio Luis Aleixo-Silva
	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (20/02868-1)	Ms. Vitoria Isabela Montanhero Cabrera
	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (11/13500-6)	Dr. Carlos A. Breyer
	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (17/06263-4)	Dr. Melina Cardoso dos Santos
Abstract:	The oxidative and nitrosative responses generated by animal and plant constitute an	

	important defense against infection and the establishment of pathogenic microorganisms such as bacteria, fungi and protozoa. Pathogens can also face oxidative stress triggered by some antimicrobials. Among distinct oxidant species, hydroperoxides are a group of chemically diverse compounds that comprise small hydrophilic molecules, such as hydrogen peroxide and peroxynitrite, and bulky hydrophobic species, such as fatty acid hydroperoxides. Peroxiredoxins (Prx) are ubiquitous enzymes and may be involved in the microbial protection against hydroperoxides generated by the hosts. In contrast to catalases and glutathione peroxidases, these enzymes do not contain prosthetic groups such as heme or selenocysteine and instead use a highly reactive cysteine residue to decompose hydroperoxides. Prx are very abundant and are present in distinct cell compartments and, in some cases, Prx can be secreted to the extracellular environment. Despite their abundance, Prx expression can be further increased in response to oxidative stress promoted by host defense systems or by treatment with hydroperoxides and antibiotics. Additionally, some Prx isoforms have been described as virulence factors. Prx are widely distributed among various hosts and pathogens and are classified into six different classes (Prx1-AhpC, BCP-PrxQ, Tpx, Prx5, Prx6 and AhpE) based on structural and biochemical factors. Some groups are absent in hosts, while others present structural peculiarities that differentiate them from host isoforms. In this context, the intrinsic structural characteristics of these enzymes may allow the development of biotechnological approaches, such as the development of new drugs to combat pathogenic microorganisms. Additionally, since some Prx isoforms are also found in the extracellular environment, they emerge as attractive targets for the production of diagnostic tests and vaccines.
Suggested Reviewers:	Helena Castro, PhD Professor, Universidade do Porto Instituto de Investigacao e Inovacao em Saude hcastro@ibmc.up.pt Expertise in redox systems of the protozoan parasite, microbial infection and virulence. Madia Trujillo, PhD Professor, Universidad de la Republica Facultad de Medicina madiat@fmed.edu.uy Expertise in neglect infectious diseases, trypanosomatides, oxidative and nitrosative response, Falk Hillmann, PhD Researcher, Leibniz Institute of Natural Product Research and Infection Biology Biobricks of Microbial Natural Product Syntheses: Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie Biobricks mikrobieller Naturstoffsynthesen falk.hillmann@leibniz-hki.de Specialist in fungal infections, fungal peroxiredoxins, search for new antiinfective compounds Francisco Javier Medrano Martin, Researcher PhD, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas Departamento de Cristalografia y Biologia Estructural fjmedrano@cib.csic.es Specialist in enzyme structure, pathogenic enzymes, biotechnology
Opposed Reviewers:	



São Vicente, January 26, 2021

Dear Prof. Dr. Alexander Steinbüchel
Editor-in-Chief of AMB
Applied Microbiology and Biotechnology,

Thank you very much for the invitation to write a minireview for publication in *Applied Microbiology and Biotechnology*. Accordingly, we present our manuscript titled “Relevance of peroxiredoxins in pathogenic microorganisms”. Oxidative and nitrosative stresses are among the main fronts of the host defense against pathogenic microorganisms, and several studies have indicated that antibiotics are also able to promote oxidative stress. Nevertheless, the increasing number of microorganism strains with resistance to multiple antibiotics is a cause of concern for global public health. In this context, our manuscript concisely addresses the importance of peroxiredoxins (Prxs) from pathogenic bacteria, fungi and protozoans. Prxs are a structurally diverse group of peroxidases that use a catalytic residue of cysteine and that are able to decompose the most diverse types of hydroperoxides with high efficiency. In this mini-review, aspects such as abundance, increased expression in response to stress conditions, structural peculiarities, variety of substrates and virulence are addressed. In fact, although there are still few applied approaches involving inhibitors or vaccines based on these proteins, studies in this area may be quite promising. In this context, we believe that our work is in accordance with the scope of *Applied Microbiology and Biotechnology* and will be of broad interest to the readers.

Thank you very much.

Best regards,

Prof. Marcos A. Oliveira, Ph.D.

Sao Paulo State University - UNESP
Biosciences Institute, Coastal Campus
Praça Infante Dom Henrique
P.O. 73601 - CEP 11380-972
São Vicente, SP, Brazil
Phone: +55 (13) 3569-7108

Relevance of peroxiredoxins in pathogenic microorganisms

Marcos Antonio de Oliveira^{1§*}, Carlos A. Tairum^{2§}, Luis Eduardo Soares Netto^{2*}, Ana Laura Pires de Oliveira¹, Rogerio Luis Aleixo-Silva², Vitoria Isabela Montanhero Cabrera¹, Carlos A. Breyer¹ and Melina Cardoso dos Santos¹.

¹ Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus do Litoral Paulista São Vicente, Brazil, 11330-900.

² Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 05508-090.

[§] These authors contributed equally to this work.

* Correspondence: Marcos A. de Oliveira – marcos.a.oliveira@clp.unesp.br; Luis E.S. Netto – nettoles@ib.usp.br

Keywords: Peroxiredoxins, oxidative stress, antibiotic resistance, hydroperoxides, virulence, structure

Abstract: The oxidative and nitrosative responses generated by animal and plant constitute an important defense against infection and the establishment of pathogenic microorganisms such as bacteria, fungi and protozoa. Pathogens can also face oxidative stress triggered by some antimicrobials. Among distinct oxidant species, hydroperoxides are a group of chemically diverse compounds that comprise small hydrophilic molecules, such as hydrogen peroxide and peroxyxynitrite, and bulky hydrophobic species, such as fatty acid hydroperoxides. Peroxiredoxins (Prx) are ubiquitous enzymes and may be involved in the microbial protection against hydroperoxides generated by the hosts. In contrast to catalases and glutathione peroxidases, these enzymes do not contain prosthetic groups such as heme or selenocysteine and instead use a highly reactive cysteine residue to decompose hydroperoxides. Prx are very abundant and are present in distinct cell compartments and, in some cases, Prx can be secreted to the extracellular environment. Despite their abundance, Prx expression can be further increased in response to oxidative stress promoted by host defense systems or by treatment with hydroperoxides and antibiotics. Additionally, some Prx isoforms have been described as virulence factors. Prx are widely distributed among various hosts and pathogens and are classified into six different classes (Prx1-AhpC, BCP-PrxQ, Tpx, Prx5, Prx6 and AhpE) based on structural and biochemical factors. Some groups are absent in hosts, while others present structural peculiarities that differentiate them from host isoforms. In this context, the intrinsic structural characteristics of these enzymes may allow the development of biotechnological approaches, such as the development of new drugs to combat pathogenic microorganisms. Additionally, since some Prx isoforms are also found in the extracellular environment, they emerge as attractive targets for the production of diagnostic tests and vaccines.

Introduction

The infection of organisms by microbial pathogens triggers several host defense mechanisms (Medzhitov 2007; Nurnberger et al. 2004), such as the release of large amounts of reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS). These molecules are able to damage pathogen macromolecules, including DNA, lipids and proteins. ROS generation is a consequence of the activation of a multicomponent system (NADPH oxidase), which uses NADPH to reduce molecular oxygen and generate the superoxide anion radical. Superoxide can undergo spontaneous or enzymatic dismutation at high rates ($10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectively), generating hydrogen peroxide, which is highly diffusible (Halliwell and Gutteridge 2015). Hydrogen peroxide and superoxide are not powerful oxidants, but they can be converted to hydroxyl radicals through Fenton and Haber-Weiss reactions (Fig. 1a). The hydroxyl radical is highly reactive and can promote oxidative damage in proteins and mutations in nucleic acids and trigger lipid peroxidation; these processes damage cell membranes and other biomolecules to generate several toxic secondary products, which contribute to the annihilation of pathogenic microorganisms (Halliwell and Gutteridge 2015).

Host organisms also eliminate pathogens by the production of nitric oxide radicals derived from arginine (Arg) oxidation to citruline (Cit) in a reaction dependent on molecular oxygen and catalyzed by the inducible nitric oxide synthase (iNOS) in animals (Prolo et al. 2014). In plants, there are also pathways that produce nitric oxide, but the underlying mechanisms are still elusive (Trapet et al. 2015). Additionally, other oxidants can be generated from nitric oxide. For instance, nitric oxide reacts with superoxide anion radicals very rapidly ($k \sim 7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), resulting in the formation of peroxynitrite, a powerful oxidizing hydroperoxide (Radi 2018). Organic hydroperoxides (OHPs), which includes hydroperoxides generated from amino acids, nucleotides and lipids, are also formed over the course of host response. The pathogen infection leads to the generation of large amounts of OHPs, which are generated by lipoxygenases or cyclooxygenases (Cordray et al. 2007) or indirectly as products of lipid peroxidation or oxidation of other macromolecules (Halliwell and Gutteridge 2015).

The lipid hydroperoxides are the most studied and are very toxic to pathogens since they can undergo in free radical mediated chain reactions, leading to alteration of the physical properties in cell membranes and causing damage to proteins and nucleic acids (Gaschler and Stockwell 2017). Noteworthy, hydroperoxides other than hydrogen peroxide can also undergo Fenton-like reactions (Fig. 1b), producing highly reactive free radicals such as alkoxy radicals (Patel and Williamson 2016). Therefore, the removal of these oxidants is fundamental to allow the establishment of pathogens in the host.

Additionally, some lines of evidence indicated that microbicidal drugs can enhance superoxide and hydrogen peroxide production, damaging distinct biological targets in microorganism cells, including DNA (Dwyer et al. 2014; Lam et al. 2020; Repolês et al. 2020). In consequence, it is important to note that at low doses, antibiotics can lead to selection of strains with increased resistance to these compounds. Meanwhile, high concentrations of antibiotics are required to abolish or strongly decrease the survival rates of the pathogens (van Acker and Coenye 2017). To counteract oxidative stress, the pathogenic organisms express several antioxidant enzymes, enabling infection, maintenance and growth of microorganism in host environments (Staerck et al. 2017). Among them, the most representative enzymes are: (i) superoxide dismutases (Sod), which convert superoxide into hydrogen peroxide and molecular oxygen; (ii) catalases (Cat), which specifically decompose hydrogen peroxide and peroxynitrite; and (iii) glutathione peroxidases (Gpx) and peroxiredoxins (Prx), which decompose several kinds of hydroperoxides, including hydrogen peroxide, peroxynitrite and OHPs (Staerck et al. 2017).

The growing occurrence of microbial strains that are resistant to the most diverse microbicides has become a global health threat. Thus, the search for new drugs to combat pathogenic microorganisms is a worldwide concern (Fisher et al. 2017). In this regard, an alternative

approach would be the search for antioxidant enzyme inhibitors as antimicrobial therapies. Prx members are important targets due to their diversity and structural differences between the isoforms found in pathogenic microbial organisms and hosts. The aim of this review is to focus on evidence taking into account aspects such as abundance, substrate diversity, and structural and functional peculiarities that place members of the Prx family as potential targets for novel strategies to combat microbial infections.

Peroxiredoxin abundance and distribution in microbial cells

Prx are the main scavengers of hydroperoxides in several organisms (Condeles et al. 2020; Seaver and Imlay 2001) and especially in microbial pathogens that lack both catalase and Gpx (Mastronicola et al. 2014; Richard et al. 2011). The significance of Prx in bacteria is highlighted by the number of different isoforms expressed, ranging from three to ten enzymes, representing some of the most abundant proteins in several bacteria. Additionally, bacterial Prx are found in the cytosol, associated with the cell membrane or with DNA, in the periplasmic space and even in biofilms (Cha et al. 1995; Enany et al. 2014; Hicks et al. 2010; Murphy et al. 2005; O'Riordan et al. 2012).

In microbial eukaryotes, such as fungi and protozoans, Prx are also very abundant. *Saccharomyces cerevisiae*, which is usually employed as a model yeast for genetic and biochemical studies, has also gained attention as an opportunistic pathogen in immunocompromised individuals (Souza Goebel et al. 2013). In this yeast, the abundance of Prx isoforms can attain ~1% of the total soluble proteins in the cell and are much more abundant than catalases and Gpx (Ghaemmaghami et al. 2003). Proteomic approaches of representative fungi and protozoans also revealed the high amount of Prx in these microorganisms (de Godoy et al. 2012; Kaneva et al. 2018).

The number of Prx isoforms is also elevated in eukaryotic organisms, achieving up to six isoforms in fungi (Park et al. 2000; Rocha et al. 2018; Skrzypek et al. 2017) and three to five isoforms in protozoans (Richard et al. 2011). Several isoforms are distributed in the most diverse cellular compartments, such as the cytosol, mitochondria, nucleus, peroxisomes, protozoan glycosomes, and they are even exported outside cells (Park et al. 2000; Richard et al. 2011; Rocha et al. 2018; Urban et al. 2005; Vallejo et al. 2012). In fungi, extracellular Prx isoforms are also associated with the hypha/cell wall and biofilm (Choi et al. 2003). It is important to highlight that biofilm confers resistance to bacteria and fungi against host immune defenses and antimicrobial drugs (Lynch and Robertson 2008). Additionally, the extracellular location of some Prx in pathogenic microorganisms makes these enzymes promising targets for diagnostic tests and vaccines (Fereig et al. 2017; O'Riordan et al. 2012; Rodrigues et al. 2020). Although the abundance of Prx in pathogenic microbes is already high in basal conditions, the oxidative burst imposed by immune cells such as macrophages or neutrophils can further enhance the levels of Prx in bacteria such as *Salmonella typhimurium* and *Mycobacterium avium* (Francis et al. 1997; Zhu et al. 2008). A similar behavior is observed in pathogenic fungi and protozoans. In *Candida glabrata* the expression of the Prx is strongly enhanced when insulted by the oxidative stress promoted by the host immune system (Gutierrez-Escobedo et al. 2020). In *Trypanosoma cruzi*, ectopic overexpression of Prx isoforms enhances the resistance of the pathogen against peroxynitrite and hydrogen peroxide produced by macrophages and pathogen metabolism (Piacenza et al. 2008).

Another point that indicated the relevance of Prx in pathogens is the induction of their expression in response to antimicrobials. For instance, Prx are upregulated by distinct bactericidal drugs, such as amikacin, ciprofloxacin, kanamycin, tetracycline, vancomycin among others (Chen et al. 2013; Kumar et al. 2013; Li et al. 2018; Vranakis et al. 2012). In pathogenic fungi and protozoans, enhanced expression in response to antimicrobial agents has also been observed for a range of drugs, such as amphotericin B, antimony, benzimidazole,

camphene thiosemicarbazide, caspofungin, fluconazole, fludioxonil, itraconazole, miltefosine and others (Andrade et al. 2008; Das 2018; Gautam et al. 2016; Gautam et al. 2008; Shishodia et al. 2019; Silva et al. 2018; Vedyappan et al. 2010). Together, the data presented in this section highlight the importance of Prx for microbial pathogen survival under oxidative stress conditions.

Catalytic mechanism of Prx

Pathogenic organisms present three main groups of peroxide-removing enzymes: catalases, Gpx and Prx. Catalases are heme-containing proteins that efficiently decompose H_2O_2 but cannot reduce OHPs (Hillar et al. 2000). In contrast, Cys-based Gpx can degrade OHPs and hydrogen peroxide but with lower efficiency when compared to seleno-dependent mammalian Gpx (Herbette et al. 2007). Finally, Prx are Cys-based peroxidases that efficiently decompose several kinds of hydroperoxides, achieving rate constants up to $10^8 M^{-1}s^{-1}$ (Reyes et al. 2011; Tairum et al. 2016).

The mechanism of action of Prx is based on a catalytic cysteine (named peroxidatic cysteine - C_P) that reduces the hydroperoxide and is oxidized to sulfenic acid (C_P-SOH) (Hall et al. 2010). In addition to C_P , Thr (or Ser), and Arg are found in the active site of all Prx described to date and compose the catalytic triad that is essential to the catalytic power of Prx enzymes (Fig. 2) (Hall et al. 2010; Poole and Nelson 2016). The catalytic triad Thr can be substituted by Ser in some Prx, with structural and functional consequences, but without affecting the reactivity under low concentrations of hydroperoxides (Tairum et al. 2016). Interestingly, catalytic Ser is more frequently found in Prx isoforms from Bacteria than in corresponding enzymes from Archaea and Eukarya (unpublished data).

C_P is very reactive to most hydroperoxides due to the active site microenvironment (Hall et al. 2010). The Thr/Ser and Arg of the catalytic triad activate C_P and orientate the substrate in the active site for optimal reactivity (Fig. 2) through a S_N2 mechanism (Hall et al. 2010). The oxidation of C_P by hydroperoxide is common to all Prx, while the subsequent steps define two groups. Some Prx have only one catalytic cysteine (1-Cys Prx), while a second cysteine residue (named resolving cysteine - C_R) is involved in the catalysis of another group (2-Cys Prx) by forming a disulfide bond ($C_P-S-S-C_R$). 2-Cys Prx can be further divided into atypical, in which both cysteines are in the same subunit; or typical, that have a homodimer as minimal catalytic unit due to C_P and C_R are in different chains (Perkins et al. 2015).

Common aspects, structural variability, and alternative functions of Prx

Prx display the thioredoxin-fold (Trx-fold) that is composed of four β -sheets surrounded by three α -helices, a structure that is shared with several other redox proteins, member of the superfamily thioredoxin (Nelson et al. 2011). Prx enzymes evolved from a Trx ancestor, with addition of secondary structural elements (Copley et al. 2004). Prx enzymes are subdivided into six classes: AhpC-Prx1, BCP-PrxQ, Tpx, Prx5, Prx6 and AhpE (Fig. 3a-f) based on their amino acid sequences and structures (Nelson et al. 2011). The AhpC-Prx1 class is composed mainly of the typical 2-Cys Prx, while the atypical 2-Cys Prx are mainly distributed in three classes: BCP-PrxQ, Prx5 and Tpx. Proteins displaying the 1-Cys Prx mechanism are mainly present in the Prx6 group, but there are also 1-Cys Prx in the BCP-PrxQ, Prx5 and AhpE classes (Nelson et al. 2011).

The oligomeric states of these enzymes are also very diverse: monomers, dimers, decamers and several other structural species (Jang et al. 2004; Tairum et al. 2016). The Prx dimers can assemble in two different ways: A-type (Fig. 4a) and B-type (Fig. 4b), in which the central β -sheets of both monomers are aligned (Poole and Nelson 2016). Members of the BCP-PrxQ, Prx5, Tpx and AhpE classes can form A-type dimers, but there is a wide variation at this level of organization. Most proteins of BCP-PrxQ class are found as monomers, with a few of them

as A-type dimers. Representatives of the Prx5 group are detected as monomers and dimers, and some bacterial members possess Prx5 fused to a glutaredoxin molecule and can form tetramers (Kim et al. 2003; Nelson et al. 2011). The Tpx members are found only as A-type dimers. Finally, the AhpE members have been described as A-type dimers that can associate in octamers (tetramers of dimers) (Hall et al. 2011).

The B-type dimer is found in members of the AhpC-Prx1 and Prx6 classes, being the minimum catalytic unit of AhpC-Prx1, since C_P and C_R are found in different monomers. Interestingly, members of the AhpC-Prx1 and Prx6 classes can further assemble into tetramers, octamers, decamers, dodecamers or high-molecular-weight species (Poole et al. 2011; Poole and Nelson 2016). Additionally, members of the AhpC-Prx1 class with Thr in the catalytic triad possess the particularity of switching oligomeric states dependent on the redox state, being observed as decamers when reduced (Fig. 4c) switching to dimers upon C_P oxidation (Tairum et al. 2016). Some peroxiredoxins present additional functions, besides the peroxidase activity. At high hydroperoxide concentrations, C_P is hyperoxidized to sulfinic acid (C_P-SO₂H), resulting in loss of peroxidase activity and concomitant acquisition of chaperone (holdase) function as a consequence of structural rearrangement to form high molecular weight species (HMW), presenting a spherical or filamentous organization (Fig. 4d and 4e) (Hall et al. 2009; Jang et al. 2004; Saccoccia et al. 2012; Tairum et al. 2016). This functional switching is related to a C-terminal α -helix that facilitates C_P hyperoxidation, which is restricted to eukaryotic isoforms with rare exceptions (e.g., *Helicobacter pylori* AhpC) (Hall et al. 2009). Molecular chaperone activity was also described in Prx from some microorganisms previously exposed to heat shock (Kamariah et al. 2018; Morais et al. 2017; Saccoccia et al. 2012; Teixeira et al. 2015). In addition, a BCP-PrxQ from *Deinococcus radiodurans* and a Prx6 from *Anabaena* sp. also present molecular chaperone activity (Cho et al. 2019; Mishra et al. 2017).

Another additional function displayed by some members of the Prx6 class is a calcium-independent phospholipase A₂ activity (PLA₂), which is not related to peroxidase function (Bannitz-Fernandes et al. 2019). The PLA₂ activity of Prx6 depends on a second active site separate of the peroxidase center, composed by a catalytic Ser, a His and an Asp (Fig. 5). In pathogens, PLA₂ activity was described in Prx6 enzymes from *Pseudomonas aeruginosa* and from *Aspergillus fumigatus*, two respiratory airway pathogens. Possibly, these phospholipase activities may be related to the metabolism of surfactants in the lungs during colonization by damaging phospholipids from the host cell membrane or nutrient acquisition (Bannitz-Fernandes et al. 2019). The dual activity of some Prx groups may provide additional importance for their physiological roles in cells, especially microorganisms.

The diverse structural features among Prx classes can represent an opportunity for the characterization of inhibitors that might be employed as drug targets in the combat of pathogens. Part of the diversity among proteins of the six Prx classes reside in the amino acid composition of the active sites (Hall et al. 2011). Indeed, Tpx and AhpE members are found almost exclusively in prokaryotes, and BCP-PrxQ is absent in animals (Poole and Nelson 2016). For the other three classes, some specific features can be taken into account to design molecules that specifically target enzymes from pathogens and not the hosts.

The amino acid sequences of microbial Prx isoforms (bacteria, fungi and protozoans) differ considerably than host enzymes (mammals and plants), ranging from 35-60% of identity (data not shown), with some of these residues in the active site region. These differences can be explored in the search for inhibitors with specific interactions with the proteins of hosts and pathogens. To illustrate this variation, structures from proteins belonging to the subclasses Prx1-AhpC, BCP-PrxQ, Prx5 and Prx6 were used as templates and were depicted with different colors that represent divergent and conserved amino acids (Fig. 6, pink and white, respectively). Notably, some of the differences between host and pathogen protein surfaces are very close to C_P (Fig. 6a-d, orange). For instance, AhpC-Prx1 from eukaryotes possesses a C-terminal α -

helix and some other specific features involved in the increased susceptibility to hyperoxidation that are close to C_P and are absent in most prokaryotes (Wood et al. 2003) (Fig. 6a, light green). Furthermore, the Thr residue from the catalytic triad is replaced by a Ser residue in some pathogenic bacteria (*Staphylococcus* sp. and *Bacillus* sp., among others), fungi (Saccharomycetales), and protozoans (*Leishmania* sp.) but is almost inexistent in the hosts (unpublished data). This single substitution confers considerable structural and functional differences between Prx containing Thr or Ser (Tairum et al. 2016). The Thr/Ser substitution may also provide a different microenvironment to ligands targeted to Prx from hosts or to Prx from pathogens (Fig. 6a, red). For some pathogenic bacteria, such as *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* and *Vibrio cholerae*, the differences in the Prx5 isoform are accentuated as a consequence of a glutaredoxin fused to the C-terminal region (Fig. 6c), a feature that is not observed in animals and plants (Kim et al. 2003).

Peroxioredoxin Reductants

To perform efficient catalysis, Prx requires appropriate reductants for fast turnover and the Trx system is the most frequently employed. The Trx system comprises thioredoxin (Trx), thioredoxin reductase (TrxR), and NADPH as the electron source (Oliveira et al. 2010). Although Trx enzymes are highly conserved, TrxR enzymes are distinct between microorganisms/plants and mammals. In both cases, TrxR are obligate dimers, but the enzymes present low molecular weights (molecular mass of monomers ~33 kDa) in bacteria, fungi and plants. In mammals, TrxR possesses ~50 kDa per monomer and contain a selenocysteine residue (Oliveira et al. 2010).

Notably, in bacteria there is a specialized Trx system, named AhpF, for the reduction of enzymes belonging to the AhpC-Prx1 class. AhpF is a multidomain enzyme, containing a TrxR portion fused to two molecules of Trx in a single polypeptide chain. Although AhpF can use either NADH or NADPH as the electron donor, NADH is the favored reductant (~100 ×), in contrast to the canonical Trx system that preferentially utilizes NADPH (Poole and Ellis 1996). In *Mycobacterium tuberculosis*, another specialized system for the reduction of some AhpC-Prx1 isoforms is present. This system comprises AhpD, a bacterial protein with thioredoxin-like activity but without significant structural homology to Trx, that acts together with dihydrolipoamide succinyltransferase (SucB) and dihydrolipoamide dehydrogenase (Lpd), also using electrons from NADH (Bryk et al. 2002).

Protozoans from the *Trypanosoma* and *Leishmania* genera present another unique thiol-disulfide network that is able to reduce AhpC-Prx1 members (so-called in trypanosomatids as tryparedoxin peroxidase - TxnPx) (Netto et al. 2016; Piacenza et al. 2008). The system uses NADH as an electron donor and includes the enzymes tryparedoxin (Txn), an oxidoreductase homologue of thioredoxin, and tryparedoxin reductase (TR), a flavoenzyme that is structurally similar to the high molecular weight TrxR. The system also comprises trypanothione (TSH), an abundant low molecular weight thiol that is present solely in trypanosomatids (Jaeger and Flohe 2006). In this case, peroxiredoxin disulfide is directly reduced by Txn, which in turn is restored to the reduced state by trypanothione. The oxidized trypanothione molecules are reduced by TR using NADH.

In some cases (Prx5 and Prx6 classes) the reductive system is composed by glutaredoxin (Grx), glutathione (GSH), glutathione reductase (GR) and NADPH (Pedrajas et al. 2016). In this system, GSH acts as a proton donor to C_P-SOH, forming a mixed disulfide with glutathione (C_P-S-SG), which is reduced by Grx, generating reduced Prx for a new catalytic round. A second GSH molecule recovers reduced Grx, generating oxidized glutathione (GSSG), which is further reduced by the enzyme glutathione reductase using electrons from NADPH. As mentioned before, in some bacteria, Prx5 is fused to a Grx domain (Kim et al. 2003).

The classes Prx6 and AhpE are mostly composed of peroxiredoxins that possess only one catalytic cysteine, the peroxidatic residue. Therefore, the C_P-SOH intermediate is directly reduced by distinct agents. Although several biological reductant substrates were tested, most of them fail to reduce microbial Prx6 or AhpE (Longo et al. 2020; Rocha et al. 2018). In fact, to date, only one microbial peroxiredoxin from the Prx6 class (Prx1 from *S. cerevisiae*) is reduced by a Trx system that is located in mitochondria.

In contrast, ascorbate is a general reductant for Prx6 enzymes (Anschau et al. 2020). Initially, we demonstrated that the sulfenic acids in AhpE from *M. tuberculosis*, yeast Prx1 and mammalian Prx6 are reduced by ascorbate, the only biological and non thiolic reductant described for peroxiredoxins so far (Monteiro et al. 2007). Later, we determined that Prx6 isoforms from pathogenic microorganisms, such as bacteria (LsfA, *P. aeruginosa*) are reduced by ascorbate at moderate rates (Anschau et al. 2020).

AhpE from *M. tuberculosis* also presents a thiolic enzymatic system that is involved in its reduction, which is represented by mycoredoxin (Mrx1), mycothiol disulfide reductase (MR), and a low molecular weight thiolic compound named mycothiol (MYC), described only in the actinobacteria group (Hugo et al. 2014).

Unique aspects such as reductive systems are often acquired by some groups of microorganisms and can be exploited as alternative therapeutic treatment. Indeed, the existing alternative systems in pathogenic microorganisms are considered important chemotherapeutic targets (Budde and Flohe 2003).

Substrate diversity and protective roles of peroxiredoxins

Prx enzymes from several microbial pathogens decompose hydrogen peroxide and peroxynitrite very efficiently, displaying rate constants ranging from 10^4 to 10^8 M⁻¹s⁻¹ (Pineyro et al. 2011; Reyes et al. 2016; Tairum et al. 2016). The reduction of OHPs by Prx is also efficient (up to 10^8 M⁻¹s⁻¹) and is important for pathogen survival (Estelle et al. 2020; Jacobson et al. 1989; Reyes et al. 2011). However, the vast majority of studies utilized synthetic organic molecules such as tert-butyl (*t*-BOOH) and cumene (CHP) hydroperoxides to mimic biological OHPs and members of all Prx classes efficiently decompose these molecules (Akerman and Muller 2005; Baker and Poole 2003; Parsonage et al. 2008; Tairum et al. 2016). It is important to note that OHPs are bulkier than hydrogen peroxide or peroxynitrite, indicating that Prx active sites are large and hydrophobic to accommodate such distinct molecules.

In a few cases, the biological significance of OHPs for some classes of Prx were investigated (Table 1). In *H. pylori*, AhpC and BCP decompose OHP with rate constants of approximately 10^5 M⁻¹s⁻¹, making the pathogen tolerant to oxidative stress (Baker et al. 2001). *M. tuberculosis* AhpE achieves rate constants of approximately 10^8 M⁻¹s⁻¹ over arachidonic acid hydroperoxide (15-HpETE), a very bulky hydroperoxide produced by reticulocytes, eosinophils, and T-lymphocytes (Reyes et al. 2011). Interestingly, AhpE is detected in the membrane fraction of *M. tuberculosis* (Gu et al. 2003). In *Paracoccidioides brasiliensis*, a Prx6 isoform can decompose linoleic hydroperoxide more efficiently than *t*-BOOH and CHP (3-8-fold higher, respectively) (Longo et al. 2020). Accordingly, linoleic and linolenic acid hydroperoxides are also of high importance in infection by pathogens due to their pronounced microbicidal effect (Estelle et al. 2020).

It is important to emphasize that although hydroperoxides can be useful in defense against pathogens, they can also be hazardous to the host. As expected, Prx from the host are also very reactive towards distinct hydroperoxides as mentioned above (Rhee and Kil 2017).

Effects of Prx inactivation in pathogenic microorganism cells

As a general trend, silencing of Prx from distinct groups renders cells more sensitivity to hydroperoxides insults (Castro et al. 2020; Comtois et al. 2003; Cosgrove et al. 2007; Hillmann et al. 2016; Missall et al. 2004; Rocha et al. 2018; Teixeira et al. 2015). Their importance in hydroperoxide decomposition can be, as an example, associated with DNA protection. In fact, the first bacterial peroxiredoxins (AhpC from *Escherichia coli* and *S. typhimurium*) were described by the observation that strains lacking their genes present high mutation rates, while strains overexpressing AhpC suppress these mutations (Storz et al. 1987). Later, this protective role was related to the ability of AhpC to decompose OHPs (Jacobson et al. 1989). The protective role due to OHPs decomposition by Prx was also observed in other bacterial species and eukaryotic microorganisms. As an example, Δ ahpC from *Bacteroides fragilis* presents five times more mutations than the wild-type strain (Rocha and Smith 1999). Accordingly, the deletion of one or more Prx isoforms in *S. cerevisiae* is not lethal but compromises genome stability (Ogusucu et al. 2009). In *Candida albicans*, the Δ tsa1 strains also present increased mutation rates, indicating that Prx is a factor that contributes to genome stability (Urban et al. 2005). The protective role of Prx in DNA integrity was also observed under nitrosative stress in *Trypanosoma brucei*. Strains defective in the enzyme uracil-DNA glycosylase (UNG), a component of the base excision DNA repair system, exhibit reduced infectivity and increased levels of DNA damage (Yague-Capilla et al. 2019). Notably, the surviving cells of the *T. brucei* Δ ung strain present increased expression of AhpC-Prx1 peroxiredoxin (Tryp1), which is correlated with peroxynitrite detoxification (Yague-Capilla et al. 2019).

Another mechanism by which Prx provides protection is the switch from peroxidase to chaperone activity, which confers thermal tolerance of cells to heat shock. As we described before, this switch is well known to occur by C_P hyperoxidation due to high concentrations of hydroperoxides (Jang et al. 2004). This functional switch can also occur as a consequence of thermal insults, but the underlying mechanism is still poorly understood. Since almost all bacteria are very resistant to C_P hyperoxidation (Wood et al. 2003), the acquisition of chaperone activity probably occurs mainly by heat shock. In this regard, there are few descriptions on the chaperone activities of bacterial Prx isoforms (Buranajitpakorn et al. 2011; Kamariah et al. 2018). The chaperone function of *E. coli* AhpC was mostly investigated by *in vitro* studies. In one case, no evidence of heat shock protection by AhpC in *Xanthomonas campestris* was obtained, using null mutants (Buranajitpakorn et al. 2011). Indeed, *in vivo* data are scarce and incomplete.

In fungi, the acquisition of chaperone function by heat shock and by C_P hyperoxidation is well characterized in *S. cerevisiae*. *In vitro* and *in vivo* studies revealed that two cytosolic isoforms of the AhpC-Prx1 class, Tsa1 and Tsa2, undergo transitions from peroxidase to chaperones as a result of oxidative stress and thermal insults and null individual mutants or the double mutant Δ tsa1/ Δ tsa2 present a significant reduction in cell viability compared with the wild-type strain (Jang et al. 2004). A decrease in cell survival as a consequence of thermal insult has also been reported in *Cryptococcus neoformans* Δ tsa1 (Missall et al. 2004).

In protozoans, the investigation is also incomplete. The AhpC-Prx1 enzymes from *Schistosoma mansoni* and *Leishmania infantum* were described to switch from peroxidase to chaperone in response to oxidative stress or heat shock (Saccoccia et al. 2012; Teixeira et al. 2015). Furthermore, genetic inactivation of this *L. infantum* mitochondrial AhpC-Prx1 isoform (Δ mtxnp_x) rendered cells with a thermosensitive phenotype, with high levels of protein aggregation at 37°C (Teixeira et al. 2015), which is compatible to the physiological temperature of mammalian hosts during infection.

Besides inactivation of Prx by genetic approaches, the use of inhibitors is another way to interrogate the roles of these proteins in distinct pathogens. However, only a few microbial peroxiredoxin inhibitors were identified to date. For instance, showdomycin is a potent C-glycosyl nucleoside antibiotic isolated from *Streptomyces showdoensis* that was detected as a

ligand of catalytic cysteines of the *Staphylococcus aureus* AhpC (Bottcher and Sieber 2010). In protozoans, conoidin A was initially described as an inhibitor of host cell invasion by the pathogenic protozoan *Toxoplasma gondii*; later, it was demonstrated that this compound is able to bind covalently to the cysteine residues of TgPrxII, a peroxiredoxin belonging to the AhpC-Prx1 subclass (Haraldsen et al. 2009). Conoidin A also prevents the growth of *Plasmodium falciparum* and increases the sensitivity of the parasite to chloroquine, an antimalarial drug, in host cells. Therefore, inactivating Prx isoforms may be a promising approach to potentiate the death of pathogens that are resistant to multiple drugs. It is worth mentioning that both conoidin A and showdomycin are bulky molecules with large hydrophobic backbones, which may mimic large biological substrates, as OHPs.

Prx as virulence factors

Since Prx play important roles in pathogen survival, it is tempting to speculate that they may represent virulence factors. In fact, enzymes belonging to five of the six Prx classes were already related to pathogen virulence (Table 2). AhpC-Prx1 isoforms present virulence roles in *Helicobacter cinaedi* and *H. pylori*, since these bacteria that had their *ahpC* genes deleted could not to colonize the stomach. Furthermore, mice infected with Δ *ahpC* strains were more susceptible to killing by macrophages (Charoenlap et al. 2012; Olczak et al. 2003). Moreover, infecting both wild-type and mice defective in interleukin-10 (IL-10) production with *H. cinaedi* lacking the *ahpC* gene presents a reduced ability to colonize the intestine (Charoenlap et al. 2012).

In *Vibrio vulnificus*, a pathogenic marine bacterium, AhpC is related to both the bacterial capacity to grow during the infection of human intestinal cells and the ability to infect mice (Baek et al. 2009). Infecting wild-type mice with a Δ *ahpC* strain of *Listeria monocytogenes* diminishes the bacterial virulence. Furthermore, this Δ *ahpC* strain was virulent when infecting mice with iNOS deficiency, indicating that AhpC also protect bacteria against nitric oxide derived oxidants, such as peroxynitrite (Dons et al. 2014).

AhpC-Prx1 members from the *Mycobacterium* genus have been widely studied and are related with catalase and isoniazid (INH) a drug largely employed in the treatment of tuberculosis. *M. tuberculosis* is able to grow inside host macrophages using diverse strategies to detoxify distinct ROS and RNS. In addition, some strains of *M. tuberculosis* present INH resistance that is related to catalase (KatG) mutations (Rintiswati et al. 2011). INH is a prodrug that requires “activation” by KatG in order to inhibit enoyl-acyl carrier protein reductase from *M. tuberculosis* by the formation of an isonicotinoyl-NAD adduct (Yu et al. 2003). Mutants of KatG are defective in the activation of INH and also in the elimination of hydrogen peroxide. Therefore, increased levels of AhpC compensate the loss in KatG activity and are a relevant factor in the *M. tuberculosis* resistance to INH (Sherman et al. 1996).

Catalase (KatA) and AhpC also have compensatory roles in *S. aureus*, especially during aerobic growth, although KatA and AhpC are not required for virulence or for survival in murine models and inside human neutrophils (Cosgrove et al. 2007). AhpC deletion did not affect the virulence of *Porphyromonas gingivalis* and *S. typhimurium* using a murine model (Johnson et al. 2004; Taylor et al. 1998). Curiously, *Streptococcus pyogenes* Δ *ahpC* was less virulent in one of two murine models tested, suggesting a differential immune response according to the host's genetic background or a relationship with the infection technique (Brenot et al. 2005).

In the fungus *C. glabrata*, deletion of *tsa2* gene (AhpC-Prx1 class) has a profound impact on virulence compared with the Δ *tsa1* strain, while Tsa1 and Tsa2 are highly induced when challenge to neutrophils and are important for both the survival and growth of this pathogen in neutrophils (Gutierrez-Escobedo et al. 2020). Similarly, mice infected with *C. neoformans* Δ *tsa1* strains are able to survive for a longer period than animals infected with wild-type pathogenic yeast. Additionally, the levels of the pathogen in the lung and in the brain were

significantly lower in animals infected with the mutant strain (Missall et al. 2004). In contrast, *C. albicans* Tsa1 is an important component against oxidative stress, but it has no impact on virulence (Urban et al. 2005).

In *T. cruzi*, overexpression of two AhpC-Prx1 isoforms makes the pathogen more efficient against the oxidative defenses of macrophages, indicating virulence roles of both enzymes (Leitsch et al. 2018). In *Plasmodium berghei*, $\Delta prx1$ strains are not able to survive in a murine model (Usui et al. 2015). For *Entamoeba histolytica*, nonvirulent strains have low expression levels of AhpC-Prx1 and overexpression of this enzyme renders higher resistance to oxidative stress and partially restores pathogenicity to this strain, while gene deletion in virulent strains lead to avirulence (Davis et al. 2006). Deletion of the mitochondrial isoform of *L. infantum* decreases the long-term persistence of the pathogen in the liver and spleen of guinea pigs compared with the wild-type strain (Angelucci et al. 2016; Castro et al. 2011). Conversely, experiments using the *L. infantum* strain with a deletion of the glycosomal isoform Prx showed that this enzyme is dispensable for virulence in mice (Castro et al. 2020).

The roles of BCP-PrxQ class members in virulence were also investigated in some bacterial species. The *H. pylori* Δbcp mutant has a significantly lower ability to colonize and survive the mouse stomach than the wild-type, mainly after three weeks of infection (Wang et al. 2005). In contrast, *Helicobacter pullorum* $\Delta prx1$ and wild-type strains show no differences when challenged with hydrogen peroxide and peroxyxynitrite or during macrophage infection (Parente et al. 2017). *Brucella melitensis* expresses a BCP-PrxQ required for bacterial virulence in the caprine host, which is probably related to its capacity to survive inside host macrophages (Zygmunt et al. 2006). The BCP-PrxQ from the phytopathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* is able to repress the recognition of some pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) in tobacco. This BCP-PrxQ can also protect bacteria from lipid peroxidation, preventing the formation of oxylipin (Jain et al. 2018), a class of oxygenated derivatives of polyunsaturated fatty acids that contribute to plant defense.

Concerning the Tpx class, the *H. pylori* Δtpx strain has a reduced capacity to colonize the mouse stomach, revealing its importance during infection (Olczak et al. 2003). It is worth mentioning that isoforms from three Prx different classes are related to the virulence of *H. pylori*. Deletion of the *tpx* gene of *Enterococcus faecalis* affects survival during macrophage infection and dependence on virulence in a mouse peritonitis model (La Carbona et al. 2007). In *Streptococcus pneumoniae*, mice infected with the $\Delta tpxD$ strain show significantly longer survival. However, this difference is not observed during blood infection, which is probably related to the high oxygen levels in the respiratory system (Hajaj et al. 2012). Deletion of the *tpx* gene of *Salmonella enterica* makes the bacteria more sensitive to hydrogen peroxide than the single mutants of the other Prx. During macrophage infection, the Δtpx strain mutant is more sensitive, while no difference was detected in the mice infection model (Horst et al. 2010). *M. tuberculosis* mutants lacking *tpx* cannot grow in the organs of infected mice, fail to induce an inflammatory response and show low resistance to macrophage infections. Additionally, Tpx is able to protect *M. tuberculosis* against the RNS generated by macrophages, as demonstrated by infecting iNOS knockout host cells (Hu and Coates 2009). This is an important finding since *M. tuberculosis* AhpC-Prx1 isoforms are unable to exert virulence effects.

Studies on the virulence of members belonging to the Prx5 class are scarce. *V. vulnificus* strain lacking the *prx5* isoform causes a delay in the death of mice by intragastric infection (Lim et al. 2014). Remarkably, a Prx5-Grx fusion of *N. meningitidis* has been related to virulence, as verified using an *ex vivo* human whole blood model of meningococcal bacteremia (Aljannat et al. 2020). As mentioned before, the Prx5-Grx enzymes has no counterparts in the host and may represent an important target for drugs. In *A. fumigatus*, a Prx5 isoform has also been characterized as a virulence factor (Hillmann et al. 2016).

Only one bacterial Prx6 has been related to virulence until now. LsfA from *P. aeruginosa* is able to specifically protect bacteria against the NOX oxidative burst derived from macrophages. Additionally, using an acute pneumonia model, mice infected with the wild-type strain present improved survival rates compared with those with a mutant lacking the *lsfa* gene (Kaihami et al. 2014). The fungus *A. fumigatus* presents three Prx6 isoforms. Experiments using the individual mutant strains for each isoform revealed that the absence of only one of the enzymes (Prx1) causes lower mortality rates compared with the wild-type. Additionally, the organs of animals infected with the Δ *prx1* strain have an elevated rate of pathogenic cell death and a high production of immunological defense cells (Rocha et al. 2018). For *Magnaporthe oryzae*, the lack of an enzyme of the Prx6 class impacts virulence in a rice seedling root model (Mir et al. 2015). Finally, until now, no studies have been performed to examine the AhpE class in pathogenic microorganisms related to virulence.

Therefore, we described several cases in which Prx are involved or not the virulence and no obvious general rule emerge from these studies. It is important to observe that microorganisms contain a large repertoire of antioxidant enzymes to combat the insult by hydroperoxides. The understanding of the cooperation among antioxidant enzymes to combat oxidative insults in distinct stages of development and in different cell compartments is probably relevant to comprehend the complex mechanisms underlying virulence.

Concluding remarks

The relevance of Prx from microorganisms was proposed since their discovery in *S. typhimurium* and *E. coli* around thirty years ago. Over the years, with the increase in the functional and structural characterization of Prx in the most diverse organisms, as well as the identification of their reducing and oxidizing substrates, it has become clear that this group of enzymes is unique and has important roles in the establishment and progression of infectious diseases caused by microorganisms. Indeed, for a number of Prx among bacteria, fungi, and protozoans, their virulence role is already well established. Although studies have focused on the application of the knowledge acquired with Prx to combat pathogenic microorganisms, as inhibitors and vaccines, are still scarce, the advancement of knowledge concerning these proteins should stimulate this field of research, considering the global crisis faced by the growing resistance of pathogenic microorganisms to antimicrobials.

Compliance with Ethical Standards

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Funding

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). The authors M.A.O., C.A.T., L.E.S.N, R.L.A.S., A.L.P.O., V.I.M.C. and M.C.S. are members of the CEPID REDOXOMA from FAPESP (grant number 2013/07937-8). This work was also supported by grants from FAPESP to M.A.O. (2017/19942-7). C.A.T., A.L.P.O, R.L.A.S., V.I.M.C., M.C.S. and C.A.B. are recipients of fellowships from FAPESP (16/15849-0; 19/04054-4; 20/00845-4; 20/02868-1; 17/06263-4 and 11/13500-6, respectively).

Conflict of Interest

There is no conflict of interest and no benefit of any kind will be received either directly or indirectly by the authors.

Author contributions

All authors wrote, revised, edited and approved the final version of the paper.

References

- 1 Akerman SE, Muller S (2005) Peroxiredoxin-linked detoxification of hydroperoxides in
2 *Toxoplasma gondii*. J Biol Chem 280(1):564-70 doi:10.1074/jbc.M406367200
- 3 Aljannat MAK, Oldfield NJ, Albasri HM, Dorrington LKG, Ohri RL, Wooldridge KG, Turner
4 DPJ (2020) The moonlighting peroxiredoxin-glutaredoxin in *Neisseria meningitidis*
5 binds plasminogen via a C-terminal lysine residue and contributes to survival in a whole
6 blood model. Microb Pathog 139:103890 doi:10.1016/j.micpath.2019.103890
- 7 Andrade HM, Murta SM, Chapeaurouge A, Perales J, Nirde P, Romanha AJ (2008) Proteomic
8 analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole. J Proteome Res 7(6):2357-
9 67 doi:10.1021/pr700659m
- 10 Angelucci F, Miele AE, Ardini M, Boumis G, Saccoccia F, Bellelli A (2016) Typical 2-Cys
11 peroxiredoxins in human parasites: Several physiological roles for a potential
12 chemotherapy target. Mol Biochem Parasitol 206(1-2):2-12
13 doi:10.1016/j.molbiopara.2016.03.005
- 14 Anschau V, Ferrer-Sueta G, Aleixo-Silva RL, Bannitz Fernandes R, Tairum CA, Tonoli CCC,
15 Murakami MT, de Oliveira MA, Netto LES (2020) Reduction of sulfenic acids by
16 ascorbate in proteins, connecting thiol-dependent to alternative redox pathways. Free
17 Radic Biol Med 156:207-216 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.06.015
- 18 Baek WK, Lee HS, Oh MH, Koh MJ, Kim KS, Choi SH (2009) Identification of the *Vibrio*
19 *vulnificus* ahpCl gene and its influence on survival under oxidative stress and virulence.
20 J Microbiol 47(5):624-32 doi:10.1007/s12275-009-0130-x
- 21 Baker LM, Poole LB (2003) Catalytic mechanism of thiol peroxidase from *Escherichia coli*.
22 Sulfenic acid formation and overoxidation of essential CYS61. J Biol Chem
23 278(11):9203-11 doi:10.1074/jbc.M209888200
- 24 Baker LM, Raudonikienė A, Hoffman PS, Poole LB (2001) Essential thioredoxin-dependent
25 peroxiredoxin system from *Helicobacter pylori*: genetic and kinetic characterization. J
26 Bacteriol 183(6):1961-73 doi:10.1128/JB.183.6.1961-1973.2001
- 27 Bannitz-Fernandes R, Aleixo-Silva R, Silva JP, Dodia C, Vazquez-Medina JP, Tao JQ, Fisher
28 A, Netto L (2019) Non-Mammalian Prdx6 Enzymes (Proteins with 1-Cys Prdx
29 Mechanism) Display PLA(2) Activity Similar to the Human Orthologue. Antioxidants
30 (Basel) 8(3) doi:10.3390/antiox8030052
- 31 Bottcher T, Sieber SA (2010) Showdomycin as a versatile chemical tool for the detection of
32 pathogenesis-associated enzymes in bacteria. J Am Chem Soc 132(20):6964-72
33 doi:10.1021/ja909150y
- 34 Brenot A, King KY, Caparon MG (2005) The PerR regulon in peroxide resistance and virulence
35 of *Streptococcus pyogenes*. Mol Microbiol 55(1):221-34 doi:10.1111/j.1365-
36 2958.2004.04370.x
- 37 Bryk R, Lima CD, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Nathan C (2002) Metabolic enzymes of
38 mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. Science
39 295(5557):1073-7 doi:10.1126/science.1067798
- 40 Budde H, Flohe L (2003) Enzymes of the thiol-dependent hydroperoxide metabolism in
41 pathogens as potential drug targets. Biofactors 17(1-4):83-92
42 doi:10.1002/biof.5520170109
- 43 Buranajitpakorn S, Piwkam A, Charoenlap N, Vattanaviboon P, Mongkolsuk S (2011) Genes
44 for hydrogen peroxide detoxification and adaptation contribute to protection against
45 heat shock in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. FEMS Microbiol Lett
46 317(1):60-6 doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02211.x
- 47 Castro H, Rocha MI, Silva R, Oliveira F, Gomes-Alves AG, Cruz T, Duarte M, Tomas AM
48 (2020) Functional insight into the glycosomal peroxiredoxin of Leishmania. Acta Trop
49 201:105217 doi:10.1016/j.actatropica.2019.105217

- 1 Castro H, Teixeira F, Romao S, Santos M, Cruz T, Florido M, Appelberg R, Oliveira P,
2 Ferreira-da-Silva F, Tomas AM (2011) Leishmania mitochondrial peroxiredoxin plays
3 a crucial peroxidase-unrelated role during infection: insight into its novel chaperone
4 activity. PLoS Pathog 7(10):e1002325 doi:10.1371/journal.ppat.1002325
- 5 Cha MK, Kim HK, Kim IH (1995) Thioredoxin-linked "thiol peroxidase" from periplasmic
6 space of *Escherichia coli*. J Biol Chem 270(48):28635-41
7 doi:10.1074/jbc.270.48.28635
- 8 Charoenlap N, Shen Z, McBee ME, Muthupalani S, Wogan GN, Fox JG, Schauer DB (2012)
9 Alkyl hydroperoxide reductase is required for *Helicobacter cinaedi* intestinal
10 colonization and survival under oxidative stress in BALB/c and BALB/c interleukin-
11 10-/- mice. Infect Immun 80(3):921-8 doi:10.1128/IAI.05477-11
- 12 Chen H, Liu Y, Zhao C, Xiao D, Zhang J, Zhang F, Chen M, Wang H (2013) Comparative
13 proteomics-based identification of genes associated with glycopeptide resistance in
14 clinically derived heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*
15 strains. PLoS One 8(6):e66880 doi:10.1371/journal.pone.0066880
- 16 Cho C, Lee GW, Hong SH, Kaur S, Jung KW, Jung JH, Lim S, Chung BY, Lee SS (2019)
17 Novel functions of peroxiredoxin Q from *Deinococcus radiodurans* R1 as a peroxidase
18 and a molecular chaperone. FEBS Lett 593(2):219-229 doi:10.1002/1873-3468.13302
- 19 Choi W, Yoo YJ, Kim M, Shin D, Jeon HB, Choi W (2003) Identification of proteins highly
20 expressed in the hyphae of *Candida albicans* by two-dimensional electrophoresis. Yeast
21 20(12):1053-60 doi:10.1002/yea.1022
- 22 Comtois SL, Gidley MD, Kelly DJ (2003) Role of the thioredoxin system and the thiol-
23 peroxidases Tpx and Bcp in mediating resistance to oxidative and nitrosative stress in
24 *Helicobacter pylori*. Microbiology (Reading) 149(Pt 1):121-9
25 doi:10.1099/mic.0.25896-0
- 26 Condeles AL, Gomes F, de Oliveira MA, Soares Netto LE, Toledo Junior JC (2020) Thiol
27 Peroxidases as Major Regulators of Intracellular Levels of Peroxynitrite in Live
28 *Saccharomyces cerevisiae* Cells. Antioxidants (Basel) 9(5) doi:10.3390/antiox9050434
- 29 Copley SD, Novak WR, Babbitt PC (2004) Divergence of function in the thioredoxin fold
30 suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor.
31 Biochemistry 43(44):13981-95 doi:10.1021/bi048947r
- 32 Cordray P, Doyle K, Edes K, Moos PJ, Fitzpatrick FA (2007) Oxidation of 2-Cys-
33 peroxiredoxins by arachidonic acid peroxide metabolites of lipoxygenases and
34 cyclooxygenase-2. J Biol Chem 282(45):32623-9 doi:10.1074/jbc.M704369200
- 35 Cosgrove K, Coutts G, Jonsson IM, Tarkowski A, Kokai-Kun JF, Mond JJ, Foster SJ (2007)
36 Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in
37 peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal
38 colonization in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 189(3):1025-35
39 doi:10.1128/JB.01524-06
- 40 Das UN (2018) Arachidonic acid and other unsaturated fatty acids and some of their metabolites
41 function as endogenous antimicrobial molecules: A review. J Adv Res 11:57-66
42 doi:10.1016/j.jare.2018.01.001
- 43 Davis PH, Zhang X, Guo J, Townsend RR, Stanley SL, Jr. (2006) Comparative proteomic
44 analysis of two *Entamoeba histolytica* strains with different virulence phenotypes
45 identifies peroxiredoxin as an important component of amoebic virulence. Mol
46 Microbiol 61(6):1523-32 doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05344.x
- 47 de Godoy LM, Marchini FK, Pavoni DP, Rampazzo Rde C, Probst CM, Goldenberg S, Krieger
48 MA (2012) Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis.
49 Proteomics 12(17):2694-703 doi:10.1002/pmic.201200078

- Dons LE, Mosa A, Rottenberg ME, Rosenkrantz JT, Kristensson K, Olsen JE (2014) Role of the *Listeria monocytogenes* 2-Cys peroxiredoxin homologue in protection against oxidative and nitrosative stress and in virulence. *Pathog Dis* 70(1):70-4 doi:10.1111/2049-632X.12081
- Dwyer DJ, Belenky PA, Yang JH, MacDonald IC, Martell JD, Takahashi N, Chan CT, Lobritz MA, Braff D, Schwarz EG, Ye JD, Pati M, Vercruysse M, Ralifo PS, Allison KR, Khalil AS, Ting AY, Walker GC, Collins JJ (2014) Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(20):E2100-9 doi:10.1073/pnas.1401876111
- Enany S, Yoshida Y, Yamamoto T (2014) Exploring extra-cellular proteins in methicillin susceptible and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *World J Microbiol Biotechnol* 30(4):1269-83 doi:10.1007/s11274-013-1550-7
- Estelle D, Laurence L, Marc O, Caroline C, Magali D, Marie-Laure F (2020) Linolenic fatty acid hydroperoxide acts as biocide on plant pathogenic bacteria: Biophysical investigation of the mode of action. *Bioorg Chem* 100:103877 doi:10.1016/j.bioorg.2020.103877
- Fereig RM, Kuroda Y, Terkawi MA, Mahmoud ME, Nishikawa Y (2017) Immunization with *Toxoplasma gondii* peroxiredoxin 1 induces protective immunity against toxoplasmosis in mice. *PLoS One* 12(4):e0176324 doi:10.1371/journal.pone.0176324
- Fisher RA, Gollan B, Helaine S (2017) Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol* 15(8):453-464 doi:10.1038/nrmicro.2017.42
- Francis KP, Taylor PD, Inchley CJ, Gallagher MP (1997) Identification of the ahp operon of *Salmonella typhimurium* as a macrophage-induced locus. *J Bacteriol* 179(12):4046-8 doi:10.1128/jb.179.12.4046-4048.1997
- Gaschler MM, Stockwell BR (2017) Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 482(3):419-425 doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.086
- Gautam P, Mushahary D, Hassan W, Upadhyay SK, Madan T, Sirdeshmukh R, Sundaram CS, Sarma PU (2016) In-depth 2-DE reference map of *Aspergillus fumigatus* and its proteomic profiling on exposure to itraconazole. *Med Mycol* 54(5):524-36 doi:10.1093/mmy/myv122
- Gautam P, Shankar J, Madan T, Sirdeshmukh R, Sundaram CS, Gade WN, Basir SF, Sarma PU (2008) Proteomic and transcriptomic analysis of *Aspergillus fumigatus* on exposure to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 52(12):4220-7 doi:10.1128/AAC.01431-07
- Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425(6959):737-41 doi:10.1038/nature02046
- Gu S, Chen J, Dobos KM, Bradbury EM, Belisle JT, Chen X (2003) Comprehensive proteomic profiling of the membrane constituents of a *Mycobacterium tuberculosis* strain. *Mol Cell Proteomics* 2(12):1284-96 doi:10.1074/mcp.M300060-MCP200
- Gutierrez-Escobedo G, Hernandez-Carreón O, Morales-Rojano B, Revuelta-Rodríguez B, Vázquez-Franco N, Castano I, De Las Penas A (2020) *Candida glabrata* peroxiredoxins, Tsa1 and Tsa2, and sulfiredoxin, Srx1, protect against oxidative damage and are necessary for virulence. *Fungal Genet Biol* 135:103287 doi:10.1016/j.fgb.2019.103287
- Hajaj B, Yesilkaya H, Benisty R, David M, Andrew PW, Porat N (2012) Thiol peroxidase is an important component of *Streptococcus pneumoniae* in oxygenated environments. *Infect Immun* 80(12):4333-43 doi:10.1128/IAI.00126-12

- 1 Hall A, Karplus PA, Poole LB (2009) Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms
2 and functions. FEBS J 276(9):2469-77 doi:10.1111/j.1742-4658.2009.06985.x
- 3 Hall A, Nelson K, Poole LB, Karplus PA (2011) Structure-based insights into the catalytic
4 power and conformational dexterity of peroxiredoxins. Antioxid Redox Signal
5 15(3):795-815 doi:10.1089/ars.2010.3624
- 6 Hall A, Parsonage D, Poole LB, Karplus PA (2010) Structural evidence that peroxiredoxin
7 catalytic power is based on transition-state stabilization. J Mol Biol 402(1):194-209
8 doi:10.1016/j.jmb.2010.07.022
- 9 Halliwell B, Gutteridge JMC (2015) Free radicals in biology and medicine, Fifth edition. edn.
10 Oxford University Press, Oxford, United Kingdom ;
- 11 Haraldsen JD, Liu G, Botting CH, Walton JG, Storm J, Phalen TJ, Kwok LY, Soldati-Favre D,
12 Heintz NH, Muller S, Westwood NJ, Ward GE (2009) Identification of Conoidin A as a
13 Covalent Inhibitor of Peroxiredoxin II. Org Biomol Chem 7:3040-3048
14 doi:10.1039/B901735F
- 15 Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR (2007) Seleno-independent glutathione peroxidases.
16 More than simple antioxidant scavengers. FEBS J 274(9):2163-80 doi:10.1111/j.1742-
17 4658.2007.05774.x
- 18 Hicks LD, Raghavan R, Battisti JM, Minnick MF (2010) A DNA-binding peroxiredoxin of
19 *Coxiella burnetii* is involved in countering oxidative stress during exponential-phase
20 growth. J Bacteriol 192(8):2077-84 doi:10.1128/JB.01324-09
- 21 Hillar A, Peters B, Pauls R, Loboda A, Zhang H, Mauk AG, Loewen PC (2000) Modulation of
22 the activities of catalase-peroxidase HPI of *Escherichia coli* by site-directed
23 mutagenesis. Biochemistry 39(19):5868-75 doi:10.1021/bi0000059
- 24 Hillmann F, Bagramyan K, Strassburger M, Heinekamp T, Hong TB, Bzymek KP, Williams
25 JC, Brakhage AA, Kalkum M (2016) The Crystal Structure of Peroxiredoxin Asp f3
26 Provides Mechanistic Insight into Oxidative Stress Resistance and Virulence of
27 *Aspergillus fumigatus*. Sci Rep 6:33396 doi:10.1038/srep33396
- 28 Horst SA, Jaeger T, Denkel LA, Rouf SF, Rhen M, Bange FC (2010) Thiol peroxidase protects
29 *Salmonella enterica* from hydrogen peroxide stress *in vitro* and facilitates intracellular
30 growth. J Bacteriol 192(11):2929-32 doi:10.1128/JB.01652-09
- 31 Hu Y, Coates AR (2009) Acute and persistent *Mycobacterium tuberculosis* infections depend
32 on the thiol peroxidase TpX. PLoS One 4(4):e5150 doi:10.1371/journal.pone.0005150
- 33 Hugo M, Van Laer K, Reyes AM, Vertommen D, Messens J, Radi R, Trujillo M (2014)
34 Mycothiol/mycoredoxin 1-dependent reduction of the peroxiredoxin AhpE from
35 *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem 289(8):5228-39
36 doi:10.1074/jbc.M113.510248
- 37 Jacobson FS, Morgan RW, Christman MF, Ames BN (1989) An alkyl hydroperoxide reductase
38 from *Salmonella typhimurium* involved in the defense of DNA against oxidative
39 damage. Purification and properties. J Biol Chem 264(3):1488-96
- 40 Jaeger T, Flohe L (2006) The thiol-based redox networks of pathogens: unexploited targets in
41 the search for new drugs. Biofactors 27(1-4):109-20 doi:10.1002/biof.5520270110
- 42 Jain M, Munoz-Bodnar A, Zhang S, Gabriel DW (2018) A Secreted 'Candidatus Liberibacter
43 asiaticus' Peroxiredoxin Simultaneously Suppresses Both Localized and Systemic
44 Innate Immune Responses In Planta. Mol Plant Microbe Interact 31(12):1312-1322
45 doi:10.1094/MPMI-03-18-0068-R
- 46 Jang HH, Lee KO, Chi YH, Jung BG, Park SK, Park JH, Lee JR, Lee SS, Moon JC, Yun JW,
47 Choi YO, Kim WY, Kang JS, Cheong GW, Yun DJ, Rhee SG, Cho MJ, Lee SY (2004)
48 Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent
49 switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. Cell 117(5):625-35
50 doi:10.1016/j.cell.2004.05.002

- 1 Johnson NA, Liu Y, Fletcher HM (2004) Alkyl hydroperoxide peroxidase subunit C (ahpC)
2 protects against organic peroxides but does not affect the virulence of *Porphyromonas*
3 *gingivalis* W83. Oral Microbiol Immunol 19(4):233-9 doi:10.1111/j.1399-
4 302X.2004.00145.x
- 5 Kaihami GH, Almeida JR, Santos SS, Netto LE, Almeida SR, Baldini RL (2014) Involvement
6 of a 1-Cys peroxiredoxin in bacterial virulence. PLoS Pathog 10(10):e1004442
7 doi:10.1371/journal.ppat.1004442
- 8 Kamariah N, Eisenhaber B, Eisenhaber F, Gruber G (2018) Molecular mechanism of the
9 *Escherichia coli* AhpC in the function of a chaperone under heat-shock conditions. Sci
10 Rep 8(1):14151 doi:10.1038/s41598-018-32527-7
- 11 Kaneva IN, Longworth J, Sudbery PE, Dickman MJ (2018) Quantitative Proteomic Analysis
12 in *Candida albicans* Using SILAC-Based Mass Spectrometry. Proteomics 18(5-
13 6):e1700278 doi:10.1002/pmhc.201700278
- 14 Kim SJ, Woo JR, Hwang YS, Jeong DG, Shin DH, Kim K, Ryu SE (2003) The tetrameric
15 structure of *Haemophilus influenza* hybrid Prx5 reveals interactions between electron
16 donor and acceptor proteins. J Biol Chem 278(12):10790-8
17 doi:10.1074/jbc.M209553200
- 18 Kumar B, Sharma D, Sharma P, Katoch VM, Venkatesan K, Bisht D (2013) Proteomic analysis
19 of *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to kanamycin and amikacin. J
20 Proteomics 94:68-77 doi:10.1016/j.jprot.2013.08.025
- 21 La Carbona S, Sauvageot N, Giard JC, Benachour A, Posteraro B, Auffray Y, Sanguinetti M,
22 Hartke A (2007) Comparative study of the physiological roles of three peroxidases
23 (NADH peroxidase, Alkyl hydroperoxide reductase and Thiol peroxidase) in oxidative
24 stress response, survival inside macrophages and virulence of *Enterococcus faecalis*.
25 Mol Microbiol 66(5):1148-63 doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05987.x
- 26 Lam PL, Wong RS, Lam KH, Hung LK, Wong MM, Yung LH, Ho YW, Wong WY, Hau DK,
27 Gambari R, Chui CH (2020) The role of reactive oxygen species in the biological
28 activity of antimicrobial agents: An updated mini review. Chem Biol Interact
29 320:109023 doi:10.1016/j.cbi.2020.109023
- 30 Leitsch D, Williams CF, Hrdy I (2018) Redox Pathways as Drug Targets in Microaerophilic
31 Parasites. Trends Parasitol 34(7):576-589 doi:10.1016/j.pt.2018.04.007
- 32 Li W, Zhang S, Wang X, Yu J, Li Z, Lin W, Lin X (2018) Systematically integrated
33 metabonomic-proteomic studies of *Escherichia coli* under ciprofloxacin stress. J
34 Proteomics 179:61-70 doi:10.1016/j.jprot.2018.03.002
- 35 Lim JG, Bang YJ, Choi SH (2014) Characterization of the *Vibrio vulnificus* 1-Cys
36 peroxiredoxin Prx3 and regulation of its expression by the Fe-S cluster regulator IscR
37 in response to oxidative stress and iron starvation. J Biol Chem 289(52):36263-74
38 doi:10.1074/jbc.M114.611020
- 39 Longo LVG, Breyer CA, Novaes GM, Gegembauer G, Leitao NP, Jr., Octaviano CE, Toyama
40 MH, de Oliveira MA, Puccia R (2020) The Human Pathogen *Paracoccidioides*
41 *brasiliensis* Has a Unique 1-Cys Peroxiredoxin That Localizes Both Intracellularly and
42 at the Cell Surface. Front Cell Infect Microbiol 10:394 doi:10.3389/fcimb.2020.00394
- 43 Lynch AS, Robertson GT (2008) Bacterial and fungal biofilm infections. Annu Rev Med
44 59:415-28 doi:10.1146/annurev.med.59.110106.132000
- 45 Mastronicola D, Falabella M, Testa F, Pucillo LP, Teixeira M, Sarti P, Saraiva LM, Giuffre A
46 (2014) Functional characterization of peroxiredoxins from the human protozoan
47 parasite *Giardia intestinalis*. PLoS Negl Trop Dis 8(1):e2631
48 doi:10.1371/journal.pntd.0002631
- 49 Medzhitov R (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response.
50 Nature 449(7164):819-26 doi:10.1038/nature06246

- 1 Mir AA, Park SY, Abu Sadat M, Kim S, Choi J, Jeon J, Lee YH (2015) Systematic
2 characterization of the peroxidase gene family provides new insights into fungal
3 pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. Sci Rep 5:11831 doi:10.1038/srep11831
- 4 Mishra Y, Hall M, Locmelis R, Nam K, Soderberg CAG, Storm P, Chaurasia N, Rai LC,
5 Jansson S, Schroder WP, Sauer UH (2017) Active-site plasticity revealed in the
6 asymmetric dimer of AnPrx6 the 1-Cys peroxiredoxin and molecular chaperone from
7 *Anabaena* sp. PCC 7210. Sci Rep 7(1):17151 doi:10.1038/s41598-017-17044-3
- 8 Missall TA, Pusateri ME, Lodge JK (2004) Thiol peroxidase is critical for virulence and
9 resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus*
10 *neoformans*. Mol Microbiol 51(5):1447-58 doi:10.1111/j.1365-2958.2004.03921.x
- 11 Monteiro G, Horta BB, Pimenta DC, Augusto O, Netto LE (2007) Reduction of 1-Cys
12 peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing
13 another function of vitamin C. Proc Natl Acad Sci U S A 104(12):4886-91
14 doi:10.1073/pnas.0700481104
- 15 Morais MAB, Giuseppe PO, Souza T, Castro H, Honorato RV, Oliveira PSL, Netto LES,
16 Tomas AM, Murakami MT (2017) Calcium and magnesium ions modulate the
17 oligomeric state and function of mitochondrial 2-Cys peroxiredoxins in Leishmania
18 parasites. J Biol Chem 292(17):7023-7039 doi:10.1074/jbc.M116.762039
- 19 Murphy TF, Kirkham C, Sethi S, Lesse AJ (2005) Expression of a peroxiredoxin-glutaredoxin
20 by *Haemophilus influenzae* in biofilms and during human respiratory tract infection.
21 FEMS Immunol Med Microbiol 44(1):81-9 doi:10.1016/j.femsim.2004.12.008
- 22 Nelson KJ, Knutson ST, Soito L, Klomsiri C, Poole LB, Fetrow JS (2011) Analysis of the
23 peroxiredoxin family: using active-site structure and sequence information for global
24 classification and residue analysis. Proteins 79(3):947-64 doi:10.1002/prot.22936
- 25 Netto LE, de Oliveira MA, Tairum CA, da Silva Neto JF (2016) Conferring specificity in redox
26 pathways by enzymatic thiol/disulfide exchange reactions. Free Radic Res 50(2):206-
27 45 doi:10.3109/10715762.2015.1120864
- 28 Nurnberger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L (2004) Innate immunity in plants and
29 animals: striking similarities and obvious differences. Immunol Rev 198:249-66
30 doi:10.1111/j.0105-2896.2004.0119.x
- 31 O'Riordan AA, Morales VA, Mulligan L, Faheem N, Windle HJ, Kelleher DP (2012) Alkyl
32 hydroperoxide reductase: a candidate *Helicobacter pylori* vaccine. Vaccine
33 30(26):3876-84 doi:10.1016/j.vaccine.2012.04.002
- 34 Ogusucu R, Rettori D, Netto LE, Augusto O (2009) Superoxide dismutase 1-mediated
35 production of ethanol- and DNA-derived radicals in yeasts challenged with hydrogen
36 peroxide: molecular insights into the genome instability of peroxiredoxin-null strains. J
37 Biol Chem 284(9):5546-56 doi:10.1074/jbc.M805526200
- 38 Olczak AA, Seyler RW, Jr., Olson JW, Maier RJ (2003) Association of *Helicobacter pylori*
39 antioxidant activities with host colonization proficiency. Infect Immun 71(1):580-3
40 doi:10.1128/iai.71.1.580-583.2003
- 41 Oliveira MA, Discola KF, Alves SV, Medrano FJ, Guimaraes BG, Netto LE (2010) Insights
42 into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and
43 functional investigation of the yeast thioredoxin system. Biochemistry 49(15):3317-26
44 doi:10.1021/bi901962p
- 45 Parente MR, Forte E, Falabella M, Boneca IG, Teixeira M, Giuffre A, Saraiva LM (2017)
46 Nitrosative stress defences of the enterohepatic pathogenic bacterium *Helicobacter*
47 *pullorum*. Sci Rep 7(1):9909 doi:10.1038/s41598-017-10375-1
- 48 Park SG, Cha MK, Jeong W, Kim IH (2000) Distinct physiological functions of thiol peroxidase
49 isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 275(8):5723-32
50 doi:10.1074/jbc.275.8.5723

- 1 Parsonage D, Karplus PA, Poole LB (2008) Substrate specificity and redox potential of AhpC,
2 a bacterial peroxiredoxin. Proc Natl Acad Sci U S A 105(24):8209-14
3 doi:10.1073/pnas.0708308105
- 4 Patel TK, Williamson JD (2016) Mannitol in Plants, Fungi, and Plant-Fungal Interactions.
5 Trends Plant Sci 21(6):486-497 doi:10.1016/j.tplants.2016.01.006
- 6 Pedrajas JR, McDonagh B, Hernandez-Torres F, Miranda-Vizuete A, Gonzalez-Ojeda R,
7 Martinez-Galisteo E, Padilla CA, Barcena JA (2016) Glutathione Is the Resolving Thiol
8 for Thioredoxin Peroxidase Activity of 1-Cys Peroxiredoxin Without Being Consumed
9 During the Catalytic Cycle. Antioxid Redox Signal 24(3):115-28
10 doi:10.1089/ars.2015.6366
- 11 Perkins A, Nelson KJ, Parsonage D, Poole LB, Karplus PA (2015) Peroxiredoxins: guardians
12 against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. Trends Biochem Sci
13 40(8):435-45 doi:10.1016/j.tibs.2015.05.001
- 14 Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Kelly JM, Wilkinson SR, Radi R (2008) Peroxiredoxins
15 play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and
16 endogenously-derived peroxynitrite. Biochem J 410(2):359-68
17 doi:10.1042/BJ20071138
- 18 Pineyro MD, Arcari T, Robello C, Radi R, Trujillo M (2011) Tryparedoxin peroxidases from
19 *Trypanosoma cruzi*: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide
20 and peroxynitrite. Arch Biochem Biophys 507(2):287-95
21 doi:10.1016/j.abb.2010.12.014
- 22 Poole LB, Ellis HR (1996) Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella*
23 *typhimurium*. 1. Purification and enzymatic activities of overexpressed AhpF and AhpC
24 proteins. Biochemistry 35(1):56-64 doi:10.1021/bi951887s
- 25 Poole LB, Hall A, Nelson KJ (2011) Overview of peroxiredoxins in oxidant defense and redox
26 regulation. Curr Protoc Toxicol Chapter 7:Unit7 9 doi:10.1002/0471140856.tx0709s49
- 27 Poole LB, Nelson KJ (2016) Distribution and Features of the Six Classes of Peroxiredoxins.
28 Mol Cells 39(1):53-9 doi:10.14348/molcells.2016.2330
- 29 Prolo C, Alvarez MN, Radi R (2014) Peroxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing
30 cytotoxin to combat invading pathogens. Biofactors 40(2):215-25
31 doi:10.1002/biof.1150
- 32 Radi R (2018) Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular
33 medicine. Proc Natl Acad Sci U S A 115(23):5839-5848 doi:10.1073/pnas.1804932115
- 34 Repolês BM, Machado CR, Florentino PT (2020) DNA lesions and repair in trypanosomatids
35 infection. Genetics and Molecular Biology 43(1)
- 36 Reyes AM, Hugo M, Trostchansky A, Capece L, Radi R, Trujillo M (2011) Oxidizing substrate
37 specificity of *Mycobacterium tuberculosis* alkyl hydroperoxide reductase E: kinetics
38 and mechanisms of oxidation and overoxidation. Free Radic Biol Med 51(2):464-73
39 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.023
- 40 Reyes AM, Vazquez DS, Zeida A, Hugo M, Pineyro MD, De Armas MI, Estrin D, Radi R,
41 Santos J, Trujillo M (2016) PrxQ B from *Mycobacterium tuberculosis* is a monomeric,
42 thioredoxin-dependent and highly efficient fatty acid hydroperoxide reductase. Free
43 Radic Biol Med 101:249-260 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.005
- 44 Rhee SG, Kil IS (2017) Multiple Functions and Regulation of Mammalian Peroxiredoxins.
45 Annu Rev Biochem 86:749-775 doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014431
- 46 Richard D, Bartfai R, Volz J, Ralph SA, Muller S, Stunnenberg HG, Cowman AF (2011) A
47 genome-wide chromatin-associated nuclear peroxiredoxin from the malaria parasite
48 *Plasmodium falciparum*. J Biol Chem 286(13):11746-55 doi:10.1074/jbc.M110.198499

- Rintiswati N, Wibawa T, Asmara W, Soebono H (2011) Effect of oxidative stress on AhpC activity and virulence in katG Ser315 Thr *Mycobacterium tuberculosis* mutant. Indonesian Journal of Biotechnology 16(2):100-110
- Rocha ER, Smith CJ (1999) Role of the alkyl hydroperoxide reductase (ahpCF) gene in oxidative stress defense of the obligate Anaerobe *Bacteroides fragilis*. J Bacteriol 181(18):5701-10 doi:10.1128/JB.181.18.5701-5710.1999
- Rocha MC, de Godoy KF, Bannitz-Fernandes R, Fabri J, Barbosa MMF, de Castro PA, Almeida F, Goldman GH, da Cunha AF, Netto LES, de Oliveira MA, Malavazi I (2018) Analyses of the three 1-Cys Peroxiredoxins from *Aspergillus fumigatus* reveal that cytosolic Prx1 is central to H₂O₂ metabolism and virulence. Sci Rep 8(1):12314 doi:10.1038/s41598-018-30108-2
- Rodrigues AM, Kubitschek-Barreira PH, Pinheiro BG, Teixeira-Ferreira A, Hahn RC, de Camargo ZP (2020) Immunoproteomic Analysis Reveals Novel Candidate Antigens for the Diagnosis of Paracoccidioidomycosis Due to *Paracoccidioides lutzii*. J Fungi (Basel) 6(4) doi:10.3390/jof6040357
- Saccoccia F, Di Micco P, Boumis G, Brunori M, Koutris I, Miele AE, Morea V, Sriratana P, Williams DL, Bellelli A, Angelucci F (2012) Moonlighting by different stressors: crystal structure of the chaperone species of a 2-Cys peroxiredoxin. Structure 20(3):429-39 doi:10.1016/j.str.2012.01.004
- Seaver LC, Imlay JA (2001) Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. J Bacteriol 183(24):7173-81 doi:10.1128/JB.183.24.7173-7181.2001
- Sherman DR, Mdluli K, Hickey MJ, Arain TM, Morris SL, Barry CE, 3rd, Stover CK (1996) Compensatory ahpC gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Science 272(5268):1641-3 doi:10.1126/science.272.5268.1641
- Shishodia SK, Tiwari S, Shankar J (2019) Resistance mechanism and proteins in *Aspergillus* species against antifungal agents. Mycology 10(3):151-165 doi:10.1080/21501203.2019.1574927
- Silva KSE, B.R.S. N, Zambuzzi-Carvalho PF, de Oliveira CM, Pires LB, Kato L, Bailao AM, Parente-Rocha JA, Hernandez O, Ochoa JG, M. SC, Pereira M (2018) Response of *Paracoccidioides lutzii* to the antifungal camphene thiosemicarbazide determined by proteomic analysis. Future Microbiol 13:1473-1496 doi:10.2217/fmb-2018-0176
- Skrzypek MS, Binkley J, Binkley G, Miyasato SR, Simison M, Sherlock G (2017) The Candida Genome Database (CGD): incorporation of Assembly 22, systematic identifiers and visualization of high throughput sequencing data. Nucleic Acids Res 45(D1):D592-D596 doi:10.1093/nar/gkw924
- Souza Goebel C, de Mattos Oliveira F, Severo LC (2013) *Saccharomyces cerevisiae* infections. Rev Iberoam Micol 30(3):205-8 doi:10.1016/j.riam.2013.03.001
- Staerck C, Gastebois A, Vandeputte P, Calenda A, Larcher G, Gillmann L, Papon N, Bouchara JP, Fleury MJJ (2017) Microbial antioxidant defense enzymes. Microb Pathog 110:56-65 doi:10.1016/j.micpath.2017.06.015
- Storz G, Christman MF, Sies H, Ames BN (1987) Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. Proc Natl Acad Sci U S A 84(24):8917-21 doi:10.1073/pnas.84.24.8917
- Tairum CA, Santos MC, Breyer CA, Geyer RR, Nieves CJ, Portillo-Ledesma S, Ferrer-Sueta G, Toledo JC, Jr., Toyama MH, Augusto O, Netto LE, de Oliveira MA (2016) Catalytic Thr or Ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms. Sci Rep 6:33133 doi:10.1038/srep33133

- Taylor PD, Inchley CJ, Gallagher MP (1998) The *Salmonella typhimurium* AhpC polypeptide is not essential for virulence in BALB/c mice but is recognized as an antigen during infection. *Infect Immun* 66(7):3208-17 doi:10.1128/IAI.66.7.3208-3217.1998
- Teixeira F, Castro H, Cruz T, Tse E, Koldewey P, Southworth DR, Tomas AM, Jakob U (2015) Mitochondrial peroxiredoxin functions as crucial chaperone reservoir in *Leishmania infantum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(7):E616-24 doi:10.1073/pnas.1419682112
- Trapet P, Kulik A, Lamotte O, Jeandroz S, Bourque S, Nicolas-Frances V, Rosnoblet C, Besson-Bard A, Wendehenne D (2015) NO signaling in plant immunity: a tale of messengers. *Phytochemistry* 112:72-9 doi:10.1016/j.phytochem.2014.03.015
- Urban C, Xiong X, Sohn K, Schroppel K, Brunner H, Rupp S (2005) The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 57(5):1318-41 doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04771.x
- Usui M, Masuda-Suganuma H, Fukumoto S, Angeles JM, Hakimi H, Inoue N, Kawazu S (2015) Effect of thioredoxin peroxidase-1 gene disruption on the liver stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Parasitol Int* 64(3):290-4 doi:10.1016/j.parint.2014.09.013
- Vallejo MC, Nakayasu ES, Matsuo AL, Sobreira TJ, Longo LV, Ganiko L, Almeida IC, Puccia R (2012) Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparative analysis with other pathogenic fungi. *J Proteome Res* 11(3):1676-85 doi:10.1021/pr200872s
- van Acker H, Coenye T (2017) The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Mediated Killing of Bacteria. *Trends Microbiol* 25(6):456-466 doi:10.1016/j.tim.2016.12.008
- Vediyappan G, Rossignol T, d'Enfert C (2010) Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrob Agents Chemother* 54(5):2096-111 doi:10.1128/AAC.01638-09
- Vranakis I, De Bock PJ, Papadioti A, Tselentis Y, Gevaert K, Tsiotis G, Psaroulaki A (2012) Quantitative proteome profiling of *C. burnetii* under tetracycline stress conditions. *PLoS One* 7(3):e33599 doi:10.1371/journal.pone.0033599
- Wang G, Olczak AA, Walton JP, Maier RJ (2005) Contribution of the *Helicobacter pylori* thiol peroxidase bacterioferritin comigratory protein to oxidative stress resistance and host colonization. *Infect Immun* 73(1):378-84 doi:10.1128/IAI.73.1.378-384.2005
- Wood ZA, Poole LB, Karplus PA (2003) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300(5619):650-3 doi:10.1126/science.1080405
- Yague-Capilla M, Garcia-Caballero D, Aguilar-Pereyra F, Castillo-Acosta VM, Ruiz-Perez LM, Vidal AE, Gonzalez-Pacanowska D (2019) Base excision repair plays an important role in the protection against nitric oxide- and in vivo-induced DNA damage in *Trypanosoma brucei*. *Free Radic Biol Med* 131:59-71 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.025
- Yu S, Giroto S, Lee C, Magliozzo RS (2003) Reduced affinity for Isoniazid in the S315T mutant of *Mycobacterium tuberculosis* KatG is a key factor in antibiotic resistance. *J Biol Chem* 278(17):14769-75 doi:10.1074/jbc.M300326200
- Zhu X, Tu ZJ, Coussens PM, Kapur V, Janagama H, Naser S, Sreevatsan S (2008) Transcriptional analysis of diverse strains *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in primary bovine monocyte derived macrophages. *Microbes Infect* 10(12-13):1274-82 doi:10.1016/j.micinf.2008.07.025
- Zygmunt MS, Hagius SD, Walker JV, Elzer PH (2006) Identification of *Brucella melitensis* 16M genes required for bacterial survival in the caprine host. *Microbes Infect* 8(14-15):2849-54 doi:10.1016/j.micinf.2006.09.002

Figure Legends

Fig. 1 Formation of oxidants by enzymatic and chemical reactions. **(a)** Nitric oxide ($\text{NO}^\bullet$) and the superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\bullet-}$) are formed by reactions catalyzed by the inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NADPH oxidase (NOX) enzymes, respectively. The direct reaction of $\text{NO}^\bullet$ and $\text{O}_2^{\bullet-}$ generates peroxynitrite (OONO^-) at extremely high rates. Superoxide is converted to hydrogen peroxide (H_2O_2) by a reaction catalyzed by the enzyme superoxide dismutase (Sod). Superoxide and hydrogen peroxide can form hydroxyl radicals ($\text{HO}^\bullet$) through the Fenton and Haber-Weiss chemical reactions, with the involvement of iron (Fe). **(b)** Organic hydroperoxides, which includes lipid hydroperoxides, can also undergo in Fenton like reactions to produce alkoxy radicals.

Fig. 2 Catalytic triad of Prx. Polar interactions among Arg, Thr/Ser and C_P (yellow lines) stabilize the S_γ in the deprotonated (thiolate) form. Polar interaction among Arg, Thr/Ser and substrate (black lines) orientate the hydroperoxide towards the thiolate of C_P . The crystallographic structure of yeast Prx (PDB = 3SBC) is represented as cartoon (light gray), highlighted amino acids are represented as balls and sticks and colored as follows: carbon = light gray, oxygen = red, nitrogen = blue, and sulfur = yellow.

Fig. 3 The common Trx-fold and structural variations among the six Prx classes. Prx from different organisms as representatives of the six classes are derived from a common Trx-fold (PDB = 2J23) (center of image). **(a)** AhpC-Prx1 - Yeast Tsa1 (PDB = 3SBC); **(b)** BCP-PrxQ - *Xylella fastidiosa* BCP (PDB = 3IXR); **(c)** Tpx - *E. coli* Tpx (PDB = 3HVV); **(d)** Prx5 - *P. falciparum* AOP (PDB = 1XIY); **(e)** Prx6 - *P. aeruginosa* LsfA (PDB = 6P0W); **(f)** AhpE - *M. tuberculosis* AhpE (PDB = 4X0X). The structures are represented as cartoon, in which the α -helices that compose the Trx-fold are represented in red and the β -sheets are colored in yellow. Additional elements specific to each class are shown in blue. The structures are represented as monomers to facilitate understanding.

Fig. 4 Representation of the two types of Prx dimers and the diversity on the quaternary structures among peroxiredoxins. Structures are represented as cartoons, and each monomer is represented by a different color. **(a)** A-type dimers present in the BCP-PrxQ, Tpx, Prx5 and AhpE classes. The A-type is represented by yeast Ahp1 (PDB = 4OWY), and the monomers are in light pink and green. **(b)** B-type dimers are found in the classes AhpC-Prx1 and Prx6 (light gray and dark blue) (PDB = 3SBC). Some dimeric Prx from the AhpC-Prx1 and Prx6 classes can assemble into toroidal structures formed by pentamers of dimers (decamers) (PDB = 3SBC) **(c)**. Additionally, under oxidative or heat stresses, some Prx can organize in high molecular weight (HMW) species as spherical **(d)** or filamentous multimers **(e)**. The HMW complexes are illustrative and were constructed using the yeast Prx coordinates (PDB = 3SBC). The monomers of the dimers are represented in dark blue and light gray to facilitate understanding.

Fig. 5 Catalytic triads of peroxidase and PLA_2 activities of a representative Prx6 enzyme. The active sites of the two functions performed by members of the Prx6 class are independent. The LsfA structure (PDB = 6P0W) is represented as cartoon and each monomer present a different color (pale green and light pink). Corresponding residues for each catalytic triad are represented as spheres and colored as follows: C = green or pink (peroxidase or phospholipase catalytic triad, respectively), N = blue, O = red and S = orange.

Fig. 6 Conservation of surface residues among Prx from the host and pathogens. Molecular surfaces of Prx enzymes, depicting the common amino acids between hosts and pathogens (white), the different ones (pink) and the active site catalytic C_P (orange). Conserved residues were considered the same amino acid or amino acids presenting similar physicochemical properties. **(a)** Molecular surface of human AhpC-Prx1 (Prx2; PDB: 1QMV) was used as template and compared with homologue isoform from *S. typhimurium* (UniProt ID: P0A251). C-terminal α -helix that are absent in most prokaryotes is colored in light green. Position of Thr/Ser in the active site is highlighted in red. **(b)** BCP-PrxQ from *X. fastidiosa* (PDB: 3IXR) compared with the plant *Citrus sinensis* (NCBI ID: XP_006474598.1). **(c)** The structure of Prx5 from *H. influenzae* (PDB: 1NM3) and human Prx5 (UniProt ID: P30044). The additional Grx molecule present in some pathogenic bacteria is colored in purple. **(d)** Human Prx6 (PDB: 1PRX) compared with its bacterial counterpart from *P. aeruginosa* (UniProt ID: A0A0H2ZEH5).



Table 1 List of different hydroperoxides that are decomposed by Prx of each class in bacteria, fungi and protozoans.

Prx class	Group	Hydroperoxide	Enzyme/Organism	Reference(s)
AhpC-Prx1	Bacteria	H ₂ O ₂ ; <i>t</i> -BOOH; CHP; Peroxynitrite; ethyl hydroperoxide; linoleic acid hydroperoxide; 5'-hydroperoxymethyluracil (thymine hydroperoxide); 5-hydroperoxy-6-hydroxy-dihydrothymine; 5-Hydroperoxy-6-methyl-6-hepten-2-one and 6-hydroperoxy-6-methyl-4-hepten-2-one; 7 α -Hydroperoxy-3 β -hydroxycholest-6-ene; Trans-9-hydroperoxyoctadec-10-enoic acid and trans-10-hydroperoxyoctadec-8-enoic acid; Trans-pinocarveyl hydroperoxide (3)	<i>EcAhpC</i> , <i>HpAhpC</i> , <i>MtAhpC</i> , <i>StAhpC</i>	Baker et al. 2001; Bryk et al. 2000; Hillas et al. 2000; Jacobson et al. 1989; Jaeger et al. 2004; Parsonage et al. 2005
AhpC-Prx1	Fungi	H ₂ O ₂ ; <i>t</i> -BOOH; CHP; Peroxynitrite	<i>ScTsa1</i> , <i>ScTsa2</i>	Munhoz and Netto 2004; Oqusucu et al. 2007; Tairum et al. 2016
AhpC-Prx1	Protozoa	H ₂ O ₂ ; <i>t</i> -BOOH; CHP; peroxynitrite; linoleic acid hydroperoxide; phosphatidylcholine hydroperoxide	<i>CfTXNPx</i> , <i>GiPrx1a</i> , <i>GiPrx1b</i> , <i>LmTryP1</i> , <i>TbcTXNPx</i> , <i>TccTXNPx</i> , <i>TcmTXNPx</i> , <i>TgcTXNPx</i>	Akerman and Muller 2005; Flohe et al. 2002; Konig et al. 2013; Mastronicola et al. 2014; Nogoceke et al. 1997; Pineyro et al. 2011; Trujillo et al. 2004
BCP-PrxQ	Bacteria	H ₂ O ₂ ; <i>t</i> -BOOH; CHP; peroxynitrite; linoleic acid hydroperoxide; fatty acids hydroperoxides	<i>EcBCP</i> , <i>HpBCP</i> , <i>MbPrxQB</i> , <i>XPrxQ</i>	Horta et al. 2010; Jeong et al. 2000; Reyes et al. 2016; Wang et al. 2005
Tpx	Bacteria	H ₂ O ₂ ; <i>t</i> -BOOH; CHP; peroxynitrite	<i>EcTpx</i> , <i>MtTpx</i>	Baker and Poole 2003; Jaeger et al. 2004
Prx5	Bacteria	H ₂ O ₂	<i>VvPrx3</i>	Ahn et al. 2018
Prx5	Fungi	H ₂ O ₂ ; <i>t</i> -BOOH	<i>AfAsp f3</i>	Hillmann et al. 2016
Prx5	Protozoa	<i>t</i> -BOOH	<i>PfAOP</i>	Staudacher et al. 2015
Prx6	Fungi	H ₂ O ₂ ; <i>t</i> -BOOH; CHP; linoleic acid hydroperoxide	<i>AfPrx1</i> , <i>AfPrxC</i> , <i>PbPrx1</i>	Longo et al. 2020; Rocha et al. 2018
AhpE	Bacteria	H ₂ O ₂ ; <i>t</i> -BOOH; CHP; peroxynitrite; 15-HpETE (arachidonic hydroperoxide); 3-CPBA (3-chloroperoxybenzoic acid); HCO ₄ ⁻ (peroxymonocarbonate); linoleic acid hydroperoxide	<i>MtAhpE</i>	Hugo et al. 2009; Reyes et al. 2011

Af = *Aspergillus fumigatus*; *Cf* = *Crithidia fasciculata*; *Ec* = *Escherichia coli*; *Gi* = *Giardia intestinalis*; *Hp* = *Helicobacter pylori*; *Lm* = *Leishmania major*; *Mb* = *Mycobacterium bovis*; *Mt* = *Mycobacterium tuberculosis*; *Pb* = *Paracoccidioides brasiliensis*; *Pf* = *Plasmodium falciparum*; *Sc* = *Saccharomyces cerevisiae*; *St* = *Salmonella typhimurium*; *Tb* = *Trypanosoma brucei*; *Tc* = *Trypanosoma cruzi*; *Tg* = *Toxoplasma gondii*; *Vv* = *Vibrio vulnificus*.

Table 2 Prx enzymes and virulence.

Prx class	Virulence factor	Protein(s)	Organism	Reference
AhpC-Prx1	Yes	AhpC	<i>Helicobacter cinaedi</i>	Charoenlap et al. 2012
	Yes	AhpC	<i>Helicobacter pylori</i>	Olczak et al. 2003
	Yes	Prx	<i>Listeria monocytogenes</i>	Dons et al. 2014
	Yes	AhpC	<i>Mycobacterium bovis</i>	Wilson et al. 1998
	No	AhpC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Heym et al. 1997
	No	AhpC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Springer et al. 2001
	No	AhpC	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Johnson et al. 2004
	No	AhpC	<i>Salmonella typhimurium</i>	Taylor et al. 1998
	No	AhpC	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cosgrove et al. 2007
	Yes	AhpC	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Brenot et al. 2005
	No	AhpC	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Brenot et al. 2005
	Yes	AhpC1	<i>Vibrio vulnificus</i>	Baek et al. 2009
	No	Tsa1	<i>Candida albicans</i>	Urban et al. 2005
	Yes	Tsa1/Tsa2	<i>Candida glabrata</i>	Gutierrez-Escobedo et al. 2020
	Yes	Tsa1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Missall et al. 2004
	Yes	Prx	<i>Entamoeba histolytica</i>	Davis et al. 2006
	Yes	mTXPx	<i>Leishmania infantum</i>	Castro et al. 2011
	No	GPrx	<i>Leishmania infantum</i>	Castro et al. 2020
	Yes	Prx	<i>Plasmodium berghei</i>	Usui et al. 2015
	Yes	TXNPx	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Pineyro et al. 2008
BCP-PrxQ	Yes	BCP	<i>Brucella melitensis</i>	Zygmunt et al. 2006
	No	Prx1	<i>Helicobacter pullorum</i>	Parente et al. 2017
	Yes	BCP	<i>Helicobacter pylori</i>	Wang et al. 2005
Tpx	Yes	Tpx	<i>Enterococcus faecalis</i>	La Carbona et al. 2007
	Yes	Tpx	<i>Helicobacter pylori</i>	Olczak et al. 2003
	Yes	Tpx	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Hu and Coates 2009
	No	Tpx	<i>Salmonella enterica</i>	Horst et al. 2010
	Yes	TpxD	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Hajaj et al. 2012
Prx5	Yes	Prx5	<i>Brucella abortus</i>	Hu et al. 2019
	Yes	Prx5-Grx	<i>Neisseria meningitidis</i>	Aljannat et al. 2020
	Yes	Prx3	<i>Vibrio vulnificus</i>	Lim et al. 2014
	Yes	Aps f3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Hillmann et al. 2016
Prx6	Yes	LsfA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kaihami et al. 2014
	Yes	Prx1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Rocha et al. 2018
	No	PrxB	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Rocha et al. 2018
	No	PrxC	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Rocha et al. 2018
	No	Tsa3	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Missall et al. 2004
	Yes	MoPrx1	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Mir et al. 2015

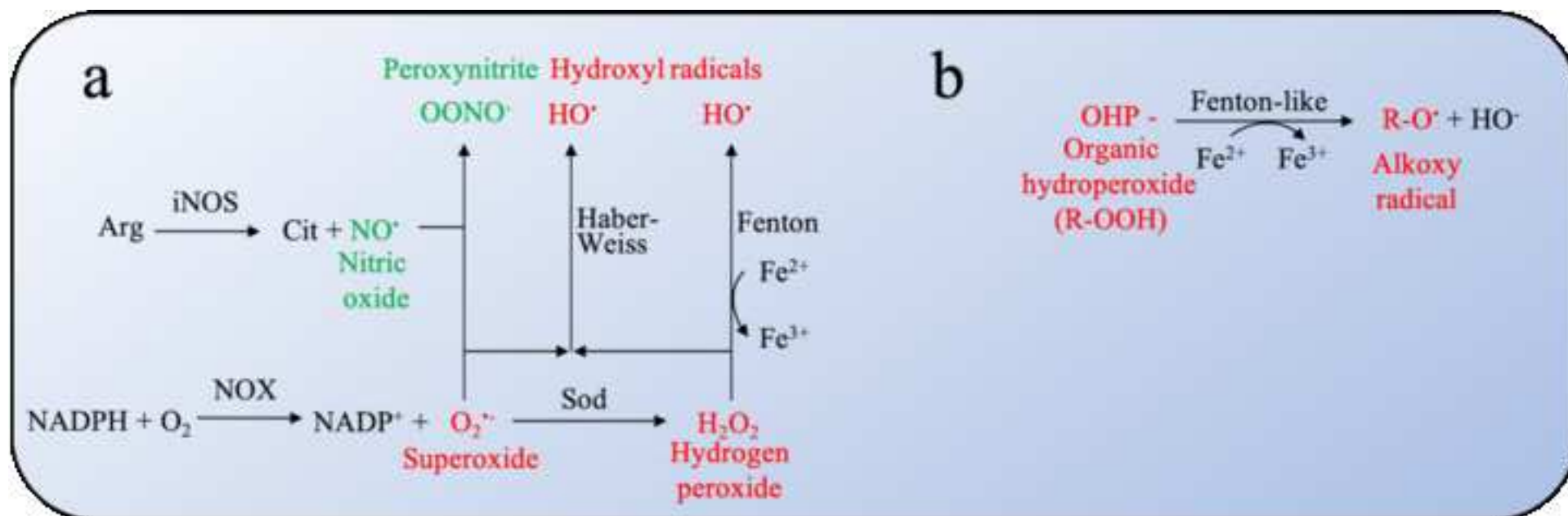


Figure 2

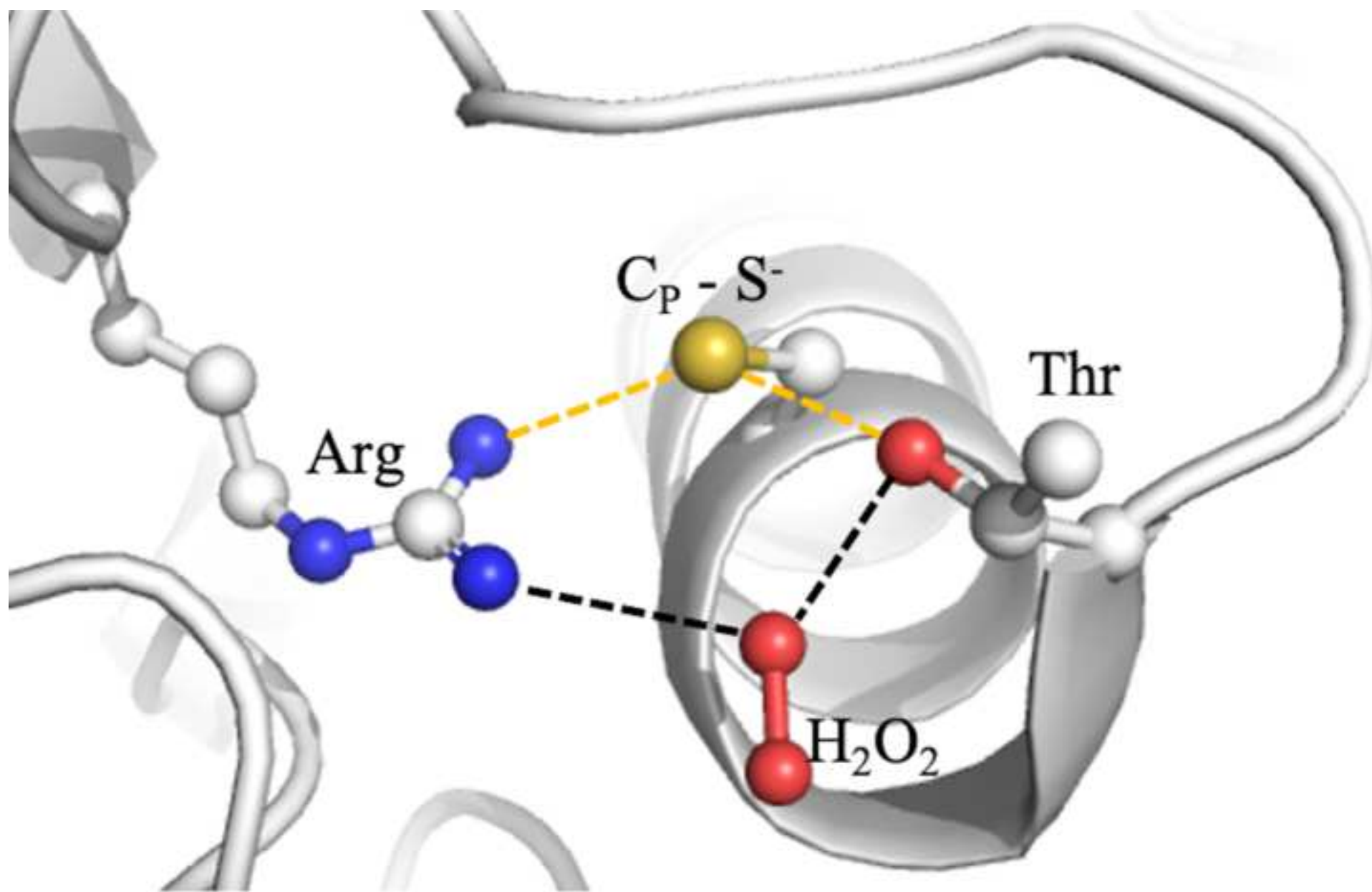
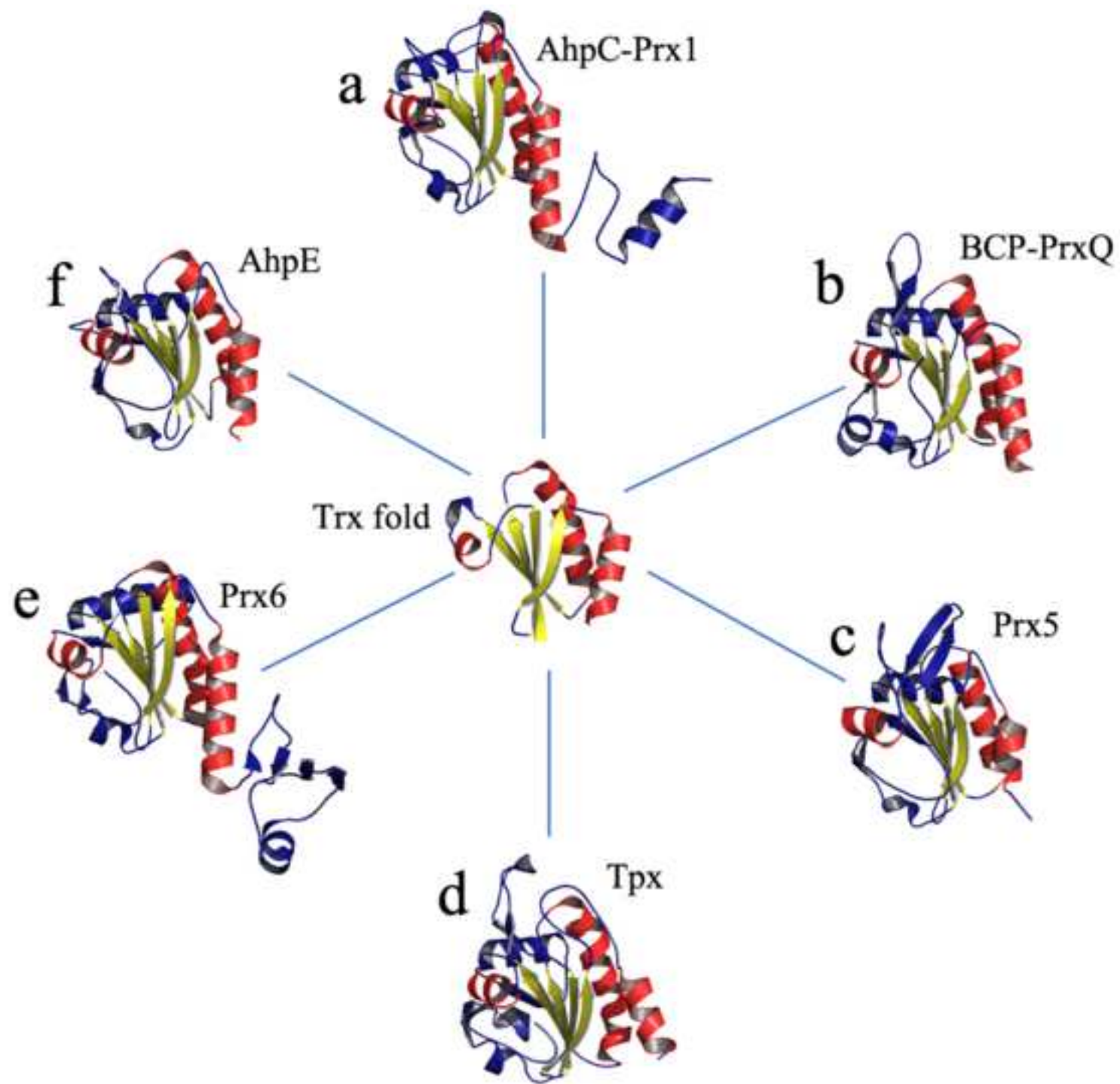
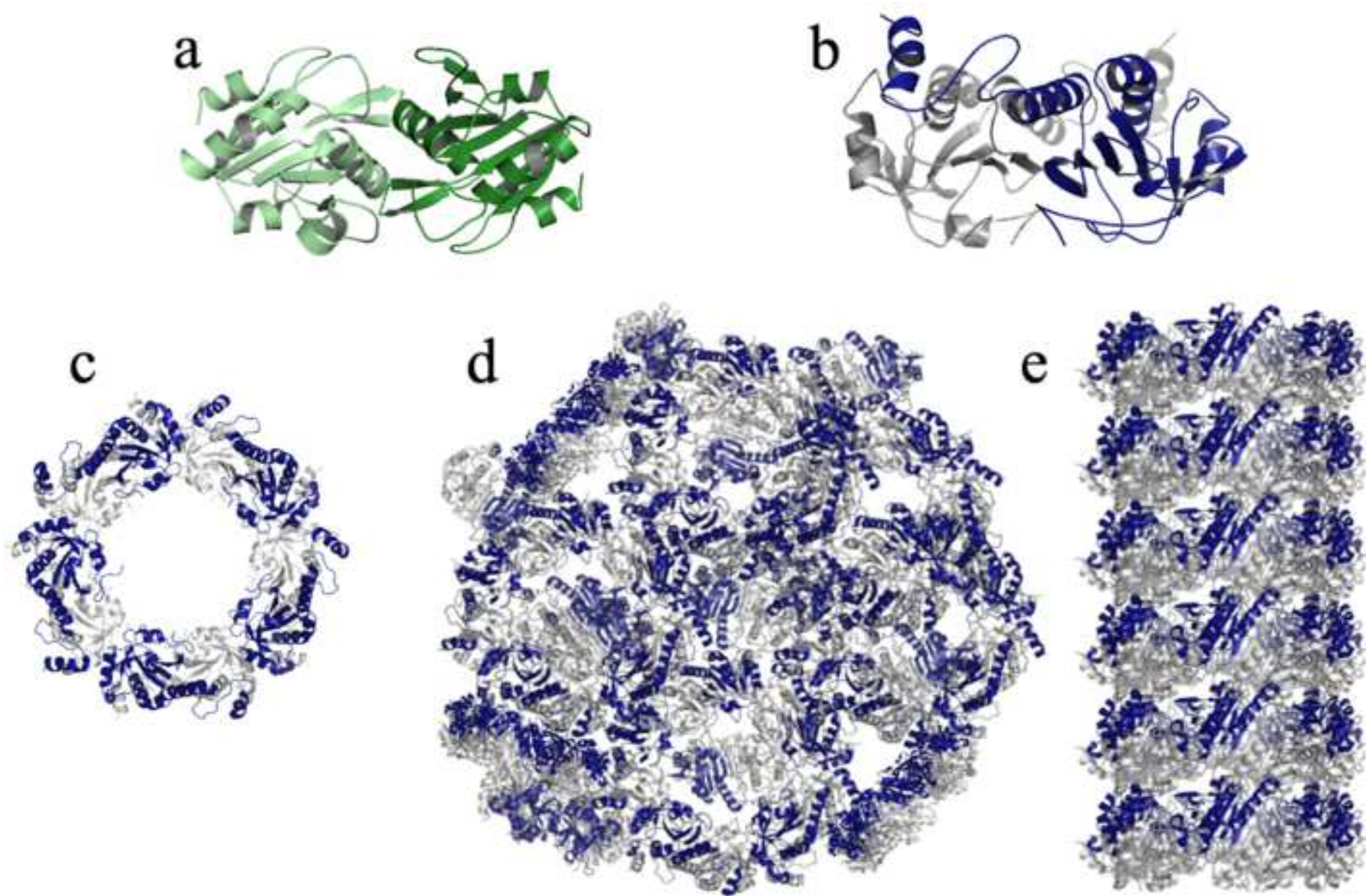
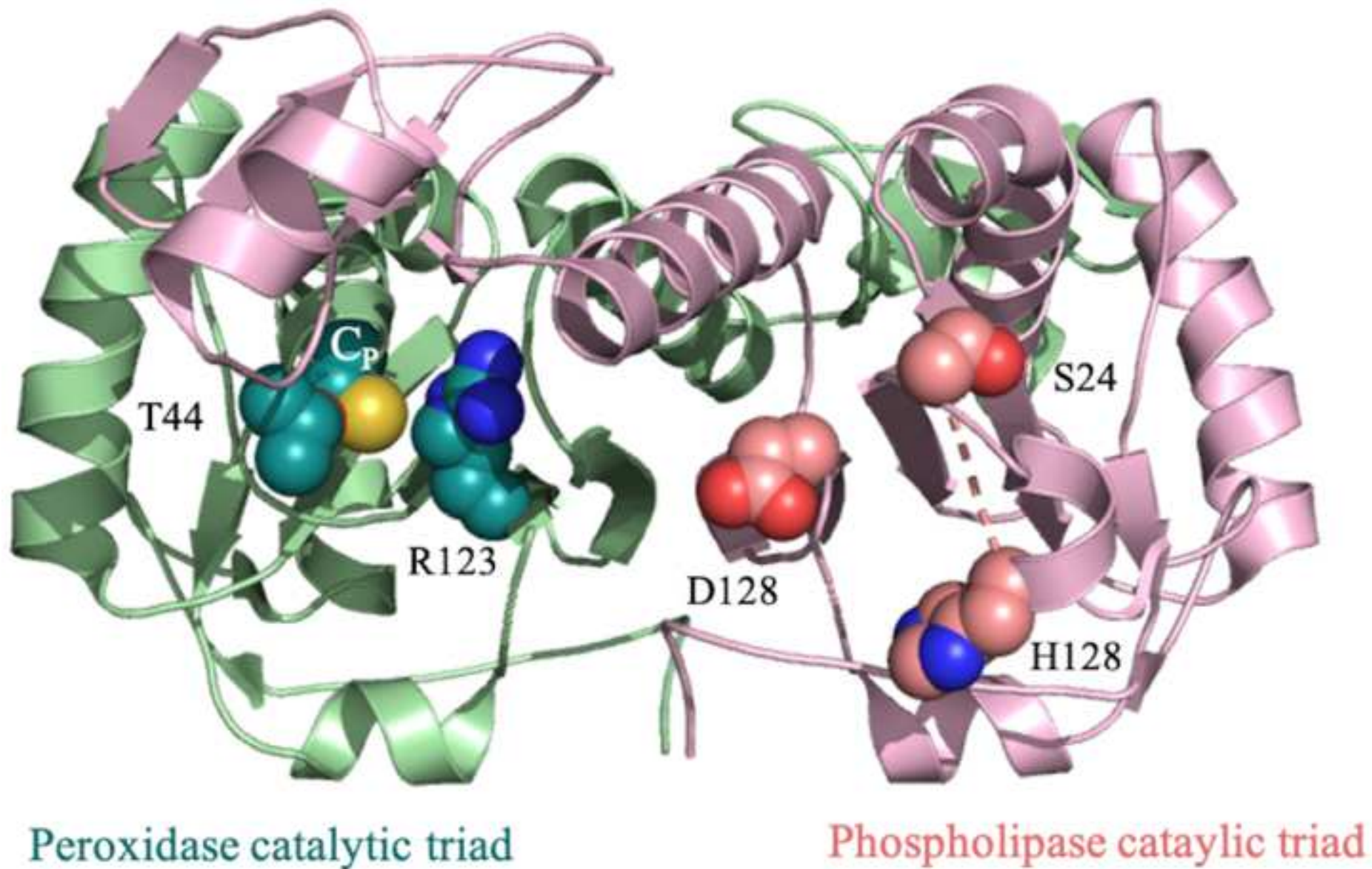
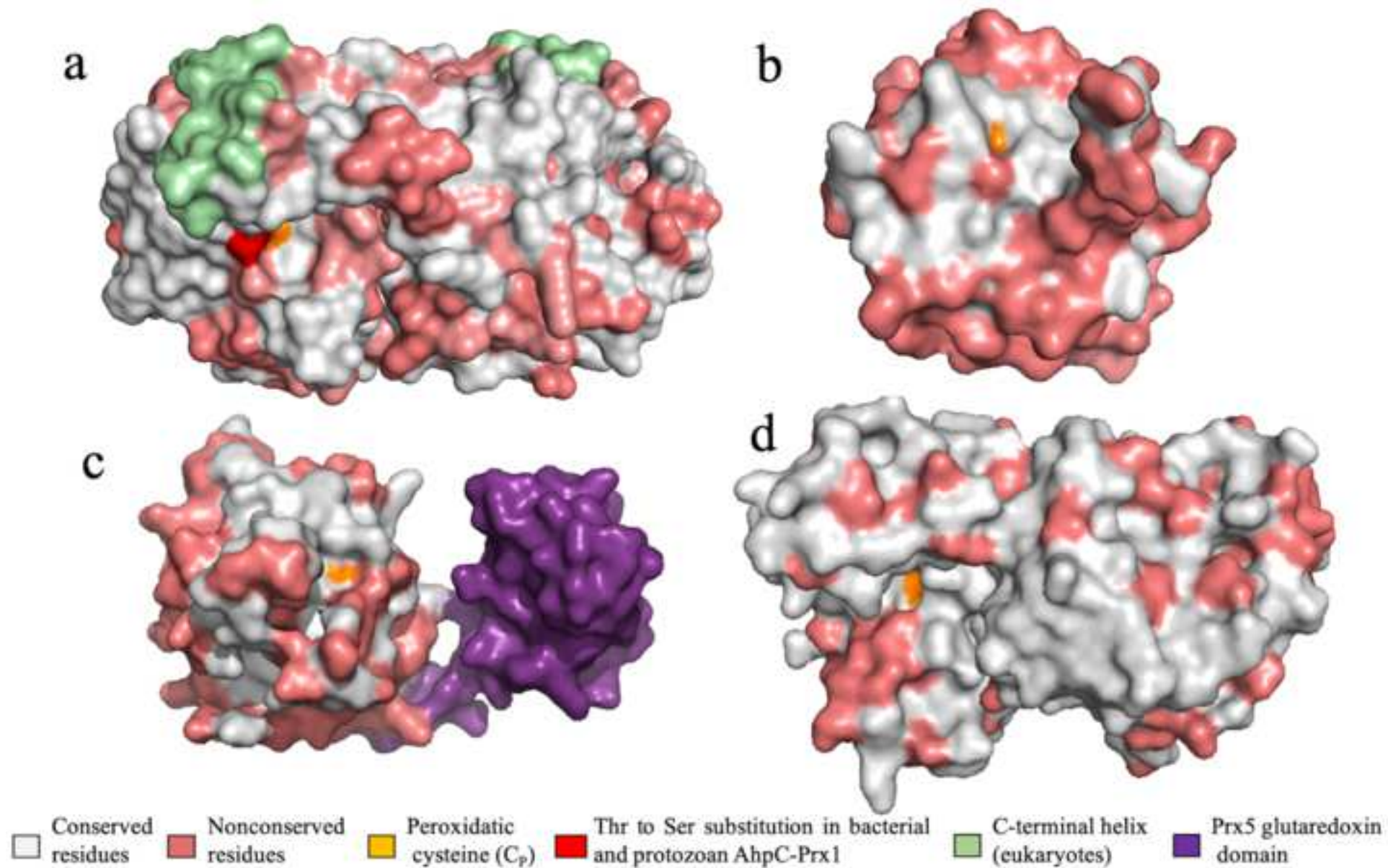


Figure 3









Apêndice E

Manuscrito em fase final de preparação para ser submetido ao periódico “*Chemical Research and Toxicology*.”

Tairum, C. A.; Santos, M. C.; Breyer, C. A.; de Oliveira, A. L. P.; Cabrera, V. I. M.; Toledo-Silva, G.; Mori, G. M.; Toyama, M. H.; Augusto, O.; Netto, L. E. S.; de Oliveira, M.A. “Serine in the Catalytic Triad Makes Typical 2-Cys Prx More Resistant to Hyperoxidation and Increase Chaperone Activity”

.

Serine in the Catalytic Triad Makes Typical 2-Cys Prx More Resistant to Hyperoxidation and Increase Chaperone Activity

Carlos A. Tairum^{1, 2§}, Melina Cardoso Santos^{1§}, Carlos Alexandre Breyer^{1§}, Ana Laura Pires de Oliveira¹, Vitoria Isabela Montanhero Cabrera¹, Guilherme Toledo-Silva³, Gustavo Maruyama Mori⁴, Marcos Hikari Toyama¹, Ohara Augusto⁵, Luis Eduardo Soares Netto^{2*} and Marcos Antonio de Oliveira^{1*}

¹ São Paulo State University, UNESP, Biosciences Institute, São Vicente, SP, Brazil.

² Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 05508-090.

³ Laboratory of Biomarkers of Aquatic Contamination and Immunochemistry, Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

⁴ Molecular Ecology Laboratory, Biosciences Institute, UNESP - São Paulo State University, São Vicente, SP, Brazil.

⁵ Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 05508-090.

[§] These authors contributed equally to this work.

* Correspondence: Marcos A. de Oliveira – marcos.a.oliveira@clp.unesp.br; Luis E.S. Netto – nettoles@ib.usp.br

Abbreviations used: Prx, Peroxiredoxin; Trx, Thioredoxin; TrxR, Thioredoxin reductase; H₂O₂, hydrogen peroxide; C_P, peroxidatic cysteine; C_R, resolving cysteine; SOH, sulfenic acid; SO₂H, sulfinic acid; IMAC, immobilized metal-ion affinity chromatography; CHP, cumene hydroperoxide; IPTG, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; DTT, dithiothreitol; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; AhpC, subunit C of alkyl hydroperoxide reductase; PaAhpC, *Pseudomonas aeruginosa* AhpC; SeAhpC, *Staphylococcus epidermidis* AhpC; EcTrx, *Escherichia coli* thioredoxin; EcTrxR, *Escherichia coli* thioredoxin reductase.

Keywords: 2-Cys Prx, catalytic triad, organic hydroperoxides, oligomerization, hyperoxidation, chaperone

ABSTRACT: Typical 2-Cys peroxiredoxins (AhpC/Prx1 subfamily) are a ubiquitous group of peroxidases that use a reactive cysteine residue (named peroxidatic cysteine = C_P) to decompose hydroperoxides, which is oxidized to sulfenic acid (C_P-SOH). Subsequently, an intermolecular disulfide bond is formed between C_P-SOH and a second cysteine (resolving Cys = C_R) from adjacent subunit, then reduced by the thioredoxin (Trx). Along the catalytic cycle, the oligomeric state of the 2-Cys Prx switches. In reduced state, a pentamer of homodimers is stabilized, dissociating into dimers upon intermolecular disulfide bond formation. High concentrations of hydroperoxides or heat shock induces the formation of high molecular weight species that were associated with a molecular chaperone (holdase) activity. C_P takes part of a catalytic triad, composed by two other polar residues (Thr/Ser and Arg). Although C_P and Arg are strictly conserved, the Thr residue can be replaced by Ser in typical 2-Cys Prxs. We and others have demonstrated that the presence of Ser in the catalytic triad stabilizes the decamer, independently of the redox state. In this work, we studied two yeast 2-Cys Prxs that share 86% of identity in their amino acid sequence, Tsa1 and Tsa2 presenting respectively a Thr or a Ser in the active site. Here, we compared the hyperoxidation susceptibilities of Tsa1 and Tsa2 and proteins containing reciprocal mutations of the catalytic triad Thr and Ser residues. Notably, 2-Cys Prx containing Ser (named here Ser-Prx) were more resistant to hyperoxidation than corresponding enzymes containing Thr (named here Thr-Prx). We also analyzed the occurrence of Ser-Prx and Thr-Prx analyzing public databases. Thr-Prxs were more frequent found in all of the three domains of life and Ser-Prx is more abundant in eubacteria. Therefore, we decided to investigate bacterial 2-Cys Prx and we observed that as yeast 2-Cys Prx (Tsa1 and Tsa2), bacterial Ser-Prx is more stable as decamer than Thr-Prx in the disulfide form. Contrastingly with the eukaryotic isoforms the bacterial Ser-Prx present a discrete enhanced resistance to hyperoxidation, but a clear resistance to thermal insults, which may be related with the enhanced stability of the decamers, as determined by thermal shift approaches. Furthermore, we observed that Ser-Prx were more efficient as molecular chaperone (holdase) than Thr-Prx through assays involving citrate synthase thermal aggregation. Finally, organic hydroperoxide (cumene hydroperoxide) inhibited more efficiently the peroxidase activities of both Ser-Prx and Thr-Prx from bacteria and yeast than hydrogen peroxide. Therefore, the presence of Thr or Ser in the catalytic triad are related with striking biochemical and structural differences in 2-Cys Prxs, with additional importance in bacteria where Ser-containing enzymes are more prevalent.

1. INTRODUCTION

Typical 2-Cys peroxiredoxins (2-Cys Prx) of the Prx1/AhpC sub-family are peroxidases widely distributed in prokaryotes and eukaryotes that reduce hydroperoxides with extremely high catalytic efficiency¹⁻⁴. These enzymes are very abundant, representing 0.1-1.0% of all soluble proteins in the cells⁵⁻⁸ and capable of decomposing distinct hydroperoxides^{9, 10}. Additionally, typical 2-Cys Prxs are mediators of redox signaling and can act as molecular chaperones¹¹⁻¹⁵.

2-Cys Prx use a fully conserved N-terminal cysteine residue (peroxidatic cysteine - C_P), which is responsible for the nucleophilic attack on the hydroperoxide and then becomes oxidized into a sulfenic acid (C_P-SOH), which can condensate with a second Cys residue (resolving cysteine, C_R-SH) forming an intermolecular disulfide (C_P-S-S-C_R) and releasing a water molecule. In most cases, these disulfide bonds are reduced by thioredoxin (Trx)¹⁶⁻¹⁹. The high reactivity of the C_P is related to the microenvironment in which it is found. C_P is in close proximity to other two fully conserved residues (Thr/Ser and Arg), performing polar interactions that increase the electrophilicity of H₂O₂ and facilitate the nucleophilic attack by the thiolate on C_P²⁰. Not only C_P is essential for the efficient reduction of hydroperoxides²¹⁻²³, as the mutation of Thr/Ser and Arg also drastically decreases the peroxidase activity of 2-Cys Prx^{3, 23-25}. Thus, these three residues (C_P, Thr/Ser and Arg) compose the so-called catalytic triad^{3, 22, 26}.

Under high H₂O₂ concentrations, C_P can undergo further oxidation generating hyperoxidized species (C_P-SO₂H or C_P-SO₃H) rather than forming the disulfide bond, leading to enzyme inactivation as Prxs cannot be recycled by Trx^{27, 28}. However, for typical 2-Cys Prxs the enzyme sulfiredoxin (Srx) can reduce C_P-SO₂H to C_P-SOH in a process dependent on ATP hydrolysis^{27, 28}. Hyperoxidized 2-Cys Prx are frequently associated with a molecular chaperone (holdase) function and also may impacting signaling pathways, like cell growth and circadian rhythm²⁹⁻³². In addition to C_P hyperoxidation, the heat shock stress is also able to confer chaperone function to these enzymes³³⁻³⁶.

A remarkable feature of 2-Cys Prxs is the presence of large structural rearrangements that are triggered by C_P oxidation. Reduced 2-Cys Prx enzymes are stabilized as decamers [(α₂)₅] and tend to be in the so called fully folded (FF) state, in which C_P is located in the first turn of an α-helix and far away from C_R (10-16 Å). Upon oxidation, partial unfolding of the α-helix containing C_P-SOH is favored (the so-called locally unfolded = LU state), allowing its

approximation to C_R with the consequent intermolecular disulfide bond formation (reviewed by Hall et al., 2011). In the disulfide form, the 2-Cys Prx decamers tend to dissociate into dimers³⁷⁻³⁹. Moreover, when C_P is hyperoxidized or when subjected to heat shock, 2-Cys Prx can switch from decamers to higher molecular weight (HMW) species^{32, 33, 35, 40, 41}. Therefore, two reversible structural switches (FF – LU and dimers-decamers) are inter-connected and the stabilities of distinct conformers are influenced by thermal and redox factors.

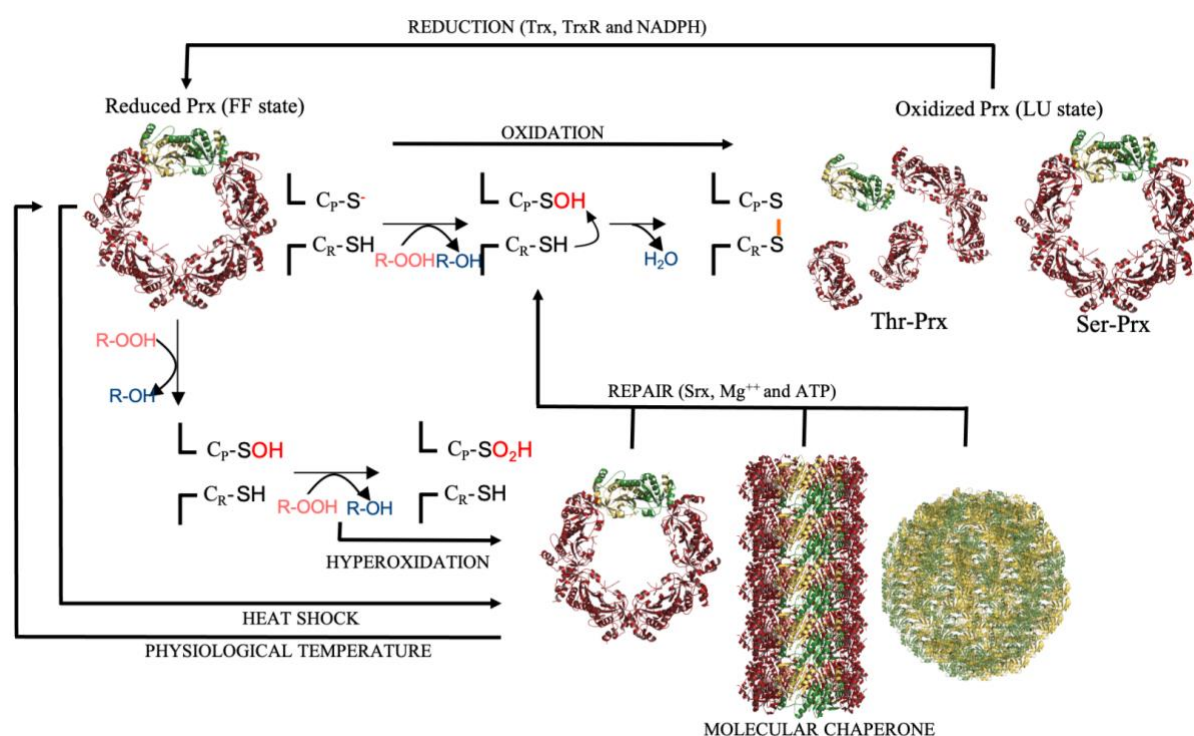


Figure 1. Structural and functional transitions of the typical 2-Cys Prx. In reduced state, fully folded (FF), typical 2-Cys Prx are decamers formed by five homodimers ($\alpha_2[5]$). In the figure the upper homodimer of decamers is represented in cartoon with different colors (yellow and green) the other in red for clearness. At low levels of hydroperoxides the C_P (sulfenic acid - C_P -SOH) occurs the condensation with C_R resulting the oxidized disulfide form (local unfolded or LU state). In typical 2-Cys Prx containing Thr, the disulfide formation result in decamer dissociation. To Ser containing 2-Cys Prx, the decamers are stable even in the oxidized form. At high levels of hydroperoxides the C_P -SOH, can react with another(s) hydroperoxide molecule(s) resulting in hyperoxidized species (C_P -SO₂H or C_P -SO₃H) and the functional switch from peroxidase to chaperone. This process can be reversed by Srx, with ATP consumption. The functional transition from peroxidase to chaperone is also triggered by thermal insults and peroxidase activity is restored by physiological temperatures. The 2-Cys Prx representations were made using the crystallographic coordinates of *Saccharomyces cerevisiae* enzyme (PDB = 3SBC) using PyMol (www.pymol.org).

Previously, we have shown the presence of Thr or Ser in the catalytic triad influences the stabilities of distinct oligomeric states that 2-Cys Prx can assume³. Yeast Tsa1 and Tsa2

contain Thr or Ser in the active site, respectively. Both enzymes are decamers in the reduced state, but Tsa1 is mainly a dimer when oxidized, while Tsa2 remains as decamer even after oxidation³. In addition, the mutation of catalytic Thr to Ser stabilizes Tsa1 in the decameric form even when oxidized (Tairum et al., 2016). Later, others also observed that the substitution of catalytic triad Thr to Ser stabilize typical 2-Cys Prxs from *Salmonella typhimurium* and from *Enterococcus faecalis* as decamers^{42, 43}.

Here, we described that the presence of Thr and Ser in the active site also affected the sensibility of 2-Cys Prx to hyperoxidation. Previously, other structural features were described to confer sensibility of C_P to hyperoxidation, namely a GGLG motif (close to the active site) and a YF motif (found in a α -helix in the C-terminal portion) that are present almost uniquely in eukaryotic enzymes³⁹. Recently, two other features were involved in susceptibility to hyperoxidation: motif A (D-X₈-N/G-X₁₀-H-X₂₇-S/G) and the motif B (T-X₃-S/T)⁴⁴. We show here that distinct 2-Cys Prxs with Ser in the catalytic triad (named here Ser-Prx) are more resistant to hyperoxidation than those containing Thr (named here Thr-Prx). Moreover, analysis of all the sequences of typical 2-Cys Prx present in the NCBI GenBank revealed that occurrence of Ser-Prx is rare in multicellular eukaryotes and more frequent in eubacteria. Therefore, we analyzed bacterial 2-Cys Prx and observed that Ser-Prx display higher stability as a decamer and are slightly more resistant to hyperoxidation. Furthermore, we found that cumene hydroperoxide (CHP) was more efficient than H₂O₂ to inactivate both Ser-Prx and Thr-Prx. Finally, we showed that Ser-Prx are more thermo stable, retaining the peroxidase activity at high temperatures and acquiring molecular chaperone activity more readily than Thr-Prx.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Amplification, Cloning and Sequencing. Yeast wild type proteins (Tsa1, Tsa2, Trx1 and TrxR1) were obtained as previously described^{3, 45}. Bacterial AhpCs and the corresponding thiol reductive systems were PCR amplified from the genomic DNA of the following species/strains: *Escherichia coli*/ATCC25922, and *Pseudomonas aeruginosa*/ATCC 29853. The *ahpc* gene from *Staphylococcus epidermidis*/ATCC12228 was synthesized by GenScript, based on the sequence SE_2357 from KEGG database, with optimized codons for expression in *E. coli* and flanked with *Nde* I and *Bam* HI restriction sites. Amplified DNA fragments and synthetic gene were digested with *Nde* I and *Bam* HI and cloned into pET15b vector previously digested with the same enzymes. The resulting recombinant vectors were sequenced in an ABI 3730 DNA

Analyzer (Applied Biosystems) using the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and then were used to transform *E. coli* BL21 (DE3) strain (Sigma-Aldrich).

2.2. Site Directed Mutagenesis. The mutagenesis protocols were performed using Quick Change II Kit (Stratagene), following manufacturer's instructions. The products were used to transform *E. coli* XL1-Blue strain (Agilent Technologies) and single colonies were grown on Luria Bertani (LB) medium for 16 hours. Then, plasmids were extracted, purified and sequenced. Plasmids containing the expected single substitutions were used to transform *E. coli* BL21 (DE3) expression strain (Sigma-Aldrich). The BL21 (DE3) strain containing the plasmid pET15b/*tsa1*^{t44s} was previously obtained (Tairum et al., 2016). All strains used in this work are summarized in table 1.

Table 1. List of strains used in this work.

Species	Strain/plasmid	Source
<i>E. coli</i>	ATCC25922	ATCC*
<i>E. coli</i>	BL21 DE3/pET15b-ahpc (Ec)	This work
<i>E. coli</i>	BL21 DE3/pET15b-ahpc (Pa)	This work
<i>E. coli</i>	BL21 DE3/pET15b-ahpc (Se)	This work
<i>E. coli</i>	BL21 DE3/pET15b-trx (Ec)	This work
<i>E. coli</i>	BL21 DE3/pET15b-trxr (Ec)	This work
<i>E. coli</i>	BL21 DE3/pET15b- <i>tsa1</i> (Sc)	Tairum et al. 2012
<i>E. coli</i>	BL21 DE3/pET15b- <i>tsa2</i> (Sc)	Tairum et al. 2016
<i>E. coli</i>	BL21 DE3/pET15b- <i>tsa1t44s</i> (Sc)	Tairum et al. 2016
<i>E. coli</i>	BL21 DE3/pET15b- <i>tsa2s44t</i> (Sc)	This work
<i>E. coli</i>	BL21 DE3/pET15b- <i>trx1</i> (Sc)	Oliveira et al. 2010
<i>E. coli</i>	BL21 DE3/pET15b- <i>trxr1</i> (Sc)	Oliveira et al. 2010
<i>E. coli</i>	XL1-Blue	Agilent
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 29853	ATCC*
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 29853	ATCC*

*American Type Culture Collection; Genes: Ec = *E. coli*, Pa = *P. aeruginosa* and Sc = *S. cerevisiae*.

2.3 Oligonucleotides. The list of oligonucleotides used to cloning process or site directed mutagenesis is shown in Table 2.

Table 2. List of amino acids used to cloning or site directed mutagenesis.

Oligonucleotide	Sequence
Ec_Trx_F	5' <u>CGC GAT CCA TAT GAT</u> GAG CGA TAA AAT TAT TCA CCT GAC T 3'
Ec_Trx_R	5' <u>CGC AAG CTT GGA TCC</u> TTA CGC CAG GTT AGC GTC GAG GAA 3'
Ec_TrxR_F	5' <u>CGC GAT CCA TAT GAT</u> GGG CAC GAC CAA ACA CAG TAA ACT G 3'
Ec_TrxR_R	5' <u>CGC AAG CTT GGA TCC</u> TTA TTT TGC GTC AGC TAA ACC ATC 3'
Pa_AhpC_F	5' <u>CGC GAT CCA TAT GAT</u> GTC CCT GAT CAA CAC TCA AGT CCA A 3'
Pa_AhpC_R	5' <u>CGC AAG CTT GGA TCC</u> TTA GAT CTT GCC GAC CAG GTC CAG G 3'
Pa_AhpC_T43S_F	5' GCT GCC TTC TCC TTC AAC TGC 3'
Pa_AhpC_T43S_R	5' GCA GTT GAA GGA GAA GGC AGC 3'
Se_AhpC_S46T_F	5' GCG GAC TTC ACC TTT GTT TGC 3'
Se_AhpC_S46T_R	5' GCA AAC AAA GGT GAA GTC CGC 3'
Tsa2S44T_F	5' ATT GGC TTT TAC TTT TGT CTG TC 3'
Tsa2S44T_R	5' GAC AGA CAA AAG TAA AAG CCA AT 3'

* Underlined bases indicate *Nde* I and *Bam* HI cloning adapters

2.4. Expression and Purification of Recombinant Proteins. Single colonies of *E. coli* BL21 (*DE3*) strain containing the expression plasmids were inoculated in LB medium (20 ml) containing 0.1 mg ampicillin/ml overnight at 37°C/250 rpm, transferred to 1 liter of fresh LB medium, and cultured further until OD₆₀₀ reached 0.6–0.8. Then the expressions of all proteins were induced by the addition of 0.3 mM IPTG at 37°C/3 hours/250 rpm in orbital shaker. Tsa2 and Tsa2^{S44T} were expressed using similar protocols, however *E. coli* Tuner (*DE3*) was used instead.

Cells were harvested by centrifugation and cell pellets were resuspended in start buffer (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 50 mM NaCl, 20 mM imidazole and 2 mM PMSF) and disrupted by sonication. The cell extracts were kept in ice during streptomycin sulfate 1% treatment for 20 min. The supernatants clarified by centrifugation were homogenized by filtration and purified by IMAC using HisTrap column (GE Healthcare). Imidazole was removed by gel filtration using PD10 Desalting column (GE Healthcare) and the purity of recombinant proteins was verified by SDS–PAGE. The yeast Trx1 was purified by boiling method as described previously ⁴⁶.

2.5 NADPH Oxidation Assay. The NADPH to NADP⁺ oxidation was monitored at A_{340nm} in 100 µl reaction mixtures containing 50 mM Hepes pH 7.4, 100 µM DTPA, 1 mM sodium azide, 1 µM Tsa1/Tsa2, 2 µM Trx1, 0.3 µM TrxR1 and 150 µM NADPH. In some cases, yeast 2-Cys

Prx were replaced by bacterial enzymes at the concentrations described in the legend of the figures. The reactions were initiated by H₂O₂ or CHP addition and the reaction mixtures were incubated at 30°C. Non-linear regression analysis were performed using the Michaelis-Menten equation and the GraphPad Prism 4 software (GraphPad Software, Inc., San Diego).

2.6. Western Blot Analysis to Evaluate the C_P Hyperoxidation of Tsa1 and Tsa2. To confirm if 2-Cys Prx were inactivated by C_P hyperoxidation, we collected samples after NADPH enzymatic assays. Proteins were pre-alkylated with NEM (50 mM) to avoid the formation of artifactual disulfides before non-reducing SDS-PAGE. Samples were then transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, Calif., USA) and were incubated with an anti-Prx-SO₃ (dilution 1:2500, AbFrontier Co #LF-PA0004) diluted 1000 times in TBST containing 3% skimmed milk and incubated on a rocking platform for 16 hours at 4°C. A HRP-conjugated secondary antibody (GE Healthcare—Little Chalfont United Kingdom) was employed and samples were detected by chemiluminescence detection (ECL Prime Western Blot, GE Healthcare—Little Chalfont United Kingdom). Images were obtained by ChemiDoc equipment (Bio-Rad—Hercules, California, EUA).

2.7. Differential Scanning Fluorimetry. The thermal or/and oxidative unfolding of PaAhpC, SeAhpC and mutants were analyzed by using differential scanning fluorimetry (DSF) ⁴⁷. Briefly, proteins (final concentration 3 µM in 10 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl) were mixed with 5.25 µl of SYPRO Orange dye diluted 200 times in DMSO. Reactions mixtures were equilibrated at 25°C for 30 seconds and then monitored from 25 - 95°C with increments of 1°C/min for 240 min using a Mx 3005P Real-Time System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) with excitation and emission filters set to 465 and 590 nm, respectively. The melting temperature (*T_m*) of AhpCs with the MxPro software and curves fit in Microsoft Excel using the Boltzmann equation to determine the midpoint of thermal denaturation (*T_m*). All measurements were carried out in triplicate and presented as mean ± SD.

2.8. Size Exclusion Chromatography (SEC) of the Yeast and Bacteria Typical 2-Cys Prx. To obtain reduced samples, 30 µM of bacterial 2-Cys Prxs were treated with TCEP 5 mM for 60 min and the TCEP excess was removed using the PD 10 column (reduced samples). To oxidize samples, reduced 2-Cys Prx (30 µM) were treated with H₂O₂ (36 µM) for 30 minutes,

at room temperature. SEC was performed in an analytical Jasco - HPLC system composed by a PU 2880 Plus injector and a PDA MD 2018 detector. Samples (10 μ M in 100 mM Tris-HCl at pH 7.4) were separated by a Phenomenex BioSep-SEC-S2000 column (7.8 $\times$ 300 mm, 5 μ m, resolution range of 15 to 2000 kDa (Phenomenex, Inc., Torrance, California, USA), using a flow of 1 ml/min in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4 monitored by tryptophan fluorescence (excitation, 280 nm; emission, 340 nm). Bovine thyroglobulin (670 kDa), bovine gamma globulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa), myoglobin (17 kDa) and vitamin B₁₂ (1.35 kDa) were used as molecular standards (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA).

2.9. Chaperone Activity Assay. Chaperone activity of PaAhpC and SeAhpC was analyzed by measuring its ability to inhibit thermally induced aggregation of citrate synthase (CS) as described by Kamariah and colleagues (2018). Briefly, CS (2 μ M) was mixed with AhpC at molar ratio 20:1 in Hepes-KOH 40 mM pH 7.5. We also evaluated the differences in chaperone ability of PaAhpC and SeAhpC samples that were previously heated (48°C for 1 hour). As negative control, samples without the AhpC were used. CS aggregation was monitored by light scattering at 360 nm using a Synergy H1 microplate reader (BioTek, Winooski, USA). The assay was executed at 43°C, with continuously shaking (fast double orbital), with reads at each 15 seconds for 90 minutes.

2.10. In Silico Screening of the Typical 2-Cys Prx Containing Thr or Ser in Catalytic Triad and Phylogenetic Analyses. The sequences of the *S. cerevisiae* Tsa1 (UniProtKB: P34760), Tsa2 (Q04120), *Salmonella typhimurium* AhpC (P0A251) and *Staphylococcus aureus* AhpC (P0A0B7) as eukaryotic and prokaryotic prototypes of typical 2-Cys Prx containing Thr or Ser in the catalytic triad. These amino acid sequences were used as query against TREMBL database using blastp⁴⁸ with a cutoff e-value of 10⁻³. Then, to minimize misidentification issues, with hmmscan (v.3.1b2)⁴⁹, we identified Pfam domains out of the putative unique orthologs and retained only those presenting the domains found in Tsa1 and Tsa2, AhpC-Prx1 (Pfam: PF00578), Redoxin (PF08534) and 1-Cys Prx_C (PF10417). Sequences presenting other domains, except for SCO1-SenC (PF026300), which we observed in the *S. aureus* AhpC, were excluded. Additionally, because Prx superfamily presents a conserved active-site cysteine P-X-X-X-(T/S)-X-V-C-P-T-E motif⁵⁰, known as C_P-loop²⁰, we removed sequences lacking this motif. After these filtering steps, we retrieved taxonomic information of the accessions we

259 obtained from the NCBI taxonomy database (Database resources of the National Center for
260 Biotechnology Information, 2016).

261

262 **2.11. Analysis of Crystallographic Structures.** The Prx quaternary structures were accessed
263 from the protein structure database (<http://www.rcsb.org>). The molecular 3D representations
264 were generated using PyMOL (<http://www.pymol.org>).

3. RESULTS

3.1 Presence of a Ser in the Catalytic Triad Increased Resistance of Yeast 2-Cys Prx to Hyperoxidation. Previously, we observed that the presence of a Ser residue in the catalytic triad stabilized yeast 2-Cys Prxs in the decameric state even in the disulfide form ³. Here, we investigated if the presence of a Ser or Thr in the catalytic triad might also affect the hyperoxidation susceptibilities of these enzymes.

The decrease of NADPH consumption at increasing hydroperoxides concentrations (H_2O_2 in Figure 2 and CHP in Figure 2) revealed 2-Cys Prx inhibition probably due to C_P hyperoxidation. Tsa1 (a Thr-Prx) was more susceptible to inactivation (Figure 2A) when compared to Tsa2 (a Ser-Prx) (Figure 2C). At concentrations higher than 500 μM , H_2O_2 significantly inhibited the peroxidase activity of the Tsa1 (Figure 2A). On the other hand, even at very high doses of H_2O_2 (10 mM), no decrease of the Tsa2 activity was observed (Figure 2C). Then, NADPH assays with mutant proteins (Tsa1^{T44S} and Tsa2^{S44T}) were performed. Tsa1^{T44S} (Figure 2B) was more resistant to H_2O_2 inactivation than wild type Tsa1 (Figure 2A). In contrast, Tsa2^{S44T} (Figure 2D) was more susceptible to inactivation than wild type Tsa2 (Figure 2C). Therefore, these results indicated that Thr-Prx are more susceptible to hyperoxidation than Ser-Prx

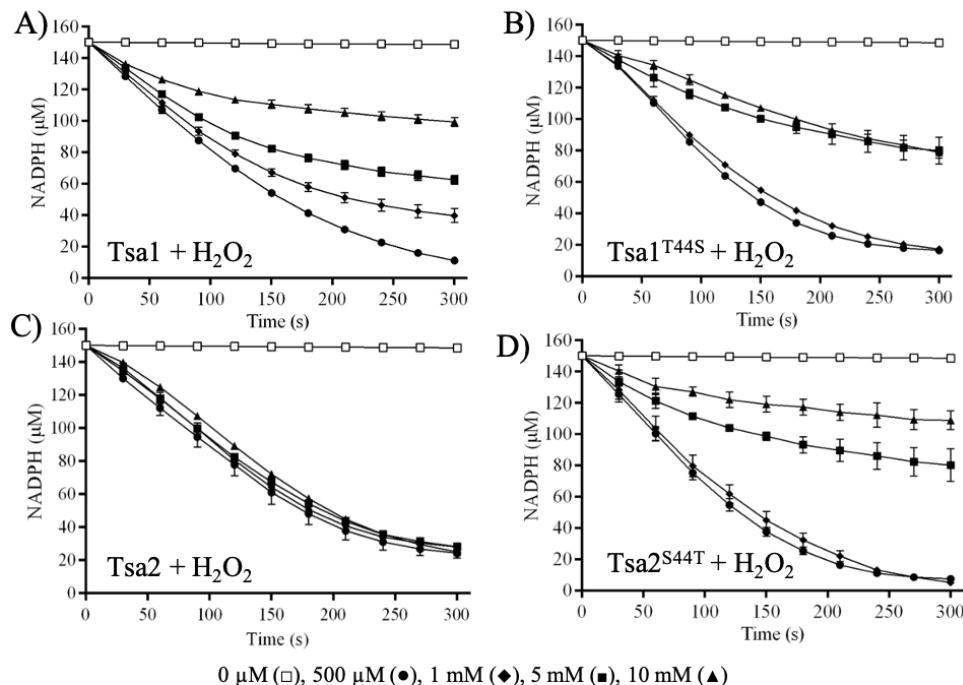


Figure 2. Tsa1, Tsa2 and mutants inhibition by H_2O_2 . *S. cerevisiae* Tsa1 (A), Tsa1^{T44S} (B), Tsa2 (C) or Tsa2^{S44T} (D) were exposed to increasing amounts of H_2O_2 . The assays were performed with 1 μM 2-Cys Prx, 2 μM Trx1, 0.3 μM TrxR1 and increased amounts of H_2O_2 (0 μM = $\square$, 500 μM = $\bullet$, 1 mM = $\blacklozenge$, 5 mM = $\blacksquare$ and 10 mM = $\blacktriangle$)

in buffer containing 50 mM Hepes pH 7.4, 100 μ M DTPA, 1 mM sodium azide and 150 μ M NADPH. The decrease in NADPH absorbance was followed at 340 nm. All the experiments were performed in triplicate and repeated at least three times with similar results.

We then verified the susceptibilities of these yeast 2-Cys Prxs to hyperoxidation by an organic hydroperoxide (CHP). The peroxidase activities of Thr-Prxs were almost abolished in all concentrations tested for Tsa1 (Figure 3A) and Tsa2^{S44T} (Figure 3D). In contrast, Ser-Prxs were considerably more resistant to inactivation (Figure 3 B, C). Indeed, the comparison of the initial rates (V_0) at the different H₂O₂ and CHP concentrations are in agreement with profile observed in the graphics with a decrease in decomposition rates to all enzymes as the hydroperoxide concentration increases (Table S1).

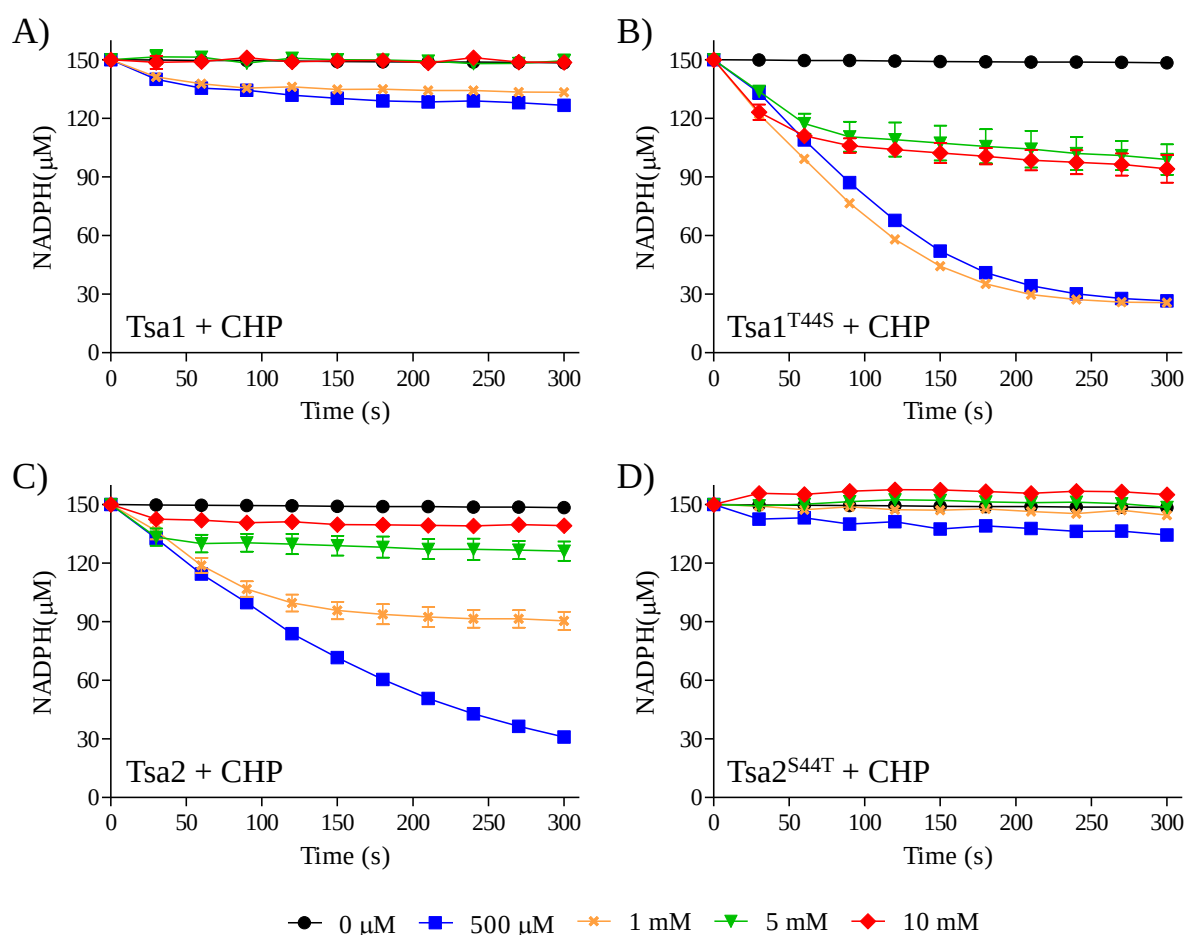


Figure 3. Inactivation of yeast Tsa1, Tsa2 and mutants by CHP. Similar to figure 1, *S. cerevisiae* Tsa1 (A), Tsa2 (B), Tsa1^{T44S} (C) or Tsa2^{S44T} (D) were treated with growing amounts of CHP and the absorbance of NADPH was monitored at 340 nm. The experiment was executed with 1 μ M 2-Cys Prx, 2 μ M Trx1, 0.3 μ M TrxR1 and increased amounts of CHP (0 μ M = ● black, 500 μ M = ■ blue, 1 mM = × orange, 5 mM = ▼ green and 10 mM = ◆ red) in

buffer containing 50 mM Hepes pH 7.4, 100 μ M DTPA, 1 mM sodium azide and 150 μ M NADPH. All the experiments were performed in triplicate and repeated at least three times with similar results.

Aiming to confirm if the inactivation of 2-Cys Prx occurred due to C_P hyperoxidation, we collected samples after these kinetic experiments and performed western blot assays using anti- SO₃ antibody (Supplementary Material, Figure S1). Hyperoxidized 2-Cys Prx can migrate as a dimer (~ 46 kDa) in non-reducing SDS-PAGE, when one of the active sites is in the disulfide form and the other with the C_P hyperoxidized (C_P-SO₃H), or as monomer, when all C_Ps are hyperoxidized. We detected bands in all samples (Supplementary Material, Figure S1), confirming that inhibition in NADPH assay occurred by C_P hyperoxidation (Figures 2 and 3).

Two main findings may be highlighted from these results. As already observed⁵¹, Tsa1 is strikingly more sensitive to hyperoxidation by the organic hydroperoxide CHP than to H₂O₂ (Figure 2A and 3A). We now observed that the same characteristic for Tsa2 (Figures 1C and 2C). Additionally, we verified that Ser-Prx (Tsa2 and Tsa1^{T44S}) are more resistant to hyperoxidation than Thr-Prx (Tsa1 and Tsa2^{S44T}), indicating that the presence of Ser in the catalytic triad is an important factor contributing to the resistance of C_P hyperoxidation (Figures 2 and 3). Accordingly, *Atsa2* yeast strains are more sensitive to organic hydroperoxides than *Atsa1* (Munhoz and Netto, 2004).

3.2 Typical 2-Cys Ser-Prx are Distributed in a More Restrict Number of Organisms than Thr-Prx. To investigate the distribution of the typical 2-Cys Ser-Prx and Thr-Prx among phylogenetic groups, we analyzed 45939 unique protein sequences, out of which 15034 accessions presented AhpC-TSA, Redoxin and 1-CysPrx_C domains denominations according to Pfam and no other domain fused, except for SCO1-SenC. Out of the sequences with taxonomic annotation at domain level, Thr-Prx represent the majority (14092 sequences, approximately 93.5%), whereas the remaining (941 sequences, approximately 6.3%) are Ser-Prx (Table 3). When the three domains of life were compared, the proportions of Thr-Prx to Ser-Prx are slightly different. Ser-Prx sequences are proportionally more representative in bacteria (7.4%) compared to eukaryotes (2.7%) and archaea (1.4%) (Figure 4). We also found 45 Thr-Prx records deposited in the NCBI database obtained by metagenome approaches and three of them were uncategorized.

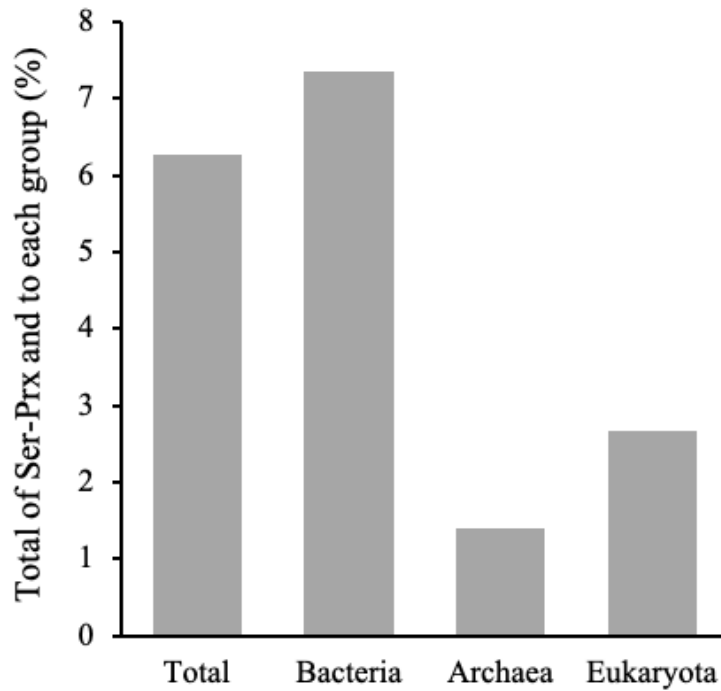


Figure 4. Distribution of the typical 2-Cys Prx containing Thr or Ser as part of the catalytic triad. The analysis of 15,034 unique sequences of typical 2-Cys from the NCBI revealed 14,092 Thr-Prx (93.7%) and 941 Ser-Prx (6.3%) sequences. Considering each domain, Ser-Prx are more abundant at bacteria (7.4%), followed by eukaryotes (2.7%) and archaea (1.4%).

The number of hits observed in Archaea was very low and the number of typical 2-Cys Thr-Prx (71) is vastly superior to that of Ser-Prx (1). Considering eukaryotes organisms, Thr-Prx are also more widely distributed (2,949 representatives present in 12 Superphyla groups) than Ser-Prx (90 sequences found in only four groups) (Table 3). Regarding chordates, the only species presenting Ser-Prx was the killifish *Fundulus heteroclitus* (Linnaeus, 1766), whereas a wide range of tetrapodes presented only Thr-Prx (See Supplementary Material, Spreadsheet 1).

Concerning bacteria, we found 16 bacterial Superphyla groups containing typical 2-Cys Thr-Prx, with the prevalence of the Proteobacteria followed by Sphingobacteria (FCB group) and Thermodesulfobacteria groups. Conversely, Ser-Prx occurs with striking predominance in the Terrabacteria group (Table 3). Curiously, Thr-Prx are distributed similarly in Gram - and Gram +, whereas Ser-Prx are found mostly from Gram - (Actinobacteria and Firmicutes). Additionally, as *S. cerevisiae*, some bacteria (e.g. *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*) possess both Thr-Prx and Ser-Prx isoforms.

Table 3. Distribution of typical 2-Cys Thr-Prx or Ser-Prx.

Thr		Ser	
Bacteria	Eukaryota	Bacteria	Eukaryota
Acidobacteria	15	Alveolata	107
Aquificae	16	Amoebozoa	83
Calditrichaeota	2	Apusozoa	2
Chrysiogenetes	1	Cryptophyta	1
Deferribacteres	5	Euglenozoa	105
Elusimicrobia	18	Heterolobosea	1
Environmental samples	3	Opisthokonta	2079
FCB group*	1455	Parabasalia (parabasalids)	13
Fusobacteria	78	Rhizaria	4
Nitrospirae/Tectomicrobia group	11	Rhodophyta	116
Nitrospirae	15	Stramenopiles	136
Proteobacteria	4890	Viridiplantae	302
PVC group	220		
Spirochaetes	149		
Synergistetes	10		
Terrabacteria group	3564		
Thermodesulfobacteria	2		
Unclassified	245		

*Superphylum that comprises Fibrobacteres, Chlorobi, and Bacteroidetes phyla, [§]Superphylum that comprises Planctomycetes, Verrucomicrobia, and Chlamydiae phyla.

3.3 Analysis of the Quaternary Structure of Bacterial Thr-Prx and Ser-Prx. We carried out SEC analysis of bacterial 2-Cys Prxs. While PaAhpC^{WT} is a decamer in the reduced form and a dimer when oxidized (Figure 5A), PaAhpC^{T44S} is a decamer when oxidized or reduced (Figure 5B). Similarly, yeast Tsa1 and *Salmonella typhimurium* AhpC (both Thr-Prx) are decamers when reduced and dimers when oxidized in disulfides, while the substitution of Thr to Ser confers higher stability to the decamer even when the 2-Cys Prxs are oxidized^{3, 38, 43}.

In the same line, SeAhpC^{WT} was presented mostly as decamer independently of the redox state, similarly to others Ser-Prx^{3, 42}, although the reduced form showed a small amount of dimers (Figure 5C). Additionally, most of SeAhpC^{S46T} was presented as decamer and only a small fraction of the enzyme was detected as dimers, independently of the redox state (Figure 5D). It has been shown by SEC and TEM that the AhpC from *Enterococcus faecalis*, a naturally Ser-Prx, is able to form a decamer independent of the redox state⁴², similarly to yeast Tsa2³. Thus, our results indicated that the Thr/Ser of the catalytic triad is a relevant factor related to

the redox sensitive structural switch, but additional aspects also interfere with the quaternary assembly of typical 2-Cys Prx.

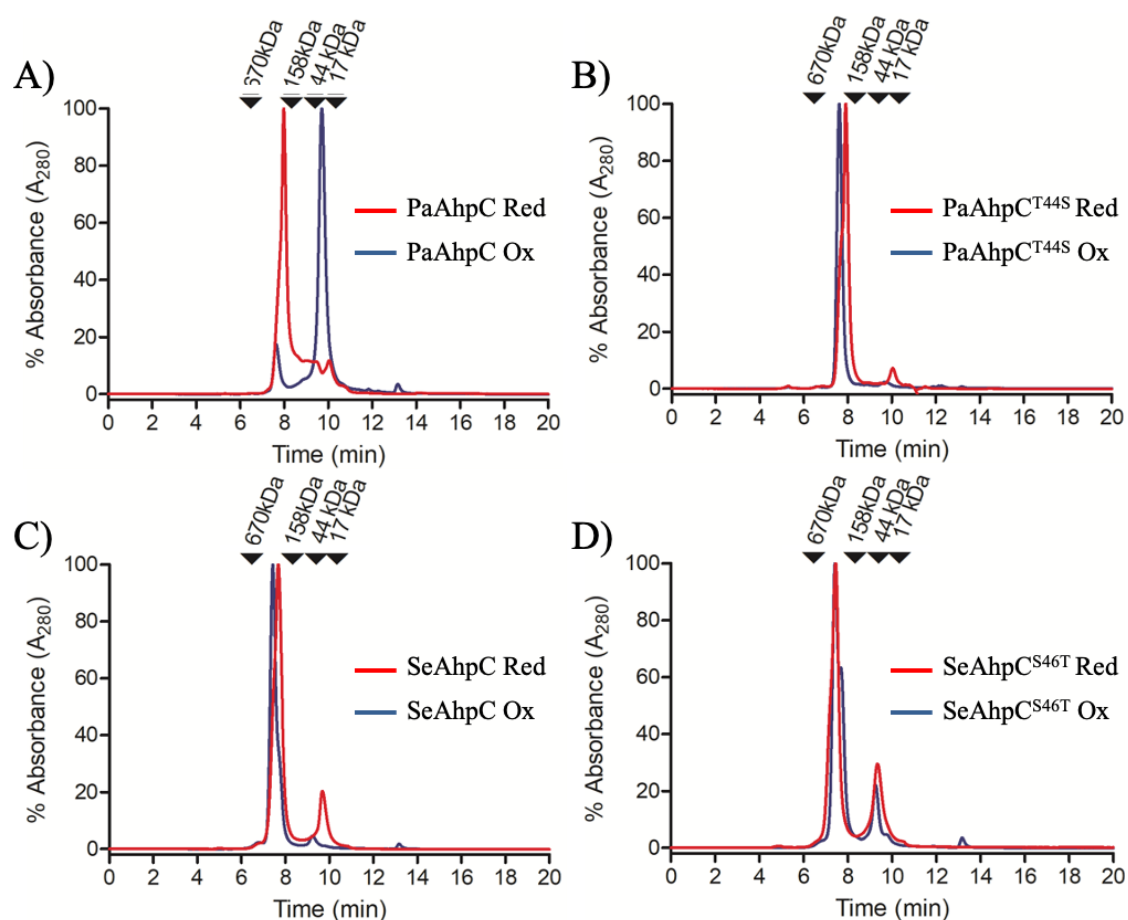


Figure 5. Size exclusion chromatography (SEC) of PaAhpC and SeAhpC and Thr/Ser mutants. PaAhpC (A), PaAhpC^{T44S} (B), SeAhpC (C) and SeAhpC^{S46T} (D), at final concentration of 30 μ M, were treated with TCEP 5 mM (red lines) or H₂O₂ 36 μ M (blue lines) for 30 minutes, at room temperature, before being submitted to SEC. The elution profile was monitored at a wavelength of 280 nm, at flow rate of 1 ml/min. Bovine thyroglobulin (670 kDa), bovine gamma globulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa) and myoglobin (17 kDa) were used as molecular standards. The experiments were performed at least three times.

3.4 Typical 2-Cys Prx from Bacteria (AhpC) Containing Ser Present a Slight Increased Resistance to Inactivation by CHP. Considering the higher abundance of Ser-Prx in prokaryotes, we investigated if the presence of Thr or Ser in the catalytic triad could also affect the susceptibility of bacterial 2-Cys Prx to hyperoxidation. We analyzed recombinant AhpCs from *Pseudomonas aeruginosa* (PaAhpC - a Thr-Prx) and AhpC from *Staphylococcus epidermidis* (SeAhpC - a Ser-Prx), as they belong to the most abundant groups from Thr-Prx (Proteobacteria) and Ser-Prx (Terrabacteria).

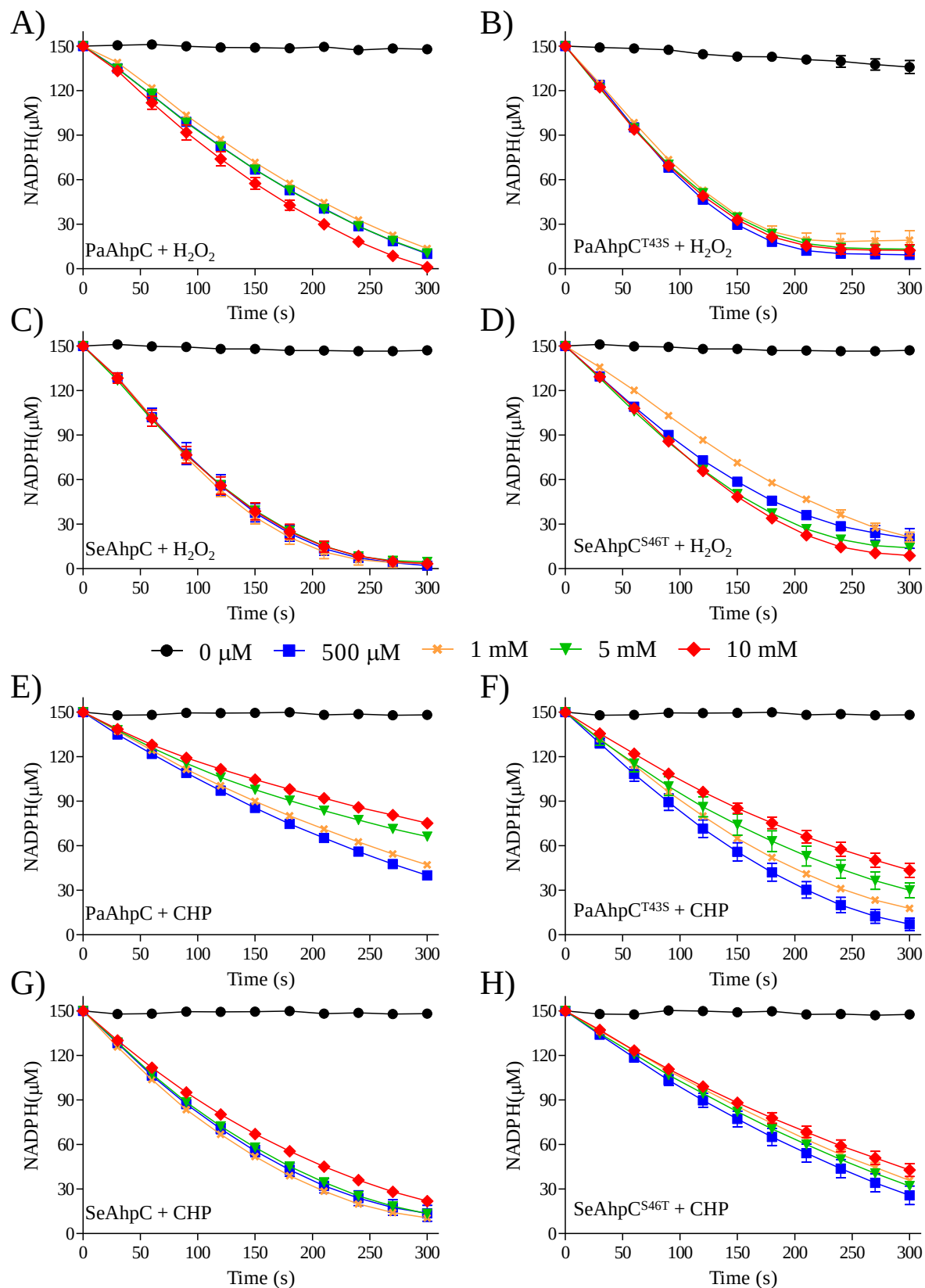


Figure 6. NADPH oxidation assay for evaluation of AhpC hyperoxidation of *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* using the heterologous *E. coli* Trx system. Reactions were executed containing PaAhpC (A and E), PaAhpC^{T43S}

(B and F), SeAhpC (C and G) or SeAhpC^{S46T} (D and H) (3 μM), EcTrx (6 μM), EcTrxR (0.9 μM), NADPH (150 μM), Hepes 50 mM pH 7.4, sodium azide 1 mM and DTPA 100 μM. The experiments were started adding growing concentrations (0 μM, 250 μM, 500 μM, 1 mM, 5 mM and 10 mM) of H₂O₂ (A, B, C and D) or CHP (E, F, G and H) and the reactions were incubated for 5 min/37°C. The oxidation of NADPH was monitored spectrophotometrically at 340 nm.

In the experimental conditions tested, H₂O₂ did not inhibit the NADPH consumption in the reaction mixtures containing wild-type PaAhpC (Figure 6A) or SeAhpC (Figure 6C) even at the highest doses (10 mM). However, all the NADPH in the reaction with SeAhpC was consumed close to 250 seconds (Figure 6C), while the reaction containing PaAhpC depleted the NADPH only after 300 seconds, indicating that SeAhpC is slightly more efficient than PaAhpC.

As observed to *S. cerevisiae* Tsa1 and Tsa2, when CHP was the substrate, the inhibition was more evident. PaAhpC inhibition was proportional to the CHP concentration (Figure 6E), whereas the mutant PaAhpC^{T43S} (Figure 6F) was more robust than the wild type enzyme. The reaction containing SeAhpC was only slightly inhibited by CHP, being more significant with 10 mM CHP (Figure 6G), but the mutant SeAhpC^{S46T} was more susceptible to inactivation (Figure 6H). To confirm that the inhibition of peroxidase activity is a consequence of the C_P hyperoxidation, western blot analysis was performed using anti- SO₃ antibody (Supplementary Material, Figure S2).

It did not escape to our attention that the Thr ⇌ Ser substitutions also altered the rates of peroxide decomposition, since the initial rates differed among the enzymes (Table S2). Comparison of the initial rates of the reactions to the lowest (250 μM) and higher (10 mM) concentrations of hydroperoxide used in the experiments shows that Ser-Prx presented higher initial rates (V₀) as general trend (Table S2). These results agree with those obtained in *Leishmania donovani* Tryparredoxin peroxidase, as substitution of Thr by Ser increased approximately 50% efficiency in the decomposition of organic peroxide ²², however no study to date have investigate proteins containing naturally the Thr to Ser substitution in eukaryotes and bacteria.

3.5 AhpCs Containing Ser Present Increased Thermal Stability – We also evaluated the stability of enzymes containing Thr or Ser enzymes by thermal shift assay. The differential scanning fluorimetry (DSF) curve for wild type PaAhpC presented a lag phase and the

determined T_m was $58.49 \pm 1.35^\circ\text{C}$ (Figure 7A). The DSF curve for PaAhpC^{T44S} displayed a sudden increase in the fluorescence and the T_m was determined to be $66.10 \pm 2.32^\circ\text{C}$. Therefore, replacement of the catalytic triad Thr by Ser resulted in an increase about 8°C in the melting temperature (Figure 7A). For SeAhpC and SeAhpC^{S46T}, the shapes of the thermal sigmoidal profiles were very similar, although the Ser to Thr substitution resulted in a decrease of $\approx 9^\circ\text{C}$ of the T_m (61.25 ± 0.50 and $52.70 \pm 0.62^\circ\text{C}$, respectively) (Figure 6B). Therefore, the presence of Ser in the catalytic triad increased the thermal stabilities of the AhpCs. Curiously, the substitution of the Thr by Ser in PaAhpC^{T43S} made the engineered enzyme even more stable than SeAhpC, for which Ser naturally occurs.

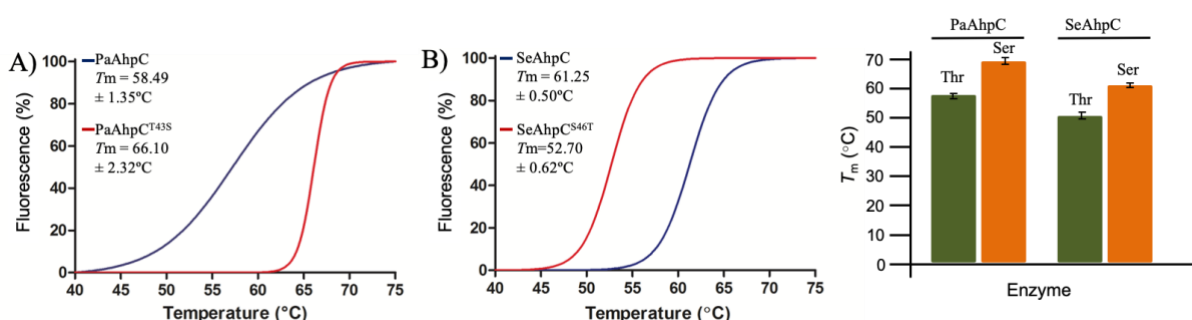


Figure 7. AhpC thermal unfolding monitored by differential scanning fluorimetry. Differential scanning fluorimetry of PaAhpC (A, blue line), PaAhpC^{T43S} (A, red line), SeAhpC (B, blue line) and SeAhpC^{S46T} (B, red line). (C) Comparative thermal stabilities of PaAhpC and SeAhpC containing Thr or Ser in the catalytic triad. Proteins were previously reduced with DTT (20 mM), desalted (PD10, GE Healthcare) and incubated with SYPRO Orange dye. The fluorescence scanning was carried out using a temperature gradient from 25°C to 95°C . The melting temperature T_m was determined by the Boltzmann equation to determine the midpoint of thermal denaturation.

Since the thermal stability increased in Ser-Prx, we tested if the proteins retained their peroxidase activities after the thermal pre-treatments. The Thr-Prx (PaAhpC and SeAhpC^{S46T}) that were heated to 55°C were partially inactivated (Figure 8A and 8D). However, the effect of temperature was much more noticeable for SeAhpC^{S46T}, where the pre-treatment at 55°C abolished the peroxidase activity of the enzyme (Figure 8D). This result agreed with the determined T_m values, as the enzyme SeAhpC^{S46T} displayed the lowest T_m value. On the other hand, the Ser-Prx (PaAhpC^{T43S} and SeAhpC) retained the activity in all temperatures tested (Figure 8B and 8C).

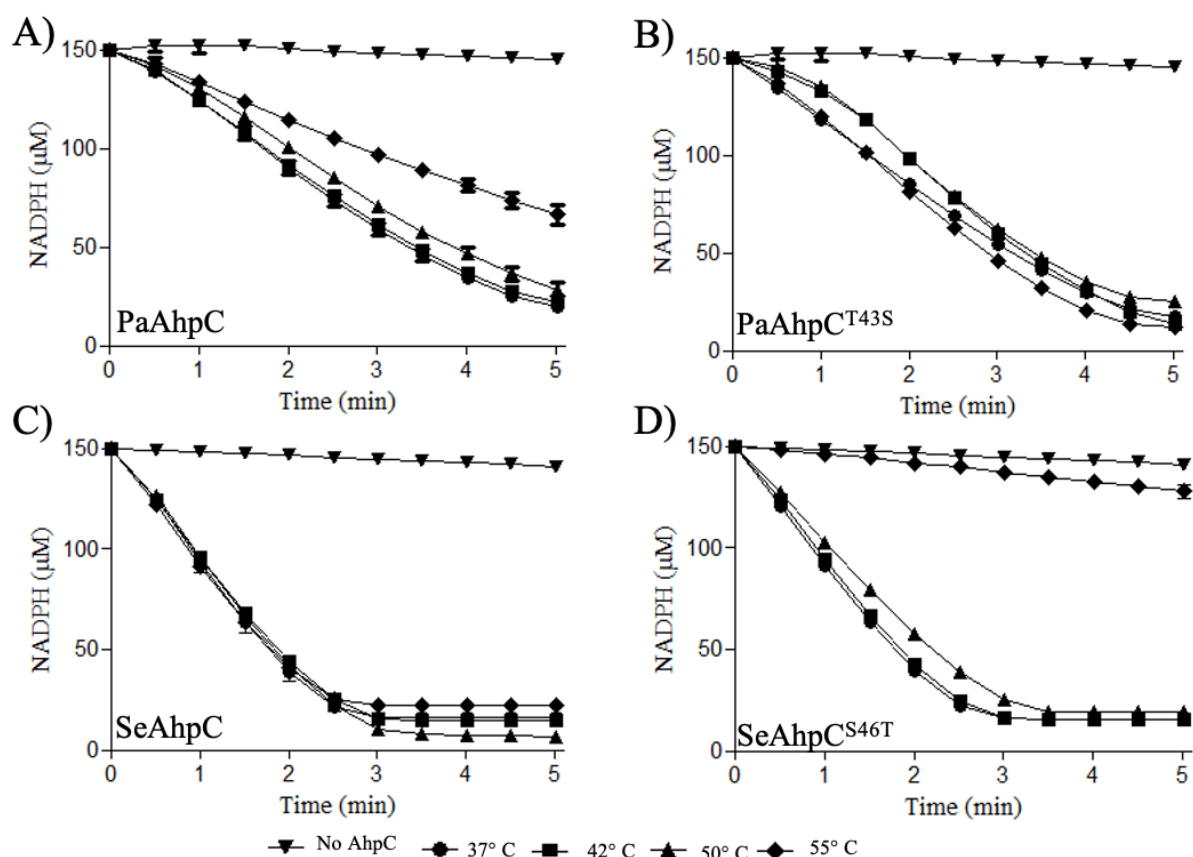


Figure 8. NADPH oxidation assay to assess the effects of thermal inactivation of AhpC enzymes. Aliquots of the PaAhpC (A), PaAhpC^{T43S} (B), SeAhpC (C) and SeAhpC^{S46T} (D) were incubated at different temperatures (37°C = ●, 42°C = ■, 50°C = ▲ and 55°C = ◆) for 1 hour. Then the enzymes were added to the reactions containing EcTrx (6 μM), EcTrxR (0.9 μM), NADPH (150 μM), HEPES (50 mM, pH 7.0), DTPA (100 μM) and sodium azide (1mM). The reactions were initiated by the addition of 500 μM H₂O₂ and absorbance at 340 nm was monitored at 37°C, for 5 minutes. As negative control (▼), reactions were performed without the addition of the AhpC.

3.6. AhpC Containing Ser Present Enhanced Chaperone Activity. We also investigated the abilities of these AhpCs to protect citrate synthase (CS) against thermal insult. CS slowly aggregated when kept at 48°C as indicated by increased light scattering as a function of time (Figure 9A and 9B, black lines). In the presence of PaAhpC, the CS aggregation decreased significantly (Figure 9A, blue line). We also tested if the pre-treatment of PaAhpC at 48°C by 1 hour was able to exert additional protection to CS, but no difference was observed in comparison to the untreated enzyme (Figure 9A, red line). In the case of SeAhpC, the sample without thermal pre-treatment presented a more pronounced protection activity (Figure 9B, blue

line) than PaAhpC. Notably, pre-heated SeAhpC (48°C/1h) protected CS with very high efficiency, because only a negligible amount of CS aggregated (Figure 9B, red line). Therefore, our results suggest that AhpCs containing Ser in the catalytic triad are more prone to act as chaperone induced by heat shock stress than their counterparts containing Thr.

The ability of the typical 2-Cys Prx to act as chaperone was already demonstrated to several enzymes from eukaryotes^{32, 33} and some bacterial proteins^{34, 52, 53}. These enzymes are able to switch from peroxidase to chaperone in response to oxidative stress, by hyperoxidation of the C_P to sulfinic acid or sulfonic acid (C_P-SO₂ or C_P-SO₃), or by thermal stress. Considering the high resistance of AhpC to C_P hyperoxidation, the thermal stress must be the main factor that triggers the chaperone activity, what was confirmed by Kamariah and coworkers (2018) using *E. coli* AhpC (Thr-Prx) as model. Here, we observed the same effect to SeAhpC, a Ser-Prx, being tempting to speculate that chaperone activity may be facilitated in these enzymes because they are stabilized as decamers, irrespective to the oxidative state.

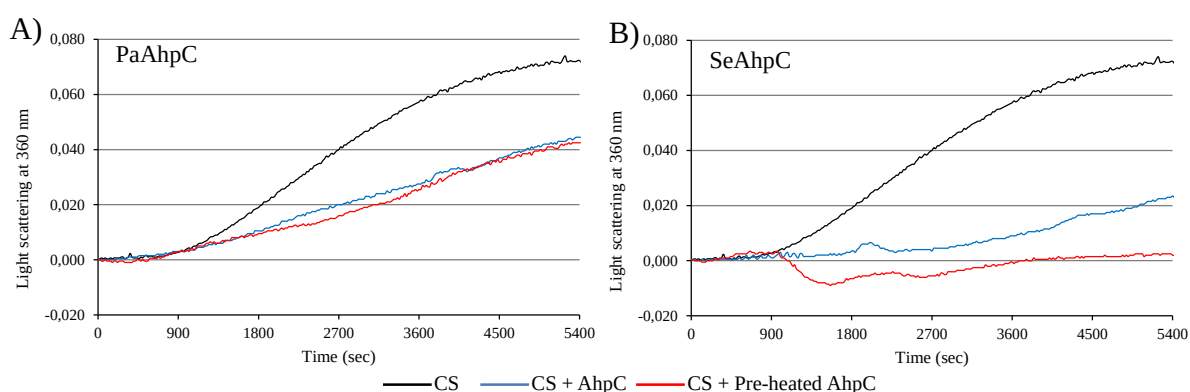


Figure 9. Comparative protection of PaAhpC and SeAhpC to citrate synthase (CS) aggregation by thermal stress. Chaperone activity of PaAhpC and SeAhpC was monitored by its ability to protect citrate synthase (CS) from thermally induced aggregation. The aggregation of 2 μ M of CS in 40 mM Hepes-KOH pH 7.5 was monitored by light scattering ($\lambda = 360$ nm) for 90 minutes either alone or in the presence of 40 μ M PaAhpC (A) or SeAhpC (B). The assays were executed with the enzyme pre-heated at 48°C for 1 hour (red lines) or not (blue lines). The CS alone was used as negative control (black lines).

DISCUSSION

The roles of Thr or Ser in the catalytic triad of the typical 2-Cys Prx has been considered redundant, but recently we and others showed that the presence of Ser in catalytic triad stabilized the decameric form of these enzymes^{3, 43}. Here, we showed that the presence of Ser or Thr in the active site affect also the C_P hyperoxidation susceptibilities, thermal resistance and

the acquisition chaperone activities of typical 2-Cys Prx. Furthermore, our results revealed that the vast majority of multicellular organisms have Thr on catalytic triad and Ser might be related with diverse ecological strategies in some groups of bacteria. Although the typical 2-Cys Prx from bacteria are very resistant to hyperoxidation, we demonstrated that the Ser to Thr substitution further increased the resistance to inactivation of AhpC by hydroperoxides.

Previously, eukaryotic 2-Cys Prxs were described to be highly susceptible to oxidative inactivation in comparison with bacterial counterparts³⁹. Accordingly, eukaryotic 2-Cys Prx were named as sensitive, while bacterial enzymes were referred as robust. Furthermore, authors identified the presence of GGLG and YF motifs exclusively in eukaryotic 2-Cys Prx, which were proposed to be positively selected during evolution³⁹. The presence of the GGLG and YF motifs near the C_P residue would represent a steric hindrance effect, decreasing the rate of intermolecular disulfide bond formation⁵⁴.

Here, we analyzed the susceptibilities of sensitive (Tsa1, Tsa2) and robust (PaAhpC, SeAhpC) 2-Cys Prx carrying Thr or Ser in the catalytic triad. Our results indicated that the substitution of Thr by Ser produced much more pronounced effect in sensitive 2-Cys Prx than in robust enzymes (comparison between Figures 2, 3 with Figure 6).

More recently, two other structural elements, named motifs A and B, were identified within the amino acid sequences of typical 2-Cys Prx, conferring resistance to hyperoxidation⁴⁴. These motifs may account at least in part for more subtle differences in hyperoxidation susceptibilities among typical human 2-Cys Prx (Prx 1-4). Accordingly, human Prx3 contains both motifs A and B and is the most resistant to hyperoxidation among human 2-Cys Prx. Furthermore, bacterial 2-Cys Prx (AhpCs) from *Salmonella enterica* contains motifs A and B and lacks GGLG and YF motifs and it is very robust against oxidative inactivation⁴⁴.

We analyzed the presence of the motifs A and B in other bacterial 2-Cys Prx (AhpCs) and we observed that these structural elements are not fully conserved (Table S3 and Figure S3). In contrast, only some residues of motifs A and B are present in Tsa1 and Tsa2. Furthermore, the amino acid composition corresponding to these motifs A and B are almost identical between these two yeast enzymes, with exception of the first residue from motif A that was marked as Glu in Tsa1 and as Asp in Tsa2. Therefore, our analysis of Thr/Ser substitutions covers amino acid sequences of 2-Cys Prxs with different sensitivities to hyperoxidation. Our data indicated that the presence of Thr or Ser in the active site is more pronounced in 2-Cys Prx displaying the GGLG/YF motifs.

We also analyzed the crystallographic structures of Tsa1 (PDB = 3SBC) and Tsa2 (PDB = 5DVB) to gain further insights on mechanisms underlying differences in the hyperoxidation susceptibilities of these enzymes. In our previous work (Tairum et al, 2016), we observed that the side chain of catalytic Ser presents higher mobility than the Thr in Tsa1. The additional methyl group in Thr side chain interacts with an aromatic ring in the adjacent dimer. Thus, the B-factor of active site regions in the 10 chains of Tsa2 structure are higher than observed to Tsa1.

Now, we analyzed the interactions of catalytic Thr and Ser in an attempt to explain the differences in hyperoxidation resistance. We observed that the Ser⁴⁴ in some chains of Tsa2 are in position quite similar to Thr⁴⁴ in Tsa1 (Figure 10A). However, in three chains, the Ser⁴⁴ of Tsa2 are found in an alternative position compared to that one observed to Thr⁴⁴. Consequently, the motif GGLG is moved away from the helix where YF motif is found (Figure 10B) and a helix upstream to the GGLG motif is also deformed. We propose that the high mobility of Ser side chain makes the interaction between GGLG and YF more unstable and, therefore, facilitate the approximation between C_P and C_R and disulfide formation, which would explain the more pronounced resistance to hyperoxidation of the eukaryotic 2-Cys Prx.

In contrast, GGLG and YF motifs are not present in AhpC sequences and the Thr/Ser substitutions in these backgrounds produce less pronounced effects on the susceptibilities to hyperoxidation. In fact, we compared the crystallographic structure of a Thr-Prx (*Salmonella typhimurium* AhpC - PDB entry 1YEP) with the only AhpC containing Ser in the PDB database (*Enterococcus faecalis* – PDB entry 5Y63), but we did not observe any major structural differences.

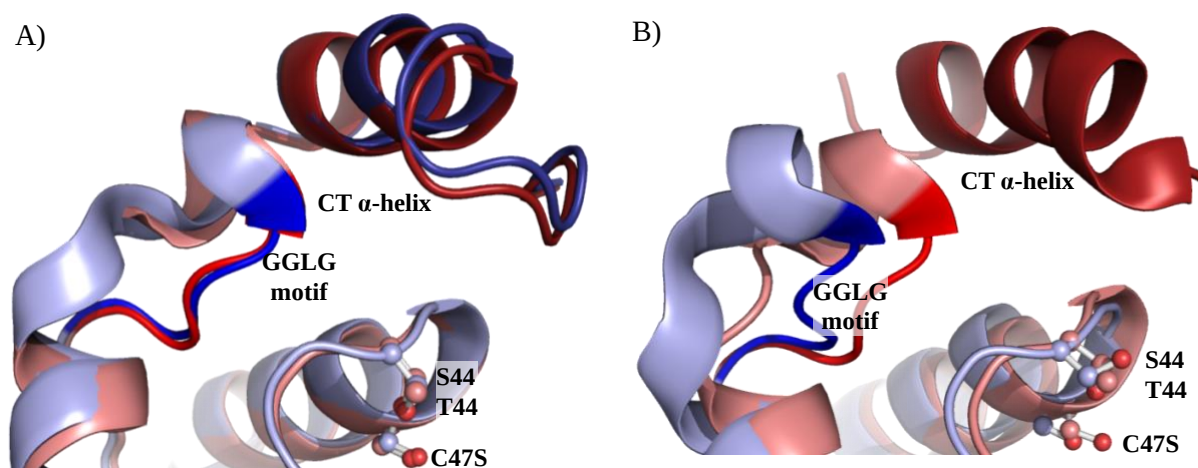


Figure 10. Active site, GGLG and YF motif regions of Tsa1 and Tsa2. **(A)** Superposition of Tsa1^{C47S} (3SBC = pink) and Tsa2^{C47S} (5DVB = light blue) show similar position of Thr⁴⁴ (Tsa1) and Ser⁴⁴ (Tsa2). Motif GGLG (red in Tsa1 and blue in Tsa2) and CT α -helix (dark red in Tsa1 and dark blue in Tsa2) are also in quite similar position. **(B)** When Ser44 is found in an alternative position, GGLG motif is displaced to a further position, while CT α -helix do not appear in the crystallographic structure probably due to be more mobile, and consequently, with low resolution. Crystallographic structures are presented in cartoon and highlighted amino acids are presented as balls and sticks. Graphical models were generated by PyMol.

We observed that 2-Cys Prx are more susceptible to hyperoxidation by organic hydroperoxides than H₂O₂ (Figures 2, 3 and 6), as previously described³⁴, which may be related with the environment close to the active site pocket. Crystallographic observations revealed the presence of large hydrophobic portions around this region^{39, 42, 55}. In fact, *ahpc* gene inactivation frequently render bacteria with increased sensitivity to organic peroxide and AhpC over-expression invariably leads to a gain of resistance against these oxidants⁵⁶⁻⁶². Moreover, *Mycobacterium tuberculosis* and *Helicobacter pylori* mutants for *ahpc* gene accumulated higher levels of lipid hydroperoxides during aerobic growth, when compared to wild type strains⁶³.

Considering that presence of Ser in catalytic triad makes 2-Cys Prx resistant to C_P hyperoxidation, more stable as a decamer and increase its chaperone activity, we speculate that these enzymes may present complementary functions, protecting cells from severe stressful conditions. Ser-Prx might be more adapted to hydroperoxides detoxification and thermal stress defense, while Thr-Prx would be better suit to cell signaling functions. Consistent with this idea, Ser-Prx are more frequent in bacteria, some of them pathogenic. Therefore, Ser-Prx might be considered as target for the development of specific inhibitors to prokaryotic enzymes. Finally, its amazing to note that the nuance of the evolutionary process since a single residue substitution by a similar residue can confers remarkable functional and structural differences between very homologous enzymes.

Acknowledgments

The authors M.A.O., M.C.S., A.L.P.O., L.E.S.N. and O.A. are members of the CEPID REDOXOMA from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (grant number 2013/07937-8). This work was also supported by grants from FAPESP to M.A.O. (2007/50930-3; 2017/19942-7) and M.H.T. (2017/20291-0). C.A.B., M.C.S., C.A.T-Jr and A.L.P.O were recipients of fellowships from FAPESP (2011/13500-6; 2013/16112-2; 2017/06263-4; 2008/09132-9; 2010/00172-8; 2018/12628-8; 2019/04054-4).

Author contributions

M.A.O., L.E.S.N., C.A.B., M.C.S. and C.A.T. conceived and designed the experiments; C.A.B., M.C.S., A.L.P.O., G.M.M., G.T.S. V.I.M.C. and C.A.T. executed the experiments; M.A.O., L.E.S.N., O.A., M.H.T., C.A.B., C.I.P., A.L.P.O., M.C.S. G.M.M., G.T.S. and C.A.T. analyzed the data; M.C.S., C.A.T., O.A., L.E.S.N. and M.A.O. wrote the paper. All authors revised, edited and approved the final version of the manuscript.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be considered as conflict of interest.

References

- (1) Horta, B. B., de Oliveira, M. A., Discola, K. F., Cussiol, J. R., and Netto, L. E. (2010) Structural and biochemical characterization of peroxiredoxin Qbeta from *Xylella fastidiosa*: catalytic mechanism and high reactivity. *J Biol Chem* 285, 16051-16065.
- (2) Ogusucu, R., Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L. E., and Augusto, O. (2007) Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. *Free Radic Biol Med* 42, 326-334.
- (3) Tairum, C. A., Santos, M. C., Breyer, C. A., Geyer, R. R., Nieves, C. J., Portillo-Ledesma, S., Ferrer-Sueta, G., Toledo, J. C., Jr., Toyama, M. H., Augusto, O., Netto, L. E., and de Oliveira, M. A. (2016) Catalytic Thr or Ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms. *Sci Rep* 6, 33133.
- (4) Truzzi, D. R., Coelho, F. R., Paviani, V., Alves, S. V., Netto, L. E. S., and Augusto, O. (2019) The bicarbonate/carbon dioxide pair increases hydrogen peroxide-mediated hyperoxidation of human peroxiredoxin 1. *J Biol Chem* 294, 14055-14067.
- (5) Bengtsson-Palme, J., Alm Rosenblad, M., Molin, M., and Blomberg, A. (2014) Metagenomics reveals that detoxification systems are underrepresented in marine bacterial communities. *BMC Genomics* 15, 749.
- (6) Chae, H. Z., Kim, H. J., Kang, S. W., and Rhee, S. G. (1999) Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res Clin Pract* 45, 101-112.
- (7) Ghaemmaghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K., and Weissman, J. S. (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737-741.
- (8) Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J., and Poole, L. B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 28, 32-40.
- (9) Cox, A. G., Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2009) Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem J* 425, 313-325.
- (10) Winterbourn, C. C. (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* 4, 278-286.
- (11) Brown, J. D., Day, A. M., Taylor, S. R., Tomalin, L. E., Morgan, B. A., and Veal, E. A. (2013) A peroxiredoxin promotes H₂O₂ signaling and oxidative stress resistance by oxidizing a thioredoxin family protein. *Cell Rep* 5, 1425-1435.
- (12) Netto, L. E., and Antunes, F. (2016) The Roles of Peroxiredoxin and Thioredoxin in Hydrogen Peroxide Sensing and in Signal Transduction. *Mol Cells* 39, 65-71.
- (13) Rhee, S. G., and Woo, H. A. (2011) Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H₂O₂, and protein chaperones. *Antioxid Redox Signal* 15, 781-794.
- (14) Stocker, S., Maurer, M., Ruppert, T., and Dick, T. P. (2018) A role for 2-Cys peroxiredoxins in facilitating cytosolic protein thiol oxidation. *Nat Chem Biol* 14, 148-155.
- (15) Tang, H. M., Siu, K. L., Wong, C. M., and Jin, D. Y. (2009) Loss of yeast peroxiredoxin Tsa1p induces genome instability through activation of the DNA damage checkpoint and elevation of dNTP levels. *PLoS Genet* 5, e1000697.
- (16) Chae, H. Z., Chung, S. J., and Rhee, S. G. (1994) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* 269, 27670-27678.

- (17) Jonsson, T. J., Ellis, H. R., and Poole, L. B. (2007) Cysteine reactivity and thiol-disulfide interchange pathways in AhpF and AhpC of the bacterial alkyl hydroperoxide reductase system. *Biochemistry* 46, 5709-5721.
- (18) Netto, L. E. S., Chae, H. Z., Kang, S. W., Rhee, S. G., and Stadtman, E. R. (1996) Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity. *J Biol Chem* 271, 15315-15321.
- (19) Pineyro, M. D., Arcari, T., Robello, C., Radi, R., and Trujillo, M. (2011) Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxyxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 507, 287-295.
- (20) Hall, A., Parsonage, D., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2010) Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on transition-state stabilization. *J Mol Biol* 402, 194-209.
- (21) Chae, H. Z., Kim, I. H., Kim, K., and Rhee, S. G. (1993) Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268, 16815-16821.
- (22) 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., and Hecht, H. J. (2002) Tryparedoxin peroxidase of *Leishmania donovani*: molecular cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism. *Arch Biochem Biophys* 397, 324-335.
- (23) Konig, J., Lotte, K., Plessow, R., Brockhinke, A., Baier, M., and Dietz, K. J. (2003) Reaction mechanism of plant 2-Cys peroxiredoxin. Role of the C terminus and the quaternary structure. *J Biol Chem* 278, 24409-24420.
- (24) Miranda-Vizuet, A., Damdimopoulos, A. E., Pedrajas, J. R., Gustafsson, J. A., and Spyrou, G. (1999) Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization. *Eur J Biochem* 261, 405-412.
- (25) Nagy, P., Kartan, A., Betz, A., Peskin, A. V., Pace, P., O'Reilly, R. J., Hampton, M. B., Radom, L., and Winterbourn, C. C. (2011) Model for the exceptional reactivity of peroxiredoxins 2 and 3 with hydrogen peroxide: a kinetic and computational study. *J Biol Chem* 286, 18048-18055.
- (26) Portillo-Ledesma, S., Sardi, F., Manta, B., Tourn, M. V., Clippe, A., Knoops, B., Alvarez, B., Coitino, E. L., and Ferrer-Sueta, G. (2014) Deconstructing the catalytic efficiency of peroxiredoxin-5 peroxidatic cysteine. *Biochemistry* 53, 6113-6125.
- (27) Biteau, B., Labarre, J., and Toledano, M. B. (2003) ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425, 980-984.
- (28) Jonsson, T. J., Johnson, L. C., and Lowther, W. T. (2008) Structure of the sulphiredoxin-peroxiredoxin complex reveals an essential repair embrace. *Nature* 451, 98-101.
- (29) Day, A. M., Brown, J. D., Taylor, S. R., Rand, J. D., Morgan, B. A., and Veal, E. A. (2012) Inactivation of a peroxiredoxin by hydrogen peroxide is critical for thioredoxin-mediated repair of oxidized proteins and cell survival. *Mol Cell* 45, 398-408.
- (30) Del Olmo, M., Kramer, A., and Herzel, H. (2019) A Robust Model for Circadian Redox Oscillations. *Int J Mol Sci* 20.
- (31) Edgar, R. S., Green, E. W., Zhao, Y., van Ooijen, G., Olmedo, M., Qin, X., Xu, Y., Pan, M., Valekunja, U. K., Feeney, K. A., Maywood, E. S., Hastings, M. H., Baliga, N. S., Merrow, M., Millar, A. J., Johnson, C. H., Kyriacou, C. P., O'Neill, J. S., and Reddy, A. B. (2012) Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature* 485, 459-464.

- (32) Veal, E. A., Underwood, Z. E., Tomalin, L. E., Morgan, B. A., and Pillay, C. S. (2018) Hyperoxidation of Peroxiredoxins: Gain or Loss of Function? *Antioxid Redox Signal* 28, 574-590.
- (33) 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) Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* 117, 625-635.
- (34) Kamariah, N., Eisenhaber, B., Eisenhaber, F., and Gruber, G. (2018) Molecular mechanism of the Escherichia coli AhpC in the function of a chaperone under heat-shock conditions. *Sci Rep* 8, 14151.
- (35) 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.
- (36) Teixeira, F., Tse, E., Castro, H., Makepeace, K. A. T., Meinen, B. A., Borchers, C. H., Poole, L. B., Bardwell, J. C., Tomas, A. M., Southworth, D. R., and Jakob, U. (2019) Chaperone activation and client binding of a 2-cysteine peroxiredoxin. *Nat Commun* 10, 659.
- (37) Peskin, A. V., Dickerhof, N., Poynton, R. A., Paton, L. N., Pace, P. E., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. C. (2013) Hyperoxidation of peroxiredoxins 2 and 3: rate constants for the reactions of the sulfenic acid of the peroxidatic cysteine. *J Biol Chem* 288, 14170-14177.
- (38) Wood, Z. A., Poole, L. B., Hantgan, R. R., and Karplus, P. A. (2002) Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry* 41, 5493-5504.
- (39) Wood, Z. A., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2003) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300, 650-653.
- (40) Angelucci, F., Saccoccia, F., Ardini, M., Boumis, G., Brunori, M., Di Leandro, L., Ippoliti, R., Miele, A. E., Natoli, G., Scotti, S., and Bellelli, A. (2013) Switching between the alternative structures and functions of a 2-Cys peroxiredoxin, by site-directed mutagenesis. *J Mol Biol* 425, 4556-4568.
- (41) Pastor-Flores, D., Talwar, D., Pedre, B., and Dick, T. P. (2020) Real-time monitoring of peroxiredoxin oligomerization dynamics in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 16313-16323.
- (42) Pan, A., Balakrishna, A. M., Nartey, W., Kohlmeier, A., Dip, P. V., Bhushan, S., and Gruber, G. (2018) Atomic structure and enzymatic insights into the vancomycin-resistant Enterococcus faecalis (V583) alkylhydroperoxide reductase subunit C. *Free Radic Biol Med* 115, 252-265.
- (43) Nelson, K. J., Perkins, A., Van Swearingen, A. E. D., Hartman, S., Brereton, A. E., Parsonage, D., Salsbury, F. R., Jr., Karplus, P. A., and Poole, L. B. (2018) Experimentally Dissecting the Origins of Peroxiredoxin Catalysis. *Antioxid Redox Signal* 28, 521-536.
- (44) Bolduc, J. A., Nelson, K. J., Haynes, A. C., Lee, J., Reisz, J. A., Graff, A. H., Clodfelter, J. E., Parsonage, D., Poole, L. B., Furdui, C. M., and Lowther, W. T. (2018) Novel hyperoxidation resistance motifs in 2-Cys peroxiredoxins. *J Biol Chem* 293, 11901-11912.

- (45) Oliveira, M. A., Discola, K. F., Alves, S. V., Medrano, F. J., Guimaraes, B. G., and Netto, L. E. (2010) Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. *Biochemistry* 49, 3317-3326.
- (46) Gonzalez Porque, P., Baldesten, A., and Reichard, P. (1970) Purification of a thioredoxin system from yeast. *J Biol Chem* 245, 2363-2370.
- (47) Huynh, K., and Partch, C. L. (2015) Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay. *Curr Protoc Protein Sci* 79, 28 29 21-28 29 14.
- (48) Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.
- (49) Mistry, J., Finn, R. D., Eddy, S. R., Bateman, A., and Punta, M. (2013) Challenges in homology search: HMMER3 and convergent evolution of coiled-coil regions. *Nucleic Acids Res* 41, e121.
- (50) Hofmann, B., Hecht, H. J., and Flohe, L. (2002) Peroxiredoxins. *Biol Chem* 383, 347-364.
- (51) Kriznik, A., Libiad, M., Le Cordier, H., Boukhenouna, S., Toledano, M. B., and Rahuel-Clermont, S. (2020) Dynamics of a Key Conformational Transition in the Mechanism of Peroxiredoxin Sulfinylation. *ACS Catal* 10, 3326-3339.
- (52) 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.
- (53) Lee, J. T., Lee, S. S., Mondal, S., Tripathi, B. N., Kim, S., Lee, K. W., Hong, S. H., Bai, H. W., Cho, J. Y., and Chung, B. Y. (2016) Enhancement of the Chaperone Activity of Alkyl Hydroperoxide Reductase C from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Resulting from a Point-Specific Mutation Confers Heat Tolerance in *Escherichia coli*. *Mol Cells* 39, 594-602.
- (54) Hall, A., Nelson, K., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2011) Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxid Redox Signal* 15, 795-815.
- (55) Dip, P. V., Kamariah, N., Nartey, W., Beushausen, C., Kostyuchenko, V. A., Ng, T. S., Lok, S. M., Saw, W. G., Eisenhaber, F., Eisenhaber, B., and Gruber, G. (2014) Key roles of the *Escherichia coli* AhpC C-terminus in assembly and catalysis of alkylhydroperoxide reductase, an enzyme essential for the alleviation of oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1837, 1932-1943.
- (56) Cha, M. K., Bae, Y. J., Kim, K. J., Park, B. J., and Kim, I. H. (2015) Characterization of two alkyl hydroperoxide reductase C homologs alkyl hydroperoxide reductase C_H1 and alkyl hydroperoxide reductase C_H2 in *Bacillus subtilis*. *World J Biol Chem* 6, 249-264.
- (57) Charoenlap, N., Eiamphungporn, W., Chauvatcharin, N., Utamapongchai, S., Vattanaviboon, P., and Mongkolsuk, S. (2005) OxyR mediated compensatory expression between *ahpC* and *katA* and the significance of *ahpC* in protection from hydrogen peroxide in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol Lett* 249, 73-78.
- (58) Fukumori, F., and Kishii, M. (2001) Molecular cloning and transcriptional analysis of the alkyl hydroperoxide reductase genes from *Pseudomonas putida* KT2442. *J Gen Appl Microbiol* 47, 269-277.

- (59) Loprasert, S., Atichartpongkun, S., Whangsuk, W., and Mongkolsuk, S. (1997) Isolation and analysis of the *Xanthomonas* alkyl hydroperoxide reductase gene and the peroxide sensor regulator genes *ahpC* and *ahpF*-oxyR-orfX. *J Bacteriol* 179, 3944-3949.
- (60) Sherman, D. R., Mdluli, K., Hickey, M. J., Arain, T. M., Morris, S. L., Barry, C. E., 3rd, and Stover, C. K. (1996) Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 272, 1641-1643.
- (61) Wilson, T., de Lisle, G. W., Marcinkeviciene, J. A., Blanchard, J. S., and Collins, D. M. (1998) Antisense RNA to *ahpC*, an oxidative stress defence gene involved in isoniazid resistance, indicates that *AhpC* of *Mycobacterium bovis* has virulence properties. *Microbiology* 144 (Pt 10), 2687-2695.
- (62) Zhang, B., Gu, H., Yang, Y., Bai, H., Zhao, C., Si, M., Su, T., and Shen, X. (2019) Molecular Mechanisms of *AhpC* in Resistance to Oxidative Stress in *Burkholderia thailandensis*. *Front Microbiol* 10, 1483.
- (63) Wang, G., Conover, R. C., Benoit, S., Olczak, A. A., Olson, J. W., Johnson, M. K., and Maier, R. J. (2004) Role of a bacterial organic hydroperoxide detoxification system in preventing catalase inactivation. *J Biol Chem* 279, 51908-51914.

Serine in the Catalytic Triad Makes Typical 2-Cys Prx More Resistant to Hyperoxidation and Increase Chaperone Activity

Supplementary Material

Carlos A. Tairum Jr.^{1,2§}, Melina Cardoso Santos^{1§}, Carlos Alexandre Breyer^{1§}, Ana Laura Pires de Oliveira¹, Vitoria Isabela Montanhero Cabrera¹, Guilherme Toledo-Silva², Gustavo Maruyama Mori³, Marcos Hikari Toyama⁴, Ohara Augusto⁵, Luis Eduardo Soares Netto⁶ and Marcos Antonio de Oliveira^{1*}

¹ Laboratory of Structural Molecular Biology, Biosciences Institute, UNESP - São Paulo State University, Biosciences Institute, São Vicente, SP, Brazil.

² Laboratory of Biomarkers of Aquatic Contamination and Immunochimistry, Departament of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

³ Molecular Ecology Laboratory, Biosciences Institute, UNESP - São Paulo State University, São Vicente, SP, Brazil.

⁴ Laboratory of Functional and Structural Characterization of Toxins of Venomous and Poisonous Animals, Biosciences Institute, UNESP - São Paulo State University, São Vicente, SP, Brazil.

⁵ Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 05508-090.

⁶ Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 05508-090.

§ These authors contributed equally to this work.

* Correspondence: Marcos A. de Oliveira – marcos.a.oliveira@clp.unesp.br; Luis E.S. Netto – nettoles@ib.usp.br

Table S1. Initial velocities of the yeast enzymes Tsa1, Tsa2 and mutants Tsa1^{T44S} and Tsa2^{S44T} to H₂O₂ or CHP.

	v0 (μM/s) H ₂ O ₂			
	0.5mM	1mM	5mM	10mM
Tsa1 ^{WT}	0.68 (± 0.05)	0.61 (± 0.05)	0.53 (± 0.01)	0.36 (± 0.06)
Tsa1 ^{T44S}	0.74 (± 0.03)	0.66 (± 0.02)	0.342 (± 0.05)	0.24 (± 0.04)
Tsa2 ^{WT}	0.60 (± 0.10)	0.60 (± 0.04)	0.50 (± 0.01)	0.46 (± 0.01)
Tsa2 ^{S44T}	0.78 (± 0.06)	0.70 (± 0.01)	0.43 (± 0.01)	0.22 (± 0.05)
	v0 (μM/s) CHP			
	0.5mM	1mM	5mM	10mM
Tsa1 ^{WT}	0.24 (± 0.03)	0.20 (± 0.014)	RA	RA
Tsa1 ^{T44S}	0.74 (± 0.03)	0.66 (± 0.02)	0.342 (±0.05)	0.24 (±0.04)
Tsa2 ^{WT}	0.56 (±0.018)	0.45 (±0.053)	RA	RA
Tsa2 ^{S44T}	RA	RA	RA	RA

RA: Residual activity

Table S2. Initial reaction rates of PaAhpC, SeAhpC and reciprocal Thr ⇌ Ser mutants using growing concentrations of H₂O₂ and CHP as oxidizing substrates.

H ₂ O ₂				
	0.5 mM	1 mM	5 mM	10 mM
PaAhpC^{WT}	0.57 (±0.02)	0.57 (±0.01)	0.58 (±0.03)	0.71 (± 0.01)
PaAhpC^{T43S}	0.94 (±0.01)	0.86 (±0.03)	0.89 (±0.02)	0.92 (±0.02)
Ratio	0.61	0.66	0.65	0.77
SeAhpC^{WT}	0.92 (±0.02)	0.82 (±0.06)	0.85 (±0.01)	0.78 (±0.01)
SeAhpC^{S44T}	0.67 (±0.01)	0.63 (±0.03)	0.75 (±0.02)	0.84 (±0.04)
Ratio	1.37	1.30	1.13	0.93
CHP				
	0.5 mM	1 mM	5 mM	10 mM
PaAhpC^{WT}	0.45 (±0.02)	0.42 (±0.01)	0.38 (±0.01)	0.35 (±0.01)
PaAhpC^{T43S}	0.69 (±0.06)	0.61 (±0.02)	0.54 (±0.06)	0.45 (±0.03)
Ratio	0.65	0.69	0.70	0.78

SeAhpC^{WT}	0.71 (±0.04)	0.74 (±0.02)	0.68 (±0.01)	0.61 (±0.01)
SeAhpC^{S44T}	0.55 (±0.02)	0.45 (±0.02)	0.48 (±0.01)	0.45 (±0.02)
Ratio	1.29	1.64	1.42	1.36

Table S3. Conservation of hyperoxidation resistance motifs in typical 2-Cys peroxiredoxins isoforms. The hyperoxidation resistance motifs in enzymes containing Thr or Ser in catalytic triad from bacteria, *S. cerevisiae* and human. In dashed lines are highlighted the enzymes used in this work.

Protein	Motif A region D(N/G)H(S/G)	Motif B region T(S/T)
AhpC_C.j. (Thr)	KGEA	TA
AhpC_P.a. (Thr)	NGHG	TT
AhpC_S.t. (Thr)	DGHG	TT
AhpC_Y.p. (Thr)	HGEA	KQ
AhpC_B.a. (Ser)	DGQA	TA
AhpC_B.s. (Ser)	EGHG	SS
AhpC_E.f. (Ser)	ENHA	NA
AhpC_S.e. (Ser)	NGHG	ST
Tsa1_S.c. (Thr)	EGEA	NS
Tsa2_S.c. (Ser)	DGEA	NS
Prx1_H.s. (Thr)	DNHS	KA
Prx2_H.s. (Thr)	NGQA	TS
Prx3_H.s. (Thr)	DNHS	TS
Prx4_H.s. (Thr)	DNQS	TS

Abbreviations and Uniprot code: AhpC_C.j.= *Campylobacter jejuni* (Q0PBH5); AhpC_P.a. = *P. aeruginosa* (Q02UU0T); AhpC_S.t. = *Salmonella typhimurium* (P0A251); AhpC_Y.p. = *Yersinia pestis* (Q0WC89); AhpC_B.c. = *Bacillus cereus* var. *anthracis* (D8GYV3); AhpC_B.s. = *Bacillus subtilis* (P80239); AhpC_E.f. = *Enterococcus faecalis* (O30738) AhpC_S.e. = *S. epidermidis* (Q8CMQ2); Tsa1_S.c. = *S. cerevisiae* (P34760); Tsa2_S.c. = *S. cerevisiae* (Q04120); Prx1_H.s. = *Homo sapiens* (Q06830); Prx2_H.s. = *H. sapiens* (P32119); Prx3_H.s. = *H. sapiens* (P30048) and Prx4_H.s. = *H. sapiens* (Q13162).

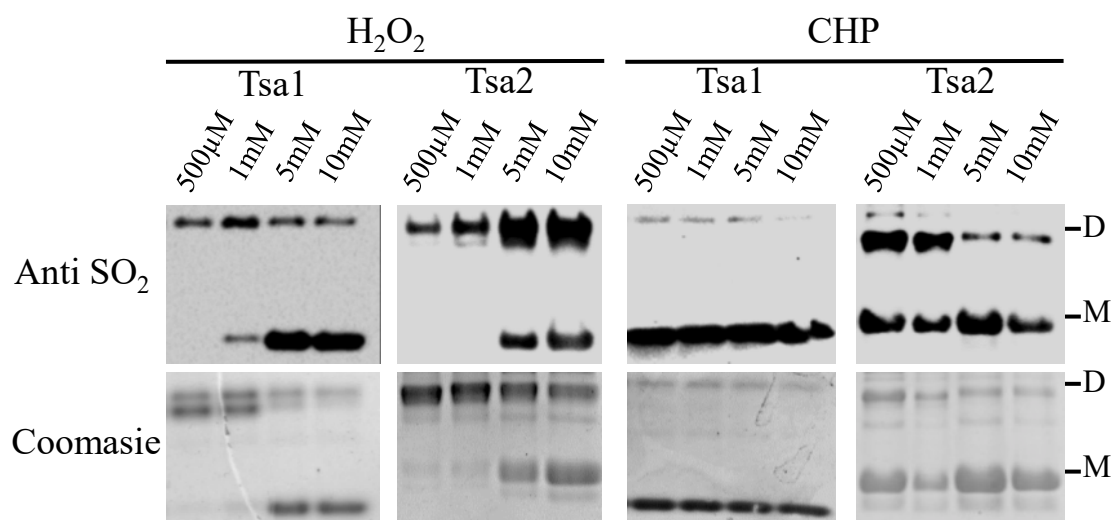
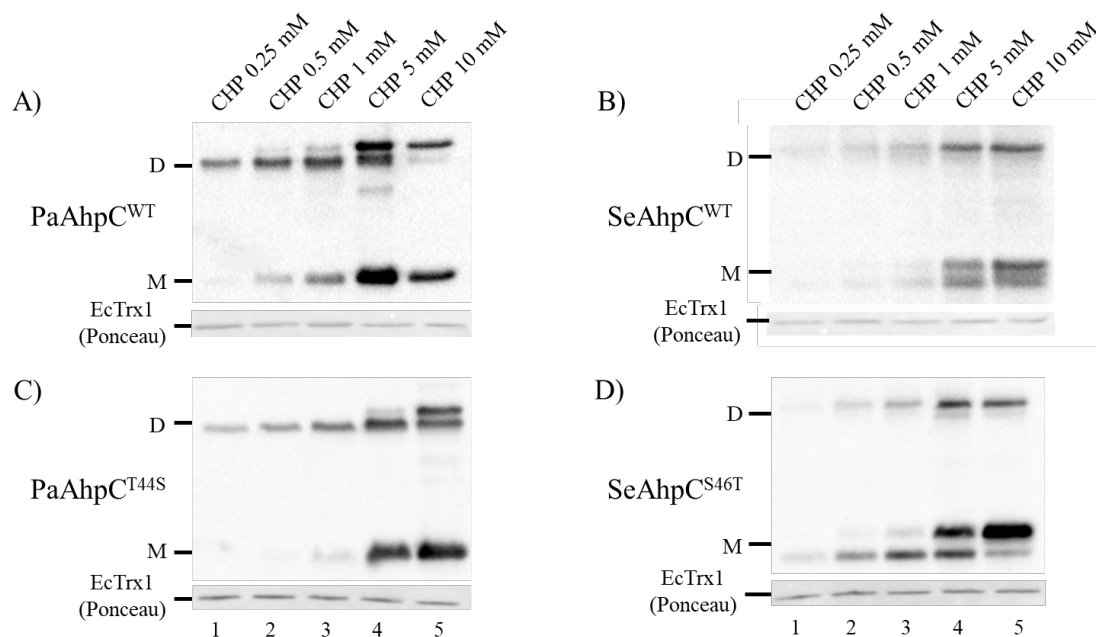


Figure S1. Western blot to confirm C_p hyperoxidation of Tsa1 and Tsa2. The anti- SO₃ antibody were used to verify if Tsa1 and Tsa2 were being hyperoxidized after NADPH assay with growing concentrations of H₂O₂ or CHP (500μM, 1mM, 5mM and 10mM) (upper panels). SDS-PAGE colored by Coomassie blue are presented in lower panel as loading control. The legends at the right side of the figures are: M = monomer and D = dimer.

73



74

Figure S2. Evaluation of AhpC hyperoxidation by western blotting. The results of the experiments were carried out in the presence of PaAhpC^{WT} (A), SeAhpC^{WT} (B), PaAhpC^{C44ST} (C) or SeAhpC^{S46T} (D) (3μM), EcTrx1 (6μM), EcTrxR (0.9μM), NADPH 1mM), sodium azide (100μM) and increasing concentrations of CHP (0.25mM, 0.5mM, 1mM, 5mM and 10mM lanes 1-5, respectively) were treated for 10 minutes at 37 ° C. The membranes were incubated with the anti-PRDX-SO₃ polyclonal primary antibody (AbFrontier) for 2 hours at room temperature and revealed using the ChemiDoc™ MP Imaging System photodocumentator (Bio-Rad). D = dimers; M = monomers.

83

84

85

86

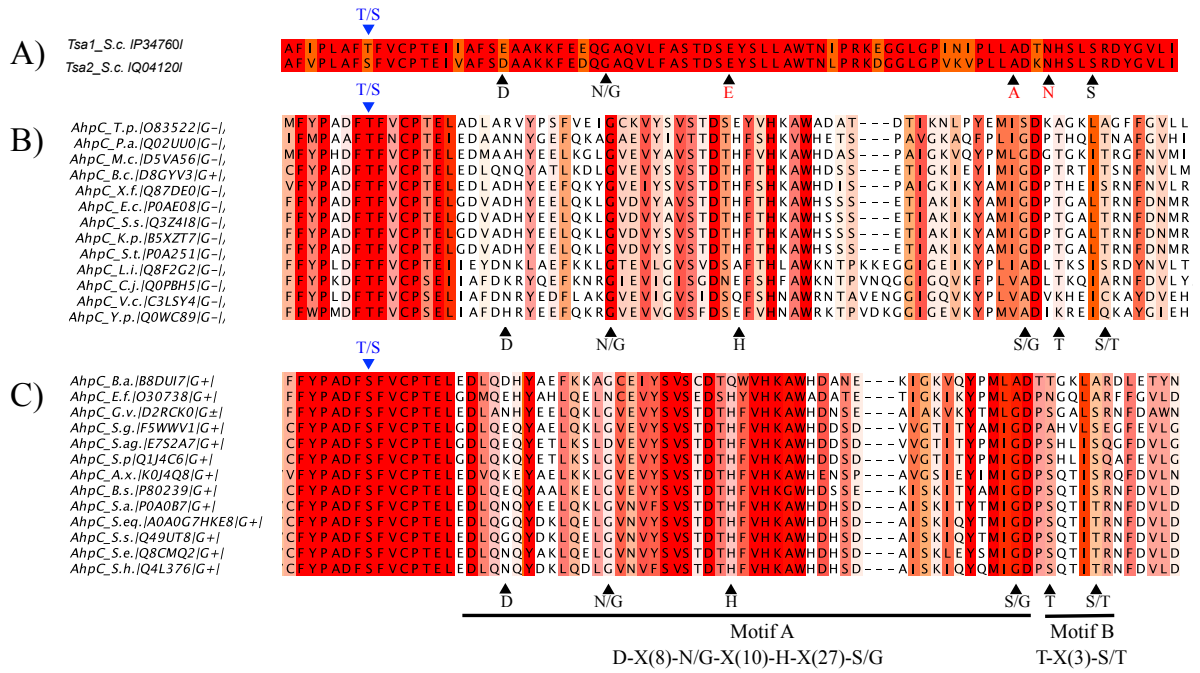


Figure S3. Sequence alignment of Tsa1, Tsa2 and bacterial typical 2-Cys Prx to evaluate the conservation of the hyperoxidation resistance motifs and catalytic Thr or Ser distribution. The shading from red to white denotes the degree of amino acid conservation (the redder, the highest the conservation). The blue arrows indicate the presence of Thr or Ser in the catalytic triad. The black arrows indicate the substitutions of amino acids belonging to the motifs A (D-X8-N/G-X10-H-X27-S/G) and B (T-X3-S/T) related to Cp hyperoxidation (Bolduc et al., 2018). **A)** Tsa1 and Tsa2 amino acid alignment (Uniprot access code P34760 and Q04120). **B)** and **C)** alignment of amino acid sequences of bacterial typical 2-Cys Prx containing Thr (**B**) or Ser (**C**) as part of their catalytic triad. The abbreviations of bacterial species used and uniprot access code are as follow: AhpC_T.p. = *Treponema pallidum* (O83522); AhpC_P.a. = *Pseudomonas aeruginosa* (Q02UU0T AhpC_M.c. = *Moraxella catarrhalis* (D5VA56); AhpC_B.c. = *Bacillus cereus* var. anthracis (D8GYV3); AhpC_X.f. = *Xylella fastidiosa* (Q87DE0); AhpC_E.c. = *Escherichia coli* (P0AE08); AhpC_S.s. = *Staphylococcus saprophyticus* (Q49UT8); AhpC_K.p. = *Klebsiella pneumoniae* (B5XZT7); AhpC_S.t. = *Salmonella typhimurium* (P0A251); AhpC_L.i. = *Leptospira interrogans* (Q8F2G2); AhpC_C.j. = *Campylobacter jejuni* (Q0PBH5); AhpC_V.c. = *Vibrio cholerae* (C3LSY4); AhpC_Y.p. = *Yersinia pestis* (Q0WC89); AhpC_B.a. = *Brucella abortus* (Q2YKW3); AhpC_E.f. = *Enterococcus faecalis* (O30738); AhpC_G.v. = *Gardnerella vaginalis* (D2RCK0); AhpC_S.g. = *Streptococcus gallolyticus* (F5WWV1OS); AhpC_S.ag. = *Streptococcus agalactiae* (E7S2A); AhpC_S.p. = *Streptococcus pyogenes* (Q1J4C6); AhpC_A.x. = *Amphibacillus xylanus* (K0J4Q8); AhpC_B.s. = *Bacillus subtilis* (P80239); AhpC_S.a. = *Staphylococcus aureus* (P0A0B7); AhpC_S.eq. = *Streptococcus equi* (A0A0G7HKE8); AhpC_S.s. = *Staphylococcus saprophyticus* (Q49UT8); AhpC_S.e. = *Staphylococcus epidermidis* (Q8CMQ2); AhpC_S.h. = *Staphylococcus haemolyticus* (Q4L376).

Apêndice F

Artigo publicado no periódico *Applied Microbiology and Biotechnology*, (2020. 104:5477–5492).

de Paula, C. P.; Santos, M. C.; Tairum, C. A.; Breyer, C. A.; Toledo-Silva, G.; Toyama, M. H.; Mori, G. M.; de Oliveira, M. A. 2020. “Glutaredoxin-like protein (GLP)—a novel bacteria sulfurtransferase that protects cells against cyanide and oxidative stresses”.

.



Glutaredoxin-like protein (GLP)—a novel bacteria sulfurtransferase that protects cells against cyanide and oxidative stresses

Carla Peres de Paula¹ · Melina Cardoso dos Santos¹ · Carlos A. Tairum¹ · Carlos Alexandre Breyer¹ ·
Guilherme Toledo-Silva² · Marcos Hikari Toyama³ · Gustavo Maruyama Mori⁴ · Marcos Antonio de Oliveira¹

Received: 27 October 2019 / Revised: 14 February 2020 / Accepted: 20 February 2020 / Published online: 19 April 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

The pathogen *Xylella fastidiosa* belongs to the *Xanthomonadaceae* family, a large group of Gram-negative bacteria that cause diseases in many economically important crops. A predicted gene, annotated as glutaredoxin-like protein (*glp*), was found to be highly conserved among the genomes of different genera within this family and highly expressed in *X. fastidiosa*. Analysis of the GLP protein sequences revealed three protein domains: one similar to monothiol glutaredoxins (Grx), an Fe-S cluster and a thiosulfate sulfurtransferase/rhodanese domain (Tst/Rho), which is generally involved in sulfur metabolism and cyanide detoxification. To characterize the biochemical properties of GLP, we expressed and purified the *X. fastidiosa* recombinant GLP enzyme. Grx activity and Fe-S cluster formation were not observed, while an evaluation of Tst/Rho enzymatic activity revealed that GLP can detoxify cyanide and transfer inorganic sulfur to acceptor molecules in vitro. The biological activity of GLP relies on the cysteine residues in the Grx and Tst/Rho domains (Cys³³ and Cys²⁶⁶, respectively), and structural analysis showed that GLP and GLP^{C266S} were able to form high molecular weight oligomers (> 600 kDa), while replacement of Cys³³ with Ser destabilized the quaternary structure. In vivo heterologous enzyme expression experiments in *Escherichia coli* revealed that GLP can protect bacteria against high concentrations of cyanide and hydrogen peroxide. Finally, phylogenetic analysis showed that homologous *glp* genes are distributed across Gram-negative bacterial families with conservation of the N- to C-domain order. However, no eukaryotic organism contains this enzyme. Altogether, these results suggest that GLP is an important enzyme with cyanide-decomposing and sulfurtransferase functions in bacteria, whose presence in eukaryotes we could not observe, representing a promising biological target for new pharmaceuticals.

Keywords Glutaredoxin (Grx) · Reactive oxygen species (ROS) · Glutaredoxin-like protein (GLP) · Thiosulfate sulfurtransferase/Rhodanese (Tst/Rho) · *Xylella fastidiosa*

Carla Peres de Paula and Melina Cardoso dos Santos contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10491-5>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Marcos Antonio de Oliveira
mao@clp.unesp.br

¹ Laboratory of Structural Molecular Biology, Biosciences Institute, UNESP - São Paulo State University, São Vicente, SP, Brazil

² Laboratory of Biomarkers of Aquatic Contamination and Immunochemistry, Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

³ Laboratory of Functional and Structural Characterization of Toxins of Venomous and Poisonous Animals, Biosciences Institute, UNESP - São Paulo State University, São Vicente, SP, Brazil

⁴ Molecular Ecology Laboratory, Biosciences Institute, UNESP - São Paulo State University, São Vicente, SP, Brazil

Introduction

Animals and plants rely on a diverse array of strategies to combat pathogen or parasite infection and establishment in their hosts. At the molecular level, oxidative burst, characterized by the rapid, massive and transient production of reactive oxygen species (ROS), is one of the best characterized mechanisms of hosts to control infection (Wojtaszek 1997; Schlauch 2011). Among ROS, hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide radical anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) can directly act as antimicrobial agents and can also serve as second messengers to activate a more diverse set of defence responses (Wojtaszek 1997; Thomas 2017). In addition to this ROS-based strategy, some organisms, particularly plants, may produce cyanogenic metabolites, which are used to combat pathogens and herbivores (Knowles 1976; Rajniak et al. 2015). Hydrogen cyanide (HCN) at high concentrations can act as a toxin by forming stable complexes with transition metals such as iron in cytochrome oxidase, and at low concentrations, HCN can regulate a variety of molecular processes, including the generation of ROS (Siegien and Bogatek 2006).

On the other hand, pathogens do not passively respond to host counterattacks. To protect themselves from host defences, for instance, pathogens use a myriad of antioxidant molecules as low molecular weight compounds and enzymes (Seres et al. 2000; Parker et al. 2011). Additionally, for antioxidant defence, protection against cyanide is mainly performed by a ubiquitous enzyme family whose catalytic activity relies on a Cys residue, thiosulfate sulfurtransferases (Tst), which are also called rhodanases (Rho) (Knowles 1976; Cipollone et al. 2007; Wang et al. 2015b). These enzymes catalyse the transfer of sulfur to nucleophilic acceptors. In addition to cyanide detoxification, Tst/Rho are able to perform sulfur assimilation, a very important process in the synthesis of essential biomolecules such as Fe-S clusters, cofactor biogenesis and amino acids (e.g. methionine and cysteine), which in turn, are fundamental for the activity of several proteins; consequently, Tst/Rho activity is essential in biochemical pathways, the regulation of enzyme activity, respiration, the regulation of gene expression, nucleotide metabolism, biofilm synthesis, among others (Ryan 1990; Sturgill et al. 2004; Ayala-Castro et al. 2008; Guimarães et al. 2011; Xu and Möller 2011; Shen et al. 2018). Sulfur also plays a central role in antioxidant defence since Cys amino acids are not only reductant molecules but they also are functionally relevant in antioxidant peptides, including mycothiol and glutathione, and antioxidant enzymes as glutathione reductases (Gr), glutaredoxins (Grx), thioredoxins (Trx), thioredoxin reductases (TrxR) and peroxiredoxins (Prx), among others (Holmgren and Aslund 1995; Oliveira et al. 2010; Alquéres et al. 2013; Netto et al. 2016; Tairum et al. 2016; Alegria et al. 2017). In fact, inhibition of cysteine biosynthesis strongly interferes with the ability of pathogens to respond to oxidative stress, infect the host

and establish infections (Campanini et al. 2015). Additionally, some pathogenic bacteria are able to produce hydrogen sulfide (H_2S) in response to oxidative host defence, which is a strong scavenger of several reactive oxygen species, including hydroxyl radical ($\text{HO}^{\cdot}$), with exceptional second-order rates ($1.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (reviewed in Pal et al. 2018).

To unveil host-pathogen relationships, one approach that has gained increased attention over the last decade is comparative genomics, as DNA sequencing technology has improved. Genome sequencing of several species from the *Xanthomonadaceae* family (specifically those of three epidemiologically relevant genera: *Xanthomonas*, *Xylella* and *Stenotrophomonas*) has revealed several predicted genes related to virulence, adhesion and responses to plant defences, including those related to ROS and sulfur metabolism represented by thiol enzymes (da Silva et al. 2002; Pieretti et al. 2009; Varani et al. 2012; Davenport et al. 2014; Giampetruzzi et al. 2015; Youenou et al. 2015; Chen et al. 2016; Wang et al. 2017).

Among several putative thiol antioxidant enzymes, proteomic analyses have revealed that a predicted enzyme annotated as a glutaredoxin-like protein (GLP) is expressed in large amounts in the pathogenic *Xylella fastidiosa* strain 9a5c (Simpson et al. 2000; Smolka et al. 2003). Unpublished comparative analyses have revealed the presence of GLP in different genomes of *Xanthomonadaceae* species, all of which contain three conserved domains: the N-terminal domain, which has high similarity to glutaredoxins, a group of enzymes that, as mentioned above, are related to several redox processes and antioxidant defence (Discola et al. 2009; Leeper et al. 2011; Netto et al. 2016); the central region, which is similar to that of the Fe-S cluster biosynthesis superfamily (Romsang et al. 2014; Pain and Dancis 2016); and the C-terminal portion, which resembles thiosulfate sulfur transferases/rhodanases, a family associated with HCN detoxification and sulfur metabolism (Knowles 1976; Cipollone et al. 2007). The biological activities of the three different domains are performed by cysteine residues, but Cys residues are found only in the Grx (Cys^{33}) and Tst/Rho domains (Cys^{266}).

Considering the high amount of GLP expressed in a pathogenic *X. fastidiosa* strain, the domains related to the protection against host defences and the conserved multidomain structure of GLP in *Xanthomonadaceae*, it is reasonable to hypothesize that GLP may be an important protein in different bacterial taxa. Therefore, the objective of this work was to biochemically and structurally characterize *X. fastidiosa* GLP and its heterologous expression in *Escherichia coli* challenged with KCN or hydrogen peroxide. To characterize the biochemical properties of GLP, the *glp* gene from *X. fastidiosa* was cloned, and the recombinant enzyme was expressed and purified. Catalytic activity of the Grx domain was not observed. Attempts to reconstitute the Fe-S cluster were also made, but no evidence of cluster formation was detected.

Conversely, enzymatic evaluation of the Tst/Rho domain revealed that the recombinant GLP protein was able to fix inorganic sulfur, transferring it to cyanide and another thiolic acceptor, *in vitro*. We demonstrated that cysteine residues are essential to Tst/Rho activity and its structural integrity since substitution of cysteine affected the enzyme activity and structure of the protein. We also investigated the *in vivo* effects of KCN and hydrogen hydroperoxide tolerance via heterologous enzyme expression in *E. coli*, which revealed that GLP can protect bacterial cells even at high concentrations of cyanide and hydrogen hydroperoxide. Finally, a detailed analysis of all the translated genes with high GLP scores in the US National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank revealed that GLP homologues were only detected in bacteria, some of which are pathogenic to plants and animals.

Materials and methods

GLP amplification, cloning and sequencing

The XF2394 open reading frame (ORF) (NCBI accession number: XF_RS10350) was amplified by PCR using genomic DNA from the *X. fastidiosa* 9a5c strain as a template and the oligonucleotides XF2394_F-5'-CGCGATCCATATGATGCCGAGTGCGGTTTTCTGC-3' and XF2394_R-5'-CGCAAGCTTGGATCCTCAATACTTCGGCACACTCGC-3', which contained *Nde* I and *Bam* HI cleavage sites (underlined sequence) (Exxtend, São Paulo, Brazil). Amplified DNA fragments were digested with *Nde* I and *Bam* HI, cloned into the *Nde* I/*Bam* HI-digested pET15b vector (Millipore, Novagen, Madison, WI, USA) and transformed into *E. coli* DH5 α (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany). The resulting pET15b/*glp* vector was sequenced with an ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Plasmids containing the correct constructs were used to transform *E. coli* BL21 (DE3) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) for heterologous expression.

Site-directed mutagenesis

GLP mutant proteins carrying cysteine (Cys³³ and Cys²⁶⁶) substitutions to serines were generated from pET15b/*glp* plasmids using the QuikChange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) and the mutagenic primers Glp^{C33S}_F (5' ATGCCGCGAGTCCGGTTTTCT 3'), Glp^{C33S}_R (5' AGAAAAACCGGACTGCGGCAT 3'), Glp^{C266S}_F (5' GCATTCTTGTTCTCATCACGGC 3') and Glp^{C266S}_R (5' GCCGTGATGAGACAAGAATGC 3') (Exxtend, São Paulo, Brazil). The reaction products were used to transform *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA,

USA), and single colonies were inoculated on Luria-Bertani (LB) medium and incubated for 16 h at 37 °C. The plasmids were then extracted, purified and sequenced to confirm their codon substitutions and then used to transform *E. coli* BL21 (DE3) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) for heterologous expression and purification.

Protein expression and purification

Single colonies of *E. coli* BL21 (DE3) containing the pET15b/*glp*, pET15b/*glp*^{C33S} and pET15b/*glp*^{C266S} plasmids were inoculated in LB medium (20 mL) containing 100 μ g ampicillin/mL and incubated overnight at 37 °C. Then, the cell cultures were transferred to 1 L of fresh LB medium and grown until OD₆₀₀ 0.6–0.8 at 37 °C. Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (0.3 mM; IPTG) was added to the culture to induce the expression of the recombinant proteins with shaking at 250 rpm in an orbital shaker for 16 h at 18 °C. Thereafter, cells were harvested by centrifugation, pellets were resuspended in start buffer (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 50 mM NaCl, 20 mM imidazole and 2 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride-PMSF) and cells were disrupted by sonication. The cell extracts were kept on ice during streptomycin sulfate 1% treatment for 20 min, and the supernatants were clarified by centrifugation, homogenized by filtration and purified by immobilized metal affinity chromatography using a HisTrap column (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) with an imidazole gradient (50–500 mM). Imidazole was removed from the samples using a PD10 desalting column (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), and purified proteins were kept in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 50 mM NaCl. SDS-PAGE analysis was used to confirm the purity of the enzymes, and their concentrations were determined by the molar extinction coefficient of *X. fastidiosa* GLP ($\epsilon_{280} = 25.565 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) obtained by the ProtParam tool (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

Glutaredoxin disulfide reduction activity

The Grx activity of GLP was evaluated by the standard assay for glutaredoxin, which measures the ability of a protein to reduce mixed disulfides formed between a glutathione molecule and β -hydroxyethyl disulfide (HED) spectrophotometrically ($\lambda = 340 \text{ nm}$) as previously described (Holmgren and Aslund 1995). The reaction mixture containing 100 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM glutathione, 6 μ g/mL GR and 0.7 mM HED was incubated at 30 °C for 3 min to allow the formation of mixed HED disulfide, and then, 0.2 mM NADPH was added. Addition of GLP 1 μ M was used to start the reactions, and the decrease in absorbance at 340 nm due to the oxidation of NADPH was recorded for 250 s.

An additional disulfide reduction assay was performed using the disulfide formed between Cys and glutathione (Cys-S-SG) as a substrate. The reaction mixture containing 1 mM glutathione, 6 µg/mL glutathione reductase (GR), 100 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.2 mM NADPH, 100 µM Cys-S-SG and 1 µM GLP protein was measured spectrophotometrically ($\lambda = 340$ nm). The mixed solution containing all the reagents except NADPH and Cys-S-SG disulfide was incubated at 25 °C for 1 min, and then, NADPH was added. After stabilization, Cys-S-SG disulfide was added, and the absorbance was recorded for 250 s to evaluate NADPH oxidation.

Glutathione-dependent peroxidase activity

Evaluation of glutathione-dependent peroxidase activity of GLP with organic *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH) was performed in vitro via an NADPH oxidation assay containing 0.2 mM NADPH, 1 mM glutathione (GSH), 6 µg/mL GR, 1 µM GLP and 1 mM *t*-BOOH (Holmgren and Aslund 1995; Discola et al. 2009). The reactions were performed in 100 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer at a final volume of 1 mL at 25 °C, and they were started by the addition of GLP. The absorbance at 340 nm was recorded for 200 s.

DTT-dependent peroxidase activity

The rate of DTT (1,4-dithiothreitol) oxidation catalysed by GLP in the presence of H₂O₂ as a substrate was evaluated by monitoring the change in absorbance at 310 nm for 250 s due to the formation of DTT disulfide as previously described (Tairum et al. 2012). The assay contained 100 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM H₂O₂, 1 µM GLP and 10 mM DTT in a 1-mL quartz cuvette at 25 °C.

Cyanide sulfurtransferase activity

To evaluate the thiosulfate sulfurtransferase/rhodanese (Tst/Rho) activity of GLP via the conversion of CN[−] to SCN[−], we performed spectrophotometric assays containing 40 mM potassium phosphate, 50 mM KCN, 50 mM sodium thiosulfate and Milli-Q water in a final volume of 0.5 mL (Nandi et al. 2000). The reactions were performed at 25 °C and initiated by the addition of 0–1.2 µM GLP, and after 10 min, the reactions were stopped by adding a formaldehyde-ferric nitrate solution [formaldehyde 2.5% (250 µL) and 750 µL of ferric nitrate (100 g of Fe(NO₃)₃·9H₂O and 200 mL of 65% HNO₃ per 1500 mL)] in a final volume of 1.5 mL. In the reaction, cyanide is converted to thiocyanate under acidic conditions, and in the presence of Fe³⁺, a red intermediate is formed, which was quantified spectrophotometrically ($\lambda = 460$ nm). To evaluate the role of the Cys³³ and Cys²⁶⁶ residues in GLP rhodanese activity, the same procedure was followed using the GLP^{C33S} and GLP^{C266S} mutants or 1 µM of wild-

type GLP pre-treated or not with *N*-ethylmaleimide (NEM) for 20 min at 25 °C.

Evaluation of sulfur acceptors

GLP sulfurtransferase activity was evaluated through NADPH oxidation assays performed at 25 °C in a final volume of 1 mL containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), *E. coli* TrxR (0.2 µM), NADPH (150 µM) and *X. fastidiosa* TsnC or *E. coli* Trx (10 µM). The reactions were started by the addition of 80 mM sodium thiosulfate and 10 µM GLP. Absorbance was monitored spectrophotometrically ($\lambda = 340$ nm) for 150 s. Competitive assays using ferric thiocyanate were also performed in the presence of thiolic compounds, such as Trx, glutathione and DTT, at a concentration of 1 or 2 M equivalents (50 or 100 mM, respectively).

Evaluation of Fe-S cluster formation in GLP

Reconstitution of the Fe-S cluster was evaluated following procedures previously described (Bandyopadhyay et al. 2008; Dai et al. 2009). Briefly, GLP and the GLP^{C33S} and GLP^{C266S} mutants (at a final concentration of 50 µM) in Tris-Cl buffer (150 mM, pH 7.4) were incubated with iron nitrate (5 mM), sodium thiosulfate (5 mM), glutathione (5 mM) and 2 mM DTT (2 mM) for 1 h at 25 °C; desalted using a PD-10 column (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) to remove excess reagents; and scanned spectrophotometrically over the range of 320 to 550 nm. All procedures were performed in an anaerobic environment (O₂ < 2 ppm).

Determination of rhodanese activity

Reactions containing potassium phosphate (40 mM), sodium thiosulfate (50 mM) and varying amounts of KCN (0.5–50 mM) were initiated with the addition of GLP, GLP^{C33S} or liver bovine rhodanese (Rhobov) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) (1 µM) at 25 °C. After 10 min, the reactions were stopped, and detection was performed as previously described (Item *Cyanide Sulfurtransferase Activity*).

Structural evaluation

The secondary structural elements of GLP and the mutants were determined experimentally by circular dichroism (CD) using a Jasco J-720 spectropolarimeter (Jasco Inc., Tokyo, Japan). Purified recombinant wild-type and mutant enzymes (10 µM) in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) were used for Far-UV CD analysis from 190 to 260 nm at 25 °C in a 0.1-cm gap cuvette. The molar ellipticity values (θ) were calculated using the molar concentration of the proteins and the total number of amino acids (328 residues). The contents of the secondary structure of GLP and the mutants were

estimated using CDNN software (Böhm et al. 1992). Their quaternary structure was estimated by size-exclusion chromatography (SEC) by means of high-performance liquid chromatography (HPLC) using a Jasco chromatograph series equipped with a PU 2880 Plus injector and a PDA MD 2018 detector (Jasco Inc., Tokyo, Japan). Samples (1 mg/mL GLP, GLP^{C33S} and GLP^{C266S} in 100 mM Tris-HCl at pH 7.4) were separated by a system containing a Phenomenex BioSep-SEC-S3000 column (7.8 × 300 mm, 5 µm, with a resolution range of 15 to 2000 kDa) (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) using a flow of 0.5 mL/min in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) and 50 mM NaCl at 25 °C. The elution profile was monitored at 280 nm. Bovine thyroglobulin (670 kDa), bovine gamma globulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa), myoglobin (17 kDa) and vitamin B₁₂ (1.35 kDa) were used as molecular standards (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA), and the chromatograms were analysed using Jasco BORWIN 1.50 (Jasco Inc., Tokyo, Japan).

GLP heterologous expression in KCN-containing media

Cultures of *E. coli* BL21 (DE3) harbouring the empty plasmids pET15b, pET15b/*glp*, pET15b/*glp*^{C266S} or pET15b/*glp*^{C33S} (recombinant vectors) were grown in LB medium containing 100 µg ampicillin/mL overnight at 37 °C/250 rpm. Thereafter, the cell cultures were transferred to 15 mL of fresh LB broth and grown until OD₆₀₀ of 0.6–0.8. Cultures in the exponential phase were diluted to OD₆₀₀ = 0.02 containing IPTG (0.1 mM) and were exposed to 0.3 mM, 1.3 mM, 1.5 mM and 2.5 mM KCN for 24 h, and their OD₆₀₀ values were subsequently recorded. The assays were performed in triplicate and repeated three times with similar results.

Evaluation of hydrogen peroxide resistance in *E. coli* harbouring the pET15b/*glp* vector

The ability of recombinant GLP to protect cells against hydrogen peroxide in vivo was determined by a comparative assay of *E. coli* BL21 (DE3) containing the pET15b plasmid (empty vector) or pET15b/*glp* plasmid (vector containing *glp* gene). To perform this assay, bacterial cells containing the empty plasmid pET15b or pET15b/*glp* were cultured overnight in LB containing 100 µg ampicillin/mL at 37 °C. The cells were diluted to OD₆₀₀ = 0.1 in fresh synthetic minimal medium (AAM) (Lisdiyanti et al. 2001) supplemented with ampicillin (100 µg/mL), and H₂O₂ was added at different concentrations (1 mM, 2 mM or 3 mM) to the medium supplemented with 100 µg of ampicillin/mL. After 12 h of incubation at 37 °C/250 rpm, OD₆₀₀ was measured spectrophotometrically to determine the cell density. All experiments were performed in triplicate and repeated three times with similar results.

Screening for *X. fastidiosa* GLP homologues and phylogenetic analyses

Protein datasets were retrieved from the NCBI GenBank through a DELTA-BLAST search (Boratyn et al. 2012) (e-value threshold = 10⁻³) using the sequence of the *X. fastidiosa* translated *glp* ORF (XF2394-NCBI: AAF85193.1) as a query and gathering the respective amino acid sequences from all resulting hits. The Pfam-A v29.0 (Finn et al. 2016) domains PF00462.21 (Glutaredoxin), PF01521.17 (Fe-S cluster) and PF00581.17 (Tst/Rho) were identified from the dataset using HMMSCAN v3.1b2 (Johnson et al. 2010). Only sequences containing the three domains in the same order as in the *X. fastidiosa* translated *glp* ORF were retained due to the tendency of the conservation of the N- to C-domain order being a consequence of functional evolutionary processes (Han et al. 2007); these sequences were then aligned using MUSCLE (Edgar 2004). The substitution model for phylogenetic analysis was determined by the Model Selection tool (MrBayes mode) of TOPALI v2.5 software (Milne et al. 2004). Bayesian information criterion (BIC) values were used to select the models that best fit the data. Phylogenetic trees were generated by MrBayes v3.2 (Ronquist et al. 2012) with two runs of 30,000,000 generations, a sample rate of 1000 and burn-in of 25% using WAG + G + I as the substitution model. The trees were drawn using FigTree v1.4.2 (tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/). Taxonomic information was retrieved from the NCBI taxonomy database (Database resources of the National Center for Biotechnology Information 2016) based on the filtered protein sequence dataset. To visualize the patterns of amino acid sequence conservation of GLP homologues based on aligned sequences, we created a sequence logo (Schneider and Stephens 1990) using WebLogo 3 (Crooks et al. 2004).

Results

GLP domain functional analysis

To evaluate the functionality of the GLP protein, we tested the possible function of each domain separately. Initially, we tested the oxidoreductase activity of the Grx domain of GLP using the standard assay of the reduction of the mixed disulfide that formed between β-hydroxyethyl disulfide (HED) and glutathione (Discola et al. 2009; Netto et al. 2016). Our results revealed that GLP was not able to reduce disulfide compounds of HED or the mixed disulfide between cysteine and glutathione (Fig. S1a and Fig. S1b). It was previously demonstrated that yeast glutaredoxins (Grx1 and Grx2) could directly reduce hydroperoxides using glutathione as an electron donor. Accordingly, the Δ*grx1* and Δ*grx2* yeast strains are very sensitive to oxidative stress induced by hydroperoxides

(Collinson et al. 2002). Therefore, peroxidase activity assays were carried out to verify the possibility that the activity of the Grx domain of GLP could be dependent on peroxidase. To test the peroxidase activity, we employed the NADPH oxidation assay using glutathione reductase and glutathione, *tert*-butyl hydroperoxide as substrates (Fig. S1c) and the DTT oxidation assay using hydrogen peroxide as the substrate (Fig. S1d). In both cases, no enzymatic activity was detected with the use of different hydroperoxides or reductant molecules. Together, these results demonstrated that GLP is not effective as a disulfide reductase or peroxidase.

Regarding the GLP Fe-S cluster domain, no cysteine residue is present in this domain to orient a Fe-S group. However, some glutaredoxins are able to assemble Fe-S clusters using glutathione molecules via conserved Cys residues (Bandyopadhyay et al. 2008). To investigate the formation of the Fe-S cluster in GLP, spectrophotometric approaches were employed under anaerobic conditions, but no evidence of Fe-S cluster assembly was detected (Fig. S2).

Finally, to evaluate the thiosulfate sulfurtransferase/rhodanese activity of GLP, we used biochemical approaches with increasing concentrations of GLP. Our results demonstrated that thiocyanate (SCN^-) formation increased proportional with the GLP concentration (Fig. 1a), which is evidence of the expected function of the Tst/Rho domain. Therefore, this domain was able to fix inorganic sulfur to produce cyanide conjugates. These results are relevant since bacteria are able to use inorganic sulfur not only to detoxify cyanide but also as a building block of several biomolecules, including thiol enzymes. Additionally, since cyanide is produced by a wide variety of plants in response to grazing and pathogens (Knowles 1976; Rajniak et al. 2015), GLP may act as a front-line defence to allow bacteria to resist the host's defences. Indeed, some species infected by *X. fastidiosa*, for instance, almond, alfalfa and peach trees, can produce cyanogenic compounds in their stems (e.g. prussic acid) (Knowles 1976).

In addition to cyanide decomposition, rhodanases can exert sulfurtransferase activity in the presence of other thiolic substrates (Bonomi et al. 1977; Martinez-Gomez et al. 2011), including thiol-containing proteins, such as thioredoxin (Trx) (Nandi et al. 2000). In the presence of thioredoxin, the sulfur atom forms a mixed disulfide with the cysteine in Trx, which is reduced by thioredoxin reductase (TrxR) using reducing equivalents from NADPH, producing hydrogen sulfide (Nandi et al. 2000). To evaluate whether GLP is able to act as sulfurtransferase to Trx, we performed a NADPH oxidation assay using *E. coli* Trx and *E. coli* TrxR or Tsnc, an isoform Trx from *X. fastidiosa* (Horta et al. 2010). The results demonstrated that EcTrx and Tsnc were not able to accept sulfur atoms from GLP (Fig. S3).

Although the results of the above experiments showed that GLP is not able to transfer sulfur atoms to *E. coli* Trx, the results are inconclusive regarding the transfer of sulfur atoms

to Tsnc. Since we used *E. coli* TrxR in the NADPH oxidation assay, sulfur transfer by GLP to Tsnc could have occurred, but at low rates, due to the inefficiency of *E. coli* TrxR to reduce *X. fastidiosa* Tsnc. It is worth mentioning that reactions at low rates between enzymes from different species have previously been reported (Oliveira et al. 2010). Because of these results, additional cyanide sulfurtransferase assays were performed using higher Tsnc concentrations (1 or 2 M equivalents). In addition to Tsnc, the low molecular weight thiolic compounds DTT and glutathione were also tested as sulfur acceptors. We found that sulfur atoms could be transferred to the potential acceptors catalysed by GLP or could react with KCN; as a higher amount of thiocyanate was formed, fewer sulfur atoms were transferred to the acceptors. We observed that Tsnc was not able to accept sulfur atoms from GLP (Fig. 1b). Conversely, GLP was able to exert its sulfurtransferase activity in the presence of thiolic compounds, such as DTT (Fig. 1c) and glutathione (Fig. 1d), indicating that CN^- may not be the sole substrate of the enzyme.

Cysteine integrity is essential for GLP sulfurtransferase activity

All Tst/Rho domains described to date use a cysteine residue to capture sulfur atoms and transfer them to their substrates (Cipollone et al. 2007; de Lira et al. 2018; Shen et al. 2015). GLP possesses two conserved cysteines, one within the Grx domain (Cys³³) and another in the Tst/Rho domain (Cys²⁶⁶). To confirm that GLP activity is centred on a particular cysteine residue, we treated the enzymes with the thiol alkylating agent *N*-ethylmaleimide (NEM), as previously performed in the ferric thiocyanate formation assay. Our results revealed that cysteine alkylation led to a large decrease in Tst/Rho activity (Fig. 2a), confirming that Cys is essential to the enzymatic properties of GLP.

Because the Cys²⁶⁶ residue is embedded in the Tst/Rho domain, it is reasonable to think that it is responsible for GLP sulfurtransferase activity. To unequivocally identify Cys²⁶⁶ as the residue responsible for Tst/Rho activity and assess whether Cys³³ plays a structural role in GLP, we performed site-directed mutagenesis by individually replacing cysteine residues with serine residues. As expected, the activity of GLP^{C266S} was completely abolished (Fig. 2b). Curiously, the Cys³³→Ser substitution resulted in an increase in sulfurtransferase activity (~3×), supporting our hypothesis regarding its structural and/or regulatory function in GLP.

Comparison of the activities of GLP and GLP^{C33S} with bovine rhodanese

Since GLP and GLP^{C33S} presented Tst/Rho activity, we compared their sulfurtransferase activity with that of one of the most well-studied enzymes of this class: bovine liver

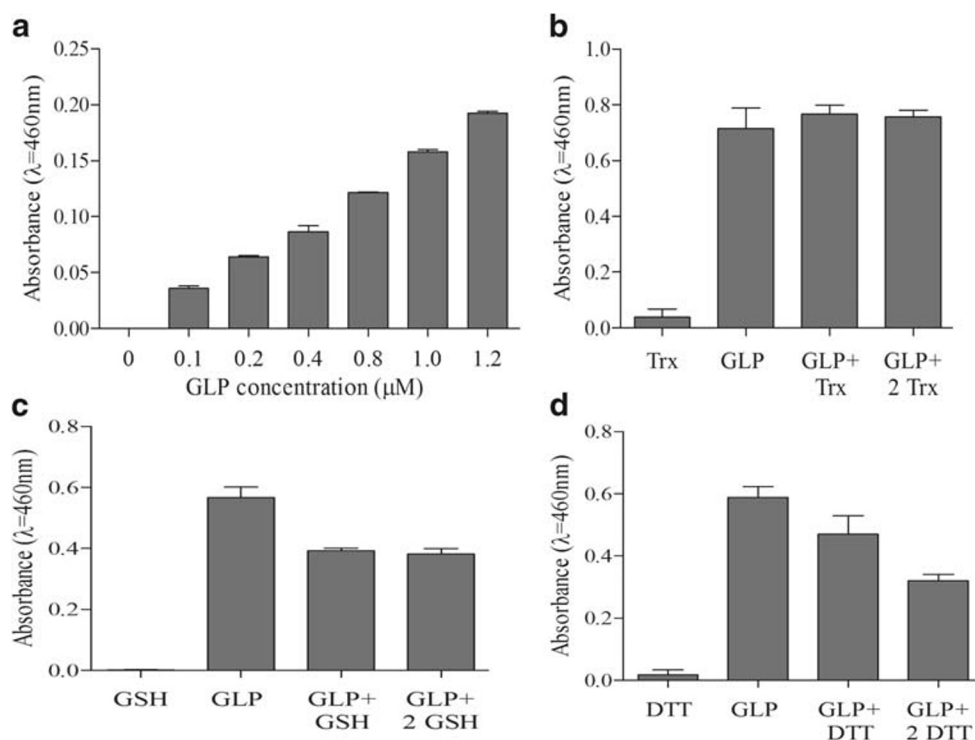


Fig. 1 GLP possesses thiosulfate–cyanide sulfurtransferase activity. **a** Cyanide detoxification was performed using KCN, and sodium thiosulfate and ferric thiocyanate formation was determined spectrophotometrically ($\lambda = 460$ nm). The reactions were performed in 0.5 mL containing 40 mM potassium phosphate, 50 mM cyanide, 50 mM sodium thiosulfate and ultrapure water (q.s.p). The reactions were initiated by adding 0–1.2 μ M of the enzyme. After 10 min, the reactions were stopped by adding a formaldehyde–ferric nitrate solution. Evaluation of the sulfurtransferase activity of GLP for *X. fastidiosa* Trx (Tsnc) (**b**) or the

low molecular weight thiolic compounds GSH (**c**) and DTT (**d**) was performed. Thiolic compounds (Tsnc, GSH and DTT) were used with 1 or 2 M equivalents in relation to GLP. The reactions were performed essentially as described above for the ferric thiocyanate assay (**a**) but in the presence of thiolic compounds. As a positive control, only GLP (1 μ M) was added to the reactions, and for the negative control, only the thiolic compounds were added. The results are representative of three independent experiments performed in triplicate

rhodanese (Rhobov) (Wang and Volini 1973). The results revealed a much higher efficiency in sulfur transfer to KCN by Rhobov than by GLP or GLP^{C33S} (Fig. 3) and are similar to the results obtained to the rhodanese from *Pseudomonas*

aeruginosa (Cipollone et al. 2004). The lower sulfurtransferase activity of GLP must be related to pathways other than KCN detoxification in bacteria, such as the assimilation of sulfur by molecules. Additionally, comparing the

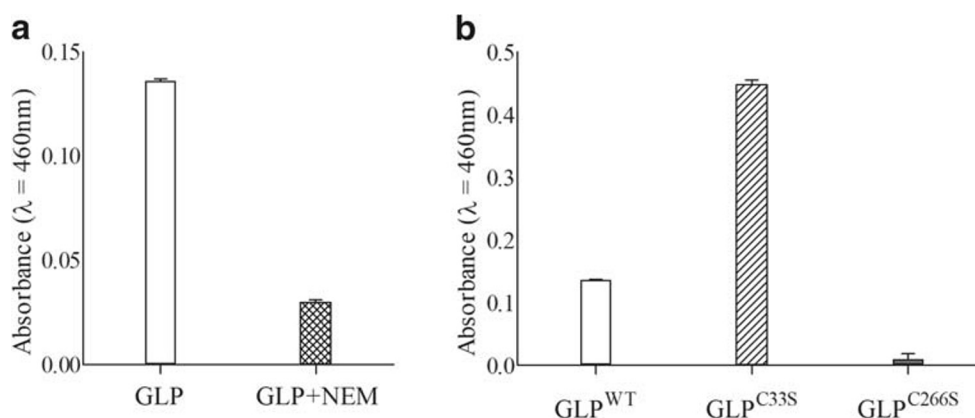


Fig. 2 Involvement of cysteine residues in GLP sulfurtransferase activity. **a** The experiment to verify the sulfurtransferase activity of GLP was performed after alkylation with NEM. The assays were performed in 0.5 mL containing 40 mM potassium phosphate pH = 7.5, 50 mM potassium cyanide, 50 mM sodium thiosulfate and ultrapure water (q.s.p). The reactions were initiated by adding 1 μ M GLP with or

without alkylation. After 10 min, the reactions were stopped by the addition of a formaldehyde–ferric nitrate solution. Ferric thiocyanate formation was determined spectrophotometrically ($\lambda = 460$ nm). **b** The sulfurtransferase activity assay of GLP^{C33S} and GLP^{C266S} was performed as mentioned before, using the wild-type GLP enzyme or GLP^{C33S} and GLP^{C266S}. All assays were performed in triplicate three times

activities of GLP and GLP^{C33S}, the mutant was able to produce twice as much product than the wild type (Fig. 3), which is another indication of the structural/regulatory function of Cys³³ in regard to GLP activity.

Cys mutations do not interfere with the secondary structure of GLP, but Cys³³ is important to the oligomeric state of GLP

To evaluate the integrity of the secondary structure of GLP after cysteine substitutions, we performed circular dichroism spectroscopy. Our results allowed us to estimate the α -helix percentage of the wild-type enzyme to be 35.4% of the amino acid composition, while the β strand composition was 15.9% (Table 1). Additionally, mutating Cys³³ or Cys²⁶⁶ to Ser did not lead to substantially differ secondary structures compared to that of wild-type GLP (Fig. S4, Table 1). These results indicate that these Cys $\rightarrow$ Ser substitutions do not substantially interfere with the secondary structure of GLP. Concerning the quaternary structure of GLP, we performed gel filtration assays of GLP and the mutants. Although the *glp* gene encodes a 35-kDa protein, the results revealed that wild-type GLP and GLP^{C266S} can form high molecular weight (HMW) complexes (~670 kDa) (Fig. 4a and c), in contrast with mammalian rhodanases, which are predominantly monomers (Crawford and Horowitz 1976; Nakajima 2015). Conversely, some rhodanase-like proteins with multiple domains are able to form oligomers, including dimers, tetramers and hexamers, among others (Cipollone et al. 2007; Shen et al. 2015). On the other hand, the Cys^{33S} mutant enzyme was mainly detected as a monomer (~35 kDa) with some HMW species (~200–700 kDa), showing the importance of the Cys³³ residue to quaternary structure maintenance (Fig. 4c). Although

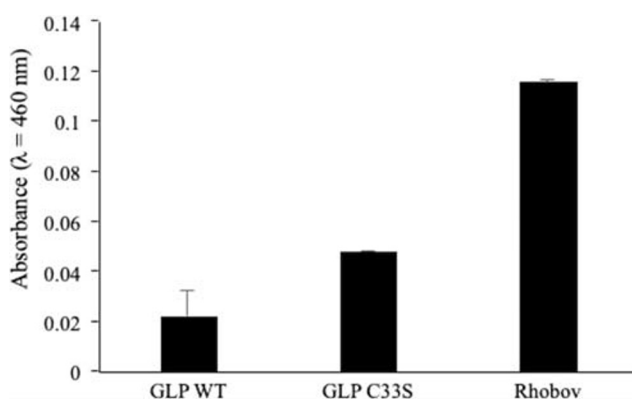


Fig. 3 Rhodanese activity of GLP, GLP^{C33S} and Rhobov. The reactions were performed in 0.5 mL containing 40 mM potassium phosphate, 100 μ M potassium cyanide and 50 mM sodium thiosulfate. The reactions were initiated by adding 1 μ M of enzyme (GLP^{WT}, GLP^{C33S} or Rhobov) and stopped after 10 min by adding a formaldehyde-ferriic nitrate solution. Ferrothiocyanite formation was determined spectrophotometrically ($\lambda = 460$ nm). Experiments were performed in triplicate and repeated three times with similar results

Table 1 Estimative of the secondary structure content by circular dichroism spectroscopy of the wild-type GLP and mutants. The spectra were acquired from 210 to 260 nm and the secondary structure content was estimated using the CDNN software

	GLP	GLP ^{C33S}	GLP ^{C266S}
α helix	35.4%	30.0%	31.5%
β strand	15.9%	18.7%	18.0%
β turn	16.50%	17.50%	17.2%
Random coil	31.3%	35.40%	34.4%

GLP^{C266S} was predominantly detected as a HMW species, similar to the wild-type enzyme, the mutant protein also presented monomeric isoforms, as observed in GLP^{C33S}, suggesting that both Cys³³ and Cys²⁶⁶ play roles in maintaining the enzyme structure (Fig. 4b and c).

Heterologous expression of GLP confers cyanide resistance to *E. coli* cells

It has been reported that 1 mM cyanide significantly inhibits aerobically growing *E. coli* (Ashcroft and Haddock 1975). Therefore, to verify any protective effect of GLP against cyanide toxicity, exponential phase cell cultures of *E. coli* BL21 (DE3) containing the empty vector (pET15b) or carrying the plasmid with the *glp* gene (pET15b/*glp*) were adjusted to OD₆₀₀ = 0.02 and challenged with 1.5 mM KCN in the presence of IPTG (0.1 mM) (Kim et al. 2017). After 24 h, the optical density of growing cells was measured. The results demonstrated that cells carrying the recombinant vector had growth rates ~91% higher than those of cells carrying the empty vector, indicating that cyanide resistance is dependent on the recombinant protein inside the cell (Fig. 5).

The ability of GLP^{C33S} and GLP^{C266S} to detoxify cyanide in vivo was also tested using the same conditions described previously. The recombinant vectors containing cysteine substitutions (pET15b/*glp*^{C33S} and pET15b/*glp*^{C266S}) were unable to confer any resistance to *E. coli* under inhibitory cyanogenic conditions (Fig. 5). This result indicates that both Cys³³ and Cys²⁶⁶ play important roles in cyanide resistance in vivo. Additionally, these results revealed that despite the in vitro increase in sulfurtransferase activity observed for GLP^{C33S} (Figs. 2b and 3), Cys³³ is essential for conferring resistance to cyanide in a biological system, supporting its structural and/or regulatory function.

In vivo evaluation of GLP protein resistance under oxidative stress by H₂O₂

To investigate the role of the GLP protein in defending against hydrogen peroxide toxicity in vivo, exponential phase cultures of *E. coli* BL21 (DE3) containing pET15b (empty vector) and

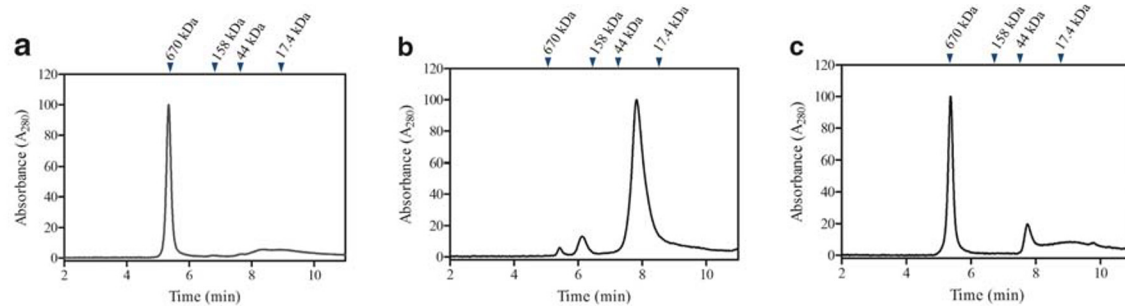


Fig. 4 Evaluation of the quaternary structure by size exclusion chromatography. Samples of the GLP (**a**), GLP^{C33S} (**b**) and GLP^{C266S} (**c**) proteins (1 mg/mL in 100 mM Tris-HCl at pH 7.4) were submitted to size-exclusion chromatography, and the elution profile was monitored at

280 nm. The bovine thyroglobulin (670 kDa), bovine gamma globulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa) and myoglobin (17 kDa) proteins were used as molecular standards (Bio-Rad) (blue arrows). Experiments were performed three times

pET15b/*glp* were induced using IPTG and challenged with increasing concentrations of H₂O₂ following the conditions previously described for *Streptococcus pyogenes* (King et al. 2000). As previously shown, exponential phase cell cultures of *E. coli* BL21 (DE3) containing the empty vector (pET15b) or carrying the plasmid with the *glp* gene (pET15b/*glp*) were adjusted to OD₆₀₀ = 0.05 and treated with increasing concentrations of hydrogen peroxide (Fig. 6). All cultures containing the empty plasmid showed efficient growth in the presence of 1 mM hydrogen peroxide. However, higher concentrations of hydroperoxide (2 mM) revealed that cells harbouring pET15b/*glp* were able to grow, reaching cell densities 14-fold higher than that of the strain containing the empty plasmid. At 3 mM H₂O₂, cells with or without plasmids were unable to grow.

These results suggest the indirect role of GLP in responding to oxidative stress caused by hydrogen peroxide. In fact, an increase in resistance to oxidative stress has been observed when antioxidant enzymes are overexpressed in bacterial systems (King et al. 2000; Shrivastava et al. 2015). On the other hand, sulfurtransferases are believed to protect mammalian cells against oxidative stress caused by radiation (Nakajima 2015). It has also been demonstrated that an *E. coli* sulfurtransferase (3-mercaptopyruvate sulfurtransferase-3MST) is able to combat oxidative stress, producing H₂S (Mironov et al. 2017). This pathway uses thioredoxin as a sulfur acceptor to produce H₂S. However, as previously demonstrated, GLP is not able to transfer sulfur atoms to bacterial Trx (Fig. S3), which may indicate the presence of another unidentified acceptor or undescribed pathway.

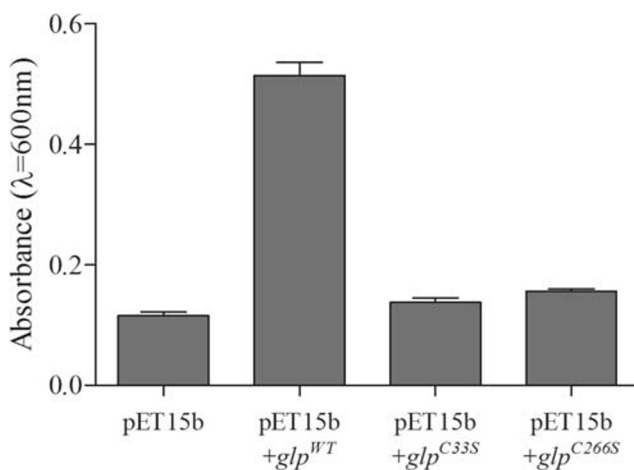


Fig. 5 Heterologous expression of GLP confers high resistance to cyanide in *E. coli*. Comparative resistance of *E. coli* cells containing pET15B, pET15b/*glp*, pET15b/*glp*^{C33S} or pET15b/*glp*^{C266S}. Cell cultures of *E. coli* BL21 (DE3) containing the empty plasmid (pET15b) or harbouring pET15b/*glp* in exponential phase were diluted to OD₆₀₀ = 0.1, exposed to KCN (1.3 mM) and grown at 37 °C, with the addition of IPTG 0.1 mM. The growth rates were determined after 24 h. All assays were performed in triplicate at least three times with similar results

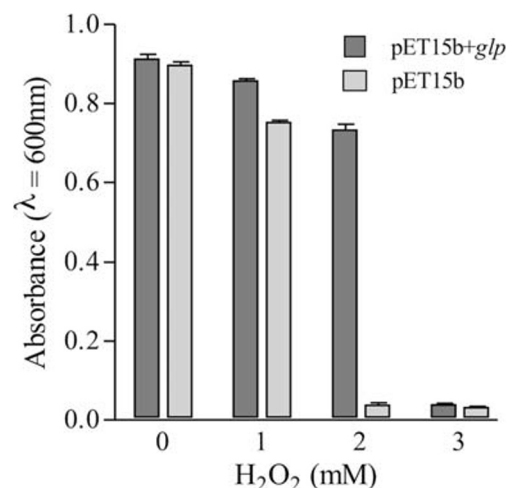


Fig. 6 GLP confers resistance to oxidative stress. *E. coli* BL21 (DE3) cell cultures in exponential growth were challenged with increasing concentrations of H₂O₂ (1, 2 and 3 mM) in AAM medium containing ampicillin for 12 h. The optical densities of the cultures were measured spectrophotometrically (OD₆₀₀), and the results were plotted. Experiments were performed in triplicate and repeated three times

GLP homologues are observed in different bacterial species but not in eukaryotes

Our screening for GLP homologues resulted in the identification of 225 proteins from different bacterial lineages, but no GLP homologues were found in eukaryotes. In total, considering the outcomes using family-level taxonomic information, we observed that at least 27 genera from eight Gram-negative bacterial families contained a protein similar to GLP with its N- to C-domain order: *Alcanivoracaceae*, *Ectothiorhodospiraceae*, *Enhygromyxa*, *Nannocystineae*, *Pseudomonadaceae*, *Rhodanobactaceae*, *Wenzhouxiangellaceae* and *Xanthomonadaceae* (Table 2). It is noteworthy that these families represent a broad range of ecological strategies, ranging from marine, for example, *Wenzhouxiangellaceae* (Wang et al. 2015a), or terrestrial (Kostka et al. 2012) bacteria to pathogenic species, such as *P. aeruginosa*, a human opportunistic pathogen (Hogardt and Heesemann 2013; Snitkin and Segre 2015), and members of the *Rhodanobactaceae* family, while some species were related to white plague disease (WPD) in some species of coral (Roder et al. 2014). The over-representation of *Xanthomonadaceae* in our dataset (Table 2) is likely because, in this family, there are many pathogenic strains that affect humans and plants; thus, more *Xanthomonadaceae* species may have been studied. Additionally, we observed that the phylogenetic tree of GLP is highly congruent according to the family-level organization (Fig. S5) and that both cysteines of *X. fastidiosa* GLP (Cys³³ and Cys²⁶⁶), which play fundamental enzymatic, structural and/or regulatory functions in GLP activity, are highly conserved across taxa (Fig. 7). Our results suggest that GLP is functionally important in a broad diversity of bacterial taxa and we could not observe any similar protein in eukaryotes.

Discussion

Thiol proteins play essential roles in all living organisms (Alquéres et al. 2013; Netto et al. 2016). In pathogenic bacteria, these groups of proteins are highly related to infection and establishment in the host, and sulfur metabolism and thiol proteins are essential to overcoming host defences (Ryan 1990; Seres et al. 2000; Campanini et al. 2015). In this work, we performed the first characterization of GLP, a thiol enzyme containing three domains: Grx, the Fe-S cluster and Tst/Rho. Under the conditions tested in this work, no glutaredoxin activity or Fe-S clusters were detected in GLP (Fig. S1 and Fig. S2). On the other hand, the Tst/Rho domain was found to be functional and able to exert sulfurtransferase activity (Fig. 1).

Via mutational and structural approaches, we showed that the Cys³³ residue in the Grx domain may be related to the modulation of enzyme activity (Figs. 2 and 3) and the maintenance of the quaternary structure (Fig. 4), while Cys²⁶⁶ is

essential to Tst/Rho activity (Figs. 2 and 3). We also showed that the integrity of both cysteines is fundamental to confer resistance to KCN in vivo using *E. coli* as a heterologous model (Fig. 5). In *X. fastidiosa*, this finding may be very important since some important cultivars affected by this phytopathogen can produce cyanogenic compounds in their stem (Knowles 1976; Rajniak et al. 2015). Furthermore, *X. fastidiosa* vectors are xylem fluid-feeding insects, and the production of cyanogenic molecules by many plants is a well-known defence strategy against grazing and predation, which may indicate that GLP is important for protecting the vectors against this kind of challenge (Rubinstein 1992; Chatterjee et al. 2008; Mithöfer and Boland 2012). We also tested whether heterologous GLP expression could confer resistance to oxidative stress, another important defence mechanism against pathogen attack (Wojtaszek 1997; Slauch 2011). For this approach, we challenged recombinant *E. coli* cells harbouring the expression vector containing the *glp* gene with high doses of hydrogen peroxide (Fig. 6), and our results revealed that the recombinant strain was resistant to oxidative stress caused by hydrogen peroxide, indicating that GLP expression may be important to combat the oxidative burst promoted by the host. This result is in agreement with previous observations indicating that sulfur assimilation confers resistance to oxidative stress and is essential to xylem colonization by *X. fastidiosa* (Campanini et al. 2015; Wang et al. 2017).

The cross talk between sulfur metabolism and oxidative stress response may be exemplified by another protein containing Tst/Rho domain in *X. fastidiosa*. In this bacterium, biofilms, extracellular matrices that may confer resistance of pathogenic bacteria to host defence response, present large amounts of sulfur (Leite et al. 2002). High sulfur content is related to bacterial cell production of intracellular sulfide, a potent ROS scavenger (reviewed in Pal et al. 2018) which is also a strong competitive inhibitor of cytochrome C oxidase. This characteristic may create a metabolic limitation in obligate aerobic growing bacteria, especially in environments with low molecular oxygen levels (e.g. plant xylem). Sulfide excess is decomposed and exported to the extracellular matrix by constituents of the BigR operon (Biofilm growth Regulator) (Barbosa and Benedetti 2007; Guimarães et al. 2011), which contains the protein coding DUF442-ETHE, a bifunctional enzyme with a DUF442 domain, a GSH-dependent sulfotransferase/rhodanese (Tst/Rho), and a ETHE domain, a sulfur dioxygenase. DUF442-ETHE is involved in the conversion of hydrogen sulfide into sulfide, a cytotoxic compound that is exported to the extracellular environment by another BigR operon protein (TauE) (de Lira et al. 2018). Similar to GLP, the DUF442 domain alone or the entire DUF442-ETHE protein is able to transfer sulfur from thiosulfate to cyanide, generating thiocyanate (SCN⁻). These evidences suggest that the fusion of Tst/Rho with other domains may lead to protein functional novelty in sulfur metabolism and oxidative stress resistance. Therefore,

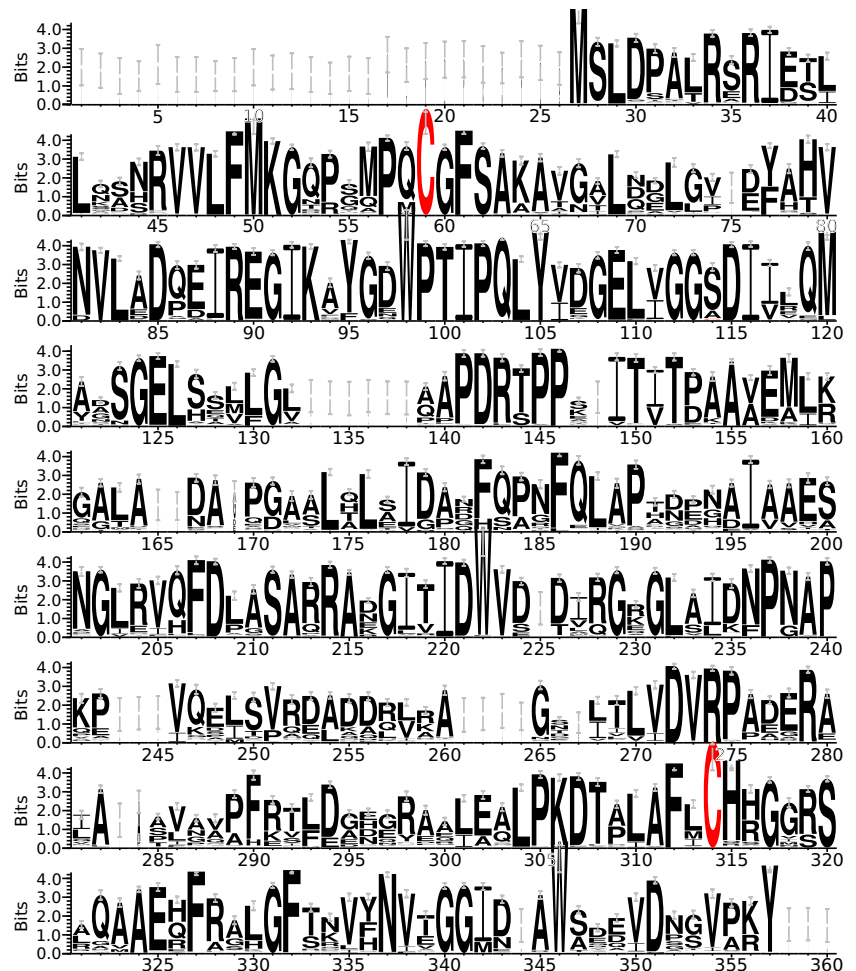
Table 2 Taxonomic identification of bacteria presenting *X. fastidiosa* glutaredoxin-like protein (GLP) homologues. Family- and species-level information of organisms presenting *X. fastidiosa* GLP homologue in NCBI taxonomy database

Family	Species	Family	Species
<i>Alcanivoracaceae</i>	<i>Marinicella</i> sp	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Pseudoxanthomonas spadix</i>
<i>Ectothiorhodospiraceae</i>	<i>Thioalkalivibrio</i> sp		<i>Pseudoxanthomonas suwonensis</i>
<i>Labilithricaceae</i>	<i>Labilithrix luteola</i>		<i>Silanimonas lenta</i>
<i>Nannocystaceae</i>	<i>Enhygromyxa salina</i>		<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>
	<i>Haliangium ochraceum</i>		<i>Stenotrophomonas daejeonensis</i>
	<i>Plesiocystis pacifica</i>		<i>Stenotrophomonas ginsengisoli</i>
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Stenotrophomonas humi</i>
<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Aquimonas voraii</i>		<i>Stenotrophomonas koreensis</i>
	<i>Dokdonella koreensis</i>		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	<i>Dyella ginsengisoli</i>		<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i>
	<i>Dyella japonica</i>		<i>Stenotrophomonas panacihumi</i>
	<i>Dyella jiangningensis</i>		<i>Stenotrophomonas pictorum</i>
	<i>Dyella</i> sp		<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
	<i>Dyella thiooxydans</i>		<i>Stenotrophomonas</i> sp
	<i>Dyella-like</i> sp		<i>Stenotrophomonas terrae</i>
	<i>Frateuria aurantia</i>		<i>Thermomonas fusca</i>
	<i>Frateuria</i> sp		<i>Thermomonas hydrothermalis</i>
	<i>Frateuria terrea</i>		<i>Xanthomonas albilineans</i>
	<i>Luteibacter</i> sp		<i>Xanthomonas arboricola</i>
	<i>Luteibacter yeojuensis</i>		<i>Xanthomonas axonopodis</i>
	<i>Mizugakiibacter sediminis</i>		<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>Vasculorum</i>
	<i>Oleigrimonas soli</i>		<i>Xanthomonas bromi</i>
	<i>Rhodanobacter denitrificans</i>		<i>Xanthomonas campestris</i>
	<i>Rhodanobacter fulvus</i>		<i>Xanthomonas cannabidis</i>
	<i>Rhodanobacter glycinis</i>		<i>Xanthomonas citri</i>
	<i>Rhodanobacter</i> sp		<i>Xanthomonas fragariae</i>
	<i>Rhodanobacter thiooxydans</i>		<i>Xanthomonas gardneri</i>
	<i>Rudaea cellulosilytica</i>		<i>Xanthomonas hortorum</i>
<i>Wenzhouxiangellaceae</i>	<i>Wenzhouxiangella marina</i>		<i>Xanthomonas hyacinthi</i>
<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Arenimonas composti</i>		<i>Xanthomonas maliensis</i>
	<i>Arenimonas donghaensis</i>		<i>Xanthomonas massiliensis</i>
	<i>Arenimonas metalli</i>		<i>Xanthomonas oryzae</i>
	<i>Arenimonas oryzaeterrae</i>		<i>Xanthomonas perforans</i>
	<i>Arenimonas</i> sp		<i>Xanthomonas phaseoli</i>
	<i>Luteimonas abyssi</i>		<i>Xanthomonas sacchari</i>
	<i>Luteimonas huabeiensis</i>		<i>Xanthomonas</i> sp
	<i>Luteimonas</i> sp		<i>Xanthomonas translucens</i>
	<i>Lysobacter daejeonensis</i>		<i>Xanthomonas vasicola</i>
	<i>Lysobacter</i> sp		<i>Xanthomonas vesicatoria</i>
	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>		<i>Xylella fastidiosa</i>
	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.		<i>Xylella taiwanensis</i>

they suggest that the biological role GLP plays may not only be restricted to cyanide detoxification, but also include other functions related with the Grx and Fe-Se domains. As demonstrated here, only the intact GLP was able to maintain the quaternary structure and protect cells against cyanide stress.

Tst/Rho domains are ubiquitous and found in several protein coding genes in prokaryotic and eukaryotic genomes. Previous studies have shown that protein with these domains may be very heterogeneous and, even within the same genome, one may find multiple genes

Fig. 7 Amino acid frequency representation of the consensus *X. fastidiosa* glutaredoxin-like protein (GLP). In each logo, the y-axis denotes the overall amino acid conservation at the consensus position, whereas the letter height indicates its relative frequency at that same position. *X. fastidiosa* GLP Cys³³ and Cys²⁶⁶, which play fundamental roles in *X. fastidiosa* GLP, are shown in red



encoding Tst/Rho domains fused with other protein domain(s) with no evident function (Cipollone et al. 2007; Moseler et al. 2019). To unveil the GLP distribution across a broad range of organisms, we screened NCBI GenBank for ORFs with the same N- to C-domains order observed in *X. fastidiosa* translated *glp* sequence. We could not find any GLP coding sequences in eukaryotes, but we observed that eight bacterial families contained taxa with similar amino acid sequences (Table 2) and highly conserved Cys residues in the Grx and Tst/Rho domains (Fig. 7), suggesting that GLP homologues are likely functionally relevant for a broad range of prokaryotes. Broadly, these findings indicate that GLP evolution may be an outcome of processes such as duplication and domain fusion followed by divergence, providing functional changes and novelty that may be adaptive (Vogel et al. 2005; Han et al. 2007; Forslund and Sonnhammer 2012; Berezovsky et al. 2017). In pathogens and parasites, fusion of pre-existing proteins seems to be particularly important as there are several examples of multi-domain enzymes

related to host defence subjugation (Becker et al. 2000; Dubois et al. 2002; Allen et al. 2009; Li et al. 2014; Kamariah et al. 2016). In conclusion, GLP protein may be an important pathogen enzyme involved in several strategies to attack and neutralize host defences and may be a potential target for specific chemotherapeutics.

Authors' contributions Conceived and designed the experiments: M.A.O., C.P.P., M.C.S., C.A.T. Jr. and C.A.B. Performed the experiments: C.P.P., M.C.S., C.A.T. Jr. and C.A.B. Analysed the data: C.P.P., M.C.S., C.A.T. Jr., C.A.B., M.H.T., G.M.M., G.T.S. and M.A.O. Contributed reagents/materials/analysis tools: M.A.O. and M.H.T. Wrote the paper: C.P.P., M.C.S., C.A.T. Jr., G.M.M. and M.A.O. All authors revised, edited and approved the final version of the article.

Funding information This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) to M.A.O. (2007/50930-3, 2017/19942-7 and Redox Processes in Biomedicine-2013/07937-8) and M.H.T. (2017/20291-0). Fellowships from FAPESP were granted to C.P.P. (10/16827-3), M.C.S. (2013/16192-6 and 2017/06263-4), C.A.T. Jr. (10/00172-8) and C.A.B. (2011/13500-6).

Compliance with ethical standards

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Alegria TG, Meireles DA, Cussiol JR, Hugo M, Trujillo M, de Oliveira MA, Miyamoto S, Queiroz RF, Valadares NF, Garratt RC, Radi R, Di Mascio P, Augusto O, Netto LE (2017) Ohr plays a central role in bacterial responses against fatty acid hydroperoxides and peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E132–E141. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619659114>
- Allen HK, Moe LA, Rodbummer J, Gaarder A, Handelsman J (2009) Functional metagenomics reveals diverse beta-lactamases in a remote Alaskan soil. *ISME J* 3:243–251. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.86>
- Alquéres S, Meneses C, Rouws L, Rothballer M, Baldani I, Schmid M, Hartmann A (2013) The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Mol Plant-Microbe Interact* 26:937–945. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-12-0286-R>
- Anna Moseler, Benjamin Selles, Nicolas Rouhier, Jérémy Couturier, (2019) Novel insights into the diversity of the sulfurtransferase family in photosynthetic organisms with emphasis on oak. *New Phytol* <https://doi.org/10.1111/nph.15870>
- Ashcroft JR, Haddock BA (1975) Synthesis of alternative membrane-bound redox carriers during aerobic growth of *Escherichia coli* in the presence of potassium cyanide. *Biochem J* 148:349–352. <https://doi.org/10.1042/bj1480349>
- Ayala-Castro C, Saini A, Outten FW (2008) Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 72:110–125. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00034-07>
- Bandyopadhyay S, Gama F, Molina-Navarro MM, Gualberto JM, Claxton R, Naik SG, Huynh BH, Herrero E, Jacquot JP, Johnson MK, Rouhier N (2008) Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe–2S] clusters. *EMBO J* 27:1122–1133. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.50>
- Barbosa RL, Benedetti CE (2007) BigR, a transcriptional repressor from plant-associated bacteria, regulates an operon implicated in biofilm growth. *J Bacteriol* 189:6185–6194. <https://doi.org/10.1128/JB.00331-07>
- Becker K, Gromer S, Schirmer RH, Müller S (2000) Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. *Eur J Biochem* 267:6118–6125. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01703.x>
- Berezovsky IN, Guamera E, Zheng Z (2017) Basic units of protein structure, folding, and function. *Prog Biophys Mol Biol* 128:85–99. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2016.09.009>
- Böhm G, Muhr R, Jaenicke R (1992) Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng* 5:191–195. <https://doi.org/10.1093/protein/5.3.191>
- Bonomi F, Pagani S, Cerletti P, Cannella C (1977) Rhodanese-mediated sulfur transfer to succinate dehydrogenase. *Eur J Biochem* 72:17–24. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11219.x>
- Boratyn GM, Schäffer AA, Agarwala R, Altschul SF, Lipman DJ, Madden TL (2012) Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. *Biol Direct* 7:12. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-7-12>
- Campanini B, Pieroni M, Raboni S, Bettati S, Benoni R, Pecchini C, Costantino G, Mozzarelli A (2015) Inhibitors of the sulfur assimilation pathway in bacterial pathogens as enhancers of antibiotic therapy. *Curr Med Chem* 22:187–213. <https://doi.org/10.2174/0929867321666141112122553>
- Chatterjee S, Almeida RPP, Lindow S (2008) Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annu Rev Phytopathol* 46:243–271. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094342>
- Chen J, Wu F, Zheng Z, Deng X, Burbank LP, Stenger DC (2016) Draft genome sequence of *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* strain Stag's leap. *Genome Announc* 4:e00240–e00216. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00240-16>
- Cipollone R, Bigotti MG, Frangipani E, Ascenzi P, Visca P (2004) Characterization of a rhodanese from the cyanogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* 325:85–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.214>
- Cipollone R, Ascenzi P, Visca P (2007) Common themes and variations in the rhodanese superfamily. *IUBMB Life* 59:51–59. <https://doi.org/10.1080/15216540701206859>
- Collinson EJ, Wheeler GL, Garrido EO, Avery AM, Avery SV, Grant CM (2002) The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J Biol Chem* 277:16712–16717. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111686200>
- Crawford JM, Horowitz PM (1976) A study of the single polypeptide nature of rhodanese. A comparison of different preparations. *Biochim Biophys Acta* 429:173–181. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(76\)90039-5](https://doi.org/10.1016/0005-2744(76)90039-5)
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 14:1188–1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004>
- da Silva AC, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, Van Sluys MA, Almeida NF, Alves LM, do Amaral AM, Bertolini MC, Camargo LE, Camarotte G, Cannavan F, Cardozo J, Chambergo F, Ciapina LP, Cicarelli RM, Coutinho LL, Cursino-Santos JR, El-Dorry H, Faria JB, Ferreira AJ, Ferreira RC, Ferro MI, Formighieri EF, Franco MC, Greggio CC, Gruber A, Katsuyama AM, Kishi LT, Leite RP, Lemos EG, Lemos MV, Locali EC, Machado MA, Madeira AM, Martinez-Rossi NM, Martins EC, Meidanis J, Menck CF, Miyaki CY, Moon DH, Moreira LM, Novo MT, Okura VK, Oliveira MC, Oliveira VR, Pereira HA, Rossi A, Sena JA, Silva C, de Souza RF, Spinola LA, Takita MA, Tamura RE, Teixeira EC, Tezza RI, Trindade dos Santos M, Truffi D, Tsai SM, White FF, Setubal JC, Kitajima JP (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417:459–463. <https://doi.org/10.1038/417459a>
- Dai Y, Liu J, Zheng C, Wu A, Zeng J, Qiu G (2009) Cys92, Cys101, Cys197, and Cys203 are crucial residues for coordinating the iron-sulfur cluster of RhdA from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Curr Microbiol* 59:559–564. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9476-x>
- Database resources of the National Center for Biotechnology Information (2016) *Nucleic Acids Res* 44:D7–D19. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1290>
- Davenport KW, Daligault HE, Minogue TD, Broomall SM, Bruce DC, Chain PS, Coyne SR, Gibbons HS, Jaissle J, Li PE, Rosenzweig CN, Scholz MB, Johnson SL (2014) Complete genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* type strain 810-2 (ATCC 13637). *Genome Announc* 2:e00974–e00914. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00974-14>
- de Lira NPV, Pauletti BA, Marques AC, Perez CA, Caserta R, de Souza AA, Vercesi AE, Paes Leme AF, Benedetti CE (2018) BigR is a sulfide sensor that regulates a sulfur transferase/dioxygenase required for aerobic respiration of plant bacteria under sulfide stress. *Sci Rep* 8:3508. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21974-x>
- Discola KF, de Oliveira MA, Rosa Cussiol JR, Monteiro G, Bárcena JA, Porras P, Padilla CA, Guimarães BG, Netto LES (2009) Structural aspects of the distinct biochemical properties of glutaredoxin 1 and

- glutaredoxin 2 from *Saccharomyces cerevisiae*. J Mol Biol 385: 889–901. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.055>
- Dubois V, Poirel L, Marie C, Arpin C, Nordmann P, Quentin C (2002) Molecular characterization of a novel class 1 integron containing *bla*_{GES-1} and a fused product of *aac*(3)-*Ib/aac*(6")-*Ib*" gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 46:638–645. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.3.638-645.2002>
- Edgar RC (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. BMC Bioinformatics 5:113. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
- Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, Potter SC, Punta M, Qureshi M, Sangrador-Vegas A, Salazar GA, Tate J, Bateman A (2016) The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. Nucleic Acids Res 44D1:D279–D185. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1344>
- Forslund K, Sonnhammer ELL (2012) Evolution of protein domain architectures. Methods Mol Biol 856:187–216. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-585-5_8
- Giampetruzzi A, Loconsole G, Boscia D, Calzolari A, Chiumenti M, Martelli GP, Saldarelli P, Almeida RP, Saponari M (2015) Draft genome sequence of CO33, a coffee-infecting isolate of *Xylella fastidiosa*. Genome Announc 3:e01472–e01415. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01472-15>
- Guimarães BG, Barbosa RL, Soprano AS, Campos BM, de Souza TA, Tonoli CC, Leme AF, Murakami MT, Benedetti CE (2011) Plant pathogenic bacteria utilize biofilm growth-associated repressor (BigR), a novel winged-helix redox switch, to control hydrogen sulfide detoxification under hypoxia. J Biol Chem 286:26148–26157. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.234039>
- Han JH, Batey S, Nickson AA, Teichmann SA, Clarke J (2007) The folding and evolution of multidomain proteins. Nat Rev Mol Cell Biol 8:319–330. <https://doi.org/10.1038/nrm2144>
- Hogardt M, Heesemann J (2013) Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* to a chronic pathogen of the cystic fibrosis lung. Curr Top Microbiol Immunol 358:91–118. https://doi.org/10.1007/82_2011_199
- Holmgren A, Aslund F (1995) Glutaredoxin. Methods Enzymol 252: 283–292. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)52031-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)52031-7)
- Horta BB, de Oliveira MA, Discola KF, Cussiol JRR, Netto LES (2010) Structural and biochemical characterization of peroxiredoxin Qbeta from *Xylella fastidiosa*: catalytic mechanism and high reactivity. J Biol Chem 285:16051–16065. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.094839>
- Johnson LS, Eddy SR, Portugaly E (2010) Hidden Markov model speed heuristic and iterative HMM search procedure. BMC Bioinformatics 11:431. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-431>
- Kamariah N, Nartey W, Eisenhaber B, Eisenhaber F, Grüber G (2016) Low resolution solution structure of an enzymatic active AhpC10: AhpF2 ensemble of the *Escherichia coli* alkyl hydroperoxide Reductase. J Struct Biol 193:13–22. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.11.004>
- Kim SK, Lee DH, Kim OC, Kim JF, Yoon SH (2017) Tunable control of an *Escherichia coli* expression system for the overproduction of membrane proteins by titrated expression of a mutant *lac* repressor. ACS Synth Biol 6:1766–1773. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00102>
- King KY, Horenstein JA, Caparon MG (2000) Aerotolerance and peroxide resistance in peroxidase and PerR mutants of *Streptococcus pyogenes*. J Bacteriol 182:5290–5299. <https://doi.org/10.1128/jb.182.19.5290-5299.2000>
- Knowles CJ (1976) Microorganisms and cyanide. Bacteriol Rev 40:652–680
- Kostka JE, Green SJ, Rishishwar L, Prakash O, Katz LS, Mariño-Ramírez L, Jordan IK, Munk C, Ivanova N, Mikhailova N, Watson DB, Brown SD, Palumbo AV, Brooks SC (2012) Genome sequences for six *Rhodanobacter* strains, isolated from soils and the terrestrial subsurface, with variable denitrification capabilities. J Bacteriol 194:4461–4462. <https://doi.org/10.1128/JB.00871-12>
- Leeper T, Zhang S, Van Voorhis WC, Myler PJ, Varani G (2011) Comparative analysis of glutaredoxin domains from bacterial opportunistic pathogens. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 67:1141–1147. <https://doi.org/10.1107/S1744309111012346>
- Leite B, Ishida ML, Alves E, Carrer H, Pascholati SF, Kitajima EW (2002) Genomics and X-ray microanalysis indicate that Ca²⁺ and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa*. Braz J Med Biol Res 35:645–650. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2002000600003>
- Li Y, Wu Q, Peng Y, Huang F, Li X, Chen L, Shi D, Zhou X, Fan X (2014) Expression, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma japonicum* in complex with FAD. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun 70:92–96. <https://doi.org/10.1107/S2053230X1303131X>
- Lisdiyanti P, Kawasaki H, Seki T, Yamada Y, Uchimura T, Komagata K (2001) Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov., and *Acetobacter orientalis* sp. nov. J Gen Appl Microbiol 47:119–131. <https://doi.org/10.2323/jgam.47.119>
- Martinez-Gomez NC, Palmer LD, Vivas E, Roach PL, Downs DM (2011) The rhodanese domain of ThiI is both necessary and sufficient for synthesis of the thiazole moiety of thiamine in *Salmonella enterica*. J Bacteriol 193:4582–4587. <https://doi.org/10.1128/JB.05325-11>
- Milne I, Wright F, Rowe G, Marshall DF, Husmeier D, McGuire G (2004) TOPALi: software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. Bioinforma Oxf Engl 20: 1806–1807. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth155>
- Mironov A, Seregina T, Nagornykh M, Luhachack LG, Korolkova N, Lopes LE, Kotova V, Zavilgelsky G, Shakulov R, Shatalin K, Nudler E (2017) Mechanism of H₂S-mediated protection against oxidative stress in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 114:6022–6027. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703576114>
- Mithöfer A, Boland W (2012) Plant defense against herbivores: chemical aspects. Annu Rev Plant Biol 63:431–450. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103854>
- Moseler A, Selles B, Rouhier N, Couturier J (2019) Novel insights into the diversity of the sulfurtransferase family in photosynthetic organisms with emphasis on oak. New Phytol. <https://doi.org/10.1111/nph.15870>
- Nakajima T (2015) Roles of sulfur metabolism and rhodanese in detoxification and anti-oxidative stress functions in the liver: responses to radiation exposure. Med Sci Monit 21:1721–1725. <https://doi.org/10.12659/MSM.893234>
- Nandi DL, Horowitz PM, Westley J (2000) Rhodanese as a thioredoxin oxidase. Int J Biochem Cell Biol 32:465–473. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(99\)00035-7](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(99)00035-7)
- Netto LES, de Oliveira MA, Tairum CA, da Silva Neto JF (2016) Conferring specificity in redox pathways by enzymatic thiol/disulfide exchange reactions. Free Radic Res 50:206–245. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1120864>
- Oliveira MA, Discola KF, Alves SV, Medrano FJ, Guimarães BG, Netto LES (2010) Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. Biochemistry 49:3317–3326. <https://doi.org/10.1021/bi901962p>
- Pain D, Dancis A (2016) Roles of Fe-S proteins: from cofactor synthesis to iron homeostasis to protein synthesis. Curr Opin Genet Dev 38: 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.03.006>
- Pal VK, Bandyopadhyay P, Singh A (2018) Hydrogen sulfide in physiology and pathogenesis of bacteria and viruses. IUBMB Life 70: 393–410. <https://doi.org/10.1002/iub.1740>

- Parker A, Cuddihy SL, Son TG, Vissers MCM, Winterbourn CC (2011) Roles of superoxide and myeloperoxidase in ascorbate oxidation in stimulated neutrophils and H₂O₂-treated HL60 cells. *Free Radic Biol Med* 51:1399–1405. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.029>
- Pieretti I, Royer M, Barbe V, Carrere S, Koebnik R, Cociancich S, Couloux A, Darrasse A, Gouzy J, Jacques MA, Lauber E, Manceau C, Mangenot S, Poussier S, Segurens B, Szurek B, Verdier V, Arlat M, Rott P (2009) The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited *Xanthomonadaceae*. *BMC Genomics* 10:616. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-616>
- Rajniak J, Barco B, Clay NK, Sattely ES (2015) A new cyanogenic metabolite in *Arabidopsis* required for inducible pathogen defence. *Nature* 525:376–379. <https://doi.org/10.1038/nature14907>
- Roder C, Arif C, Daniels C, Weil E, Voolstra CR (2014) Bacterial profiling of white plague disease across corals and oceans indicates a conserved and distinct disease microbiome. *Mol Ecol* 23:965–974. <https://doi.org/10.1111/mec.12638>
- Romsang A, Duang-Nkern J, Leesukon P, Saninjuk K, Vattanaviboon P, Mongkolsuk S (2014) The iron-Sulphur cluster biosynthesis regulator IscR contributes to iron homeostasis and resistance to oxidants in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 9:e86763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086763>
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* 61:539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Rubinstein B (1992) Similarities between plants and animals for avoiding predation and disease. *Physiol Zool* 65:473–492. <https://doi.org/10.1086/physzool.65.3.30157965>
- Ryan CA (1990) Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 28:425–449. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.28.090190.002233>
- Schneider TD, Stephens RM (1990) Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res* 18:6097–6100. <https://doi.org/10.1093/nar/18.20.6097>
- Seres T, Knickelbein RG, Warshaw JB, Johnston RB (2000) The phagocytosis-associated respiratory burst in human monocytes is associated with increased uptake of glutathione. *J Immunol* 165:3333–3340. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.6.3333>
- Shen J, Keithly ME, Armstrong RN, Higgins KA, Edmonds KA, Giedroc DP (2015) *Staphylococcus aureus* CstB is a novel multidomain persulfide dioxygenase-sulfurtransferase involved in hydrogen sulfide detoxification. *Biochemistry* 54:4542–4554. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00584>
- Shen J, Walsh BJC, Flores-Mireles AL, Peng H, Zhang Y, Zhang Y, Trinidad JC, Hultgren SJ, Giedroc DP (2018) Hydrogen sulfide sensing through reactive sulfur species (RSS) and nitroxyl (HNO) in *Enterococcus faecalis*. *ACS Chem Biol* 13:1610–1620. <https://doi.org/10.1021/acschembio.8b00230>
- Shrivastava AK, Singh S, Singh PK, Pandey S, Rai LC (2015) A novel alkyl hydroperoxidase (AhpD) of *Anabaena* PCC7120 confers abiotic stress tolerance in *Escherichia coli*. *Funct Integr Genomics* 15:77–92. <https://doi.org/10.1007/s10142-014-0407-y>
- Siegięń I, Bogatek R (2006) Cyanide action in plants - from toxic to regulatory. *Acta Physiol Plant* 28:483–497. <https://doi.org/10.1007/BF02706632>
- Simpson AJ, Reinach FC, Arruda P, Abreu FA, Acencio M, Alvarenga R, Alves LM, Araya JE, Baia GS, Baptista CS, Barros MH, Bonaccorsi ED, Bordin S, Bové JM, Briones MR, Bueno MR, Camargo AA, Camargo LE, Carraro DM, Carrer H, Colauto NB, Colombo C, Costa FF, Costa MC, Costa-Neto CM, Coutinho LL, Cristofani M, Dias-Neto E, Docena C, El-Dorri H, Facincani AP, Ferreira AJ, Ferreira VC, Ferro JA, Fraga JS, França SC, Franco MC, Frohme M, Furlan LR, Garnier M, Goldman GH, Goldman MH, Gomes SL, Gruber A, Ho PL, Hoheisel JD, Junqueira ML, Kemper EL, Kitajima JP, Krieger JE, Kuramae EE, Laigret F, Lambais MR, Leite LC, Lemos EG, Lemos MV, Lopes SA, Lopes CR, Machado JA, Machado MA, Madeira AM, Madeira HM, Marino CL, Marques MV, Martins EA, Martins EM, Matsukuma AY, Menck CF, Miracca EC, Miyaki CY, Monteriro-Vitorello CB, Moon DH, Nagai MA, Nascimento AL, Netto LE, Nhani A Jr, Nobrega FG, Nunes LR, Oliveira MA, de Oliveira MC, de Oliveira RC, Palmieri DA, Paris A, Peixoto BR, Pereira GA, Pereira HA Jr, Pesquero JB, Quaggio RB, Roberto PG, Rodrigues V, de M Rosa AJ, de Rosa VE Jr, de Sá RG, Santelli RV, Sawasaki HE, da Silva AC, da Silva AM, da Silva FR, da Silva WA Jr, da Silveira JF, Silvestri ML, Siqueira WJ, de Souza AA, de Souza AP, Terenzi MF, Truffi D, Tsai SM, Tsuchiko MH, Vallada H, Van Sluys MA, Verjovski-Almeida S, Vettore AL, Zago MA, Zatz M, Meidanis J, Setubal JC (2000) The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406:151–159. <https://doi.org/10.1038/35018003>
- Slauch JM (2011) How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Mol Microbiol* 80:580–583. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07612.x>
- Smolka MB, Martins-de-Souza D, Martins D, Winck FV, Santoro CE, Castellari RR, Ferrari F, Brum IJ, Galembeck E, Della Coletta Filho H, Machado MA, Marangoni S, Novello JC (2003) Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. *Proteomics* 3:224–237. <https://doi.org/10.1002/pmic.200390031>
- Snitkin ES, Segre JA (2015) *Pseudomonas aeruginosa* adaptation to human hosts. *Nat Genet* 47:2–3. <https://doi.org/10.1038/ng.3172>
- Sturgill G, Toutain CM, Komperda J, O'Toole GA, Rather PN (2004) Role of CysE in production of an extracellular signaling molecule in *Providencia stuartii* and *Escherichia coli*: loss of CysE enhances biofilm formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186:7610–7617. <https://doi.org/10.1128/JB.186.22.7610-7617.2004>
- Tairum CA, de Oliveira MA, Horta BB, Zera FJ, Netto LES (2012) Disulfide biochemistry in 2-cys peroxiredoxin: requirement of Glu50 and Arg146 for the reduction of yeast Tsa1 by thioredoxin. *J Mol Biol* 424:28–41. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.09.008>
- Tairum CA, Santos MC, Breyer CA, Geyer RR, Nieves CJ, Portillo-Ledesma S, Ferrer-Sueta G, Toledo JC, Toyama MH, Augusto O, Netto LES, de Oliveira MA (2016) Catalytic Thr or Ser residue modulates structural switches in 2-Cys peroxiredoxins by distinct mechanisms. *Sci Rep* 6:33133. <https://doi.org/10.1038/srep33133>
- Thomas DC (2017) The phagocyte respiratory burst: historical perspectives and recent advances. *Immunol Lett* 192:88–96. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.08.016>
- Varani AM, Monteiro-Vitorello CB, de Almeida LGP, Souza RC, Cunha OL, Lima WC, Civerolo E, Van Sluys MA, Vasconcelos AT (2012) *Xylella fastidiosa* comparative genomic database is an information resource to explore the annotation, genomic features, and biology of different strains. *Genet Mol Biol* 35:149–152. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572012005000019>
- Vogel C, Teichmann SA, Pereira-Leal J (2005) The relationship between domain duplication and recombination. *J Mol Biol* 346:355–365. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.11.050>
- Wang SF, Volini M (1973) The interdependence of substrate and protein transformations in rhodanese catalysis. I. Enzyme interactions with substrate, product, and inhibitor anions. *J Biol Chem* 248:7376–7385
- Wang G, Tang M, Li T, Dai S, Wu H, Chen C, He H, Fan J, Xiang W, Li X (2015a) *Wenzhouxiangella marina* gen. nov, sp. nov, a marine bacterium from the culture broth of *Picochlorum* sp. 122, and proposal of *Wenzhouxiangellaceae* fam. nov. in the order *Chromatiales*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107:1625–1632. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0458-7>

- Wang Z, Liu L, Guo F, Zhang T (2015b) Deciphering cyanide-degrading potential of bacterial community associated with the coking wastewater treatment plant with a novel draft genome. *Microb Ecol* 70: 701–709. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0611-x>
- Wang P, Lee Y, Igo MM, Roper MC (2017) Tolerance to oxidative stress is required for maximal xylem colonization by the xylem-limited bacterial phytopathogen, *Xylella fastidiosa*. *Mol Plant Pathol* 18: 990–1000. <https://doi.org/10.1111/mpp.12456>
- Wojtaszek P (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* 322:681–692. <https://doi.org/10.1042/bj3220681>
- Xu XM, Møller SG (2011) Iron-sulfur clusters: biogenesis, molecular mechanisms, and their functional significance. *Antioxid Redox Signal* 15:271–307. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3259>
- Youenou B, Favre-Bonté S, Bodilis J, Brothier E, Dubost A, Muller D, Nazaret S (2015) Comparative genomics of environmental and clinical *Stenotrophomonas maltophilia* strains with different antibiotic resistance profiles. *Genome Biol Evol* 7:2484–2505. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv161>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.