



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Centro de Biologia Molecular e Estrutural  
BIO 7016 – Trabalho de Conclusão de Curso II

Efeito da S-nitrosilação nas enzimas tirosina fosfatases PtpA e PtpB de  
*Mycobacterium tuberculosis*

Gabriela Ecco

Florianópolis, dezembro de 2010.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Centro de Biologia Molecular e Estrutural  
BIO 7016 – Trabalho de Conclusão de Curso II

Efeito da S-nitrosilação nas enzimas tirosina fosfatases PtpA e PtpB de  
*Mycobacterium tuberculosis*

Gabriela Ecco

Trabalho submetido à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II (BIO 7016), como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pelo Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadores: Prof. Dr. Hernán Terenzi  
Dr. Javier Vernal

Florianópolis, dezembro de 2010.

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço ao Professor Dr. Hernán Terenzi, pela orientação e por ter me dado todo apoio necessário para a realização desse e de outros trabalhos durante esses cinco anos;
- Ao Dr. Javier Vernal, por ser meu orientador na bancada, pelos conselhos e por me mostrar o melhor caminho em todos os momentos em que duvidei de meus experimentos;
- Ao Dr. Guilherme Razzera, pela ajuda fundamental no final desse trabalho, pelas conversas e por me ajudar a entender melhor a estrutura das proteínas;
- Aos meus pais Roseli e Ivan, por terem sempre me dado tanto amor e apoio, por me ensinarem o gosto pelo estudo e por compartilharem com tanta alegria minhas conquistas;
- Ao meu noivo Lucas, pelo amor que me faz sentir completa, pela compreensão, por me ensinar um pouco mais sobre equilíbrio e por ter escutado pacientemente todos os altos e baixos desse trabalho;
- À minha irmã Carolina pela alegria, pelo carinho e por relevar todas as minhas crises de estresse;
- Ao pessoal do laboratório Angela, Angélica, Carolina, Franciele, Gabrielle, Giselle, Jean, João, Manuel, Patrícia Severino, Patrícia Rabelo, Ricardo, Tiago e Viviane, pela amizade, pela ajuda, pela convivência no laboratório durante esses anos e por tornarem meu dia-a-dia ainda mais alegre e divertido; agradeço em especial à Camila e à Priscila que, além de tudo isso, participaram diretamente da realização desse trabalho;
- Aos amigos da Biologia Elisa, Luís, Márcio, Ninna e Patrícia, pela amizade que construímos, pelos cafés, pelas conversas e por preencherem com ótimas lembranças esses cinco anos de faculdade;
- Aos Professores Dr. Edmundo Grisard, Dr. Jamil Assreuy e Dra. Maria Risoleta Marques, por aceitarem fazer parte da banca avaliadora desse trabalho;
- À UFSC, FAPESC, FINEP, CAPES, ao CNPq, MCT e INCT de Biologia Estrutural e Bioimagem, por fornecerem os meios para que esse trabalho fosse desenvolvido;
- A todos outros que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho e para a minha formação profissional e pessoal.

## RESUMO

O *Mycobacterium tuberculosis* possui duas proteínas tirosina fosfatases (PTPs) codificadas no seu genoma, PtpA e PtpB, ambas proteínas secretadas e importantes fatores de virulência dessa bactéria. A S-nitrosilação, a adição covalente de um grupo NO a resíduos de cisteína, é uma das principais reações do óxido nítrico (NO) com substratos biológicos e está relacionada a eventos de sinalização celular e à atividade microbicida desse radical. Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo investigar a susceptibilidade da PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* à S-nitrosilação por ação do NO, bem como estudar os efeitos dessa modificação pós-traducional nessas proteínas. As proteínas PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* foram expressas de maneira heteróloga, purificadas e submetidas a ensaios para avaliar a susceptibilidade à S-nitrosilação. Verificou-se que a PtpA é S-nitrosilada, enquanto que a PtpB não é susceptível à S-nitrosilação. Para determinar qual dos resíduos de cisteína da PtpA é modificado pelo NO, foram construídos os vetores de expressão para as mutações Cys11Ala, Cys16Ala e Cys53Ala. Juntamente com a PtpA, as proteínas mutadas foram utilizadas em ensaios de susceptibilidade à S-nitrosilação e em ensaios de atividade catalítica. Estabeleceu-se que a S-nitrosilação da PtpA ocorre no resíduo Cys53 e verificou-se que essa modificação reduz a atividade desse fator de virulência.

**Palavras-chave:** Tirosina fosfatase, *Mycobacterium tuberculosis*, óxido nítrico, nitrosilação.

## ABSTRACT

*Mycobacterium tuberculosis* genome codes for two protein tyrosine phosphatases (PTPs), PtpA and PtpB. Both proteins are secreted and they are important virulence factors of this pathogen. S-nitrosylation, the covalent addition of NO group to cysteine residues, is one of the main reactions of nitric oxide (NO) with biological substrates. S-nitrosylation is associated with cellular signaling and with the microbicidal activity of NO radical. In this context the aim of this work was to investigate *M. tuberculosis* PtpA and PtpB susceptibility to S-nitrosylation upon NO action, and to study the effects of this post-translational modification on these proteins. *M. tuberculosis* PtpA and PtpB were expressed in *E. coli*, purified and were used in biotin switch assays to evaluate their susceptibility to S-nitrosylation. We have observed that PtpA is S-nitrosylated while PtpB is not susceptible to S-nitrosylation. In order to determine which PtpA cysteine residue was modified by NO, we have constructed expression vectors for mutations Cys11Ala, Cys16Ala and Cys53Ala. Along with PtpA, mutated proteins were used in biotin switch assays and activity assays. We have established that PtpA S-nitrosylation occurs at Cys53 residue and we have observed that this modification reduces the activity of this virulence factor.

**Key words:** Tyrosine phosphatase, *Mycobacterium tuberculosis*, nitric oxide, nitrosylation.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>7</b>
1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e a tuberculose .....	7
1.2 Proteínas tirosina fosfatases .....	9
1.3 PtpA e PtpB de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	12
1.4 Oxido Nítrico e S-nitrosilação .....	14
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos .....	18
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>19</b>
3.1 Vetores de expressão.....	19
3.2 Preparação de bactérias competentes .....	19
3.3 Transformação de bactérias .....	19
3.4 Expressão das proteínas PtpA e PtpB .....	20
3.5 Purificação das proteínas PtpA e PtpB .....	21
3.6 Quantificação de proteínas.....	22
3.7 Expressão e purificação da proteína PTP1B.....	22
3.8 Ensaio de biotinylação para detecção de proteínas S-nitrosiladas.....	22
3.9 Mutação sítio-dirigida.....	24
3.10 Cálculo de atividade específica e ensaios de atividade enzimática na presença de GSNO.....	25
3.11 Modelo tridimensional de PtpA S-nitrosilada em Cys53.....	25
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
4.1 Expressão e purificação de PtpA e PtpB.....	26
4.2 Ensaios de biotinylação para detecção de proteínas S-nitrosiladas .....	28
4.3 Construção dos plasmídeos mutantes PtpA_C11A, PtpA_C16A, PtpA_C53A .....	30
4.4 Expressão e purificação das proteínas mutantes PtpA_C11A, PtpA_C16A, PtpA_C53A.....	32

4.5 Ensaio de biotinylation das proteínas mutantes PtpA_C11A, PtpA_C16A, PtpA_C53A.....	34
4.6 Ensaio de atividade enzimática de PtpA, PtpA_C11A, PtpA_C16A, PtpA_C53A e PtpB na ausência e presença de GSNO.....	36
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
5.1 PtpA é susceptível à S-nitrosilação.....	38
5.2 A S-nitrosilação de PtpA ocorre em Cys53.....	39
5.3 A S-nitrosilação em Cys53 afeta a atividade de PtpA.....	40
5.4 Implicações da S-nitrosilação de PtpA para a biologia de <i>M. tuberculosis</i> .....	41
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>43</b>
<b>7 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXO A - ARTIGOS PUBLICADOS.....</b>	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 *Mycobacterium tuberculosis* e a tuberculose

O *Mycobacterium tuberculosis*, bactéria causadora da tuberculose, é um dos agentes infecciosos que mais causa mortes no mundo. Apesar da existência de antibióticos antituberculose e da vacina contra tuberculose (BCG, Bacilo de Calmette-Guérin), foram registrados 1,3 milhão de casos de morte por tuberculose no mundo em 2008 e a Organização Mundial da Saúde estima que, atualmente, um terço da população mundial esteja infectado pelo *M. tuberculosis* (OMS, 2010).

A tuberculose humana é uma doença infecto-contagiosa que atinge principalmente o sistema respiratório. Ela é transmitida pela inalação de bacilos de *M. tuberculosis* suspensos no ar que, ao penetrarem nas vias respiratórias, são fagocitados por macrófagos alveolares (RUSSELL; BARRY; FLYNN, 2010). Dentro dos macrófagos, as micobactérias se reproduzem e há a indução de uma resposta inflamatória que leva à formação do granuloma ou tubérculo — que dá nome à doença.

O granuloma consiste em macrófagos e outros fagócitos que, juntamente com linfócitos e fibras colágenas da matriz, circundam as células infectadas pela micobactéria, isolando-as (RUSSELL, 2007). Na maioria dos casos, o sistema imune do hospedeiro consegue manter o *M. tuberculosis* isolado dentro do granuloma e, assim, é estabelecido um equilíbrio entre o patógeno e o sistema imune do hospedeiro (infecção latente). No entanto, quando o sistema imune do hospedeiro está comprometido, como no caso de co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), desnutrição ou envelhecimento — ou qualquer outra condição que diminua o número ou prejudique a função de células T CD4+ — o granuloma rompe-se, a doença desenvolve-se (tuberculose ativa) e o indivíduo libera milhares de partículas infecciosas no ar (RUSSELL, 2007). Cerca de 15% dos pacientes com tuberculose ativa desenvolve ainda a tuberculose extrapulmonar, que é causada pelo crescimento bacteriano excessivo, que invade a corrente sanguínea e espalha micobactérias pelo corpo (DUCATI et al., 2006).

O risco de uma pessoa infectada desenvolver a tuberculose ativa é de cerca de 5% após o primeiro ano e de 10% durante a vida, sendo que esse número passa para 8% ao ano em pessoas



co-infectadas com HIV (DUCATI et al., 2006). As células T CD4<sup>+</sup> secretam citocinas e ativam os macrófagos. Sendo assim elas são essenciais, durante a latência da doença, para o equilíbrio entre o sistema imune do hospedeiro e a micobactéria. Na infecção pelo HIV, no entanto, o número de células T CD4<sup>+</sup> é reduzido, comprometendo a contenção do *M. tuberculosis* pelo sistema imune do paciente (NUNN et al., 2005). Atualmente, a tuberculose é uma das principais causas de morte entre indivíduos HIV positivos (OMS, 2010).

Apesar de haver vacina e tratamento para a tuberculose, a eficácia dos mesmos está sendo questionada por muitos estudos. Por um lado, a vacina BCG protege apenas contra as formas mais agressivas da tuberculose e principalmente as crianças (RUSSELL; BARRY; FLYNN, 2010). Por outro lado, o tratamento para a tuberculose é longo, com seis meses de duração, e consiste na administração combinada de quatro fármacos: isoniazida, rifampicina, pirazinamida e estreptomicina (ou etambutol) (DUCATI et al., 2006). Além de longo, o tratamento tem vários efeitos colaterais, o que leva alguns pacientes a desistirem do mesmo. Isso levou ao desenvolvimento de cepas resistentes conhecidas como multi-resistentes e ultra-resistentes, o que dificulta ainda mais o controle desta doença (DORMAN; CHAISSON, 2007).

O *M. tuberculosis* pertence ao gênero *Mycobacterium* que compreende bactérias filamentosas aeróbias, Gram positivas, diferenciadas por complexos lipídicos de superfície (KOUL et al., 2004). O gênero *Mycobacterium* é o único da família Mycobacteriaceae, composta de mais de 50 espécies patogênicas ou de vida livre, encontradas na água, alimentos, solo e vegetação (EISENSTADT; HALL, 1995). O *M. tuberculosis* pertence ao complexo do *M. tuberculosis*, juntamente com outras cinco espécies causadoras de tuberculose: *Mycobacterium bovis*, que infecta uma grande variedade de mamíferos, inclusive humanos; *Mycobacterium bovis* BCG, uma cepa atenuada de *M. bovis*; *Mycobacterium africanum*, que infecta humanos na África Subsaariana; *Mycobacterium microti*, que infecta algumas espécies de roedores; e *Mycobacterium canetti*, uma espécie muito rara, encontrada em poucos casos da doença humana (COLE, 2002). Essas espécies possuem genoma quase idêntico e, inclusive, são consideradas por alguns como uma única espécie (IMAEDA, 1985). Acredita-se que o complexo do *M. tuberculosis* tenha se originado de uma bactéria do solo, de vida livre, que se adaptou a infectar mamíferos (COLE, 2002).

A sobrevivência e replicação do *M. tuberculosis* nas células hospedeiras é possível graças

a mecanismos de defesa que esse patógeno adquiriu durante a co-evolução com o sistema imune do hospedeiro. Durante a infecção, o *M. tuberculosis* inibe processos celulares do hospedeiro, o que possibilita a sobrevivência desse patógeno dentro dos macrófagos. Essas estratégias vão desde a síntese de proteínas que intervêm nos processos de sinalização celular até a produção de moduladores que interferem na ativação de macrófagos (KOUL et al., 2004; MUELLER; PIETERS, 2006). Uma importante estratégia de evasão do *M. tuberculosis* é a inibição da fusão fagossomo-lisossomo. Os estudos recentes apontam que essa inibição ocorre pela ação de proteínas quinases e fosfatases sintetizadas pela micobactéria (PIETERS, 2008; CHAO et al., 2010).

## 1.2 Proteínas tirosina fosfatases

As proteínas quinases e as proteínas fosfatases são enzimas que catalisam, respectivamente, a fosforilação e defosforilação de substratos. Juntas, elas participam na transdução de sinais e modulam uma grande variedade de eventos celulares. A fosforilação é uma das principais modificações pós-traducionais conhecidas. A adição ou remoção de um grupo fosfato de uma proteína pode gerar um motivo de reconhecimento para interações proteína-proteína, controlar a estabilidade dessas moléculas e, principalmente, controlar a atividade enzimática (ZHANG, 2002).

Com base na função, estrutura e especificidade, as proteínas fosfatases podem ser divididas, de maneira geral, em proteínas serina/treonina fosfatases e proteínas tirosina fosfatases (PTPs). As proteínas serina/treonina fosfatases são metaloenzimas que defosforilam resíduos de fosfoserina e fosfotreonina em um único passo de reação, utilizando como nucleófilo uma molécula de água ativada por metal. As PTPs, por outro lado, catalisam preferencialmente a hidrólise do fosfato ligado a resíduos de tirosina com um intermediário enzimático cisteinil fosfato (BARFORD; DAS; EGLOFF, 1998).

As PTPs são uma superfamília de proteínas estruturalmente diversas, agrupadas pela conservação do motivo catalítico CX<sub>5</sub>R (TABERNERO et al., 2008). Como as proteínas fosfatases em geral, as PTPs estão envolvidas na regulação de uma série de eventos biológicos importantes. Em eucariotos, alguns dos eventos regulados por fosforilação e defosforilação de

resíduos de tirosina são: a proliferação de células, a progressão do ciclo celular, a homeostase metabólica, a ativação transcricional, a transmissão neural, o desenvolvimento e o envelhecimento (HUNTER, 2009). Além disso, perturbações na fosforilação de tirosinas estão envolvidas em diversas doenças humanas, como por exemplo, no câncer. Em procariotos, as PTPs estão envolvidas na adaptação ao ambiente, patogênese e interação com o hospedeiro, divisão e regulação do ciclo celular, transporte de moléculas, síntese de metabólitos, além de outros eventos de síntese e regulação (COZZONE et al., 2004).

As PTPs podem ser subdivididas em famílias de diversas maneiras, no entanto, uma classificação bastante utilizada é a de Alonso e colaboradores (ALONSO et al., 2004), baseada nos diferentes tipos de PTPs humanas (Figura 1). Segundo essa classificação, as PTPs podem ser separadas em quatro famílias: (1) PTPs baseadas em cisteína de Classe I; (2) PTPs baseadas em cisteína de Classe II; (3) PTPs baseadas em cisteína de Classe III; e (4) PTPs baseadas em aspartato.

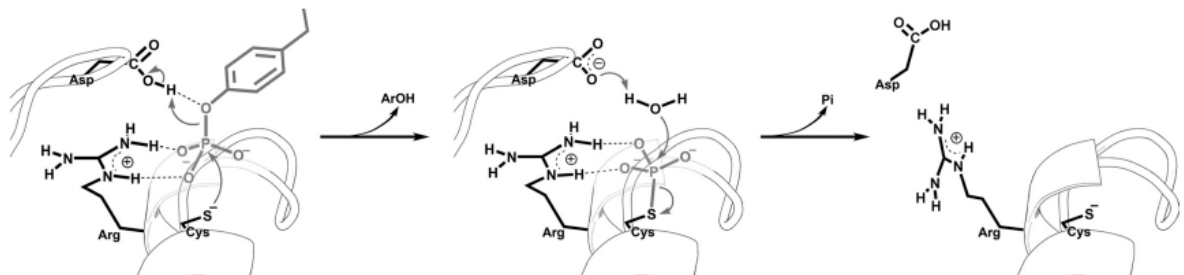
<b>1) PTPs baseadas em Cys de Classe I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>— PTPs Clássicas</li> <li>— DSPs</li> </ul>	<b>Especificidade de substrato</b>  <b>PTyr</b> <b>PTyr, PThr, PSer, fosfoinositídeos</b>  <b>PTyr</b>  <b>PTyr, PThr</b>  <b>PTyr, PSer?</b>
<b>2) PTPs baseadas em Cys de Classe II</b>	
<b>3) PTPs baseadas em Cys de Classe III</b>	
<b>4) PTPs baseadas em Asp</b>	

**Figura 1.** *Classificação e especificidade de substratos de PTPs.* Nos quadros à esquerda, estão as quatro classes de PTPs; no quadro à direita, a especificidade de substrato de cada classe. Fonte: adaptado de ALONSO et al., 2004.

As PTPs baseadas em cisteína de Classe I são a maior família de PTPs e nela estão contidas as chamadas PTPs Clássicas e as PTPs de Dupla Especificidade (DSPs). As PTPs Clássicas defosforilam especificamente resíduos de fosfotirosina. Já as DSP são mais diversas em termos de substratos e defosforilam resíduos de fosfotirosina, fosfoserina e fosfotreonina, além de fosfoinositídeos.

As PTPs baseadas em cisteína de Classe II correspondem às PTPs de baixa massa molecular (LMW-PTPs). Elas são proteínas menores, com cerca de 18 kDa, possuem representantes nos principais grupos de seres vivos e são estruturalmente relacionadas às arsenato redutases bacterianas. Já as PTPs baseadas em cisteína de Classe III defosforilam especificamente resíduos de fosfotirosina e fosfotreonina e provavelmente evoluíram de uma enzima bacteriana semelhante à rodanase. Finalmente, as PTPs baseadas em aspartato, apesar de serem classificadas como PTPs, possuem um mecanismo catalítico diferente, com um aspartato catalítico e dependência de um cátion.

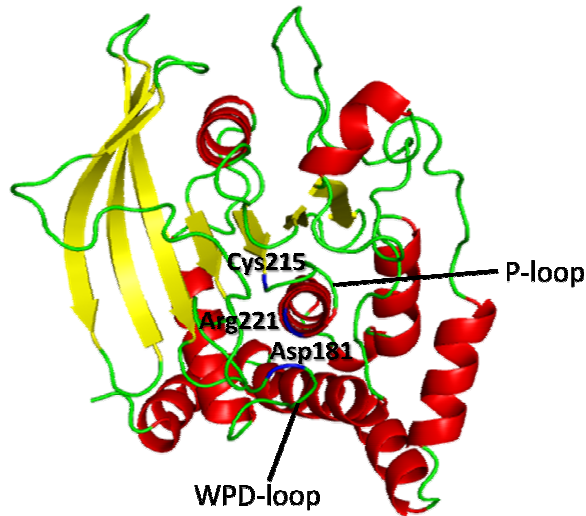
As PTPs baseadas em cisteína — e que serão abordadas neste trabalho —, como o nome sugere, possuem um mecanismo catalítico baseado em um resíduo de cisteína (TABERNEIRO et al., 2008). O resíduo de cisteína catalítico (presente no motivo CX<sub>5</sub>R) age como nucleófilo e o resíduo de arginina conservado está envolvido na ligação do substrato e na estabilização do intermediário de reação (Figura 2). Outro resíduo fundamental e conservado é o aspartato catalítico, que funciona como ácido geral em uma primeira etapa da catálise, e como base na segunda etapa.



**Figura 2:** Mecanismo geral de catálise de PTPs baseadas em cisteína. Os resíduos de Cys, Arg e Asp catalíticos estão destacados e o grupo fosfato é mostrado no sítio ativo. A arginina estabiliza o substrato enquanto o ataque nucleofílico é realizado pela cisteína. Na primeira etapa, o aspartato age como um ácido e, na etapa final, ele age como uma base. Fonte: BRANDÃO; HENGGE; JOHNSON, 2010 .

Não apenas os resíduos catalíticos são conservados, mas também a estrutura geral do sítio ativo das PTPs é bastante preservada ao longo da evolução (Figura 3). A cisteína e a arginina catalíticas localizam-se em um *loop* denominado P-*loop*, que se estrutura como um “berço”, e que mantém o grupo fosfato no local para o ataque nucleofílico. Além disso, o aspartato catalítico

está localizado no WPD-*loop*, que dá lugar ao DPYY-*loop* no caso das LMW-PTPs (TABERNERO et al., 2008).



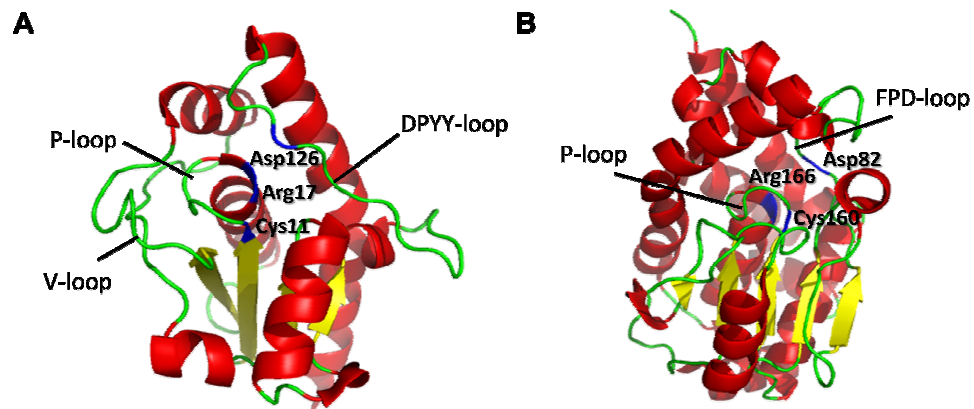
**Figura 3.** Estrutura tridimensional da PTP clássica humana PTP1B. Os resíduos catalíticos estão indicados e coloridos em azul. O P-*loop* e o WPD-*loop* também estão indicados. A estrutura corresponde ao arquivo do PDB 1PTV (PTP1B C215S).

### 1.3 PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis*

O *M. tuberculosis* possui, de acordo com seu genoma (COLE et al., 1998), apenas duas PTPs, PtpA e PtpB, ambas envolvidas na patogenicidade desse microrganismo. A PtpB (Figura 4A) é uma proteína secretada no meio de cultura, inicialmente caracterizada como uma PTP clássica com atividade específica para fosfotirosina (KOUL et al., 2000; VERGNE et al., 2005). No entanto, um estudo mais recente demonstrou que essa enzima exibe tripla especificidade de substratos, defosforilando *in vitro* resíduos de fosfotirosina, fosfoserina/fosfotreonina e ainda fosfoinosítídeos (BERESFORD et al., 2007). Esse mesmo estudo sugere que a PtpB possa estar envolvida no metabolismo de fosfoinosítídeos do hospedeiro, bem como nas vias de sinalização a eles associadas — que são importantes na maturação do fagossomo. Os substratos fisiológicos da PtpB e a função exata dessa enzima para a micobactéria ainda não são totalmente conhecidos.

De qualquer maneira, muitos estudos já mostraram que essa enzima tem papel importante na sobrevivência de *M. tuberculosis*. A deleção gênica de PtpB aumenta a mortalidade da

bactéria tanto em macrófagos murinos ativados com IFN- $\gamma$ , quanto em cobaias — o modelo *in vivo* de tuberculose mais próximo do humano (SINGH et al., 2003). Além disso, recentemente, foi demonstrado que a inibição *in vivo* da PtpB reduz substancialmente a sobrevivência do *M. tuberculosis* em macrófagos murinos infectados (BERESFORD et al., 2009).



**Figura 4.** Estrutura tridimensional das PTPs de *M. tuberculosis*. **A.** Estrutura tridimensional da PtpA de *M. tuberculosis* (PDB 1U2P). Os resíduos catalíticos (Cys11, Arg17, Asp126) estão em azul. O P-loop, o DPYY-loop e o loop variável (V-loop) estão indicados. **B.** Estrutura tridimensional da PtpB de *M. tuberculosis* (PDB 1YWF). Os resíduos catalíticos (Cys160, Arg166, Asp82) estão coloridos em azul. O P-loop e o WPD-loop (que em PpB é o FPD-loop) também estão indicados.

Já a PtpA (Figura 4B) é uma LMW-PTP que defosforila especificamente resíduos de tirosina (KOUL et al., 2000). A PtpA também é secretada no citosol do macrófago e sua expressão é aumentada quando ocorre a infecção dessas células (COWLEY; BABAKAIF; AV-GAY, 2002) — o que sugere uma interação dessa proteína com os macrófagos do hospedeiro. Apesar de não ser necessária para o crescimento de *M. tuberculosis* em macrófagos murinos, a PtpA é essencial para o sucesso da infecção em humanos (BACH et al., 2008; GRUNDNER; COX; ALBER, 2008). Tanto a deleção gênica da PtpA como a expressão — no citosol dos macrófagos — de anticorpos neutralizantes de PtpA reduzem o crescimento de *M. tuberculosis* em macrófagos humanos. Além disso, recentemente, nosso laboratório demonstrou que chalconas inibidoras da PtpA também diminuem a sobrevivência da bactéria em macrófagos humanos (MASCARELLO et al., 2010).

A proteína VPS33B (*Human Class C Vacuolar Protein Sorting VPS33B*), um regulador de fusão de membrana presente nos macrófagos, é o único substrato fisiológico conhecido de PtpA (BACH et al., 2008). A VPS33B faz parte do complexo HOPS (*Homotypic Vacuole Fusion and Vacuole Protein Sorting*), um complexo protéico que promove a ancoragem e fusão de vesículas com membranas-alvo. A defosforilação de VPS33B pela PtpA prejudica o funcionamento desse complexo e impede a fusão do fagossomo com o lisossomo no macrófago (BACH et al., 2008). A inibição da fusão fagossomo-lisossomo é uma resposta celular do processo infeccioso que é inibida pelo *M. tuberculosis*. A PtpA, portanto, é um importante fator de virulência de *M. tuberculosis*, envolvido no estabelecimento da infecção desse patógeno.

Recentemente, foi detectada ainda a presença de uma fosfotirosina quinase em *M. tuberculosis*, PtkA (BACH; WONG; AV-GAY, 2009). Bach, Wong e Av-Gay (2009) demonstraram que a PtpA é fosforilada pela PtkA em dois resíduos de Tyr (Tyr131 e Tyr132). Há duas hipóteses sobre o papel da fosforilação da PtpA: a fosforilação poderia tanto modular a atividade dessa enzima, como poderia regular sua secreção (CHAO et al., 2010). Também foi observado que PtkA não é um substrato da PtpA, o que é consistente com o fato de que a PtpA é uma proteína secretada que age no hospedeiro.

#### **1.4 Óxido Nítrico e S-nitrosilação**

O óxido nítrico (NO) é um radical lipofílico ubíquo e altamente difusível. Ele possui propriedades químicas que o tornam um agente sinalizador versátil, envolvido em uma série de processos fisiológicos (BRUCKDORFER, 2005). Em mamíferos, o NO está envolvido em diversos processos patofisiológicos — como respostas imune e inflamatória —, neurotransmissão e homeostase vascular (FANG, 2004).

Nas células, o NO é produzido a partir de L-arginina e oxigênio pelas óxido nítrico sintases (NOS). Há três diferentes isoformas dessas enzimas, com diferentes padrões de expressão, regulação e papéis fisiológicos — essa diversidade ajuda, inclusive, a conferir a especificidade dos sinais transmitidos pelo NO (MARTÍNEZ; ANDRIANTSITOHAINA, 2009). Além disso, o NO pode ser gerado a partir de óxidos de nitrogênio exógenos (oriundos da

alimentação, flora intestinal ou agente infecciosos, por exemplo) ou ainda endógenos (como os produtos de oxidação do próprio NO) (HESS et al., 2005).

O NO é a principal espécie reativa de nitrogênio (ERN) presente nas células e também a principal fonte de outras ERN (MARTÍNEZ; ANDRIANTSITOHAINA, 2009). O termo ERN se refere a vários produtos de nitrogênio como nitroxil (HNO), cátion nitrosônio ( $\text{NO}^+$ ), óxidos de nitrogênio, S-nitrosotióis (RSNOs), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), dentre outros. Nos meios biológicos, as ERN induzem reações que incluem nitrosilação de grupo sulfidril (S-nitrosilação) ou metais e nitração de resíduos de tirosina (MARTÍNEZ; ANDRIANTSITOHAINA, 2009).

Quando o NO se liga a metais, ele pode levar a ativação de enzimas, como é o caso da ativação da enzima guanilato ciclase, uma importante reação do NO com substratos biológicos, fundamental em alguns processos de sinalização celular mediados por NO. Essa enzima é responsável pela conversão de guanosina 5'-trifosfato (GTP) em guanosina 5'-trifosfato cíclico (cGTP) e funciona como um receptor fisiológico para o NO. A guanilato ciclase é ativada pela ligação do NO com o grupo heme presente na enzima, o que ativa a enzima e leva ao estabelecimento de vias de transdução de sinal, principalmente nos sistemas nervoso e cardiovascular (GARTHWAITE, 2010).

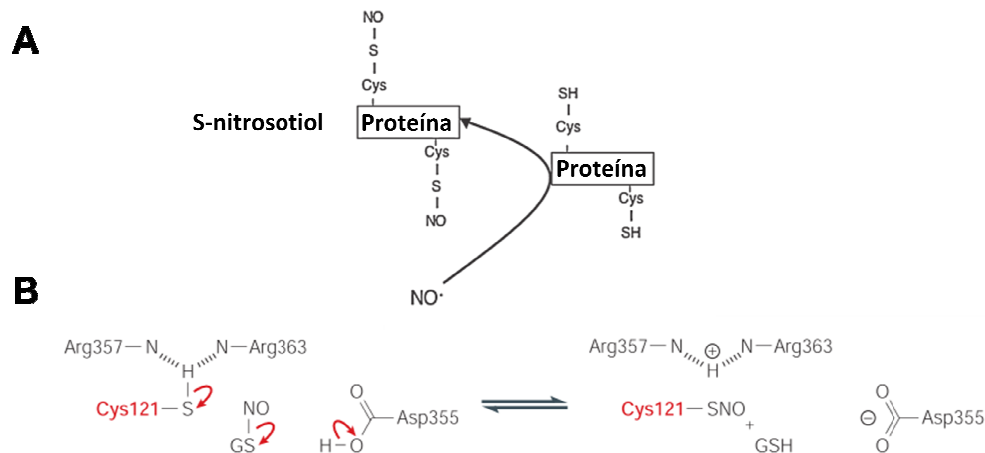
Juntamente com a ativação de guanilato ciclase, a S-nitrosilação é uma das principais reações do NO e seus derivados com substratos biológicos. Ela consiste na adição covalente de um grupo NO ao tiol reativo de resíduos específicos de cisteína em peptídeos e proteínas, para formar um S-nitrosotiol (Figura 5) (MARTÍNEZ; ANDRIANTSITOHAINA, 2009). A S-nitrosilação ocorre pela transferência do NO de um doador S-nitrosotiol para um tiol de uma cisteína aceptora (transnitrosilação) ou via reação de oxidação do NO com o tiol de uma cisteína na presença de um aceptor de elétrons (metal de transição ou  $\text{O}_2$ , por exemplo) (FOSTER; FORRESTER; STAMLER, 2009). A S-nitrosilação é uma modificação pós-traducional que exerce funções específicas de sinalização, finamente reguladas no espaço e no tempo, e, assim como a fosforilação, atua sobre a maior parte das classes de proteínas (HESS et al., 2005).

Várias PTPs são S-nitrosiladas como consequência da ação do NO, resultando, por exemplo, em perda de atividade e/ou proteção contra oxidação irreversível (CASELLI et al., 1994; TAKAKURA et al., 1999; XIAN et al., 2000; CHEN et al., 2008). A proteína humana



PTP1B é S-nitrosilada no resíduo de cisteína catalítico Cys215 e isso protege o sítio ativo da oxidação irreversível e inibe temporariamente a atividade da proteína (CHEN et al., 2008).

Além de ocorrer com frequência nas PTPs, a S-nitrosilação está ligada à atividade microbicida. A S-nitrosilação em proteases de microrganismos está relacionada à atividade antimicrobiana das ERN contra Coxsackievirus, HIV-1, *Leishmania infantum*, *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma cruzi* (STAMLER; LAMAS; FANG, 2001).



**Figura 5.** Esquema da reação de S-nitrosilação. **A.** Esquema geral da S-nitrosilação de uma proteína, gerando um S-nitrosotiol. **B.** Esquema da reação de S-nitrosilação (transnitrosilação) de uma metionina adeniltransferase hepática, mediada por S-nitrosoglutationa (GSNO). Fonte: adaptado de MARTÍNEZ; ANDRIANTSITOHAINA, 2009 e HESS et al., 2005.

O papel do NO e outras ERN na biologia do *M. tuberculosis*, no entanto, ainda não é bem estabelecido. No curso da infecção, o *M. tuberculosis* fica exposto a ERN e também a espécies reativas de oxigênio (ERO) no hospedeiro. Por um lado, há estudos que apontam as ERN como uma das principais ações microbidas do hospedeiro contra o *M. tuberculosis* (CHAN et al., 1992; RICH et al., 1997; ZAHRT; DERETIC, 2002). Por outro lado, há trabalhos que demonstram mecanismos moleculares de resistência do *M. tuberculosis* às ERO e ERN e de regulação celular mediada por essas espécies (ZAHRT; DERETIC, 2002; DARWIN et al., 2003; KUMAR et al., 2007; ATTARIAN et al., 2009). É possível que a exposição do *M. tuberculosis* ao NO desencadeie, inclusive, o estabelecimento da infecção latente (KUMAR et al., 2007).

Os efeitos moleculares do NO sobre esse patógeno ou mesmo sobre suas PTPs, no entanto, ainda são pouco conhecidos. Já foi demonstrado que as ERO reduzem a atividade da

PtpA, enquanto que possuem pouco efeito sobre a PtpB (GRUNDNER; NG; ALBER, 2005; FLYNN et al., 2010). Os efeitos do NO e outras ERN em PtpA e PtpB até hoje não foram investigados.

Tendo em vista a importância da tuberculose e a necessidade de novas terapias para essa doença, torna-se fundamental um melhor entendimento do metabolismo desse patógeno e de sua interação com o hospedeiro. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho é aprofundar os conhecimentos acerca do efeito do NO em PtpA e PtpB de *M. tuberculosis*.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho foi investigar a susceptibilidade de PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* à S-nitrosilação por ação do NO, bem como os efeitos dessa modificação pós-traducional nessas proteínas.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Expressar de maneira heteróloga PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* e purificá-las;
- Avaliar a ocorrência de S-nitrosilação em PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* por ação do NO;
- Se confirmada a S-nitrosilação, determinar o resíduo de cisteína S-nitrosilado por meio de mutação sítio dirigida dos resíduos de cisteína;
- Expressar e purificar as proteínas mutantes e avaliar a ocorrência de S-nitrosilação nas mesmas;
- Determinar a atividade específica de PtpA, PtpB e mutantes na presença e ausência de doador de NO;

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Vetores de expressão

O plasmídeo contendo o gene da PtpA de *M. tuberculosis* (pET28a-Mt\_PtpA) e o plasmídeo contendo o gene da PtpB (pET28a-Mt\_PtpB) foram fornecidos pelo laboratório dirigido pelo Dr. Pedro Alzari (Unité de Biochimie Structurale, Institut Pasteur, Paris, França).

#### 3.2 Preparação de bactérias competentes

O preparo de bactérias competentes tem como finalidade torná-las, através de tratamento químico, capazes de incorporar facilmente fragmentos de DNA. Para tanto, células bacterianas *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  ou BL21(DE3) armazenadas a -80°C foram cultivadas a 37°C em 50 mL de meio Luria Bertani (LB) líquido (1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl, pH 7,5) até a densidade ótica de 0,4 a 600 nm. As células foram então centrifugadas a 6000 x g, por 20 min. O precipitado foi homogeneizado com 0,1M CaCl<sub>2</sub> gelado, mantido por uma hora em gelo e centrifugado novamente a 6000 x g, por 20 min (AUSUBEL et al., 1992). As bactérias foram finalmente homogeneizadas em 5 mL de 0,1 M CaCl<sub>2</sub> contendo 20% de glicerol, mantidas em gelo por 30 min e posteriormente armazenadas a -80°C.

#### 3.3 Transformação de bactérias

Para a transformação das bactérias competentes, as mesmas foram inicialmente incubadas com 50 ng do vetor de expressão de interesse, em gelo, durante 30 min. As células foram, então, mantidas por 90 segundos a 42°C e novamente em gelo por 2 min. Em seguida, foram adicionados 500  $\mu$ L de meio LB às bactérias, que foram mantidas a 37°C por 45 min, plaqueadas em meio LB sólido (1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl, 1,5% Agar, pH 7,5) suplementado com 50  $\mu$ g/mL de canamicina e mantidas a 37°C por mais 15 horas (AUSUBEL et al., 1992). O vetor pET28a+ possui um gene de resistência à canamicina, logo, o uso desse

antibiótico durante o cultivo seleciona apenas as bactérias que incorporaram o vetor de expressão. Como controle, foi realizado o mesmo procedimento com bactérias que não receberam vetor de expressão.

Para a propagação do plasmídeo, foram utilizadas bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  e os plasmídeos foram purificados com o kit *Wizard Plus SV Minipreps* (Promega).

### 3.4 Expressão das proteínas PtpA e PtpB

Os vetores de expressão pET28a-Mt\_PtpA e pET28a-Mt\_PtpB foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* BL21(DE3), conforme protocolo descrito no item acima. O vetor pET28a+ (Novagen) contém o promotor do fago T7, o que permite a expressão do gene de interesse em cepas de bactérias DE3 — cujo genoma possui o gene para a RNA polimerase do fago T7. As colônias selecionadas por resistência ao antibiótico canamicina foram utilizadas para a realização dos pré-inóculos.

Os pré-inóculos foram preparados em 10 mL de meio LB líquido suplementado com 50  $\mu\text{g/mL}$  de canamicina e incubados a 37°C sob agitação (150 rpm). Cada inóculo foi feito a partir de 5 mL do pré-inóculo, em 250 mL de meio LB novo, com as mesmas concentrações de antibiótico descritas, a 37°C.

Para a indução de expressão, quando a densidade ótica do cultivo em 600 nm alcançou 0,6 a 0,8 — equivalente à metade da fase logarítmica de crescimento — as bactérias foram mantidas a 15 °C por 20 min. Em seguida, foi adicionado isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), até uma concentração final de 0,5 mM. O IPTG é um análogo da alolactose. Quando presente, ele induz a expressão da RNA polimerase do fago T7, que se encontra codificada no genoma bacteriano sob controle do *operon lac*. Como consequência, o gene contido no vetor passa a ser transcrito pela bactéria, uma vez que o repressor também se desliga da região operadora do gene fusão. O tempo e a temperatura de indução da expressão protéica foram padronizados anteriormente em nosso laboratório, isto é, 15°C, por 15 horas (PURIFICAÇÃO, 2008).

Após a indução, os cultivos foram centrifugados a 6000 x g, por 30 min, a 4°C e lavados com tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl, 10 mM imidazol, 10% glicerol). Em seguida, as células foram homogeneizadas com tampão de lise suplementado com inibidor de

proteases (PMSF, fluoreto de fenilmetilsulfonila, concentração final de 40µg/mL), rompidas por sonicação em gelo (7 ciclos de 20 segundos, com intervalo de 30 segundos entre cada um, a uma potência de 14W e o homogenato foi centrifugado (12000 x g, por 20 min, a 4°C). A porção solúvel obtida foi utilizada para purificação.

### 3.5 Purificação das proteínas PtpA e PtpB

As proteínas PtpA e PtpB expressas foram purificadas em condições nativas por cromatografia de afinidade em metal imobilizado (IMAC). Os genes da PtpA e da PtpB estão inseridos no vetor pET28a+ de forma que as proteínas expressas possuem uma cauda de histidinas N-terminal, o que permite a purificação através dessa metodologia.

Foram utilizadas colunas HisTrap (*HisTrap HP Kit for purification of histidine tagged proteins*, Amersham Biosciences), carregadas com níquel, conectadas a um cromatógrafo ÄKTA (GE Healthcare). A coluna foi inicialmente equilibrada com o tampão de lise e o sobrenadante obtido após a lise e centrifugação dos cultivos foi adicionado à coluna, à temperatura ambiente. Em seguida, a coluna foi lavada com concentrações crescentes de imidazol, começando com o tampão de lise sem imidazol até uma concentração final de 500 mM de imidazol. O imidazol compete quimicamente com a cauda de histidinas da proteína recombinante e, ao ser aumentada a concentração do imidazol, a proteína é eluída da coluna.

Após a purificação por afinidade, as frações protéicas foram submetidas a diálises para a retirada gradual do imidazol da solução. A diálise (membrana de celulose MW 5.3 kDa) foi feita a 4°C, sob agitação constante e em quatro etapas: 2 horas contra cada novo tampão (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl, 5 mM DTT, 10% glicerol, em uma relação 1:100 de amostra e tampão) decrescendo a concentração de imidazol (150 mM, 75 mM e 35 mM), sendo que o último tampão, não continha imidazol (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 5 mM DTT, 20% glicerol e 5 mM EDTA). Em seguida, as proteínas foram concentradas por ultrafiltração (*Amicon Ultra-15* Millipore, membrana de poro de 10 kDa). Finalmente, as proteínas foram submetidas a mais uma diálise, dessa vez contra o tampão HEN (250 mM Hepes pH 7,7, 1 mM EDTA, 0,1 mM neocuproína) e estocadas a -20°C.

A pureza das frações protéicas foi analisada por SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate* –

*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), em géis de poliacrilamida 16%, sob condições desnaturantes e redutoras, corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* (SCHAGGER; VON JAGOW, 1987).

### **3.6 Quantificação de proteínas**

A quantificação do conteúdo protéico foi realizada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976) com albumina de soro bovino como padrão ou espectrofotometricamente a 280 nm na presença de hidrócloro de guanidina 6M, levando em consideração a absorvidade molar calculada.

### **3.7 Expressão e purificação da proteína PTP1B**

A PTP1B é uma PTP clássica humana amplamente estudada, envolvida na regulação da sinalização por insulina e do crescimento celular. Ela é S-nitrosilada e tem sua atividade enzimática diminuída como consequência da S-nitrosilação (LI; RICHARD WHORTON, 2003; CHEN et al., 2008). Por esses motivos, ela foi utilizada como controle positivo em alguns ensaios de S-nitrosilação de PtpA e PtpB. A PTP1B pura foi fornecida pela aluna de mestrado Priscila Graziela Alves Martins. O plasmídeo para expressão da PTP1B humana (pET19b-Hs\_PTP1B) foi fornecido pelo Dr. Tiago Brandão (Departamento de Química, UFMG). Esse plasmídeo codifica para uma proteína truncada de 37 kDa — otimizada para expressão e purificação — correspondente aos primeiros 321 resíduos de aminoácido da proteína PTP1B (BARFORD et al., 1994). A expressão foi feita em bactérias *E. coli* BL21(DE3) e a purificação foi realizada por cromatografia de troca iônica (BRANDÃO; HENGGE; JOHNSON, 2010).

### **3.8 Ensaio de biotilação para detecção de proteínas S-nitrosiladas**

Com o objetivo de investigar se a PtpA e a PtpB são S-nitrosiladas foram realizados ensaios de biotilação (*biotin switch*) segundo Jaffrey e Snyder (JAFFREY; SNYDER, 2001), com algumas modificações. Essa técnica detecta proteínas S-nitrosiladas através da substituição

do grupo NO ligado ao resíduo de Cys pela biotina, sendo que essa última é posteriormente detectada por *Western blot*.

Para realização desses experimentos, a concentração de cada proteína pura foi ajustada até um máximo de 0,8 mg/mL e as amostras foram tratadas com 1 mM, 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 10  $\mu$ M ou 1  $\mu$ M de S-nitrosoglutationa (GSNO) por 30 min, no escuro, em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 min com 4 volumes de tampão de bloqueio (250 mM Hepes pH 7,7, 1 mM EDTA, 0,1 mM neocuproína, 2,5% SDS, 27 mM metil-metano-tiosulfonato) a 50°C, com agitação freqüente. O metil-metano-tiosulfonato (MMTS) é utilizado para bloquear os resíduos de cisteína que não foram nitrosilados pelo óxido nítrico.

O MMTS residual foi removido por precipitação com 10 volumes de acetona gelada (-20°C) e as proteínas foram ressuspensas em tampão HENS (250 mM Hepes pH 7,7, 1 mM EDTA, 0,1 mM neocuproína, 1 % SDS). As S-nitrosilações foram reduzidas com 1 mM de ascorbato de sódio por 10 min, em temperatura ambiente. Em seguida, as cisteínas livres foram biotinizadas com 2 mM de biotina-HPDP (*N*-(6-(Biotinamido)hexil)-3'-(2'-piridilditio)-propionamida) diluída em DMSO (*EZ-Link Biotin-HPDP*, Thermo Scientific) por 1h, em temperatura ambiente. O ascorbato reduz os grupos S-nitrosotiol, deixando os resíduos de cisteína, antes nitrosilados, livres para a ligação com a biotina-HPDP.

Como controles negativos, algumas amostras foram tratadas com 1mM de glutathiona reduzida (GSH) ao invés de GSNO ou com 1 mM de GSNO seguido de tratamento com 10 mM de DTT. Ainda outro controle negativo foi feito, tratando-se com DMSO, ao invés de biotina, um grupo de amostras previamente nitrosiladas com GSNO. Além disso, como controle de especificidade, em um grupo de amostras não foi adicionado MMTS.

Para detecção de proteínas biotinizadas por *Western blot*, amostras do ensaio de biotina foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF), as membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado (5%) e incubadas com anticorpo anti-biotina de camundongo (1:10000) (Sigma) por 1 h, em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas em temperatura ambiente por 1 h com um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (1: 30000). Para detecção dos sinais foi utilizado o kit *Amersham ECL Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare) e filmes *Amersham Hyperfilm ECL* (GE Healthcare). Após a exposição, os filmes foram revelados



utilizando-se o processador automatizado de filmes SRX-101A (Konica Minolta Medical & Graphic) do Laboratório de Protozoologia (UFSC, Florianópolis), ou as membranas foram analisadas diretamente em scanner laser FLA9000 (Fuji).

### 3.9 Mutação sítio-dirigida

Com o objetivo de investigar o sítio de S-nitrosilação em PtpA, os códons correspondentes a resíduos de cisteína dessa proteína foram mutados para alanina de forma a criar as seguintes substituições de aminoácidos: C11A, C16A ou C53A. O kit *QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) foi utilizado para modificar os códons selecionados no plasmídeo pET28a-Mt\_PtpA.

Os seguintes oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados e utilizados para gerar os vetores mutantes: (i) para a mutação Cys11 para Ala, 5'- GTC ACA TTC GTT **GCG** ACG GGC -3'; (ii) para a mutação Cys16 para Ala, 5'- ACG GGC AAC ATC **GCA** CGG TCG CCA ATG -3'; (iii) para a mutação Cys53 para Ala, 5'- CAT GTA GGC AGT **GCA** GCA GAC GAG CGG GCG -3' (os códons destacados correspondem ao nucleotídeos mutados). A mistura de reação foi feita conforme instrução do fabricante e o programa do termociclador consistiu em um passo de desnaturação inicial a 95°C por 1 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 65°C por 12 min.

Os produtos de reação foram incubados com 10U/μL de DpnI por 1 h, a 37 °C para digestão do DNA molde metilado e, em seguida, foram utilizados para transformar células *E. coli* XL10-Gold ultracompetentes. Os plasmídeos gerados foram posteriormente purificados com o kit *Wizard Plus SV Minipreps* (Promega). Os mesmos foram visualizados, após eletroforese, em géis de agarose 0,8% corados com brometo de etídio.

As mutações foram confirmadas por sequenciamento de DNA e as proteínas mutantes foram expressas e purificadas da mesma forma que a PtpA *wild type* (PtpA).

### 3.10 Cálculo de atividade específica e ensaios de atividade enzimática na presença de GSNO

A metodologia para os testes de atividade enzimática foi adaptada da previamente descrita para PtpA por Koul e colaboradores (2000). As atividades de PtpA, PtpA\_C11A, PtpA\_C16A, PtpA\_C53A, PtpB e PTP1B foram avaliadas a 37 °C em espectrofotômetro leitor de microplaca (*Infinite 200 Pro*, Tecan).

As reações continham 20 mM imidazol pH 7,0, 50 nM de enzima e 20 mM *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP) como substrato. Para não haver interferência no tratamento com GSNO, as reações foram realizadas na ausência de qualquer agente redutor. A quantidade de *p*-nitrofenol (*p*NP) produzida foi medida a 410 nm, durante 10 min (com leituras a cada 1 min). O *p*NPP é um substrato genérico para fosfatases, que permite detecção espectrofotométrica de seu produto. A atividade específica foi calculada utilizando-se a absorvidade molar de 2249.6 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (determinada experimentalmente para as condições descritas acima). Controles negativos foram realizados na ausência de enzima para monitorar a hidrólise espontânea de *p*NPP.

Para os ensaios de nitrosilação, utilizou-se GSNO como doador de NO e GSH como controle. As enzimas foram pré-incubadas com 1mM GSNO ou GSH por 30 min à temperatura ambiente, no escuro, e depois adicionadas à reação. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

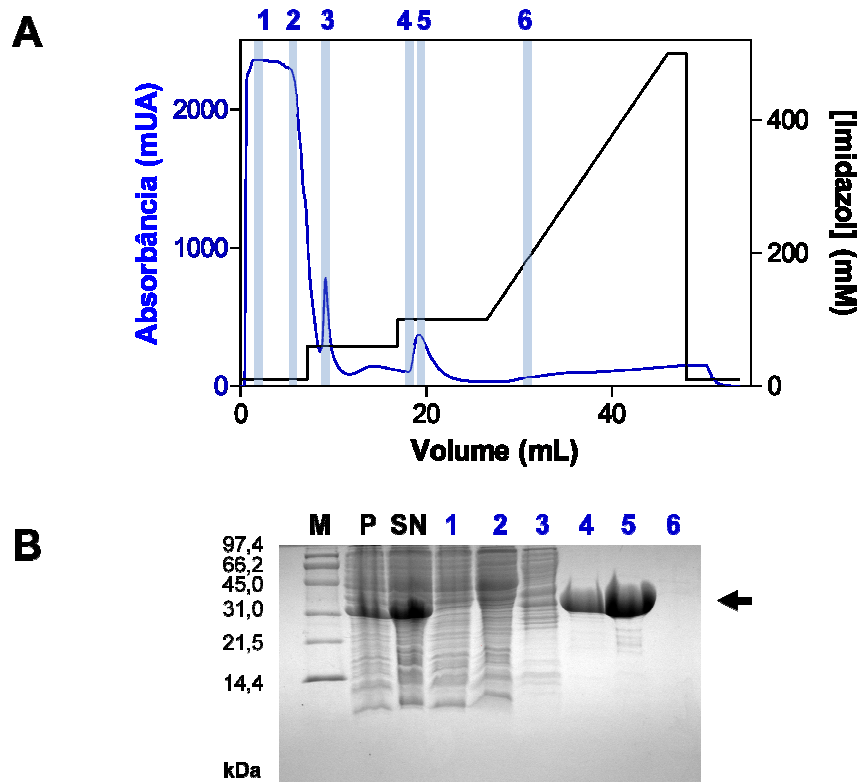
### 3.11 Modelo tridimensional de PtpA S-nitrosilada em Cys53

A representação estrutural da PtpA nitrosilada em Cys53 foi construída utilizando-se a estrutura cristalina de PtpA de *M. tuberculosis* (PDB 1U2P) em colaboração com o Dr. Guilherme Razzera. O grupo NO foi introduzido a partir das coordenadas atômicas do S-NO do resíduo Cys215 S-nitrosilado da estrutura da proteína PTP1B humana (PDB 3EUO). A acessibilidade do solvente foi obtida com o uso do programa *Swiss-pdbviewer* 4.0.1 ([www.expasy.org/spdbv/](http://www.expasy.org/spdbv/)) e as figuras foram preparadas com o programa *PyMOL* (2003, DeLano Scientific LLC).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Expressão e purificação de PtpA e PtpB

As proteínas PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* foram expressas em *E. coli* BL21(DE3) a partir dos vetores de expressão pET28a-Mt\_PtpA e pET28a-Mt\_PtpB, respectivamente.

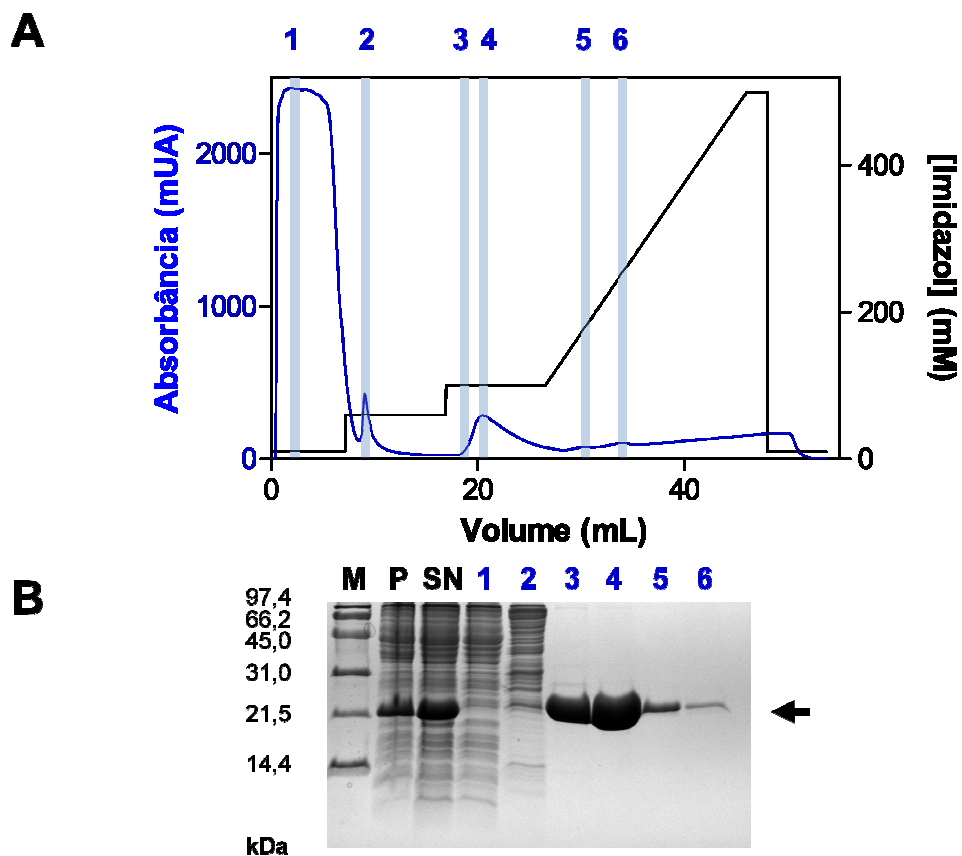


**Figura 6.** Purificação da PtpB recombinante por IMAC em cromatógrafo ÄKTA. **A.** Gráfico da eluição das proteínas com concentrações crescentes de imidazol. A fração solúvel do lisado bacteriano (contendo a PtpB recombinante com cauda de histidinas N-terminal) foi aplicada à coluna HisTrap e a coluna foi lavada com concentrações crescentes de imidazol. Em azul, no eixo das abscissas esquerdo, está representada a absorvância a 280 nm de cada volume de eluição. Em preto, no eixo das abscissas direito, está representada a concentração de imidazol em cada volume de eluição. As faixas azuis enumeradas são as frações eluídas, coletadas e analisadas no SDS-PAGE mostrado em B. **B.** SDS-PAGE da purificação da PtpB. As frações bacterianas e as frações coletadas (1-6) foram analisadas em SDS-PAGE 16%. A seta indica a banda correspondente à PtpB (32,3 kDa). M, marcador de massa molecular; P, fração insolúvel do lisado bacteriano; SN, fração solúvel do lisado bacteriano.

A PtpB com cauda de histidinas (massa teórica de 32,3 kDa) contida na fração solúvel bacteriana foi purificada por IMAC em coluna HisTrap acoplada a um cromatógrafo ÄKTA

(Figura 6). A PtpB recombinante foi eluída em 100 mM de imidazol (Figura 6, linhas 4 e 5). As frações eluídas correspondentes à PtpB recombinante foram coletadas, reunidas e submetidas a diálise em tampão redutor para retirada do imidazol.

A PtpA contida na fração solúvel bacteriana também foi purificada por IMAC. A proteína recombinante com cauda de histidinas na porção N-terminal (massa teórica de 20 kDa) foi eluída com concentração crescente de 100 mM a 250 mM de imidazol (Figura 7, linhas 3, 4, 5 e 6). As frações eluídas da coluna HisTrap correspondentes à PtpA recombinante foram coletadas, reunidas e submetidas a diálise em tampão redutor para remoção do imidazol.



**Figura 7.** Purificação da PtpA recombinante por IMAC em cromatógrafo ÄKTA. **A.** Gráfico da eluição das proteínas com concentrações crescentes de imidazol. A fração solúvel do lisado bacteriano (contendo a PtpA recombinante com cauda de histidinas N-terminal) foi aplicada à coluna HisTrap e a coluna foi lavada com concentrações crescentes de imidazol. Em azul, no eixo das abscissas esquerdo, está representada a absorbância a 280 nm de cada volume de eluição. Em preto, no eixo das abscissas direito, está representada a concentração de imidazol em cada volume de eluição. As faixas azuis enumeradas são as frações eluídas, coletadas e analisadas no SDS-PAGE mostrado em B. **B.** SDS-PAGE da purificação da PtpA. As frações bacterianas e as frações coletadas (1-6) foram analisadas em SDS-PAGE 16%. A seta indica a banda correspondente à PtpB (32,3 kDa). M, marcador de massa molecular; P, fração insolúvel do lisado bacteriano; SN, fração solúvel do lisado bacteriano.

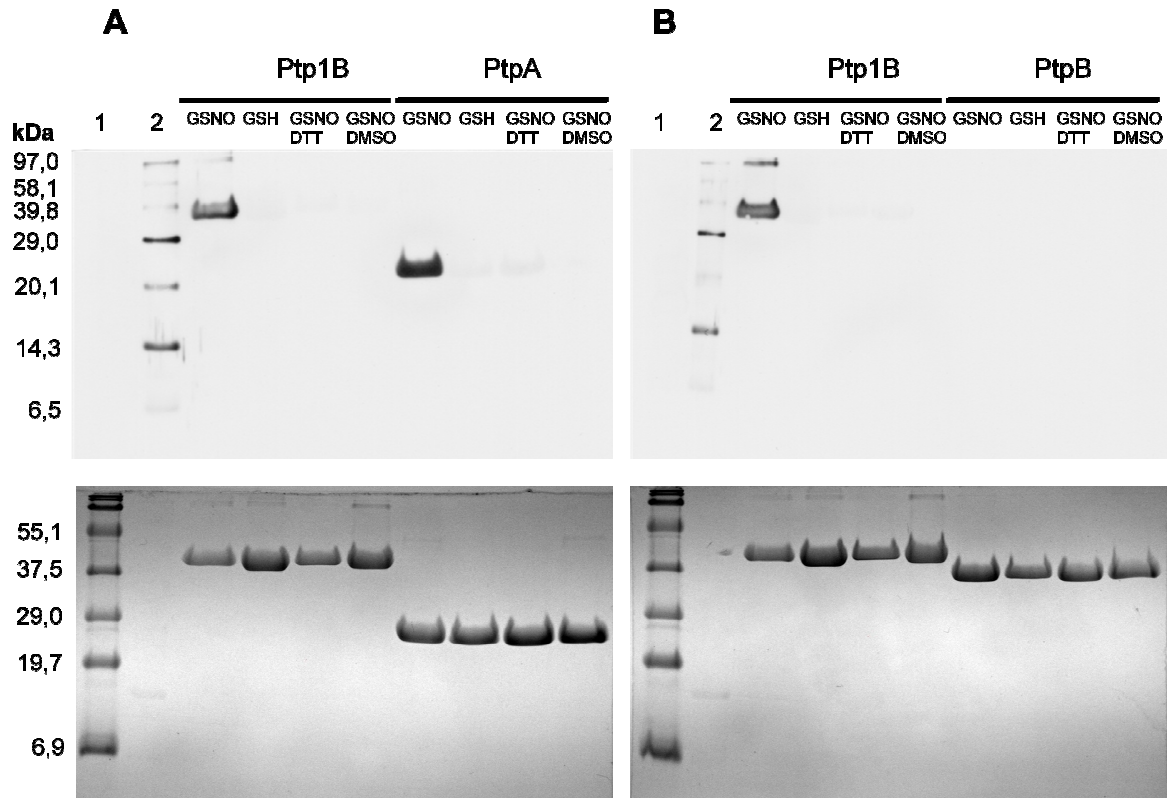
Após as diálises para retirada do imidazol, a PtpA e a PtpB foram mais uma vez dialisadas, desta vez contra tampão HEN, concentradas e quantificadas para realização dos demais experimentos. O rendimento final de cada purificação foi de aproximadamente 9 mg de PtpB por litro de cultivo e cerca de 13 mg de PtpA por litro de cultivo.

#### **4.2 Ensaio de biotilação para detecção de proteínas S-nitrosiladas**

Com o objetivo de avaliar se a PtpA e a PtpB sofrem S-nitrosilação por ação do NO, as proteínas puras em tampão HEN foram submetidas a ensaios de biotilação para detecção de proteínas S-nitrosiladas (figura 8). Esse ensaio detecta se uma proteína é S-nitrosilada por meio da substituição da S-nitrosilação por uma biotilação. Nesses ensaios, as proteínas são tratadas com um doador de NO, aquelas que forem S-nitrosiladas incorporam uma molécula de biotina e, finalmente, essa última é detectada por *Western blot*.

Quando a PtpA foi tratada com 1 mM do doador de NO GSNO, detectou-se uma banda no *Western blot* correspondente a essa proteína biotilada, com cerca de 20 kDa (Figura 8A). Por outro lado, quando a PtpB foi tratada com o doador de NO, não se observou nenhuma banda (Figura 8B). Em ambos os experimentos foi utilizada a proteína PTP1B como controle positivo. O mesmo padrão observado para a PtpA foi observado para a PTP1B recombinante (Figura 8A e 8B).

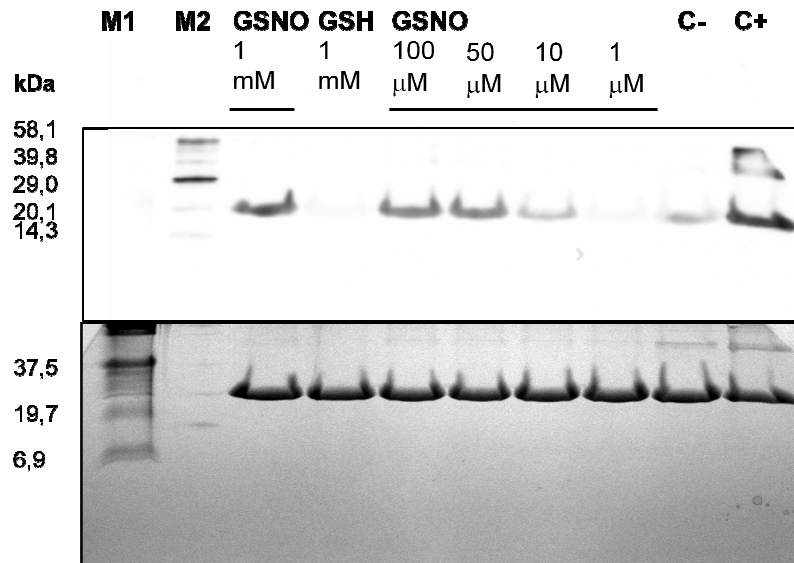
Nos controles negativos realizados (quando as proteínas foram tratadas com 1 mM de GSH em lugar do GSNO, ou 1 mM de GSNO seguido do agente redutor DTT, ou quando foi utilizado somente DMSO sem biotina) nenhuma banda foi detectada. Em todos os casos, a proteína estava presente em quantidades semelhantes, conforme mostra o SDS-PAGE (Figura 8, abaixo), o que confirma que as bandas detectadas pelo *Western blot* no tratamento com GSNO são devidas à presença de NO. Esses resultados demonstram que a PtpA é S-nitrosilada na presença de GSNO, enquanto que a PtpB não sofre S-nitrosilação.



**Figura 8.** Ensaio de biotinylation de *PtpA* e *PtpB* para detecção de proteínas *S*-nitrosiladas. **A** Ensaio de biotinylation da *PtpA* com a *PTP1B* como controle. A *PtpA* e a *PTP1B* em tampão HEN foram tratadas com 1 mM de GSNO, 1 mM de GSH ou 1 mM de GSNO seguido de 10 mM de DTT, conforme indicado. Em seguida, as amostras foram incubadas com MMTS para bloqueio dos resíduos de Cys livre, reduzidas com ascorbato de sódio e posteriormente submetidas à biotinylation (ou, quando indicado, tratadas com DMSO sem biotina). Acima está mostrada a revelação do *Western blot* com anticorpo anti-biotina e abaixo está o SDS-PAGE das mesmas amostras. **B** Ensaio de biotinylation da *PtpB* com a *PTP1B* como controle. As amostras de *PTP1B* e *PtpB* foram tratadas da mesma forma que em **A**. Acima está mostrada a revelação do *Western blot* com anticorpo anti-biotina e abaixo está o SDS-PAGE das mesmas amostras. 1, Marcador de massa molecular pré-corado; 2, Marcador de massa molecular biotinylationado.

A concentração utilizada de GSNO (1 mM) é elevada em termos de níveis de NO fisiológicos (RICH et al., 1997). Portanto, foram realizados ensaios de biotinylation de *PtpA* com concentrações menores de GSNO (Figura 9). Quando a proteína foi tratada com 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M e 1 mM de GSNO, foram observadas bandas de cerca de 20 kDa correspondentes à *PtpA* biotinylationada. Na amostra de *PtpA* tratada com 10  $\mu$ M de GSNO, por outro lado, detectou-se uma banda fraca na região de 20 kDa. No entanto, essa banda possui intensidade de sinal semelhante à banda observada no controle negativo tratado com DMSO sem biotina e, logo, não pode ser considerada como sinal de biotinylation. No tratamento com 1  $\mu$ M de GSNO não foi observado

nenhum sinal de biotinição, assim como no controle com 1 mM de GSH. O controle no qual as proteínas não são bloqueadas com MMTS, conforme esperado, foi positivo. Em conjunto, esses dados demonstram que a PtpA é S-nitrosilada na faixa de concentração de 50  $\mu$ M a 1 mM de GSNO.



**Figura 9.** Ensaio de biotinição da PtpA com diferentes concentrações de GSNO. A PtpA recombinante pura em tampão HEN foi tratada com 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM de GSNO ou 1 mM de GSH, conforme indicado. Em seguida, as amostras foram incubadas com MMTS para bloqueio dos resíduos de Cys livres, reduzidas com ascorbato de sódio e posteriormente submetidas à biotinição. Foram realizados ainda um controle positivo com a PtpA na ausência de MMTS (C+) e um controle negativo (C-) tratado com DMSO sem biotina. Acima está mostrada a revelação do *Western blot* com anticorpo anti-biotina e abaixo está o SDS-PAGE das mesmas amostras. M1, Marcador de massa molecular pré-corado; M2, Marcador de massa molecular biotinilado.

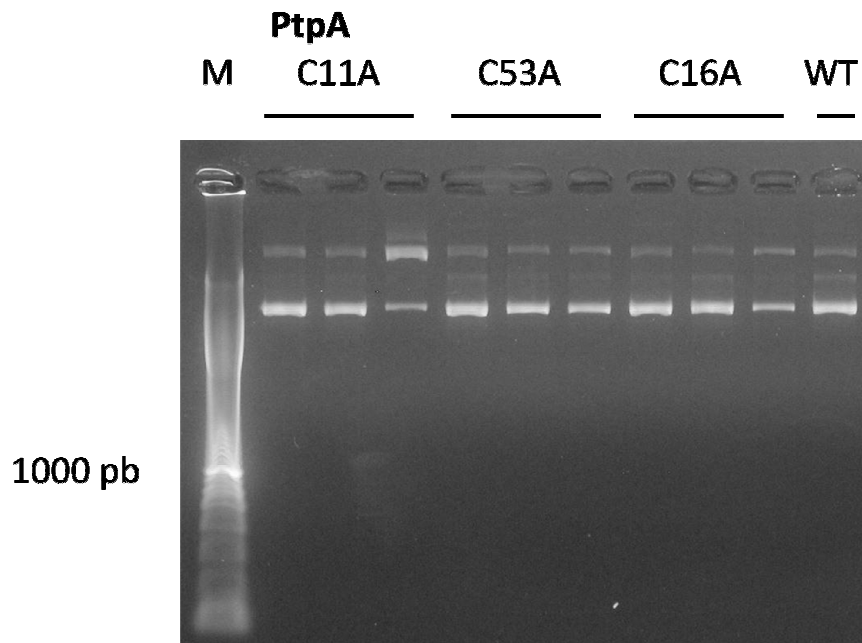
#### 4.3 Construção dos plasmídeos mutantes PtpA\_C11A, PtpA\_C16A, PtpA\_C53A

Uma vez confirmada a S-nitrosilação da PtpA, a seqüência primária da proteína foi analisada e detectaram-se três resíduos de cisteína (Figura 10). Para investigar em qual deles ocorre a S-nitrosilação, foram construídos plasmídeos mutados para cada um desses três resíduos no gene que codifica a PtpA: pET28a-Mt\_PtpA\_C11A, pET28a-Mt\_PtpA\_C16A e pET28a-Mt\_PtpA\_C53A.

10                    20                    30                    40                    50                    60  
 MSDPLHVTFFV **CTGNIC**RSFPM AEKMFAQQLR HRGLGDAVRV TSAGTGNWHV **GSC**ADERAAG  
 70                    80                    90                    100                    110                    120  
 VLRAHGYPFD HRAAQVGTEH LAADLLVALD RNHARLLRQL GVEAARVRML RSFDPRSGTH  
 130                    140                    150                    160  
 ALDVEDPYYG DHSDFEEVFA VIESALPGLH DWVDERLARN GPS

**Figura 10.** Seqüência primária da proteína PtpA de *M. tuberculosis*. As três cisteínas (Cys11, Cys16 e Cys53) estão destacadas em vermelho e o número dos resíduos de aminoácidos está indicado. Número de acesso do NCBI: NP\_216750.1

Os plasmídeos mutados foram construídos através de mutação sítio dirigida, com o uso do kit *QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene), e transformados em bactérias *E. coli* XL10-Gold. As colônias positivas foram cultivadas e foi realizada a extração do plasmídeo com kit comercial (Figura 11). Foram obtidos plasmídeos do mesmo tamanho que o vetor pET28a-Mt\_PtpA (aproximadamente 5,8 kb). As seqüências dos genes mutados foram analisadas por seqüenciamento e as mutações foram confirmadas.



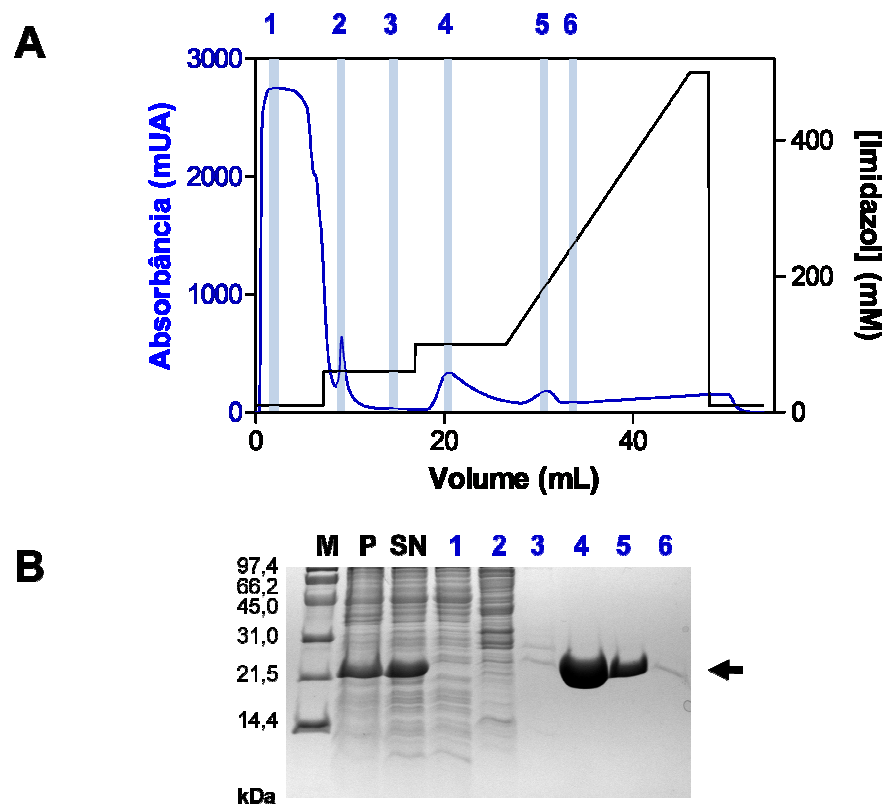
**Figura 11.** Eletroforese em gel de agarose da extração dos plasmídeos mutados após propagação em bactérias XL10-Gold. Após obtenção dos plasmídeos mutados por meio de kit comercial, os mesmos foram propagados e visualizados em eletroforese em gel de agarose 0,8%. M, marcador de massa molecular.



#### 4.4 Expressão e purificação das proteínas mutantes PtpA\_C11A, PtpA\_C16A, PtpA\_C53A

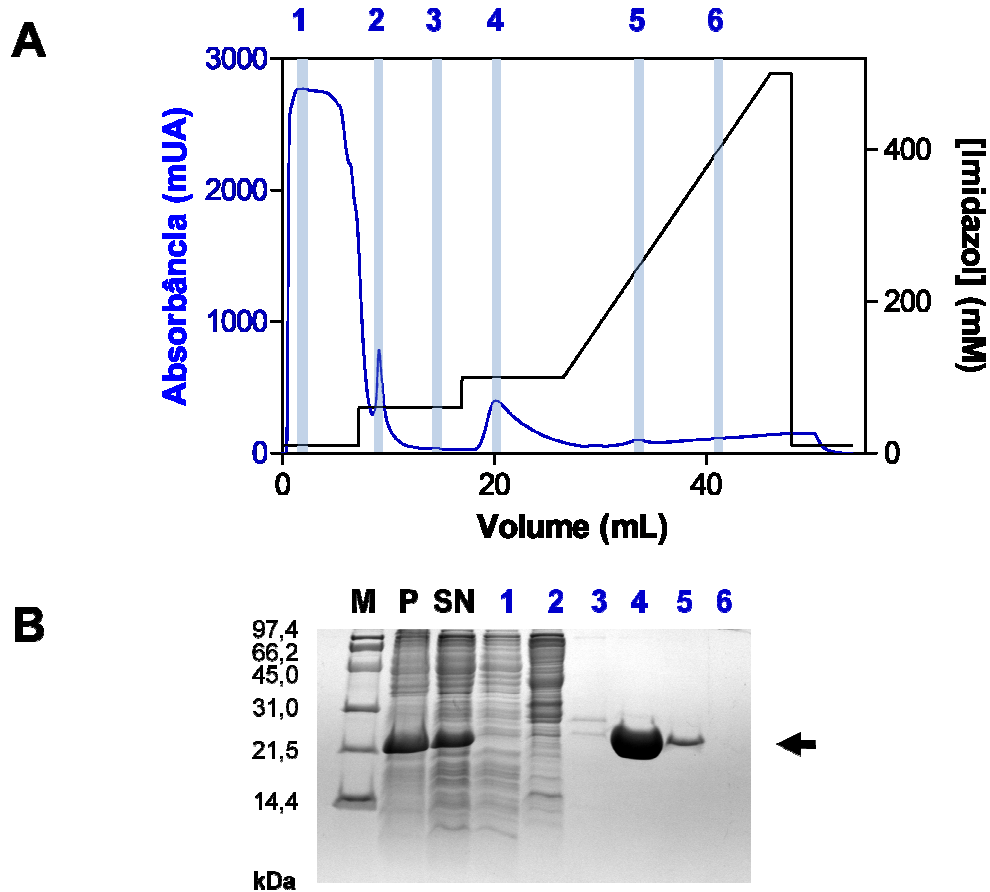
Os vetores pET28a-Mt\_PtpA\_C11A, pET28a-Mt\_PtpA\_C16A e pET28a-Mt\_PtpA\_C53A obtidos foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* BL21(DE3) e as proteínas mutadas foram expressas e purificadas da mesma forma que a PtpA.

A PtpA\_C11A foi eluída com concentração crescente de 100 a 200 mM de imidazol (Figura 12) e o rendimento da purificação foi de aproximadamente 13 mg de proteína por litro de cultivo.



**Figura 12.** Purificação da PtpA\_C11A recombinante por IMAC em cromatógrafo ÄKTA. **A.** Gráfico da eluição das proteínas com concentrações crescentes de imidazol. A fração solúvel do lisado bacteriano (contendo a PtpA\_C11A recombinante com cauda de histidinas N-terminal) foi aplicada à coluna HisTrap e a coluna foi lavada com concentrações crescentes de imidazol. Em azul, no eixo das abscissas esquerdo, está representada a absorvância a 280 nm de cada volume de eluição. Em preto, no eixo das abscissas direito, está representada a concentração de imidazol em cada volume de eluição. As faixas azuis enumeradas são as frações eluídas, coletadas e analisadas no SDS-PAGE mostrado em B. **B.** SDS-PAGE da purificação da PtpA\_C11A. As frações bacterianas e as frações coletadas (1-6) foram analisadas em SDS-PAGE 16%. A seta indica a banda correspondente à PtpA\_C11A (32,3 kDa). M, marcador de massa molecular; P, fração insolúvel do lisado bacteriano; SN, fração solúvel do lisado bacteriano.

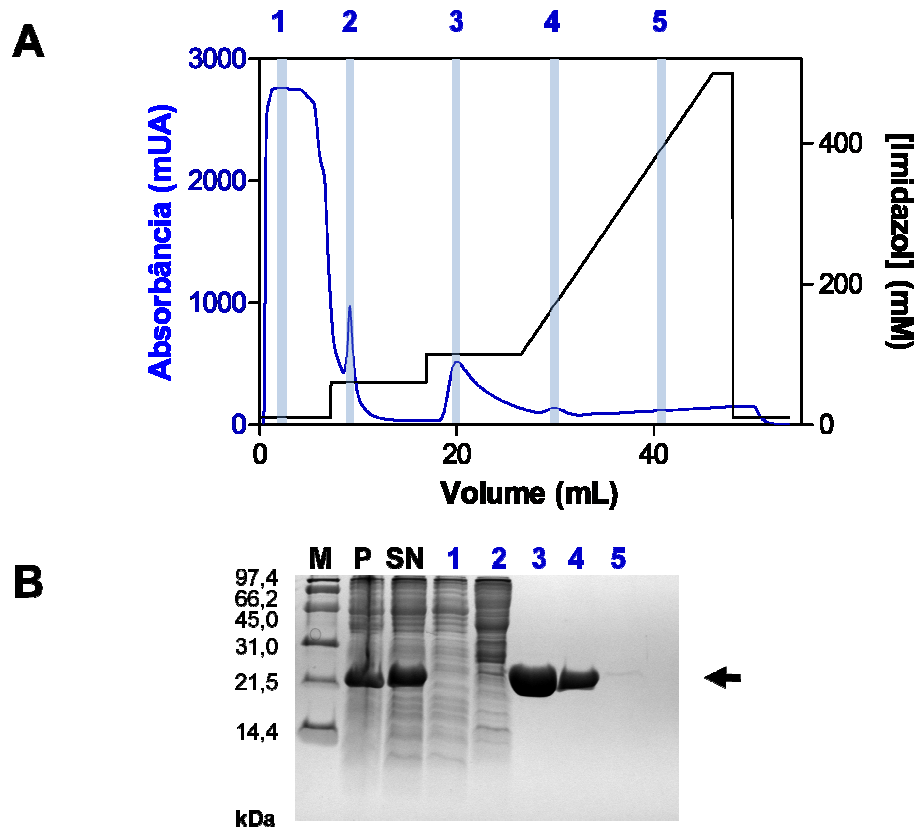
A PtpA\_C16A foi eluída com concentração crescente de 100 a 200 mM de imidazol (Figura 13) e o rendimento final da purificação foi de cerca de 14 mg de proteína por litro de cultivo.



**Figura 13.** Purificação da PtpA\_C16A recombinante por IMAC em cromatógrafo ÄKTA. **A.** Gráfico da eluição das proteínas com concentrações crescentes de imidazol. A fração solúvel do lisado bacteriano (contendo a PtpA\_C16A recombinante com cauda de histidinas N-terminal) foi aplicada à coluna HisTrap e a coluna foi lavada com concentrações crescentes de imidazol. Em azul, no eixo das abscissas esquerdo, está representada a absorbância a 280 nm de cada volume de eluição. Em preto, no eixo das abscissas direito, está representada a concentração de imidazol em cada volume de eluição. As faixas azuis enumeradas são as frações eluídas, coletadas e analisadas no SDS-PAGE mostrado em B. **B.** SDS-PAGE da purificação da PtpA\_C16A. As frações bacterianas e as frações coletadas (1-6) foram analisadas em SDS-PAGE 16%. A seta indica a banda correspondente à PtpA\_C16A (32,3 kDa). M, marcador de massa molecular; P, fração insolúvel do lisado bacteriano; SN, fração solúvel do lisado bacteriano.

Da mesma maneira que as outras proteínas, a PtpA\_C53A foi eluída com concentração crescente de 100 a 250 mM imidazol (Figura 14) e o rendimento final da purificação foi de

aproximadamente 21 mg de proteína por litro de cultivo.



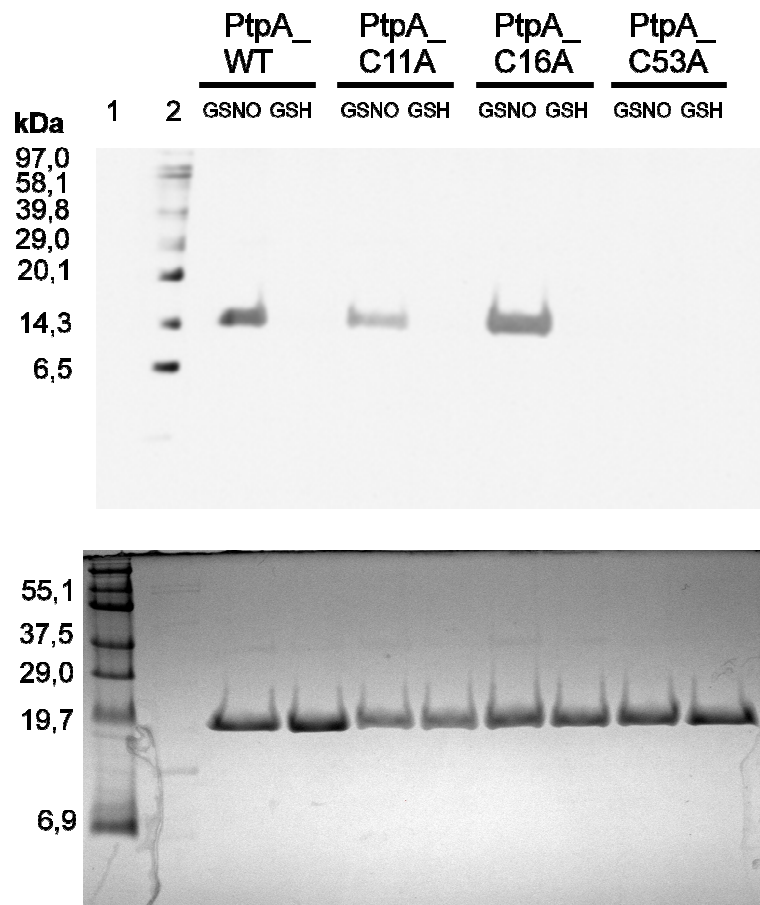
**Figura 14.** Purificação da *PtpA\_C53A* recombinante por IMAC em cromatógrafo ÄKTA. **A.** Gráfico da eluição das proteínas com concentrações crescentes de imidazol. A fração solúvel do lisado bacteriano (contendo a *PtpA\_C53A* recombinante com cauda de histidinas N-terminal) foi aplicada à coluna HisTrap e a coluna foi lavada com concentrações crescentes de imidazol. Em azul, no eixo das abscissas esquerdo, está representada a absorbância a 280 nm de cada volume de eluição. Em preto, no eixo das abscissas direito, está representada a concentração de imidazol em cada volume de eluição. As faixas azuis enumeradas são as frações eluídas, coletadas e analisadas no SDS-PAGE mostrado em B. **B.** SDS-PAGE da purificação da *PtpA\_C53A*. As frações bacterianas e as frações coletadas (1-6) foram analisadas em SDS-PAGE 16%. A seta indica a banda correspondente à PtpB (32,3 kDa). M, marcador de massa molecular; P, fração insolúvel do lisado bacteriano; SN, fração solúvel do lisado bacteriano.

#### 4.5 Ensaios de biotilação das proteínas mutantes *PtpA\_C11A*, *PtpA\_C16A*, *PtpA\_C53A*

As proteínas mutantes purificadas, após diálise contra tampão HEN, foram submetidas a ensaios de biotilação para identificar qual dos resíduos de Cys da *PtpA* é susceptível à S-nitrosilação (Figura 15). Quando a proteína mutante *PtpA\_C11A* foi tratada com 1 mM de

GSNO, uma banda do tamanho da PtpA (20 kDa) é observada. Da mesma forma, quando a PtpA\_C16A é tratada com a mesma quantidade do doador de NO, a mesma banda é detectada. Por outro lado, quando a PtpA\_C53A é tratada com GSNO, nenhum sinal de biotinição é observado no *Western blot*, indicando que a S-nitrosilação ocorre no resíduo Cys53.

Como controle, foi utilizada a PtpA tratada com 1 mM de GSNO ou 1 mM de GSH. Para todas as proteínas testadas, não foi detectada nenhuma banda quando as mesmas foram tratadas com 1 mM de GSH, o que indica que o efeito observado é devido à presença do NO. Esse ensaio também foi realizado utilizando-se 100  $\mu$ M de GSNO como doador de NO e o resultado obtido foi o mesmo.



**Figura 15.** Ensaio de biotinição de PtpA\_C11A, PtpA\_C16A e PtpA\_C53A, com a PtpA como controle. As proteínas PtpA, PtpA\_C11A, PtpA\_C16A e PtpA\_C53A puras em tampão HEN foram tratadas com 1 mM de GSNO ou 1 mM de GSH, conforme indicado. As amostras foram posteriormente incubadas com MMTS para bloqueio dos resíduos de Cys livre, reduzidas com ascorbato de sódio e posteriormente submetidas à biotinição. Acima está mostrada a revelação do *Western blot* com anticorpo anti-biotina e abaixo está o SDS-PAGE das mesmas amostras. 1, Marcador de massa molecular pré-corado; 2, Marcador de massa molecular biotinilado.

#### 4.6 Ensaios de atividade enzimática de PtpA, PtpA\_C11A, PtpA\_C16A, PtpA\_C53A e PtpB na ausência e presença de GSNO

Como os ensaios de biotilação demonstraram que a PtpA é S-nitrosilada enquanto que a PtpB não sofre S-nitrosilação, investigou-se, em seguida, o efeito do NO na atividade da PtpA e suas mutantes. Para tanto, inicialmente foram determinadas as atividades específicas de cada proteína utilizando como substrato *p*NPP (Tabela 1).

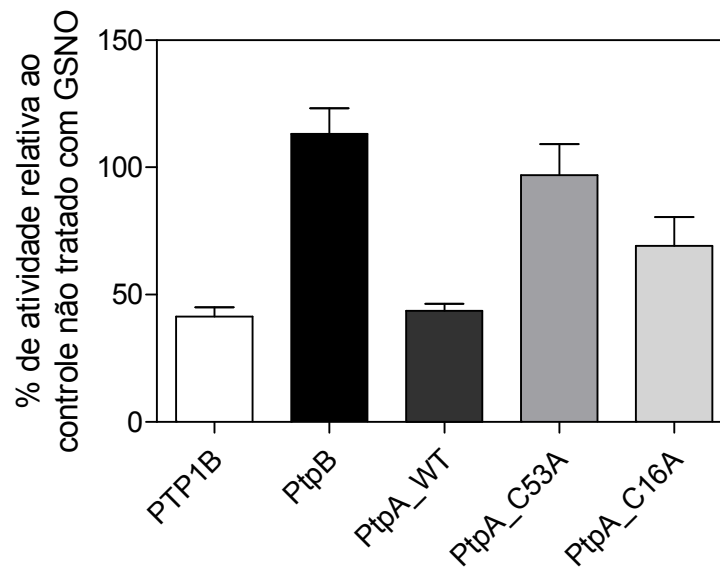
A atividade específica da PtpA foi de  $2,03 \pm 0,45 \mu\text{mol } p\text{NP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . A proteína mutante sem o resíduo de Cys catalítico, PtpA\_C11A, não demonstrou atividade alguma. A PtpA\_C16A apresentou redução da atividade enzimática, conservando apenas 21,41 ( $\pm 4,76$ ) % da atividade da PtpA. Por outro lado, a mutação C53A não afetou significativamente a atividade da enzima. A mutante PtpA\_C53A exibiu uma atividade específica de  $2,08 (\pm 0,18) \mu\text{mol } p\text{NP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . A atividade específica da PtpB também foi avaliada e foi de  $1,26 \pm 0,17 \mu\text{mol } p\text{NP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ .

**Tabela 1. Atividade específica de PtpB, PtpA e mutantes**

Proteína	Atividade específica ( $\mu\text{mol } p\text{NP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )	% da atividade de PtpA <sup>1</sup>
PtpB	1,26 ( $\pm 0,17$ )	—
PtpA	2,03 ( $\pm 0,45$ )	—
PtpA_C53A	2,08 ( $\pm 0,18$ )	96,26 ( $\pm 6,53$ )
PtpA_C16A	0,39 ( $\pm 0,12$ )	21,41 ( $\pm 4,76$ )

<sup>1</sup> Esse valor corresponde à média das porcentagens da atividade enzimática (de cada uma das triplicatas) em relação à atividade de PtpA (em cada triplicata correspondente)

Em seguida, o efeito da S-nitrosilação na atividade catalítica das proteínas foi investigado através de ensaios enzimáticos na presença de GSNO. Para tanto, a atividade específica de PtpB, PtpA, PtpA\_C11A, PtpA\_C16A, PtpA\_C53A foi avaliada na presença e ausência de 1 mM de GSNO, utilizando-se a PTP1B como controle. Considerando que o controle não tratado possuía atividade máxima, a atividade relativa de cada proteína tratada com o doador de NO foi calculada (Figura 16).



**Figura 16.** Influência do NO na atividade de PtpB, PtpA, PtpA\_C16A, PtpA\_C53A com PTP1B como controle. As enzimas foram tratadas com 1 mM de GSNO por 30 min, no escuro, antes do início da reação. Um controle não tratado foi realizado para cada enzima. O eixo das ordenadas mostra a porcentagem da atividade específica das proteínas tratadas com GSNO relativamente a das respectivas amostras não tratadas. Cada reação foi realizada em triplicata, a 37°C, em tampão imidazol 20 mM pH 7,0, com *p*-nitrofenilfosfato como substrato. A atividade específica foi calculada com base no coeficiente de absorvidade molar do *p*-nitrofenol calculado para essas condições ( $\epsilon = 2249.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

A PtpA conservou apenas cerca de 44% da atividade quando a proteína foi tratada com 1 mM de GSNO, em comparação a PtpA não tratada. Conforme esperado segundo os resultados do ensaio de biotinylação, o doador de NO teve pouco efeito na atividade da PtpB. A PTP1B foi utilizada como controle positivo e manteve aproximadamente 41% de atividade quando comparada à amostra não tratada. Em relação ao efeito do NO sobre a atividade das mutantes, enquanto a PtpA conservou 44% da sua atividade quando tratada com o doador de NO, a PtpA\_C53A manteve quase 100% de atividade e a PtpA\_C16A manteve cerca de 75% da atividade.

Esses dados sugerem que a PtpA é inibida na presença de GSNO e corroboram os resultados obtidos nos ensaios de biotinylação. Além disso, esses resultados estão de acordo com o fato de que a nitrosilação da PtpA ocorre no resíduo Cys53. Em conjunto, esses dados sugerem que a atividade da PtpA é reduzida como consequência da S-nitrosilação de Cys53.

## 5 DISCUSSÃO

Apesar do *M. tuberculosis* estar exposto a ERN durante a infecção, o efeito molecular do NO nesse patógeno ainda não é bem estabelecido. O *M. tuberculosis* possuiu algumas estruturas celulares associadas à resposta desse patógeno ao NO, como o proteassomo (DARWIN et al., 2003), o sistema tiorredoxina (ATTARIAN et al., 2009) e a histidina quinase DosS (KUMAR et al., 2007). No entanto, a compreensão integral do processo de resposta da micobactéria ao NO ainda é limitada. A S-nitrosilação é uma das principais reações do NO e de outras ERN com moléculas biológicas e possui funções importantes na resposta à infecção e na sinalização celular (STAMLER; LAMAS; FANG, 2001; HESS et al., 2005). Nesse contexto, esse trabalho determinou a susceptibilidade da PtpA, um importante fator de virulência de *M. tuberculosis*, à S-nitrosilação em Cys53.

### 5.1 PtpA é susceptível à S-nitrosilação

Os resultados dos ensaios de biotinição demonstraram a susceptibilidade da PtpA de *M. tuberculosis* à S-nitrosilação, a partir de 50  $\mu$ M do doador de NO GSNO. Além disso, os experimentos determinaram a ausência dessa modificação na outra tirosina fosfatase desse patógeno, PtpB. Esses resultados estão de acordo com o que foi previamente descrito para a oxidação dessas proteínas (GRUNDNER; NG; ALBER, 2005; FLYNN et al., 2010). As diferentes susceptibilidades à oxidação são atribuídas ao fato da PtpA possuir uma conformação estrutural mais aberta, enquanto que a PtpB se fecha sobre o sítio ativo (como pode ser observado na Figura 4) (GRUNDNER; NG; ALBER, 2005; FLYNN et al., 2010). A PtpB possui uma tampa (*lid*) constituída por duas hélices, dinâmica, que se fecha sobre o sítio ativo, protegendo-o. Dessa forma, a PtpA estaria mais exposta às espécies reativas tanto de oxigênio quanto de nitrogênio, enquanto a PtpB ficaria mais protegida. É possível que esse mesma tampa proteja a PtpB da S-nitrosilação.

Rhee e colaboradores (2005) avaliaram o S-nitrosoproteoma de *M. tuberculosis* através de uma modificação do ensaio de biotinição de Jaffrey e Snyder (2001). Dentre as 29 proteínas detectadas, nenhuma tirosina fosfatase ou tirosina quinase foi encontrada. O fato da PtpA não ter

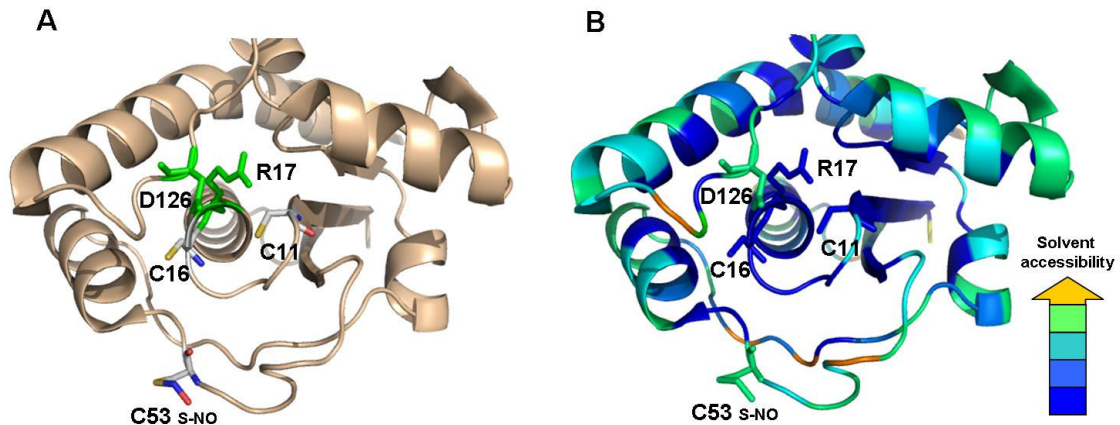
sido observada nesse S-nitrosoproteoma pode ser explicado pelo fato de esta ser uma proteína secretada pela micobactéria (COWLEY; BABAKAIFF; AV-GAY, 2002).

## 5.2 A S-nitrosilação de PtpA ocorre em Cys53

Foi demonstrado, ainda, através dos ensaios de biotilação com as proteínas mutantes, que a S-nitrosilação da PtpA ocorre no resíduo de Cys53. Diferentemente do que foi observado em alguns estudos de S-nitrosilação de PTPs até agora (CHEN et al., 2008), a S-nitrosilação da PtpA não ocorre na cisteína catalítica (Cys 11). A cisteína catalítica conservada das PTPs é caracterizada por possuir um baixo pKa, o que é essencial para a atividade enzimática dessas proteínas (ZHANG; DIXON, 1993). Esse baixo pKa também deixa esse resíduo de cisteína susceptível à oxidação e à S-nitrosilação (BARFORD, 2004; HESS et al., 2005). No entanto, Apesar de muitos estudos detectarem a S-nitrosilação de PTPs e a relacionarem especulativamente ao resíduo de Cys catalítico (pela perda de atividade frente ao NO, por exemplo) são poucos os autores que observam a S-nitrosilação da cisteína catalítica por técnicas mais precisas (espectrometria de massa, mutação sítio-dirigida) (BARRETT et al., 2005; CHEN et al., 2007; FOSTER; FORRESTER; STAMLER, 2009). Além disso, o baixo pKa da cisteína catalítica freqüentemente é atribuído à presença da His adjacente, bastante conservada nas PTPs clássicas, mas que não está presente na PtpA nem em algumas das LMW-PTP (ZHANG; DIXON, 1993; TABERNERO et al., 2008).

Uma possibilidade é que a nitrosilação de PtpA na Cys53 ocorra devido à posição desse resíduo na PtpA. A estrutura da enzima mostra claramente que a Cys53 é mais acessível ao solvente — em comparação com a Cys11 e a Cys16, que se localizam no *P-loop* (Figura 17). Essa observação sugere que a acessibilidade do solvente pode ter um papel importante na determinação da seletividade da S-nitrosilação da PtpA. Estudos recentes têm demonstrado que a acessibilidade do tiol reativo ao doador de NO, bem como a ação de efetores alostéricos (como O<sub>2</sub> e Ca<sup>2+</sup>) são determinantes críticos da especificidade da S-nitrosilação (FOSTER; FORRESTER; STAMLER, 2009).





**Figura 17:** Representação esquemática da estrutura da PtpA de *M. tuberculosis* S-nitrosilada em Cys53 (adaptada do arquivo PDB 1U2P). **A.** Representação da proteína com as três cisteínas (Cys11, Cys16 e Cys53) e os resíduos catalíticos (Cys11, Arg17 e Asp126) destacados. A S-nitrosilação de Cys53 também é mostrada. **B.** Representação da acessibilidade do solvente à PtpA. A mesma vista de **A** é mostrada em relação à acessibilidade ao solvente. O azul corresponde a regiões menos acessíveis e o amarelo às mais acessíveis. A Cys53 é claramente mais exposta que as outras cisteínas.

Nesse sentido, um ponto importante a ser considerado, é que ainda é difícil prever qual resíduo de Cys é S-nitrosilado nas proteínas. Muitos trabalhos buscam indicativos e motivos específicos de aminoácidos que apontem onde ocorre a S-nitrosilação, mas ainda tem se mostrado difícil prever a especificidade dessa reação (MARINO; GLADYSHEV, 2010). Há proteínas com inúmeros resíduos de cisteína, mas em que apenas um deles é S-nitrosilado. O receptor de rianodina de músculo esquelético RyR1, por exemplo, possui cerca de 50 tióis livres, sendo que apenas uma cisteína (Cys3635) é S-nitrosilada (SUN et al., 2001; HESS et al., 2005).

### 5.3 A S-nitrosilação em Cys53 afeta a atividade de PtpA

Os resultados obtidos nos ensaios de atividade com PtpB, PtpA e mutantes corroboram os dados obtidos através dos ensaios de biotilação. Na presença do doador de NO, a PtpB não tem sua atividade significativamente alterada. Esse resultado era esperado, uma vez que a PtpB não é S-nitrosilada. A S-nitrosilação, por outro lado, afetou a atividade da PtpA. Quando tratada com GSNO, esta enzima teve sua atividade reduzida cerca de 56%. A redução da atividade da PtpA é compatível com a reação controle com a PTP1B, cuja atividade diminuiu 59% na presença de

GNSO. Esse último dado está de acordo com encontrado por Li e Whorton (2003), que demonstraram que a incubação da PTP1B com 1 mM de GSNO inibiu-a em cerca de 60%.

Os ensaios de atividade com as mutantes de PtpA suportam o dado de que a S-nitrosilação ocorre no resíduo Cys53. Enquanto a PtpA conservou 44% da atividade, a atividade da PtpA\_C53A não foi significativamente alterada. A PtpA\_C16A, por outro lado, manteve 75% da atividade. Esse valor maior observado para a PtpA\_C16A possivelmente é influenciado pela reduzida atividade específica que essa mutante apresenta, quando comparada à PtpA. A atividade da PtpA\_C11A na presença de GSNO não pode ser avaliada já que, conforme descrito anteriormente, essa mutante não possui atividade alguma (MADHURANTAKAM; CHAVALI; DAS, 2008).

Esses resultados sugerem que a atividade da PtpA é reduzida como consequência da S-nitrosilação de Cys53. Diversos outros estudos demonstraram a inibição da atividade de PTPs como consequência da ação do NO (CASELLI et al., 1994; XIAN et al., 2000; BARRETT et al., 2005; HESS et al., 2005). No entanto, diferentemente da PtpA, nas PTPs que tiveram a atividade reduzida pelo NO e cujo aminoácido S-nitrosilado foi determinado, a S-nitrosilação ocorre no resíduo de cisteína catalítico (BARRETT et al., 2005; CHEN et al., 2007; FOSTER; FORRESTER; STAMLER, 2009).

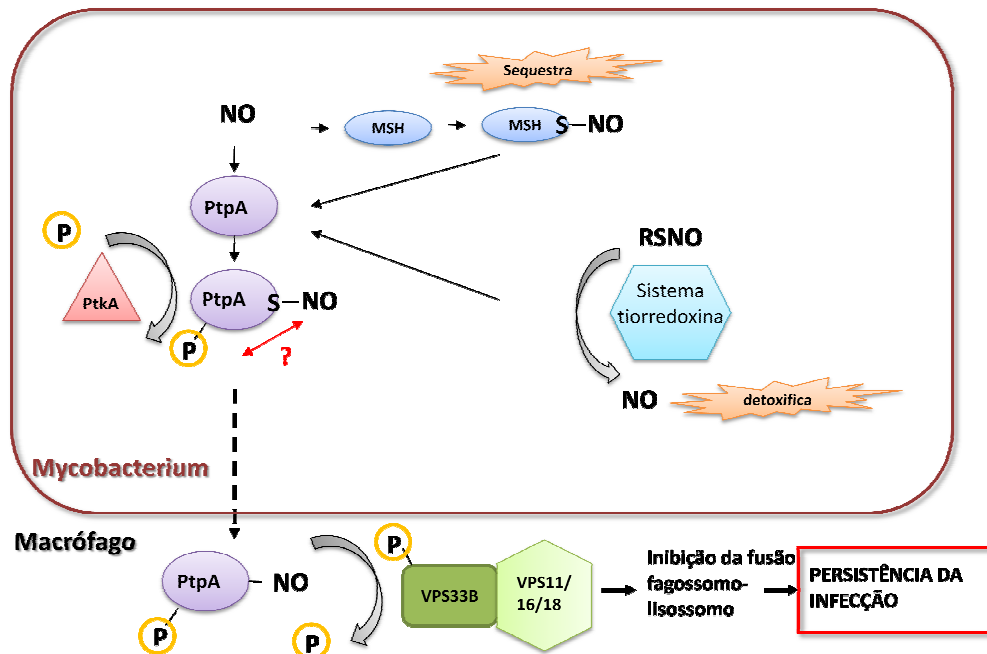
#### **5.4 Implicações da S-nitrosilação de PtpA para a biologia de *M. tuberculosis***

No curso da infecção, o *M. tuberculosis* encontra um ambiente hostil devido à produção de ERN e ERO pelo hospedeiro. O papel do NO no combate à infecção por *M. tuberculosis* ainda é discutido. Por um lado, há evidências que apontam para um papel microbicida do NO e outras ERN (CHAN et al., 1992; RICH et al., 1997; ZAHRT; DERETIC, 2002). Por outro, há trabalhos que argumentam que o NO não elimina completamente o patógeno, já que este último possui mecanismos de detoxificação e resistência a essas espécies (ZAHRT; DERETIC, 2002; DARWIN et al., 2003; ATTARIAN et al., 2009). Acredita-se que o NO, além de controlar a infecção, poderia também funcionar, juntamente com ERO e outras ERN, como um sinal para o estabelecimento da infecção latente (KUMAR et al., 2007).

Nesse cenário, é possível formular duas hipóteses do papel biológico da S-nitrosilação da

PtpA de *M. tuberculosis*. Na primeira hipótese, a S-nitrosilação da PtpA seria um mecanismo de defesa do hospedeiro contra o patógeno. Com a produção de ERO e ERN no macrófago, a PtpA seria S-nitrosilada e oxidada e sua atividade seria reduzida. Com a inibição da PtpA, mesmo que parcial, o crescimento da micobactéria seria prejudicado.

Na segunda hipótese, a S-nitrosilação da PtpA poderia ser um mecanismo de sinalização do *M. tuberculosis* (Figura 18). De forma análoga ao que ocorre com a proteína humana CLIC4 (MALIK et al., 2010), a S-nitrosilação da PtpA poderia mediar o transporte de PtpA do *M. tuberculosis* para o citoplasma do macrófago, podendo alterar sua interação com proteínas de transporte. A PtpA atua no macrófago e sua secreção é aumentada em decorrência do processo de infecção (COWLEY; BABAKAIFF; AV-GAY, 2002), mas o mecanismo dessa secreção ainda não é conhecido. Há a possibilidade de que a fosforilação da PtpA pela PtkA medie esse transporte (CHAO et al., 2010), mas nenhuma evidência experimental desse fato foi demonstrada até agora. Inclusive, a S-nitrosilação e a fosforilação poderiam atuar juntas (ou de forma oposta) nesse processo.



**Figura 18:** Representação esquemática das possíveis implicações biológicas da S-nitrosilação de PtpA. O *M. tuberculosis* possui o micotiol (MSH) que sequestra o NO livre e o sistema tiorredoxina que detoxifica os nitrosotióis (RSNO). Na presença de NO, essas moléculas podem interagir com a PtpA, que pode ser S-nitrosilada. Além disso, a PtpA interage com a PtkA e pode ser fosforilada. É possível que haja uma interação entre a S-nitrosilação e a fosforilação de PtpA e que uma ou outra ou ambas estejam envolvidas na secreção de PtpA para o citosol do macrófago. Uma vez secretada, PtpA defosforila a VPS33B, participando, assim, na inibição da fusão fagossomo-lisossomo.

## 6 CONCLUSÕES

- As proteínas PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* foram expressas de maneira heteróloga com sucesso;
- Os ensaios de biotinylação demonstraram que a PtpA é S-nitrosilada a partir de 50  $\mu$ M de GSNO, enquanto que a PtpB não sofre S-nitrosilação;
- Para determinar o sítio de S-nitrosilação da PtpA, foram construídos vetores de expressão da PtpA contendo as mutações PtpA\_C11A, PtpA\_C16A e PtpA\_C53A e as respectivas proteínas mutantes foram expressas e purificadas;
- Ensaios de biotinylação com as proteínas mutantes revelaram que a S-nitrosilação da PtpA ocorre em Cys53;
- A atividade específica das proteínas purificadas foi determinada na presença e ausência do doador de NO GSNO e demonstrou-se que a PtpA é inibida como consequência da S-nitrosilação;

## 7 PERSPECTIVAS

A descoberta da S-nitrosilação de PtpA de *M. tuberculosis* em Cys53 e sua relação com a atividade desse fator de virulência é apenas o início de uma série de estudos que ainda podem ser realizados nessa área. Há alguns experimentos que ainda devem ser feitos para avaliar melhor as implicações estruturais da S-nitrosilação de PtpA em Cys53, bem como sua influência na estabilidade da proteína. Os experimentos subsequentes que serão realizados envolvem a avaliação da estabilidade térmica de PtpA e suas mutantes por dicroísmo circular na presença de NO. Além disso, a S-nitrosilação de PtpA será analisada por Ressonância Magnética Nuclear.

Há ainda uma série de análises *in vivo* e *ex vivo* que podem ser realizadas para avaliar as implicações biológicas dessa S-nitrosilação. Inicialmente, seria interessante avaliar a ocorrência da S-nitrosilação de PtpA quando o *M. tuberculosis* é exposto ao NO e quais as conseqüências dessa nitrosilação para a micobactéria. Além disso, uma vez confirmada a S-nitrosilação *in vivo* de PtpA, a mutante PtpA\_C53A poderia ser também utilizada em ensaios para avaliar a importância biológica dessa S-nitrosilação.

Em termos biotecnológicos, é possível vislumbrar ainda o desenvolvimento de inibidores específicos de PtpA baseados na ação do NO. A síntese de inibidores que se baseiem na liberação específica do NO nas proximidades do sítio ativo de PtpA poderia levar, futuramente, ao desenvolvimento de novos fármacos para tuberculose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, A. et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. **Cell**, v. 117, n. 6, p. 699-711, 2004.

ATTARIAN, R. et al. Glutathione disulfide and S-nitrosoglutathione detoxification by Mycobacterium tuberculosis thioredoxin system. **FEBS Letters**, v. 583, n. 19, p. 3215-3220, 2009.

AUSUBEL, F. M. et al. **Short protocols in molecular biology**. 2 ed., John Wiley and Sons. 1992.

BACH, H. et al. Mycobacterium tuberculosis Virulence Is Mediated by PtpA Dephosphorylation of Human Vacuolar Protein Sorting 33B. **Cell Host and Microbe**, v. 3, n. 5, p. 316-322, 2008.

BACH, H.; WONG, D.; AV-GAY, Y. Mycobacterium tuberculosis PtkA is a novel protein tyrosine kinase whose substrate is PtpA. **Biochemical Journal**, v. 420, n. 2, p. 155-160, 2009.

BARFORD, D. The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 14, n. 6, p. 679-686, 2004.

BARFORD, D.; DAS, A. K.; EGLOFF, M. P. The structure and mechanism of protein phosphatases: Insights into catalysis and regulation. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 27, p. 133-164, 1998.

BARFORD, D. et al. Purification and Crystallization of the Catalytic Domain of Human Protein Tyrosine Phosphatase 1B Expressed in Escherichia coli. **Journal of Molecular Biology**, v. 239, n. 5, p. 726-730, 1994.

BARRETT, D. M. et al. Inhibition of protein-tyrosine phosphatases by mild oxidative stresses is dependent on S-nitrosylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 15, p. 14453-14461, 2005.

BERESFORD, N. et al. MtpB, a virulence factor from Mycobacterium tuberculosis, exhibits triple-specificity phosphatase activity. **Biochemical Journal**, v. 406, n. 1, p. 13-18, 2007.

BERESFORD, N. J. et al. Inhibition of MtpB phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* impairs mycobacterial survival in macrophages. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 5, p. 928-936, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO, T. A. S.; HENGGE, A. C.; JOHNSON, S. J. Insights into the reaction of protein-tyrosine phosphatase 1B: Crystal structures for transition state analogs of both catalytic steps. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 21, p. 15874-15883, 2010.

BRUCKDORFER, R. The basics about nitric oxide. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 1-2 SPEC. ISS., p. 3-31, 2005.

CASELLI, A. et al. Nitric oxide causes inactivation of the low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 40, p. 24878-24882, 1994.

CHAN, J. et al. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, v. 175, n. 4, p. 1111-1122, 1992.

CHAO, J. et al. Protein kinase and phosphatase signaling in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and pathogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 3, p. 620-627, 2010.

CHEN, Y. Y. et al. Cysteine S-nitrosylation protects protein-tyrosine phosphatase 1B against oxidation-induced permanent inactivation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 50, p. 35265-35272, 2008.

CHEN, Y. Y. et al. Mass spectrometry-based analyses for identifying and characterizing S-nitrosylation of protein tyrosine phosphatases. **Methods**, v. 42, n. 3, p. 243-249, 2007.

COLE, S. T. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Microbiology**, v. 148, n. 10, p. 2919-2928, 2002.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537-544, 1998.

COWLEY, S. C.; BABAKAIFF, R.; AV-GAY, Y. Expression and localization of the Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 4, p. 233-241, 2002.

COZZONE, A. J. et al. Protein phosphorylation on tyrosine in bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 181, n. 3, p. 171-181, 2004.

DARWIN, K. H. et al. The Proteasome of Mycobacterium tuberculosis Is Required for Resistance to Nitric Oxide. **Science**, v. 302, n. 5652, p. 1963-1966, 2003.

DORMAN, S. E.; CHAISSON, R. E. From magic bullets back to the Magic Mountain: The rise of extensively drug-resistant tuberculosis - Commentary. **Nature Medicine**, v. 13, n. 3, p. 295-298, 2007.

DUCATI, R. G. et al. The resumption of consumption - A review on tuberculosis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7, p. 697-714, 2006.

EISENSTADT, J.; HALL, G. S. Microbiology and classification of mycobacteria. **Clinics in Dermatology**, v. 13, n. 3, p. 197-206, 1995.

FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: Concepts and controversies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 820-832, 2004.

FLYNN, E. M. et al. Dynamic active-site protection by the M. tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpB lid domain. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 13, p. 4772-4780, 2010.

FOSTER, M. W.; FORRESTER, M. T.; STAMLER, J. S. A protein microarray-based analysis of S-nitrosylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 45, p. 18948-18953, 2009.



GARTHWAITE, J. New insight into the functioning of nitric oxide-receptive guanylyl cyclase: Physiological and pharmacological implications. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 334, n. 1-2, p. 221-232, 2010.

GRUNDNER, C.; COX, J. S.; ALBER, T. Protein tyrosine phosphatase PtpA is not required for *Mycobacterium tuberculosis* growth in mice. **FEMS Microbiology Letters**, v. 287, n. 2, p. 181-184, 2008.

GRUNDNER, C.; NG, H. L.; ALBER, T. *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpB structure reveals a diverged fold and a buried active site. **Structure**, v. 13, n. 11, p. 1625-1634, 2005.

HESS, D. T. et al. Protein S-nitrosylation: Purview and parameters. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 2, p. 150-166, 2005.

HUNTER, T. Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 21, n. 2, p. 140-146, 2009.

IMAEDA, T. Deoxyribonucleic acid relatedness among selected strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium microti*, and *Mycobacterium africanum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 35, n. 2, p. 147-150, 1985.

JAFFREY, S. R.; SNYDER, S. H. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. **Science's STKE [electronic resource] : signal transduction knowledge environment**, v. 2001, n. 86, 2001.

KOUL, A. et al. Cloning and characterization of secretory tyrosine phosphatases of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 19, p. 5425-5432, 2000.

KOUL, A. et al. Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 189-202, 2004.

KUMAR, A. et al. *Mycobacterium tuberculosis* DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.

104, n. 28, p. 11568-11573, 2007.

LI, S.; RICHARD WHORTON, A. Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B in intact cells by S-nitrosothiols. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, n. 2, p. 269-279, 2003.

MADHURANTAKAM, C.; CHAVALI, V. R. M.; DAS, A. K. Analyzing the catalytic mechanism of MPtpA: A low molecular weight protein tyrosine phosphatase from Mycobacterium tuberculosis through site-directed mutagenesis. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 71, n. 2, p. 706-714, 2008.

MALIK, M. et al. S-nitrosylation regulates nuclear translocation of chloride intracellular channel protein CLIC4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 31, p. 23818-23828, 2010.

MARINO, S. M.; GLADYSHEV, V. N. Structural Analysis of Cysteine S-Nitrosylation: A Modified Acid-Based Motif and the Emerging Role of Trans-Nitrosylation. **Journal of Molecular Biology**, v. 395, n. 4, p. 844-859, 2010.

MARTÍNEZ, M. C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Reactive nitrogen species: Molecular mechanisms and potential significance in health and disease. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 11, n. 3, p. 669-702, 2009.

MASCARELLO, A. et al. Inhibition of Mycobacterium tuberculosis tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: Kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 3783-3789, 2010.

MUELLER, P.; PIETERS, J. Modulation of macrophage antimicrobial mechanisms by pathogenic mycobacteria. **Immunobiology**, v. 211, n. 6-8, p. 549-556, 2006.

NUNN, P. et al. Tuberculosis control in the era of HIV. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 10, p. 819-826, 2005.

OMS. Fact sheet N°104:Tuberculosis 2010. Disponível em:<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html>>. Acesso em: 08 Novembro 2010.

PIETERS, J. Mycobacterium tuberculosis and the Macrophage: Maintaining a Balance. **Cell Host and Microbe**, v. 3, n. 6, p. 399-407, 2008.

PURIFICAÇÃO, M. **Identificação de potenciais substratos de PTPA, tirosina-fosfatase de Mycobacterium tuberculosis**. Florianópolis, SC, 2008 81 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

RHEE, K. Y. et al. S-nitroso proteome of Mycobacterium tuberculosis: Enzymes of intermediary metabolism and antioxidant defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 2, p. 467-472, 2005.

RICH, E. A. et al. Mycobacterium tuberculosis (MTB)-stimulated production of nitric oxide by human alveolar macrophages and relationship of nitric oxide production to growth inhibition of MTB. **Tubercle and Lung Disease**, v. 78, n. 5-6, p. 247-255, 1997.

RUSSELL, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 39-47, 2007.

RUSSELL, D. G.; BARRY, C. E.; FLYNN, J. L. Tuberculosis: What we don't know can, and does, hurt us. **Science**, v. 328, n. 5980, p. 852-856, 2010.

SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.

SINGH, R. et al. Disruption of mptpB impairs the ability of Mycobacterium tuberculosis to survive in guinea pigs. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 751-762, 2003.

STAMLER, J. S.; LAMAS, S.; FANG, F. C. Nitrosylation: The prototypic redox-based signaling mechanism. **Cell**, v. 106, n. 6, p. 675-683, 2001.

SUN, J. et al. Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 20, p. 11158-11162, 2001.

TABERNERO, L. et al. Protein tyrosine phosphatases: Structure-function relationships. **FEBS Journal**, v. 275, n. 5, p. 867-882, 2008.

TAKAKURA, K. et al. Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by peroxyntirite. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 369, n. 2, p. 197-207, 1999.

VERGNE, I. et al. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 11, p. 4033-4038, 2005.

XIAN, M. et al. Inhibition of protein tyrosine phosphatases by low-molecular-weight S-nitrosothiols and S-nitrosylated human serum albumin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 268, n. 2, p. 310-314, 2000.

ZAHRT, T. C.; DERETIC, V. Reactive nitrogen and oxygen intermediates and bacterial defenses: Unusual adaptations in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 4, n. 1, p. 141-159, 2002.

ZHANG, Z. Y. Protein Tyrosine Phosphatases: Structure and Function, Substrate Specificity and Inhibitor Development. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 42, p. 209-234, 2002.

ZHANG, Z. Y.; DIXON, J. E. Active site labeling of the yersinia protein tyrosine phosphatase: The determination of the pKa of the active site cysteine and the function of the conserved histidine 402. **Biochemistry (Moscow)**, v. 32, n. 36, p. 9340-9345, 1993.

## ANEXO A - Artigos publicados

Artigos publicados durante o estágio no Centro Molecular de Biologia Estrutural.

ECCO, G. et al. Mycobacterium tuberculosis tyrosine phosphatase A (PtpA) activity is modulated by S-nitrosylation. **Chemical Communications**, v. 46, n. 40, p. 7501-7503, 2010.

ECCO, G. et al. Initial characterization of a recombinant kynureninase from Trypanosoma cruzi identified from an EST database. **Gene**, v. 448, n. 1, p. 1-6, 2009.

MATIOLLO, C. et al. A transthyretin-related protein is functionally expressed in Herbaspirillum seropedicae. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 387, n. 4, p. 712-716, 2009.

## *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase A (PtpA) activity is modulated by S-nitrosylation†

Gabriela Ecco, Javier Vernal, Guilherme Razzera, Priscila Alves Martins, Camila Matiollo and Hernán Terenzi\*

Received 2nd June 2010, Accepted 21st August 2010

DOI: 10.1039/c0cc01704c

*M. tuberculosis* PtpA and PtpB, the only two phosphotyrosine phosphatases (Ptps) present in this pathogen, play an important role in mycobacteria survival inside macrophages. The aim of the present work was to investigate *M. tuberculosis* PtpA and PtpB susceptibility to S-nitrosylation, a reversible covalent bond between nitric oxide (NO) and specific cysteine (sulfur) residues in proteins. PtpB was not modified by NO, in contrast, PtpA Cys53 was identified by site directed mutagenesis as the target of S-nitrosylation.

Due to the emergence in recent years of *Mycobacterium tuberculosis* multi-resistant strains, tuberculosis (TB) is still the most important cause of death among infectious diseases. In 2008, there were approximately 1.3 million cases of death from tuberculosis globally and WHO estimates that one-third of the world's population is currently infected with *M. tuberculosis*.<sup>1,2</sup> An important pre-requisite for the rapid development of new clinically relevant drugs is the understanding of host–pathogen interaction and how this contributes to the development of the disease.

To survive in humans, pathogenic bacteria have evolved many mechanisms to evade the host immune response.<sup>3–5</sup> Suggested modulators of host–pathogen interactions are bacterial kinases and phosphatases, which participate in the modulation of a variety of cellular events<sup>6</sup> and have been associated with virulence by contributing to intracellular pathogen survival. *M. tuberculosis* has two protein tyrosine phosphatases (Ptps), PtpA and PtpB. These two enzymes are secreted by mycobacteria and are involved in survival in host macrophages.<sup>3,7</sup> Disruption of PtpB diminishes the ability of the mutant *M. tuberculosis* strain to survive in activated macrophages and guinea pigs. Furthermore, it has been recently demonstrated that PtpB inhibition severely reduces mycobacteria survival in infected macrophages.<sup>8</sup> On the other hand, PtpA plays an inhibitory role on phagocytosis and is required for growth of *M. tuberculosis* in human macrophages.<sup>4</sup> It was also shown that PtpA inactivation attenuates the growth of *M. tuberculosis* in human macrophages. In addition, the macrophage protein target, the vacuolar protein sorting 33 homolog B (VPS33B), a regulator of membrane fusion, is a substrate of this enzyme. VPS33B activity leads to phagosome–lysosome fusion, a cellular response to infection

process, and its activity is inhibited by *M. tuberculosis* infection.<sup>4</sup> More recently, the presence of a phosphotyrosine kinase (PtkA) was detected in *M. tuberculosis*, and interestingly PtpA was shown to be a substrate of PtkA, although PtkA is not a substrate for PtpA.<sup>5</sup>

From the host perspective, one important strategy to fight pathogens is the production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *M. tuberculosis* resides inside macrophages where it is exposed to ROS and RNS.<sup>9</sup> ROS have been shown to reduce PtpA activity while it has little effect on PtpB—mainly because of its three-dimensional structure.<sup>10</sup> The effects of RNS on PtpA and PtpB, however, have never been investigated to date.

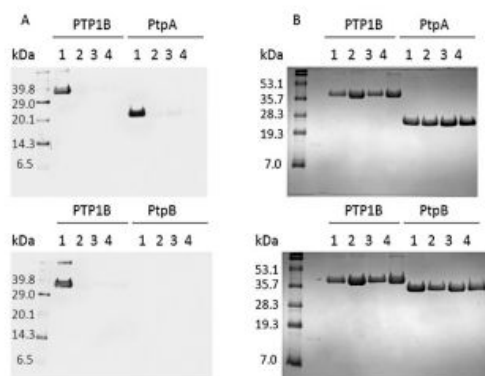
NO and other RNS are important molecules in cell signaling events, protein function regulation and host defense mechanisms.<sup>11</sup> Among Ptps, several of these enzymes were shown to be nitrosylated as a consequence of NO action, which results in loss of activity or protection from oxidation.<sup>12</sup> Additionally, NO and other RNS exhibit potent antimicrobial activity *in vitro* for a wide range of microorganisms.<sup>11</sup> S-nitrosylation of cysteine residues in target proteins is one of the main reactions of NO and of several NO-derived species.<sup>11</sup> S-nitrosylation of specific cysteine residues in microbial proteases is related to the antimicrobial activities of RNS against Coxsackievirus, HIV-1, *Leishmania infantum*, *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi*. In *M. tuberculosis* NO is toxic for *in vivo* and *in vitro* growth,<sup>13</sup> however, little is known about its molecular effects on this pathogen.

In this context, the aim of the present work was to investigate NO action on *M. tuberculosis* PtpA and PtpB activity by post-translational modification of their Cys residues. We also report here the site-directed mutagenesis of the three Cys residues present in PtpA, Cys11, Cys16 and Cys53, and the effect of each of these mutations on the PtpA nitrosylation pattern and activity.

S-nitrosylation of *Mycobacterium tuberculosis* PtpA and PtpB was assessed through the biotin switch technique. Proteins were purified as described (ESI†), and pure proteins were used in the biotin switch assays.† PTP1B was previously shown to be S-nitrosylated and was used as a positive control. In the presence of 1 mM GSNO, PtpA is S-nitrosylated while PtpB shows no nitrosylation pattern (Fig. 1A and B). Furthermore, PtpA S-nitrosylation was also observed using a lower concentration of GSNO (0.1 mM, data not shown). For both proteins, when the experiment was performed with GSH instead of GSNO or when samples were treated with GSNO and DTT, no biotin was detected on the western blot—the

Centro de Biologia Molecular Estrutural, BQA CCB UFSC, Florianópolis-SC, Brazil. E-mail: hterenzi@ccb.ufsc.br; Fax: +55 48 3721 6973; Tel: +55 48 3721 6426

† Electronic supplementary information (ESI) available: Complete experimental protocols. See DOI: 10.1039/c0cc01704c

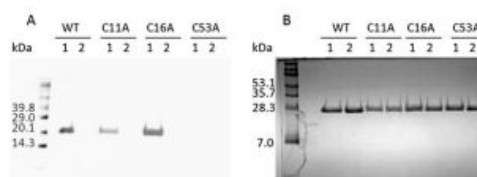


**Fig. 1** S-Nitrosylation of NO-treated PTP1B, PtpA and PtpB. Twenty micrograms of purified recombinant proteins PTP1B, PtpA or PtpB were treated separately with 1 mM GSNO (1), 1 mM GSH (2) or 10 mM DTT after GSNO treatment (3), respectively. Then, proteins were labelled with biotin using the biotin switch method. As a negative control, a set of GSNO-treated samples were incubated with DMSO instead of biotin (4). (A) Detection of S-nitrosylated proteins: eight micrograms of the above proteins were separated by SDS-PAGE and blotted onto polyvinylidene difluoride-membrane. Biotinylated proteins were detected using anti-biotin antibodies. The relative molecular masses of protein standards are shown on the left. (B) Eight micrograms of protein treated as in (A) were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Numbers on the left indicate molecular weights.

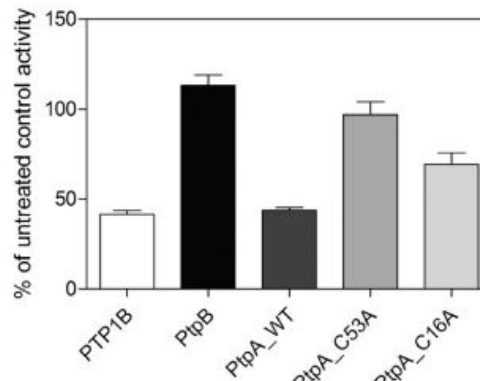
same occurred when biotin was not added to the samples. The same pattern observed for PtpA was displayed in PTP1B positive controls. These results demonstrate that PtpA is S-nitrosylated while PtpB does not undergo S-nitrosylation.

Since PtpA has three Cys residues, Cys11, Cys16 and Cys53, we examined the potential specific S-nitrosylated Cys residue in PtpA through site directed mutagenesis. Wild-type PtpA cysteine residues were mutated to alanine in order to create the following mutants: PtpA\_C11A, PtpA\_C16A and PtpA\_C53A. These mutant proteins were expressed and purified in the same way as the wild type protein and then were also subjected to biotin switch assays. When exposed to GSNO PtpA\_C11A and PtpA\_C16A mutants were S-nitrosylated as PtpA\_WT (Fig. 2). However, PtpA\_C53A was not nitrosylated in the presence of the NO donor. When samples were treated with GSH instead of GSNO, nitrosylation was not observed. Negative controls with DTT and without biotin were also performed (data not shown). These results indicate that PtpA Cys53 residue is S-nitrosylated as a consequence of NO action.

We further investigated whether nitrosylation had any effect on PtpA catalytic activity. PtpA, PtpB and PTP1B activity was measured in the presence and absence of GSNO. After 30 min of incubation with 1 mM GSNO, PtpA activity decreased to 43.7% ( $\pm 2.7\%$ ) relative to the untreated control (Fig. 3). As expected from the previous biotin switch results, the NO donor had little effect on PtpB activity. PTP1B was used as a positive control and its activity was diminished to 41.4% ( $\pm 3.6\%$ ), similarly to that previously reported.<sup>16</sup> These results



**Fig. 2** S-Nitrosylation of NO-treated PtpA WT, C11A, C16A and C53A mutants. Twenty micrograms of these purified recombinant proteins were treated separately with 1 mM GSNO (1) or 1 mM GSH (2), respectively. (A) Detection of S-nitrosylated proteins: eight micrograms of the above proteins were separated by SDS-PAGE and blotted onto polyvinylidene difluoride-membrane. Biotinylated proteins were detected using anti-biotin antibodies. The relative molecular masses of protein standards are shown on the left. (B) Eight micrograms of proteins treated as in (A) were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Numbers on the left indicate molecular weights.



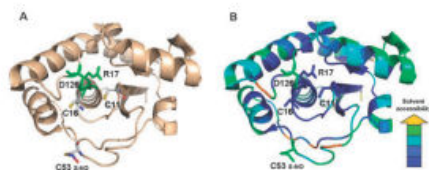
**Fig. 3** NO action on Ptps activity. Enzymes were incubated in the presence of GSNO for 30 min and enzyme activity was measured as described in materials and methods. Each bar represents the relative activity of the enzymes when compared to the corresponding untreated control. All assays were performed in triplicate.

suggest that PtpA activity is inhibited as a consequence of GSNO addition.

Afterwards, we analyzed the effect of the point mutations on PtpA activity. PtpA\_C11A mutant displayed no activity at all, as previously described.<sup>17</sup> PtpA\_C16A conserved only 21.4% ( $\pm 4.8\%$ ) of the wild-type specific activity. Interestingly, C53A mutation did not affect significantly the enzyme activity.

In order to analyze the effect of Cys53 S-nitrosylation on PtpA activity, PtpA mutants' activities were measured in the presence of GSNO. While GSNO-treated PtpA\_WT diminished its activity by 56.3% when compared with the untreated enzyme, PtpA\_C53A treated with GSNO maintained 96.9% ( $\pm 17.2\%$ ) of the activity (Fig. 3). Interestingly, PtpA\_C16A conserved 75.2% ( $\pm 6.4\%$ ) of the activity relative to the untreated enzyme. Altogether, these results suggest that PtpA activity is impaired as a consequence of Cys53 S-nitrosylation.

In this work, we describe for the first time, the effect of S-nitrosylation on a mycobacterial tyrosine phosphatase.



**Fig. 4** Schematic representation of the S-nitrosothiol form of the Cys53 in the *Mycobacterium tuberculosis* PtpA structure (adapted from 1U2P PDB). (A) Stick representation of the Cys residues and the (CX5R) signature that forms the P-loop present in the active site of PtpA. The residues representing the catalytic Cys11, Arg17 and Asp126 are labeled. At the bottom, the Cys53 nitrosylated side chain is also shown. (B) The same view as in panel A showing the solvent accessibility of PtpA. Clearly the Cys53 is a solvent-exposed residue.

We demonstrated *M. tuberculosis* PtpA susceptibility to S-nitrosylation by biotin switch assays and the absence of this modification in *M. tuberculosis* PtpB. Our results are in agreement with those previously reported for PtpA and PtpB oxidation.<sup>10</sup> PtpA activity is severely diminished by oxidation, while PtpB shows higher resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inactivation.<sup>10</sup> This oxidation resistance is apparently due to a physical blockage of PtpB active site by a dynamic two-helix lid. This same lid might possibly protect PtpB active site from nitrosylation.

PtpA S-nitrosylation was shown to occur at Cys53, differently to PTP1B, which is S-nitrosylated at its catalytic cysteine. Probably, the Cys53 nitrosylation is due to the Cys53 SH position in PtpA. The PtpA structure clearly shows that Cys53 is more accessible to the solvent compared to the nucleophile Cys11 and the redox regulatory Cys16 located in the P-loop (Fig. 4). This observation suggests that solvent accessibility plays a critical role in determining the selectivity of S-nitrosylation in PtpA. According to the PtpA 3D structure, most probably, the S-NO state of Cys53 faces the solvent as shown in the schematic view in Fig. 4, but we cannot rule out that a change in the Cys53 side chain may affect the residues in the active P-loop upon NO binding. Further structural experiments should be performed in order to understand the involvement of this Cys-NO residue on PtpA activity.

We also demonstrated that S-nitrosylation diminishes PtpA activity. Site directed mutagenesis on Cys residues confirmed Cys53 as the S-nitrosylation target residue. PtpA<sub>WT</sub> activity was inhibited in the presence of GSNO, while PtpA<sub>C53A</sub> activity remained constant in the presence or in the absence of the NO donor. Surprisingly, despite the presence of Cys53, PtpA<sub>C16A</sub> activity was less affected when compared to PtpA<sub>WT</sub> in the presence of GSNO. However, C16A mutation itself severely damaged the enzyme activity when compared to the PtpA<sub>WT</sub>.

Altogether, these results suggest that NO would have an inhibitory effect on PtpA, while it would have little or no effect on PtpB activity. Inside macrophages, *M. tuberculosis* is exposed to RNS and other radicals during oxidative burst. Furthermore, as was previously reported,<sup>14,15</sup> PtpA inhibition disrupts mycobacterial growth in macrophages. These findings lead us to suggest that inside macrophages, when exposed to RNS, PtpA could be inhibited by NO, thus decreasing mycobacterial survival, while PtpB would remain active as a consequence of its lack of susceptibility to NO.

The authors are grateful to CNPq, CAPES, MCT, FINEP and FAPESC for financial support and fellowships.

## Notes and references

- 1 R. Johnson, E. M. Streicher, G. E. Louw, R. M. Warren, P. D. van Helden and T. C. Victor, *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2006, **8**, 97.
- 2 WHO, Tuberculosis Fact Sheet No. 104. In <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html> (2010).
- 3 A. Koul, A. Choidas, M. Treder, A. K. Tyagi, K. Drlica, Y. Singh and A. Ullrich, *J. Bacteriol.*, 2000, **182**, 5425.
- 4 H. Bach, K. G. Papavinasasundaram, D. Wong, Z. Hmama and Y. Av-Gay, *Cell Host Microbe*, 2008, **3**, 316.
- 5 H. Bach, D. Wong and Y. Av-Gay, *Biochem. J.*, 2009, **420**, 155.
- 6 N. K. Tonks, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2006, **7**, 833.
- 7 J. Chao, D. Wong, X. Zheng, V. Poirier, H. Bach, Z. Hmama and Y. Av-Gay, *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, **1804**, 620.
- 8 N. J. Beresford, D. Mulhearn, B. Szczepankiewicz, G. Liu, M. E. Johnson, A. Fordham-Skelton, C. Abad-Zapatero, J. S. Cavet and L. Taberner, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2009, **63**, 928; B. Zhou, Y. He, X. Zhang, J. Xu, Y. Luo, Y. Wang, S. G. Franzblau, Z. Yang, R. J. Chan, Y. Liu, J. Zheng and Z. Y. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 4573.
- 9 R. Attarian, C. Bennie, H. Bach and Y. Av-Gay, *FEBS Lett.*, 2009, **583**, 3215.
- 10 E. M. Flynn, J. A. Hanson, T. Alber and H. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 4772.
- 11 J. S. Stamler, S. Lamas and F. C. Fang, *Cell (Cambridge, Mass.)*, 2001, **106**, 675.
- 12 Y. Y. Chen, H. M. Chu, K. T. Pan, C. H. Teng, D. L. Wang, A. H. Wang, K. H. Khoo and T. C. Meng, *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**, 35265; A. Caselli, G. Camici, G. Manao, G. Moneti, L. Pazzagli, G. Cappugi and G. Ramponi, *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 24878; M. Xian, K. Wang, X. Chen, Y. Hou, A. McGill, B. Zhou, Z. Y. Zhang, J. P. Cheng and P. G. Wang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, **268**, 310.
- 13 J. Chan, K. Tanaka, D. Carrol, J. Flynn and B. R. Bloom, *Infect. Immun.*, 1995, **63**, 736.
- 14 L. D. Chiaradia, A. Mascarello, M. Purificação, J. Vernal, M. N. Sechini Cordeiro, M. E. Zenteno, A. Villarino, R. J. Nunes, R. A. Yunes and H. Terenzi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 6227.
- 15 A. Mascarello, L. D. Chiaradia, J. Vernal, A. Villarino, R. V. Guido, P. Perizzolo, V. Poirier, D. Wong, P. G. Martins, R. J. Nunes, R. A. Yunes, A. D. Andricopulo, Y. Av-Gay and H. Terenzi, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**, 3783.
- 16 S. Li and A. R. Whorton, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003, **410**, 269.
- 17 C. Madhurantakam, V. R. Chavali and A. K. Das, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, 2008, **71**, 706.





Contents lists available at ScienceDirect

Gene

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/gene](http://www.elsevier.com/locate/gene)

## Initial characterization of a recombinant kynureninase from *Trypanosoma cruzi* identified from an EST database

Gabriela Ecco<sup>a,\*</sup>, Javier Vernal<sup>a,\*</sup>, Guilherme Razzera<sup>b</sup>, Carolina Tavares<sup>a</sup>, Viviane Isabel Serpa<sup>a</sup>, Santiago Arias<sup>a</sup>, Fabricio Klerynton Marchini<sup>c</sup>, Marco Aurélio Krieger<sup>c</sup>, Samuel Goldenberg<sup>c,\*</sup>, Hernán Terenzi<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Biologia Molecular Estrutural, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

<sup>b</sup> Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear, Jiri Jonas, Departamento de Bioquímica Médica, ICB/CCS/UFRRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>c</sup> Instituto Carlos Chagas, ICC-Fiocruz, Curitiba, Paraná, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 March 2009  
Received in revised form 12 August 2009  
Accepted 13 August 2009  
Available online 19 August 2009

Received by F.G. Alvarez-Valin

#### Keywords:

Metacyclogenesis  
Heterologous expression  
Chagas' disease

### ABSTRACT

Kynureninase has been described in bacteria, fungi and animals as an enzyme involved in the catabolic degradation pathway of L-tryptophan. This pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent enzyme catalyzes the hydrolytic cleavage of L-kynurenine and 3-hydroxy-L-kynurenine to yield L-alanine and either anthranilic or 3-hydroxyanthranilic acid, respectively. We identified a putative kynureninase gene from a *Trypanosoma cruzi* project aiming at the structural and functional characterization of more than 100 proteins differentially expressed during metacyclogenesis. This gene encodes a protein similar in size and sequence to kynureninases from other sources. This open reading frame was cloned and the recombinant enzyme was overexpressed. Recombinant *T. cruzi* kynureninase was purified to homogeneity and its identity was confirmed by mass spectrometry. The apparent molecular mass of the native *T. cruzi* kynureninase was estimated by gel filtration, suggesting that the protein is a homodimer. Circular dichroism spectrum indicated a mixture of  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet structure, expected for an aminotransferase fold. L-kynurenine, preferentially hydrolyzed by prokaryotic inducible kynureninases, and 3-hydroxy-L-kynurenine, the preferred substrate in fungi and vertebrates, are both catabolized equally well by *T. cruzi* kynureninase. Further experimental assays will be performed to fully understand the importance of this enzyme for *T. cruzi* metabolism.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The protozoan *Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas' disease, a parasitic disease widely distributed from Mexico to Central and South America. *T. cruzi* is estimated to infect nearly 15 million people in Latin America. Although estimates show a decrease in the incidence of Chagas' disease during the last few decades due to the interruption of transmission, it continues to represent a health threat

for about 28 million people (TDR/WHO, 2007). Chagas' disease is incurable in the chronic stage and, therefore, a better understanding of parasite metabolism is important in the design of effective anti-trypanosome drugs.

A putative kynureninase gene was identified from a *T. cruzi* project aiming at the structural and functional characterization of more than 100 proteins differentially expressed during metacyclogenesis (Silva et al., 2007). This transcriptomics project was conceived to identify genes more expressed in infective (metacyclic trypomastigotes) forms of *T. cruzi* as compared to non-infective and replicative (epimastigotes) forms of the parasite. Kynureninase gene was identified among these more expressed genes. The results obtained by microarray analysis were confirmed by real-time PCR analysis. Kynureninase (E.C. 3.7.1.3) is a pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent enzyme that catalyzes the hydrolytic cleavage of L-kynurenine and 3-hydroxy-L-kynurenine to yield L-alanine and either anthranilic or 3-hydroxyanthranilic acid, respectively. N-formyl-kynurenine can also be used as a substrate. Kynureninase has been described in bacteria, fungi, vertebrates (Koushik et al., 1997; Jakoby and Bonner, 1953; Shetty and Gaertner, 1973; Toma et al., 1997; Gaertner and Shetty, 1977; Allegri et al., 2003) and more recently in

**Abbreviations:** EST, expressed sequence tags; NAD, nicotinamide-adenine dinucleotide; AIDS, acquired immunodeficiency syndrome; TEV, tobacco etch virus; PCR, polymerase chain reaction; LB, Luria-Bertani; OD, optical density; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; DTT, dithiothreitol; kDa, kilodaltons; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; bp, base pairs.

\* Corresponding authors. J. Vernal is to be contacted at Centro de Biologia Molecular Estrutural, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil. Tel.: +55 48 3721 6426; fax: +55 48 3721 9672. S. Goldenberg, Instituto Carlos Chagas ICC-Fiocruz, Rua Professor Alcagary Munhoz Mader 3775 CIC 81350-010, Curitiba, PR Brazil. Tel.: +55 41 33163230; fax: +55 41 33163267.

E-mail addresses: [jvernal@yahoo.com](mailto:jvernal@yahoo.com) (J. Vernal), [sgoldenberg@fiocruz.br](mailto:sgoldenberg@fiocruz.br) (S. Goldenberg).

0378-1119/\$ – see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.gene.2009.08.007



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)

## A transthyretin-related protein is functionally expressed in *Herbaspirillum seropedicae*

Camila Matiollo<sup>a</sup>, Javier Vernal<sup>a</sup>, Gabriela Ecco<sup>a</sup>, Jean Borges Bertoldo<sup>a</sup>, Guilherme Razzera<sup>b</sup>, Emanuel M. de Souza<sup>c</sup>, Fábio O. Pedrosa<sup>c</sup>, Hernán Terenzi<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Centro de Biologia Molecular Estrutural, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

<sup>b</sup>Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear – Jiri Jonas, Departamento de Bioquímica Médica, ICB/CCS/UFRRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 July 2009

Available online 24 July 2009

#### Keywords:

*Herbaspirillum seropedicae*

Transthyretin-related protein

Hydroxyisourate

### ABSTRACT

Transthyretin-related proteins (TRPs) constitute a family of proteins structurally related to transthyretin (TTR) and are found in a large range of bacterial, fungal, plant, invertebrate, and vertebrate species. However, it was recently recognized that both prokaryotic and eukaryotic members of this family are not functionally related to transthyretins. TRPs are in fact involved in the purine catabolic pathway and function as hydroxyisourate hydrolases. An open reading frame encoding a protein similar to the *Escherichia coli* TRP was identified in *Herbaspirillum seropedicae* genome (*Hs*\_TRP). It was cloned, overexpressed in *E. coli*, and purified to homogeneity. Mass spectrometry data confirmed the identity of this protein, and circular dichroism spectrum indicated a predominance of  $\beta$ -sheet structure, as expected for a TRP. We have demonstrated that *Hs*\_TRP is a 5-hydroxyisourate hydrolase and by site-directed mutagenesis the importance of three conserved catalytic residues for *Hs*\_TRP activity was further confirmed. The production of large quantities of this recombinant protein opens up the possibility of obtaining its 3D-structure and will help further investigations into purine catabolism.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Transthyretin-related proteins (TRPs) constitute a family of proteins structurally related to transthyretin (TTR) [1,2]. TRPs are found in a large range of bacterial, fungal, plant, invertebrate, and vertebrate species, such as *Bacillus subtilis* [3,4], *Escherichia coli* [2,5,6], *Salmonella dublin* [7], *Mus musculus* [8], *Arabidopsis thaliana* [9], *Caenorhabditis elegans* [1], and *Ostertadia ostertagi* [10]. The C-terminal sequence motif Y-[RK]-G-[ST] constitute a signature sequence for the TRPs which distinguishes proteins of this family unambiguously from TTR and other proteins listed as transthyretin-like in protein sequence databases [1,2].

The biological function of TTR is to transport and to distribute the two thyroid hormones 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T3) and 3,5,3',5'-tetraiodo-L-thyronine (T4 or thyroxine), as well as vitamin A in complex with the retinol-binding protein in human extracellular fluids [1,7,11–13]. TTRs have so far been identified only in vertebrates species [1] such as *Gallus gallus* [14], *Crocodylus porosus* [15], and *Canis familiaris* [16,17]. Some human disorders are related to TTR tissue deposition, such as Senile Systemic Amyloidosis (SSA),

Familial Amyloidotic Polyneuropathy (FAP), and Cardiomyopathy (FAC) [18].

Because of the high level of sequence similarity to TTR, TRPs were suspected to have a transport function. However, it has been recently recognized that both prokaryotic and eukaryotic members of this family are not functionally related to transthyretins. TRPs are involved in the purine catabolic pathway and function as hydroxyisourate hydrolases [5,19].

Purines are major components of nucleic acids and nucleotides and are continuously formed and degraded in biosphere [20]. In some organisms, such as *B. subtilis*, purine bases serve as an alternative nitrogen source when the preferred nitrogen sources are exhausted [3].

Uric acid, a major intermediate of purine catabolism, can be excreted or subjected to further degradation, depending on the presence of unique enzyme systems in different organisms. In humans, uric acid is the end product of the purine degradation pathway [21]. In other species, three sequential enzymatic reactions using uric acid as a substrate result in ureides, including allantoin and allantoinate [4]. The first enzyme involved in uric acid degradation is urate oxidase (uricase). This enzyme catalyzes the conversion of urate to 5-hydroxyisourate (HIU) [22]. TRPs function as 5-hydroxyisourate hydrolases (HIUHases), catalyzing the hydrolysis of 5-hydroxyisourate to yield 2-oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-

\* Corresponding author. Fax: +55 48 3721 9672.

E-mail address: [hterenzi@ccb.ufsc.br](mailto:hterenzi@ccb.ufsc.br) (H. Terenzi).