

Camila Matiollo

**Efeito da S-nitrosilação sobre a estrutura de PtpA, e clonagem e caracterização inicial de PtkA e SapM de *Mycobacterium tuberculosis***

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Hernán F. Terenzi

Coorientador: Prof. Dr. Javier Vernal

Florianópolis  
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Matiollo, Camila

Efeito da S-nitrosilação sobre a estrutura de PtpA, e clonagem e caracterização inicial de PtkA e SapM de *Mycobacterium tuberculosis* [dissertação] / Camila Matiollo ; orientador, Hernán Francisco Terenzi ; co-orientador, Javier Ignacio Vernal. - Florianópolis, SC, 2012.  
127 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. *Mycobacterium tuberculosis*. 3. S-nitrosilação. 4. PtpA PtkA. 5. SapM. I. Terenzi, Hernán Francisco. II. Vernal, Javier Ignacio. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

**“Efeito da S-nitrosilação sobre a estrutura de PtpA, e clonagem e caracterização inicial de PtkA e SapM de *Mycobacterium tuberculosis*”**

por

**Camila Matiollo**

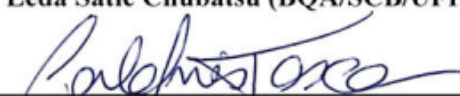
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 22/PPGBQA/2012) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

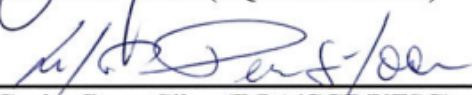
Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Hernán Francisco Terenzi**  
**(Presidente/BOA/CCB/UFSC)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Javier Vernal (Coorientador)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Leda Satie Chubatsu (BQA/SCB/UFPR)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Carla Ines Tasca (BQA/CCB/UFSC)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Carlos Peres Silva (BQA/CCB/UFSC)**

\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 13 de dezembro de 2012.



Dedico este trabalho à minha mãe,  
Marisa, e ao meu namorado  
Leonardo.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que ajudaram neste trabalho. Como não foram poucos, não tenho a pretensão de agradecer nomeadamente a todos, pois esqueceria alguém, inevitavelmente. Assim, aqueles que se reconhecerem aqui, sintam-se agradecidos, com todo o meu carinho. Mas, algumas pessoas eu desejo agradecer especialmente:

Ao meu orientador, professor Dr. Hernán Terenzi, por ter me aceitado no laboratório em 2007 na iniciação científica, e, em seguida, no mestrado. Pela confiança e por disponibilizar todos os recursos para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu coorientador, professor Dr. Javier Vernal, que me ensinou e incentivou em todos os momentos, permitindo que eu construísse meu caminho. Agradeço por dividir seu conhecimento, pelo incentivo, paciência, conselhos, bom humor e por servir de exemplo de pesquisador e ser humano.

Aos meus queridos colegas do Centro de Biologia Molecular Estrutural e, principalmente, aqueles que se tornaram grandes amigos, com que compartilhei e aprendi muito: Carolina Botelho, Deise Kolling, Louise Delatorre, Priscila Martins, Gabrielle Müller, Angélica Cavalett, Tiago Bortolotto, Jean Bertoldo, Gabriel Kreft, Paulo César Leal, Elis Amaral Rosa, Vanessa Oliveira e Martina Blank. Em especial a Gabriela Ecco, Angela Menegatti e Guilherme Razzera, que fizeram parte deste trabalho.

A minha mãe, Marisa, pelo amor, zelo, paciência, apoio em todos os momentos da minha vida e pelos sacrifícios que fez para que eu pudesse conquistar meus objetivos.

Ao meu namorado Leonardo, pela sua imensa paciência e apoio, tanto moral quanto técnico, e todo o amor nos meus melhores e piores dias!

À UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo e ao CNPQ, MCT, FINEP, FAPESC e Instituto de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB).





Os grandes estão partindo. Mas seu legado continua através de seus aprendizes cujas vidas tocadas por eles foram. E novos grandes surgirão, para viver, ensinar e partir novamente plantando sementes em mentes pequenas. E elas crescerão. Enquanto houver mestres e discípulos ainda há esperança.

Pelicano



MATIOLLO, C. Efeito da S-nitrosilação sobre a estrutura de PtpA, e clonagem e caracterização inicial de PtkA e SapM de *Mycobacterium tuberculosis*. 2012. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

## RESUMO

A S-nitrosilação de PtpA de *Mycobacterium tuberculosis* diminui sua atividade fosfatase. O objetivo deste trabalho é investigar o efeito da S-nitrosilação nos parâmetros cinéticos e na estabilidade térmica de PtpA. Por meio de ensaios de *biotin switch* observou-se que a substituição do resíduo Cys53 por um resíduo de alanina em mutantes resultou em proteínas incapazes de se ligar a biotina após tratamento com doador de NO. Observou-se também que a  $K_M$  da PtpA nitrosilada foi semelhante à sua forma não modificada, mas a  $V_{max}$  foi reduzida pela metade. Em contraste, a mutante C53A tratada com GSNO mostrou  $K_M$  e  $V_{max}$  semelhantes à forma não tratada. Na desnaturação térmica de PtpA S-nitrosilada, a  $T_M$  diminuiu consideravelmente na proteína selvagem, C11A e C16A, porém as mutantes C53A, C11A/C53A e C16A/C53A não tiveram mudanças significativas. Esses resultados sugerem que a S-nitrosilação ocorre especificamente na C53 não catalítica, essa alteração não afeta a afinidade pelo substrato e a S-nitrosilação da Cys53 afeta a estabilidade térmica da proteína. Por outro lado, outras duas proteínas de *M tuberculosis* foram estudadas, PtkA e SapM. A tirosina cinase PtkA fosforila a PtpA em dois resíduos de tirosina situados no PDYY-loop e se autofosforila na Tyr262. Neste trabalho, a PtkA recombinante foi expressa em bactérias *E. coli* BL21(DE3) e purificada por IMAC. Ensaio de CD revelaram que a proteína apresenta 42% de  $\alpha$ -hélice e 7% de folha- $\beta$ , o que sugere que a proteína recombinante está corretamente enovelada. Por pertencer a família de proteínas HAD, a PtkA requer  $Mg^{2+}$  para a hidrólise do ATP. Foi observado que a  $T_M$  da proteína aumenta consideravelmente na presença do metal, de 31 °C para 43 °C. Assim pode-se dizer que a ligação do metal ao sítio ativo estabiliza a estrutura terciária da proteína. A PtkA também é S-nitrosilada, porém o efeito dessa modificação pós-traducional sobre a atividade e estrutura da proteína ainda é desconhecido. A sequência de DNA que codifica SapM também foi inserida no vetor de expressão pET-14b. Diversas condições de expressão foram testadas sendo que se obteve maior rendimento em bactérias *E. coli* BL21 (DE3) pLysS na temperatura e tempo de indução

de 15 °C por 20 horas. Como a proteína permaneceu na fração insolúvel do lisado bacteriano, essa teve que ser solubilizada pela adição de ureia 8M e posteriormente purificada por IMAC. As condições para o correto re-enovelamento ainda devem ser otimizadas para dar sequência à caracterização de SapM.

Palavras-chave: S-nitrosilação, PtpA, PtkA, SapM, *Mycobacterium tuberculosis*.

MATIOLLO, C. Efeito da S-nitrosilação sobre a estrutura de PtpA, e clonagem e caracterização inicial de PtkA e SapM de *Mycobacterium tuberculosis*. 2012. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

## ABSTRACT

The S-nitrosylation of *Mycobacterium tuberculosis* PtpA decreases its phosphatase activity. The aim of this work is to investigate the effect of S-nitrosylation in PtpA kinetic parameters and thermal stability. By biotin switch assays it was observed that the substitution of Cys53 residue by an alanine residue in mutants C53A, C53A/C11A, C53A/C16A and C53A/C11A/C16A resulted in proteins unable to bind biotin upon NO donor treatment. It was also observed that the  $K_M$  of nitrosylated PtpA was similar to its unmodified form, but the  $V_{max}$  was reduced to half. In contrast, C53A treated with GSNO showed  $K_M$  and  $V_{max}$  similar to the untreated form. Thermal denaturation of S-nitrosylated PtpA was evaluated by CD spectroscopy. When GSNO was added to PtpA, the  $T_M$  decreased in wild type, C11A and C16A, while significant differences in C53A, C11A/C53A and C16A/C53A mutants were not observed. These results suggest that S-nitrosylation occurs specifically in the non-catalytic Cys53, this modification does not affect substrate affinity, and S-nitrosylated Cys53 affects protein thermal stability. Moreover, two other *M. tuberculosis* proteins are studied, PtkA and SapM. Tyrosine kinase PtkA phosphorylates PtpA in two tyrosine residues located in PDYY-loop and autophosphorylates at Tyr262. In this work, recombinant PtkA was expressed in *E. coli* BL21 (DE3), and purified by IMAC. CD experiments reveal that the protein has 42%  $\alpha$ -helix and 7%  $\beta$ -sheet, which suggest that the recombinant protein is properly coiled. Like other proteins belonging to HAD family, PtkA requires  $Mg^{2+}$  for ATP hydrolysis. It was observed that the  $T_M$  of this protein greatly increases in the presence of metal, from 31 °C to 43 °C. Thus, it can be said that the metal binding to the active site of this enzyme stabilizes the tertiary structure of the protein. It was observed that PtkA is also S-nitrosylated, but the effect of this post-translational modification on the structure and activity of the protein is still unknown. The DNA sequence encoding SapM was also inserted into the expression vector pET-14b. Various expression conditions were tested. The higher yield was obtained in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS during 20 hours of induction at 15 °C. As the protein remained in the insoluble

fraction of the bacterial lysate, it had to be solubilized by addition of 8M urea, and further purified by IMAC. The conditions for proper re-folding still have to be optimized in order to be able to continue SapM characterization .

Keywords: S-nitrosylation, PtpA, PtkA, SapM, *Mycobacterium tuberculosis*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida do <i>M. tuberculosis</i> durante a tuberculose pulmonar.....	19
<b>Figura 2:</b> Estrutura tridimensional da PtpA de <i>M. tuberculosis</i> .....	21
<b>Figura 3:</b> Mecanismo geral de catálise das PTPs baseadas em cisteína. .....	21
<b>Figura 4:</b> Mecanismo de ação de PtpA na interrupção de processos celulares do macrófago hospedeiro.....	23
<b>Figura 5:</b> Esquema da reação de S-nitrosilação.....	24
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática da estrutura da PtpA de <i>M. tuberculosis</i> S-nitrosilada em C53.....	26
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática da mutação sítio-dirigida realizada pelo kit <i>QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit</i> (Stratagene®).....	33
<b>Figura 8:</b> Cromatografia de Afinidade por Metal Imobilizado.....	35
<b>Figura 9:</b> Representação esquemática do ensaio de “ <i>Biotin Switch</i> ”..	37
<b>Figura 10:</b> Mapa do vetor pGEM®-T Easy.....	44
<b>Figura 11:</b> Mapa do vetor de expressão pET-14b.....	45
<b>Figura 12:</b> <i>Região de inserção no vetor pET-14b</i> .....	46
<b>Figura 13:</b> Esquema da indução da expressão gênica no vetor pET-14b por IPTG.....	46
<b>Figura 14:</b> Mutação sítio-dirigida de acordo com HIGUCHI; KRUMMELL; SAIKI (1988).....	50
<b>Figura 15:</b> Extração dos plasmídeos mutados após propagação em bactérias XL10-Gold competentes.....	52
<b>Figura 16:</b> Purificação da PtpA recombinante por IMAC em cromatógrafo ÄKTA.....	53
<b>Figura 17:</b> Ensaio de biotinição de PtpA e mutantes para detecção de proteínas S-nitrosiladas.....	55
<b>Figura 18:</b> Espectro MALDI-TOF de PtpA selvagem.....	56
<b>Figura 19:</b> Espectro MALDI-TOF de PtpA C11A.....	56
<b>Figura 20:</b> Espectro MALDI-TOF de PtpA C16A.....	57
<b>Figura 21:</b> Espectro MALDI-TOF de PtpA C53A.....	57
<b>Figura 22:</b> Espectro TOF-TOF do precursor de <i>m/z</i> 1893.....	59

<b>Figura 23:</b> Espectro TOF-TOF do precursor de $m/z$ 2275.....	60
<b>Figura 24:</b> Espectro TOF-TOF do precursor de $m/z$ 1814.....	61
<b>Figura 25:</b> Atividade específica de PtpA mensurada através da hidrólise do <i>pNPP</i> .....	62
<b>Figura 26:</b> Cinética de PtpA selvagem e mutante C53A tratadas com GSH ou GSNO.....	63
<b>Figura 27:</b> Espectroscopia de dicroísmo circular de PtpA selvagem e mutantes.....	65
<b>Figura 28:</b> Espectroscopia de dicroísmo circular de PtpA selvagem depois do tratamento com GSH e GSNO. ....	65
<b>Figura 29:</b> Perfil de desnaturação térmica de PtpA selvagem e mutantes após tratamento com GSH, GSNO ou GSNO e DTT.....	67
<b>Figura 30:</b> Variação da $T_M$ de PtpA selvagem e mutantes depois do tratamento com GSNO.....	68
<b>Figura 31:</b> Desvios do deslocamento químico observados em espectros bidimensionais de correlação heteronuclear ( $^{15}\text{N}$ -HSQC) da PtpA submetida a diferentes concentrações de GSNO.....	70
<b>Figura 32:</b> Amplificação do gene que codifica a proteína PtkA a partir do DNA genômico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . ....	72
<b>Figura 33:</b> Clivagem do vetor <i>pGEM</i> <sup>®</sup> - <i>T Easy</i> com as enzimas de restrição <i>NdeI</i> e <i>BamHI</i> liberando o fragmento gênico que codifica a PtkA.....	72
<b>Figura 34:</b> Digestão do vetor de expressão pET-14b com as enzimas de restrição <i>NdeI</i> e <i>BamHI</i> .....	73
<b>Figura 35:</b> PCR de colônia de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ transformadas com o vetor ligado ao fragmento.....	73
<b>Figura 36:</b> Digestão dos plasmídeos pET14b- <i>Mt_PtkA</i> com as enzimas <i>NdeI</i> e <i>BamHI</i> .....	74
<b>Figura 37:</b> Purificação da PtkA recombinante por IMAC em cromatógrafo ÄKTA.....	75
<b>Figura 38:</b> Espectro MALDI-TOF de PtkA intacta.....	76
<b>Figura 39:</b> Identificação de PtkA por espectrometria de massa MALDI-TOF.....	77
<b>Figura 40:</b> Alinhamento da sequência de PtkA de <i>M. tuberculosis</i> com seus homólogos.....	78
<b>Figura 41:</b> Modelo estrutural de PtkA de <i>M. tuberculosis</i> . ....	79



<b>Figura 42:</b> Espectroscopia de dicroísmo circular de PtkA selvagem... 80	80
<b>Figura 43:</b> Espectroscopia de dicroísmo circular de PtkA selvagem com e sem adição de MgCl <sub>2</sub> ..... 81	81
<b>Figura 44:</b> Perfil de desnaturação térmica de PtkA selvagem com e sem adição de MgCl <sub>2</sub> ..... 81	81
<b>Figura 45:</b> Ensaio de biotilação de PtkA selvagem para a detecção de proteínas S-nitrosiladas. .... 82	82
<b>Figura 46:</b> Mutação sítio-dirigida PtkA C61A.. ..... 83	83
<b>Figura 47:</b> Ensaio de biotilação de PtkA e mutante C61A para detecção de proteínas S-nitrosiladas ..... 84	84
<b>Figura 48:</b> Amplificação do fragmento que codifica a proteína SapM de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . .... 85	85
<b>Figura 49:</b> Clivagem do vetor <i>pGEM</i> <sup>®</sup> - <i>T Easy</i> com as enzimas de restrição <i>XhoI</i> e <i>BamHI</i> liberando o fragmento gênico que codifica a SapM..... 85	85
<b>Figura 50:</b> Digestão do vetor de expressão pET-14b com as enzimas de restrição <i>XhoI</i> e <i>BamHI</i> . .... 86	86
<b>Figura 51:</b> PCR de colônia de <i>E. coli</i> DH5a transformadas com o vetor ligado ao fragmento..... 86	86
<b>Figura 52:</b> Digestão dos plasmídeos pET14b-Mt_PtkA com as enzimas <i>XhoI</i> e <i>BamHI</i> . .... 87	87
<b>Figura 53:</b> Teste de indução da expressão de SapM..... 88	88
<b>Figura 54:</b> Purificação da SapM recombinante por IMAC em cromatógrafo ÄKTA. .... 89	89
<b>Figura 55:</b> Espectro MALDI-TOF de SapM ..... 90	90
<b>Figura 56:</b> Identificação de SapM por espectrometria de massa MALDI-TOF. .... 91	91

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Parâmetros cinéticos ( $V_{max}$ ,  $K_M$  e  $k_{cat}$ ) de PtpA selvagem e mutante C53A depois do tratamento com GSH ou GSNO..... 64

**Tabela 2.** Valores médios das temperaturas de desnaturação ( $T_M$ ) em °C de PtpA e mutantes após tratamentos com GSH (1 mM), GSNO (1 mM) e GSNO (1 mM) + DTT (1 mM). ..... 68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACN</b>	Acetonitrila
<b>AIDS</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BCG</b>	Bacilo Calmette-Guérin
<b>BMRB</b>	<i>Biological Magnetic Resonance Bank</i>
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>CD</b>	<i>Circular Dichroism</i> - Dicroísmo Circular
<b>DC</b>	<i>Dendritic cell</i> - célula dendrítica
<b>DDQ</b>	Desvio de deslocamento químico
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>dNTP</b>	Deoxiribonucleotídeo trifosfato
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EEA1</b>	<i>Early Endosome Antigen - 1</i>
<b>ERN</b>	Espécies Reativas de Nitrogênio
<b>ERO</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>ESI</b>	<i>Electrospray Ionization</i>
<b>GSH</b>	Glutationa
<b>GSNO</b>	S-nitrosoglutationa
<b>HAD</b>	<i>Haloacid Dehalogenase-like Hydrolase</i>
<b>HEN</b>	Tampão HEPES, EDTA e Neocuproína
<b>HENS</b>	Tampão HEPES, EDTA, Neocuproína e SDS
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência humana
<b>HNO</b>	Nitroxil
<b>HOPS</b>	<i>Homotypic Vacuole Fusion and Vacuole Protein Sorting</i>
<b>HPDP-Biotina</b>	N-[6-(Biotinamido)hexil]-3'-(2'-piridilditio) propionamida
<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<b>IMAC</b>	Cromatografia de afinidade por metal imobilizado
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzível
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
<b><math>k_{cat}</math></b>	Constante catalítica
<b><math>K_M</math></b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>LMW-PTP</b>	<i>Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase</i>

<b>MALDI</b>	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MDR</b>	<i>Multidrug resistant</i>
<b>MMTS</b>	Metil-metano-tiosulfonato
<b>Mtb</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NO<sup>+</sup></b>	Cátion nitrosônio
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrito
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Bank</i>
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>pI</b>	Ponto isoelétrico
<b>PMSF</b>	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
<b>pNP</b>	<i>p</i> -nitrofenol
<b>pNPP</b>	<i>p</i> -nitrofenilfosfato
<b>PT3P</b>	Fosfoinositol 3-fosfato
<b>PtkA</b>	Tirosina cinase A de <i>M. tuberculosis</i>
<b>PTP</b>	Tirosina fosfatase
<b>PTP1B</b>	Tirosina fosfatase 1B
<b>PtpA</b>	Tirosina fosfatase A de <i>M. tuberculosis</i>
<b>PtpB</b>	Tirosina fosfatase B de <i>M. tuberculosis</i>
<b>PVDF</b>	Difluoreto de polivinilideno
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RSNOs</b>	S-nitrosotióis
<b>SapM</b>	Fosfatase ácida secretada de <i>M. tuberculosis</i>
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
<b>TB</b>	Tuberculose
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>T<sub>M</sub></b>	<i>Melting Temperature</i>
<b>TOF</b>	<i>Time-of-flight</i>
<b>V<sub>máx</sub></b>	Velocidade máxima
<b>VPS33B</b>	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 33B</i>
<b>Vps-C</b>	<i>Class C vacuolar protein sorting complex</i>
<b>WB</b>	<i>Western Blot</i>
<b>XDR</b>	<i>Extensively drug resistant</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e a tuberculose .....	17
1.2. Proteína tirosina fosfatase A - PtpA - de <i>M. tuberculosis</i> .....	20
1.3. Óxido Nítrico e S-nitrosilação .....	23
1.4. Proteína tirosina cinase A – PtkA - de <i>M. tuberculosis</i> .....	27
1.5. SapM – Fosfatase Ácida Secretada de <i>M. tuberculosis</i> .....	28
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	30
2.1. Objetivo geral .....	30
2.2. Objetivos específicos .....	30
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
3.1 Vetor de expressão da proteína PtpA .....	32
3.2 Mutações sítio-dirigidas de PtpA .....	32
3.3 Preparação de bactérias competentes .....	33
3.4 Transformação de bactérias .....	34
3.5 Expressão das proteínas PtpA e mutantes .....	34
3.6 Purificação das proteínas PtpA e mutantes .....	35
3.7 Ensaio de biotilação para detecção de proteínas S-nitrosiladas ...	36
3.8 Espectrometria de massa .....	38
3.9 Cálculo de atividade específica e ensaios de atividade enzimática de PtpA na presença de GSNO .....	39
3.10 Espectroscopia de Dicroísmo Circular .....	40
3.11. Expressão e purificação de proteínas marcadas com <sup>15</sup> N .....	41
3.12. Ensaio de Ressonância Magnética Nuclear .....	41
3.13. Clonagem dos genes <i>ptkA</i> e <i>sapM</i> de <i>M. tuberculosis</i> .....	42
3.14 Construção dos vetores de expressão dos genes <i>ptkA</i> e <i>sapM</i> .....	45
3.15 Teste de indução da expressão de SapM .....	47
3.16 Expressão e Purificação de SapM .....	47
3.17 Expressão e Purificação de PtkA .....	48
3.18 Ensaio de fosforilação de PtpA pela PtkA .....	48
3.19 Modelagem estrutural .....	49
3.20 Mutação sítio-dirigida de PtkA .....	49
<b>4. RESULTADOS</b> .....	52
4.1 Construção dos plasmídeos mutantes de PtpA .....	52
4.2 Expressão e purificação de PtpA selvagem e mutantes .....	52
4.3 Ensaio de biotilação para detecção de proteínas S-nitrosiladas ..	54
4.4 Confirmação da biotilação por espectrometria de massa MALDI-TOF .....	55
4.5 Ensaio de atividade enzimática de PtpA, PtpA_C16A, PtpA_C53A, PtpA_C16A/C53A na ausência e presença de GSNO. ....	62

4.6 Determinação dos parâmetros cinéticos – $V_{m\acute{a}x}$ , $K_M$ e $k_{cat}$ – de PtpA selvagem e mutante C53A na ausência e presença de GSNO.....	63
4.7 Análise da estrutura secundária de PtpA e mutantes por CD.....	64
4.8 Análise da estabilidade térmica de PtpA e mutantes.....	66
4.9 Ensaios de Ressonância Magnética Nuclear da PtpA.....	69
4.10 Clonagem do gene que codifica a PtkA.....	71
4.11 Expressão e purificação de PtkA recombinante.....	74
4.12. Análise por espectrometria de massa da proteína PtkA.....	76
4.13 Modelagem molecular por homologia estrutural de PtkA.....	77
4.14 Análise da estrutura secundária de PtkA recombinante por Dicroísmo Circular (CD).....	79
4.15 Ensaio de fosforilação de PtpA pela PtkA.....	82
4.16 Ensaio de biotilação de PtkA.....	82
4.17 Mutação sítio-dirigida de PtkA.....	83
4.18 Ensaio de biotilação de PtkA selvagem e mutante C61A.....	84
4.19 Clonagem do gene que codifica SapM de <i>M. tuberculosis</i> .....	84
4.20 Teste de indução da expressão de SapM recombinante.....	87
4.21 Purificação de SapM recombinante.....	88
4.22 Análise por espectrometria de massa da proteína SapM.....	90
4.23 Análise da estrutura secundária de SapM recombinante por CD..	91
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	92
5.1 A S-nitrosilação da C53 não altera a afinidade de PtpA pelo substrato.....	92
5.2 A S-nitrosilação da C53 diminui a estabilidade térmica de PtpA ...	93
5.3 A S-nitrosilação da C53 provoca mudança conformacional na região em torno da modificação.....	93
5.4 Importância da S-nitrosilação de PtpA para a biologia de <i>M. tuberculosis</i> .....	94
5.5 O íon $Mg^{2+}$ é importante para a estabilidade térmica de PtkA de <i>M. tuberculosis</i> .....	95
5.6 A PtkA de <i>M. tuberculosis</i> é S-nitrosilada na C61.....	96
5.7 A SapM de <i>M. tuberculosis</i> permaneceu na fração insolúvel do lisado bacteriano.....	97
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	98
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	100

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Mycobacterium tuberculosis* e a tuberculose

O *Mycobacterium tuberculosis* é o agente etiológico da tuberculose (TB), a segunda causa mais comum de morte em adultos dentro das doenças infecciosas, depois do HIV. Apesar da existência de antibióticos antituberculose e de vacina (BCG, Bacilo de Calmette-Guérin), a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que um terço da população mundial esteja infectada pelo *M. tuberculosis* e que ocorram 1,4 milhão de mortes por tuberculose todo ano (OMS, 2012). O aumento do número de casos tem sido atribuído a diversos fatores, entre eles o aumento da resistência aos fármacos, a pandemia HIV/AIDS, o maior número de usuários de drogas injetáveis e o envelhecimento da população (DUCATI et al., 2006).

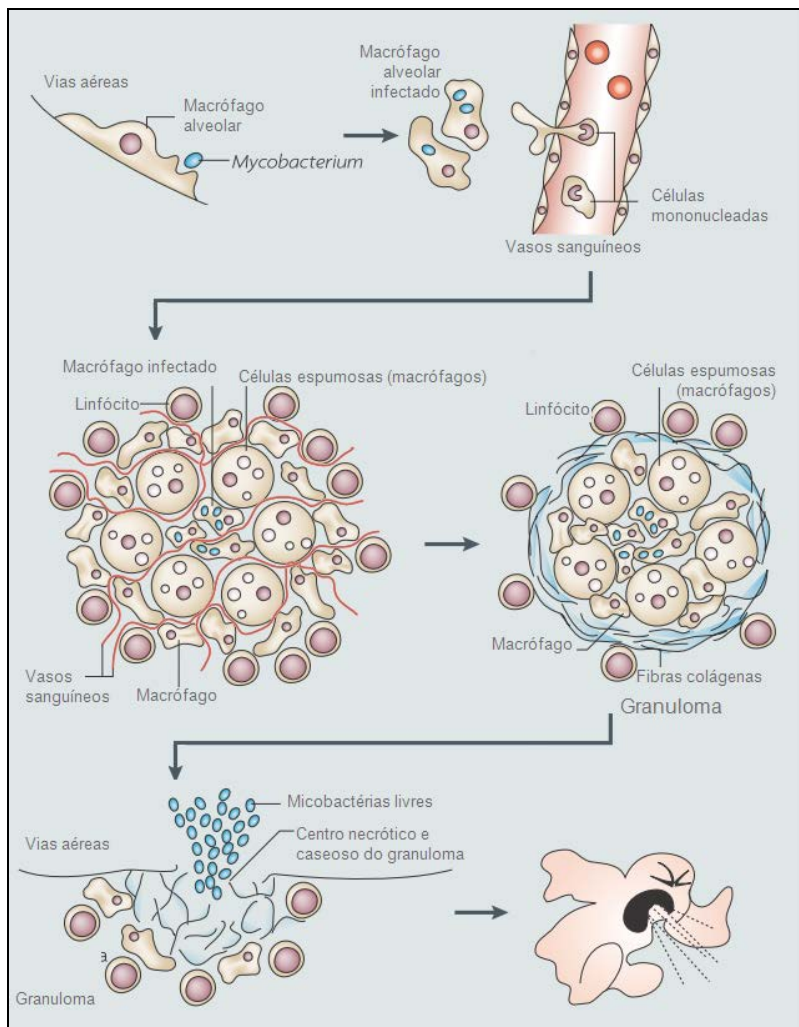
A eficácia da vacina e do tratamento para a tuberculose vem sendo questionada por muitos estudos. A vacina BCG protege apenas contra as formas mais agressivas da doença e, principalmente, as crianças (RUSSELL; BARRY; FLYNN, 2010). O tratamento é longo, com seis meses de duração e, segundo recomendações da OMS, consiste na administração combinada de quatro fármacos: isoniazida, rifampicina, pirazinamida e estreptomina (ou etambutol) durante os dois primeiros meses, seguidos da combinação de isoniazida e rifampicina nos quatro meses posteriores (DUCATI et al., 2006). Além de longo, o tratamento tem vários efeitos colaterais, o que leva alguns pacientes a desistirem do mesmo. Isso permitiu o desenvolvimento de cepas multi-resistentes (MDR; *multidrug resistant*) e ultra-resistentes (XDR; *extensively drug resistant*), o que dificulta ainda mais o controle dessa doença (DORMAN; CHAISSON, 2007). Há, portanto, uma necessidade crescente do desenvolvimento de novos fármacos que auxiliem no tratamento dessa doença. Com essa finalidade, torna-se fundamental um melhor entendimento das complexas interações entre o patógeno e seu hospedeiro humano (KOUL et al., 2011).

A tuberculose humana atinge principalmente o sistema respiratório, sendo transmitida pela inalação de bacilos de *M. tuberculosis* suspensos no ar os quais, 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 pró-inflamatória que leva à formação do granuloma ou tubérculo. Esse granuloma consiste em

macrófagos e outros fagócitos que, juntamente com linfócitos e fibras colágenas da matriz, circundam as células infectadas pelo bacilo, 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 estabelecida a infecção latente. Um dos principais mecanismos micobacteriostáticos dos macrófagos é a produção de óxido nítrico pela ação da enzima óxido nítrico sintase 2 (iNOS) (DUCATI et al., 2006). No entanto, quando o sistema imune do hospedeiro está comprometido, por causas como desnutrição, envelhecimento, terapia com inibidores de iNOS, coinfeção com HIV (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) (Figura 1). Aproximadamente 15% dos pacientes com tuberculose ativa desenvolve ainda a tuberculose extrapulmonar, a qual é causada pelo crescimento bacteriano excessivo, que invade a corrente sanguínea (DUCATI et al., 2006). Uma vez na corrente sanguínea, as micobactérias podem infectar diversas outras partes do organismo, como sistema nervoso central, articulações, aparelho genitourinário, olhos, pele, e pericárdio (GUPTA; KUMAR, 2011; MEHTA et al., 2012).

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 – MAPK, INF- $\gamma$ , calmodulina – 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. Estudos recentes apontam que essa inibição ocorre pela ação de proteínas cinases e fosfatases sintetizadas pela micobactéria (HOUBEN et al., 2006; PIETERS, 2008; CHAO et al., 2010).





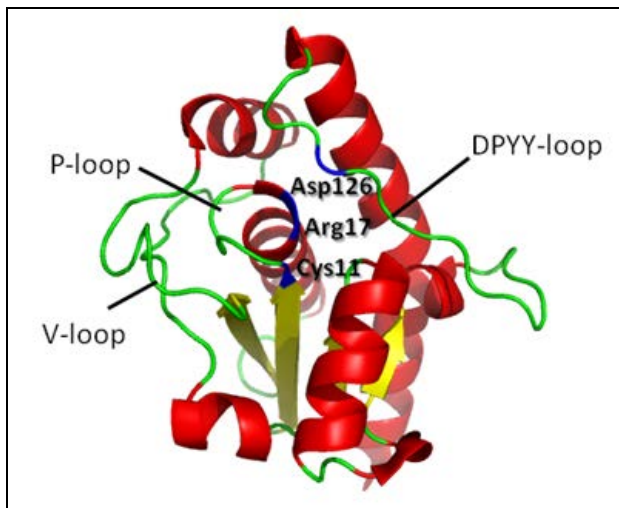
**Figura 1:** Ciclo de vida do *M. tuberculosis* durante a tuberculose pulmonar. A infecção é iniciada quando bacilos são inalados e fagocitados por macrófagos alveolares residentes. Isso leva a uma resposta pró-inflamatória, que provoca o recrutamento de monócitos da circulação, bem como a neovascularização do local da infecção. Os macrófagos nos granulomas se diferenciam em células epitelióides, células gigantes multinucleadas e células espumosas cheias de gotículas lipídicas. Em volta do granuloma forma-se uma cápsula de material fibroso da matriz extracelular. Muitos dos granulomas persistem nesse estado de equilíbrio, mas com a progressão para doença os bacilos infecciosos são liberados para as vias aéreas. Adaptado de Russel (2007).

## 1.2. Proteína tirosina fosfatase A - PtpA - de *M. tuberculosis*

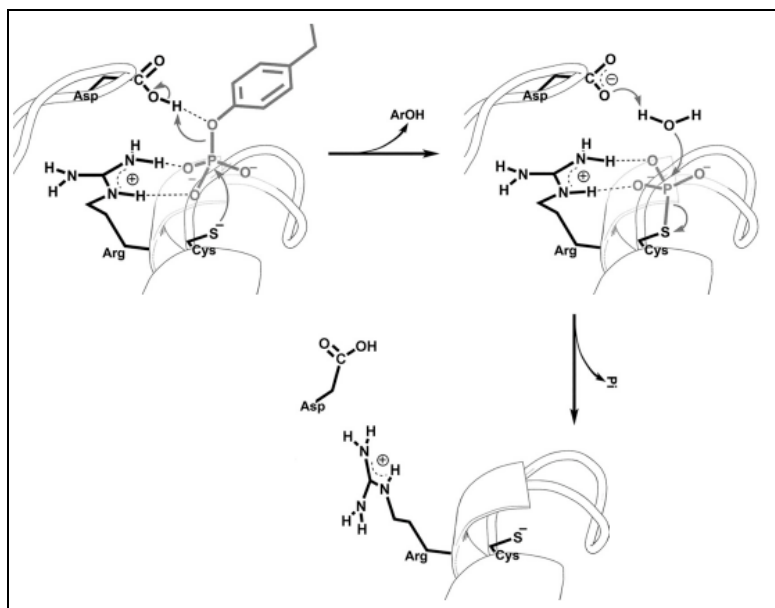
As proteínas cinases são mediadores chave da transdução de sinais. Elas são responsáveis pela transferência de um grupo fosfato de um doador para um aminoácido aceptor em um substrato proteico, processo chamado de fosforilação. Já o processo inverso - desfosforilação - é mediado por proteínas fosfatases. Assim, a fosforilação e desfosforilação de proteínas é um mecanismo regulatório versátil e sofisticado para a adaptação das células a mudanças ambientais tanto em organismos procarióticos quanto eucarióticos (BACH; WONG; AV-GAY, 2009). O balanço entre fosforilação e desfosforilação de proteínas é a base para o controle de diversos eventos biológicos disparados por efetores extracelulares, como hormônios, mitógenos, carcinógenos, citocinas, neurotransmissores, substâncias ou metabólitos tóxicos. A ação desses efetores está envolvida em diferentes processos como regulação da divisão, diferenciação, desenvolvimento e morte celular, regulação do metabolismo e expressão gênica, contração, transporte, locomoção celular, aprendizado e memória (AOYAMA et al., 2003).

O *M. tuberculosis* possui, de acordo com seu genoma (COLE et al., 1998; COLE et al., 2002), apenas duas proteínas tirosina fosfatases, PtpA e PtpB, ambas enzimas secretadas e envolvidas na patogenicidade desse micro-organismo.

A PtpA (Figura 2) é uma LMW-PTP (*Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase*) que desfosforila especificamente resíduos de tirosina (KOUL et al., 2000). Ela pertence à classe das PTPs baseadas em cisteína, como o nome sugere, possuem um mecanismo catalítico baseado em um resíduo de cisteína. O resíduo de cisteína catalítico (presente no motivo CX5R) age como nucleófilo e o resíduo de arginina conservado está envolvido na ligação do substrato e na estabilização do intermediário de reação (Figura 3). 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. 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 2:** 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.



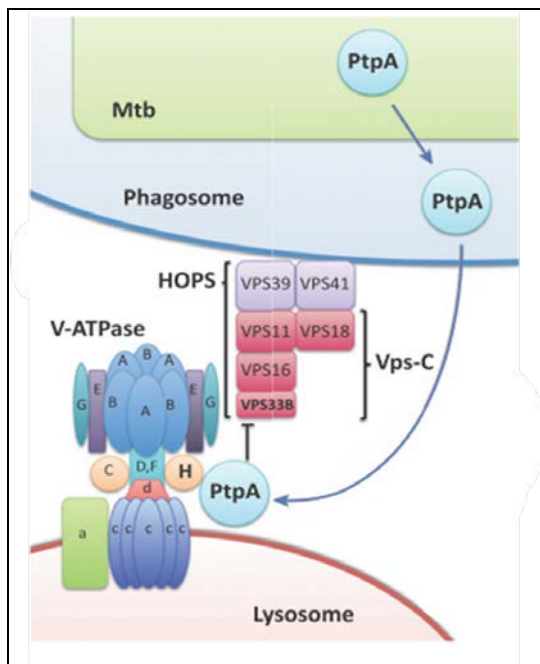
**Figura 3:** Mecanismo geral de catálise das PTPs baseadas em cisteína. Os resíduos de Cys, Arg e Asp catalíticos estão destacados e o grupo fosfato é mostrado no sítio ativo. A arginina estabiliza o substrato enquanto o ataque

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).

Assim como a PtpB, a PtpA é secretada no citosol do macrófago e sua expressão é aumentada quando ocorre a infecção dessas células (COWLEY; BABAKAIFF; AV-GAY, 2002), o que sugere uma interação dessa proteína com os macrófagos do hospedeiro. 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, foi o primeiro substrato fisiológico conhecido de PtpA. A VPS33B é uma subunidade do Vps-C (*class C vacuolar protein sorting complex*), o qual faz parte do complexo HOPS (*Homotypic Vacuole Fusion and Vacuole Protein Sorting*), um complexo proteico que promove a ancoragem e fusão de vesículas com membranas alvo. A desfosforilação de VPS33B pela PtpA prejudica o funcionamento desse complexo e impede a fusão do fagossomo com o lisossomo no macrófago (Figura 4). A fusão fagossomo-lisossomo é uma resposta celular do processo infeccioso que é inibida pelo *M. tuberculosis*. A PtpA é, portanto, um importante fator de virulência de *M. tuberculosis*, envolvido no estabelecimento da infecção desse patógeno (BACH et al., 2008).

Recentemente, foi demonstrado que a PtpA também se liga à subunidade H da ATPase macrófago-vacuolar- $H^+$  (V-ATPase), um complexo de proteínas na membrana do fagossomo responsável pela acidificação luminal. Essa interação da PtpA com a V-ATPase do macrófago é necessária para a desfosforilação do VPS33B, anteriormente relatada, e posterior exclusão da V-ATPase do fagossomo durante a infecção por *M. tuberculosis* (Figura 4). Essas descobertas mostram que a inibição da acidificação do fagossomo pelas micobactérias pode ser atribuída diretamente à PtpA (WONG et al., 2011; WONG, CHAO e AV-GAY, 2012).



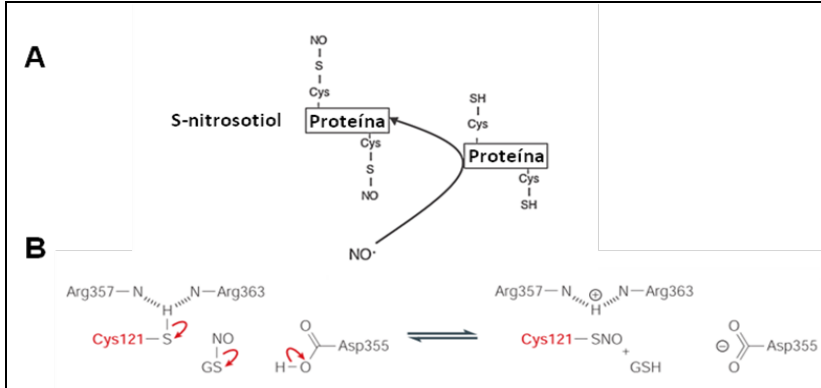
**Figura 4:** Mecanismo de ação de PtpA na interrupção de processos celulares do macrófago hospedeiro. A PtpA é secretada para o citosol do macrófago, onde se liga à subunidade H da V-ATPase de forma a localizar especificamente o seu substrato, a VPS33B na interface de fusão do fagossoma-lisossoma. VPS33B é uma subunidade do complexo Vps-C, que serve como o núcleo de fusão homotípica e triagem de proteínas (HOPS) e regula o tráfico de membrana ao longo da via endocítica. A desfosforilação de VPS33B, finalmente, resulta na exclusão de V-ATPase a partir do fagossoma micobacteriano. Adaptado de WONG, CHAO e AV-GAY (2012).

### 1.3. Óxido Nítrico e S-nitrosilação

O óxido nítrico (NO) é um radical lipofílico pequeno, ubíquo e altamente difusível. É a principal espécie reativa de nitrogênio (ERN) presente nas células e também a principal fonte de outras ERN. O termo ERN se refere a vários produtos de nitrogênio como nitroxil (HNO), cátion nitrosônio (NO<sup>+</sup>), óxidos de nitrogênio, S-nitrosotióis (RSNOs), peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), dentre outros. O NO possui propriedades químicas que o tornam um agente sinalizador versátil, envolvido em uma série de processos fisiológicos em espécies filogeneticamente distantes (LAMATTINA et al., 2003). Em mamíferos, está envolvido em diversos processos patofisiológicos como respostas imune e

inflamatória, neurotransmissão e homeostase vascular (TUTEJA et al., 2004).

Nos meios biológicos, as ERN induzem reações que incluem nitrosilação de grupo sulfidril (S-nitrosilação) ou metais (como ferro, cobre e zinco), e nitração de resíduos de tirosina (MARTÍNEZ; ANDRIANTSITOHAINA, 2009; ASTIER et al., 2011). 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  $O_2$ , 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).



**Figura 5:** Esquema da reação de S-nitrosilação. **A**, Esquema geral da S-nitrosilação de uma proteína, que produz um S-nitrosotiol. **B**, Esquema da reação de S-nitrosilação (transnitrosilação) de uma metionina adenisiltransferase hepática, mediada por S-nitrosoglutathione (GSNO). O resíduo de Cys S-nitrosilado está destacado em vermelho. Adaptado de MARTÍNEZ; ANDRIANTSITOHAINA, 2009 e HESS et al., 2005.

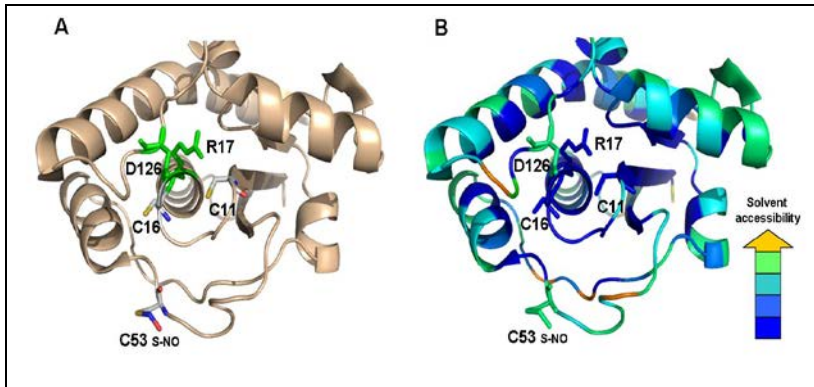
Várias PTPs são S-nitrosiladas como consequência da ação do NO, o que resulta, por exemplo, na perda de atividade e/ou proteção

contra oxidação irreversível (CASELLI et al., 1994; TAKAKURA et al., 1999; XIAN et al., 2000; CHEN et al., 2008). A proteína humana PTP1B, por exemplo, é S-nitrosilada no resíduo de cisteína catalítico Cys215. Essa nitrosilação 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 micro-organismos está relacionada à atividade antimicrobiana das ERN contra *Coxsackievirus*, HIV-1, *Leishmania infantum*, *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma cruzi* (STAMLER; LAMAS; FANG, 2001).

Apesar do *M. tuberculosis* estar constantemente exposto a ERN durante a infecção, o efeito molecular do NO nesse patógeno ainda não é bem estabelecido. Algumas estruturas de *M. tuberculosis* associadas à resposta ao NO como o proteassomo (DARWIN et al., 2003), o sistema tiorredoxina (ATTARIAN et al., 2009) e a histidina cinase DosS (KUMAR et al., 2007), já são conhecidas, mas a compreensão integral desse processo ainda é limitada. Por um lado, há estudos que apontam as ERN como uma das principais ações microbicidas 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).

O S-nitroso proteoma do *M. tuberculosis* identificou 29 proteínas S-nitrosiladas no micro-organismo, porém a PtpA não consta nessa relação (RHEE et al., 2005). Entretanto, recentemente, nosso grupo mostrou que enquanto a PtpB não sofre S-nitrosilação, a PtpA é passível dessa modificação pós-traducional. Por mutações sítio-dirigidas nas cisteínas (C11A, C16A e C53A) foi observada que a S-nitrosilação ocorre na C53. Como consequência, a S-nitrosilação na C53 de PtpA diminui sua atividade fosfatase (ECCO et al., 2010). 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 (C11). Uma possibilidade é que a nitrosilação de PtpA na C53 ocorra devido à localização desse resíduo. A estrutura da enzima mostra claramente que a C53 é mais acessível ao solvente, em comparação com a C11 e a C16, que se localizam no P-loop (Figura 6) (ECCO et al., 2010).



**Figura 6:** Representação esquemática da estrutura da PtpA de *M. tuberculosis* S-nitrosilada em C53 (adaptada do arquivo PDB 1U2P). **A**, representação da proteína com as três cisteínas (C11, C16 e C53) e os resíduos catalíticos (C11, R17 e D126) destacados. A S-nitrosilação da C53 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 C53 é claramente mais exposta que as outras cisteínas. Fonte: ECCO et al. (2010).

Essa observação sugere que a localização desse resíduo na PtpA pode ter um papel importante na determinação da seletividade da S-nitrosilação da PtpA (ECCO et al., 2010). Porém, ainda é difícil prever qual resíduo de cisteína 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 nas quais somente 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 (C3635) é S-nitrosilada (SUN et al., 2001; HESS et al., 2005). Estudos recentes têm demonstrado que a acessibilidade do tiol reativo ao doador de NO, bem como a ação de efetores alostéricos (como  $O_2$  e  $Ca^{2+}$ ) são determinantes críticos da especificidade da S-nitrosilação (FOSTER; FORRESTER; STAMLER, 2009).

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).

Nesse contexto, ainda não se sabe como a S-nitrosilação em um resíduo de cisteína que não pertence ao sítio ativo, como na PtpA, possa alterar a sua atividade. Como o efeito da S-nitrosilação não é diretamente no sítio catalítico, supõe-se que essa modificação na C53 altere a conformação estrutural de PtpA de modo a interferir na sua atividade fosfatase. Para confirmar essa hipótese, estudos estruturais devem ser realizados. Por outro lado, também não se sabe se a S-nitrosilação afeta a interação da PtpA com a cinase correspondente, a PtkA, nem se esta também é S-nitrosilada e, conseqüentemente, a importância disso na patogênese da tuberculose.

#### **1.4. Proteína tirosina cinase A – PtkA - de *M. tuberculosis***

Recentemente, Bach, Wong e Av-Gay (2009) detectaram a presença de uma fosfotirosina cinase em *M. tuberculosis* - PtkA - codificada pelo gene *Rv2232*. O produto desse gene foi inicialmente anotado como um membro da superfamília HAD (*Haloacid Dehalogenase-like hydrolase*) (COLE et al., 1998; COLE et al., 2002). Até o momento não tinha sido identificada nenhuma tirosina cinase em *M. tuberculosis*. Nesse trabalho, foi demonstrado que a PtkA fosforila PtpA em dois resíduos de tirosina (Tyr128 e Tyr129) situados no DPYY-loop e se autofosforila na Tyr262 (BACH; WONG; AV-GAY, 2009; STEHLE et al., 2012). Também foi observado que a 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 (BACH; WONG; AV-GAY, 2009). Foram supostas duas hipóteses sobre o papel da fosforilação da PtpA: a fosforilação poderia tanto modular a atividade dessa enzima como regular sua secreção (CHAO et al., 2010).

Em diversos tipos de LMW-PTP, a fosforilação ocasiona ou o aumento da atividade (TAILOR et al., 1997; BUCCIANTINI et al., 1999) ou a regulação negativa (SCHWARZER et al., 2006). A regulação da LMW-PTP humana HCPTP-A, a qual possui 37% de similaridade de sequência em relação à PtpA, é realizada pela fosforilação dos dois resíduos de tirosina adjacentes conservados (Y131, Y132) pela pp60<sup>v-Src</sup>. Embora a fosforilação da Y131 aumente a atividade da enzima fosfatase em 25 vezes, a fosforilação da Y132 não afeta a atividade da enzima, porém conduz ao recrutamento de uma

proteína importante para a transdução do sinal. Assim, esses resultados indicam que ambos os resíduos de tirosina são de uma importância crucial para a regulação funcional e estrutural de HCPTP-A (BUCCIANINI et al., 1999). Dessa maneira, supõe-se que tanto a fosforilação de PtpA em Y128/Y129 pela PtkA, quanto a mudança conformacional no DPYY-*loop* decorrente da fosforilação, tenham um papel importante na relação estrutura-atividade de PtpA (STEHLE et al., 2012).

### 1.5. SapM – Fosfatase Ácida Secretada de *M. tuberculosis*

Inicialmente, o gene *Rv3310* de *M. tuberculosis* foi anotado como uma proteína hipotética (COLE et al., 1998). De acordo com sua estrutura primária, essa proteína hipotética possuiria massa molecular de 31,807 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 6,14. Contudo, Saleh e Belisle (2000) identificaram-a em filtrado de cultura de *M. tuberculosis* como uma fosfatase ácida secretada, de aproximadamente 27 kDa. Por espectrometria de massa, foi confirmado que essa proteína não possui os primeiros 43 aminoácidos do produto gênico predito, sendo estes característicos de uma sequência N-terminal procariótica responsável pela secreção SecA-dependente (SALEH; BELISLE, 2000; WONG, CHAO e AV-GAY, 2012). As vias SEC estão envolvidas no translocamento de proteínas através da membrana plasmática pela identificação do peptídeo sinal e sua clivagem após o evento de secreção (CHAMPION; COX, 2007). Assim, essa fosfatase ácida de 27 kDa foi designada SapM (*Secreted acid phosphatase of M. tuberculosis*) e, devido a sua natureza secretora, foi sugerido que SapM pudesse interagir com moléculas do hospedeiro durante a infecção (SALEH; BELISLE, 2000).

A sequência de aminoácidos de SapM não apresenta homologia significativa com nenhum outro gênero de proteínas procarióticas. Também não apresenta motivos característicos de proteínas fosfotreonina/serina e tirosina fosfatases, metalofosfoesterases, histidina fosfatases. Contudo, possui dois resíduos de histidinas, 93 e 204 (numeração correspondente à sequência original do gene *sapM*), que são conservados nas regiões altamente homólogas de fosfatases ácidas de fungos como a fosfatase ácida de *Penicillium chrysogenum* (Pc-PhoA) (HAAS et al., 1992), de *Aspergillus (niger) ficuum* (Af-PhoA) (EHRlich et al., 1994) e de *Kluyveromyces lactis* (Kl-PhoX) (FERMINAN; DOMINGUEZ, 1997) (SALEH; BELISLE, 2000).

Inicialmente, foi concluído que SapM não tinha qualquer atividade contra fosfolípidos, com base na ausência de atividade com fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e ácido fosfatídico (SALEH; BELISLE, 2000). Contudo, um estudo de Vergne e colaboradores (2005) demonstrou que a concentração do PI3P - um lipídio regulador do tráfico de membranas e essencial para fusão fagossomo lisossomo - é mantida em fagossomos contendo micobactérias mortas, mas é diminuída em fagossomos com bacilos vivos. Esse trabalho mostrou que a remoção do PI3P é provocada pela sua desfosforilação promovida pela SapM. Isso sugeriu que essa fosfatase também medeia a detenção da maturação do fagossoma por perturbar o recrutamento de proteínas efetoras de PI3P tais como o antígeno endossomal precoce 1 (EEA1 – *Early Endosome Antigen 1*). Nesse mesmo estudo, a adição de SapM *in vitro* inibiu a fusão tardia dos fagossomas (VERGNE et al., 2005).

Em um estudo mais recente, camundongos vacinados com *Mycobacterium bovis* BCG ( $\Delta sapM$ ) apresentaram uma sobrevivência prolongada quando infectados com *M. tuberculosis* (FESTJENS et al., 2011). Isso porque, a vacina BCG  $\Delta sapM$  foi mais eficaz na indução de recrutamento e ativação de células dendríticas (DC) CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>int</sup> CD40<sup>int</sup> durante o processo inflamatório. O aumento da eficácia da vacina pode ser o resultado de uma falta de inibição da maturação do fagossoma, permitindo apresentação de antígenos e ativação bem-sucedida da imunidade adaptativa por células dendríticas. Assim, SapM inibe a migração de células dendríticas para sua ativação nos gânglios linfáticos que drenam o local de vacina BCG subcutânea. Esse estudo também mostrou que a dupla supressão  $\Delta fbpA\Delta sapM$  em *MtbH37Rv* resultou em uma cepa altamente atenuada e imunogênica, apoiando ainda mais o papel de SapM no bloqueio da maturação do fagossoma (SAIKOLAPPAN et al., 2012).

Apesar da importância de SapM na imunogenicidade de *M. tuberculosis*, ainda não existe nenhum inibidor específico para essa fosfatase, possivelmente devido ao estudo limitado dessa proteína e ao limitado conhecimento acerca dos possíveis alvos aos quais os inibidores deveriam se ligar nessa família de fosfatases (WONG; CHAO; AV-GAY, 2012).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

- Investigar o efeito da S-nitrosilação sobre os parâmetros cinéticos, estrutura secundária, estabilidade térmica e estrutura terciária de PtpA. Clonar e realizar a caracterização inicial de outras duas enzimas de *Mycobacterium tuberculosis*, PtkA e SapM.

### 2.2. Objetivos específicos

- Confirmar a S-nitrosilação da C53 de PtpA por biotilação de PtpA selvagem e mutantes e por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF das proteínas biotinizadas;
- Determinar o efeito da S-nitrosilação sobre os parâmetros cinéticos de PtpA;
- Analisar o efeito da modificação sobre a estabilidade térmica de PtpA das por meio de espectroscopia de dicroísmo circular;
- Avaliar o efeito da S-nitrosilação na estrutura tridimensional de PtpA por meio de estudos de Ressonância Magnética Nuclear.
- Clonar os genes que codificam as proteínas PtkA e SapM de *M. tuberculosis* e inseri-los no vetor de expressão pET-14b;
- Expressar a PtkA de *M. tuberculosis* em bactérias *E. coli* BL21 (DE3) e purificá-las por Cromatografia de Afinidade por Metal Imobilizado (IMAC);
- Testar diversas condições de cultivo e estabelecer a melhor delas para a expressão e purificação de SapM;
- Confirmar a identidade das proteínas purificadas por espectrometria de massa MALDI-TOF
- Avaliar o efeito do  $Mg^{2+}$  sobre a estrutura secundária e estabilidade térmica de PtkA por espectroscopia de dicroísmo circular;

- Obter o modelo estrutural de PtkA com base na estrutura terciária de proteínas da mesma família;
- Avaliar a ocorrência de S-nitrosilação na PtkA de *M. tuberculosis* por ação do NO;
- Se observada a S-nitrosilação, confirmar o resíduo de cisteína S-nitrosilado por meio da mutação sítio dirigida C61A;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Vetor de expressão da proteína PtpA

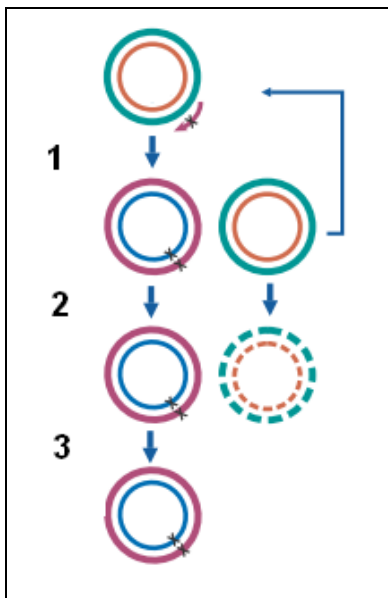
O plasmídeo contendo o gene da PtpA de *M. tuberculosis* (pET28a-Mt\_PtpA) foi fornecido pelo laboratório dirigido pelo Dr. Pedro Alzari (*Unité de Biochimie Structurale, Institut Pasteur, Paris, França*).

#### 3.2 Mutações sítio-dirigidas de PtpA

Em estudo anterior do nosso grupo, com o objetivo de investigar o sítio de S-nitrosilação na 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 e C53A. A partir daí foi observado que a mutante C53A não sofreu S-nitrosilação. Pôde-se então concluir que a S-nitrosilação ocorre na cisteína 53. Como parte do trabalho desta dissertação, foram feitas mutantes duplas - C11A/C16A, C11A/C53A, C16A/C53A - para investigar o efeito de cada cisteína separadamente, assim como a mutante desprovida das três cisteínas - C11A/C16A/C53A. O kit *QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) (Figura 7) 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 de PtpA: (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.

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



**Figura 7:** Representação esquemática da mutação sítio-dirigida realizada pelo kit *QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene®). **1.** Amplificação do DNA plasmidial molde a partir de iniciador mutado produzindo plasmídeos com a mutação desejada. **2.** Digestão do DNA parental metilado. **3.** Transformação de células *E. coli* XL10-Gold ultracompetentes com o produto da mutação. Adaptado de SMITH (2007).

### 3.3 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 armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  foram cultivadas a  $37^{\circ}\text{C}$  em 40 mL de meio SOC líquido (2% peptona, 0,5 % extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgSO}_4$ , 20 mM glicose) até a densidade ótica de 0,4 em 600 nm. As células foram então centrifugadas a  $2600 \times g$  por 20 min. O sedimento foi homogeneizado com solução TB (10 mM PIPES, 55 mM  $\text{MnCl}_2$ , 15 mM  $\text{CaCl}_2$ , 250 mM KCl, pH 6,7) gelada, mantido por 30 min em gelo e centrifugado novamente a  $2600 \times g$  durante 20 min (TU et al., 2005). As bactérias foram finalmente homogeneizadas em 5 mL de solução TB contendo 20% de glicerol, aliqüotadas e armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4 Transformação de bactérias

Para a transformação das bactérias competentes, as mesmas foram inicialmente incubadas com o vetor de expressão de interesse, em gelo, durante 20 min. As células foram, então, mantidas durante 2 min a 42 °C e novamente em gelo por 2 min. Em seguida, foram adicionados 500 µL de meio LB líquido às bactérias, que foram mantidas a 37 °C durante 1 hora, semeadas em meio LB sólido (1 % peptona, 0,5 % extrato de levedura, 0,5 % NaCl, 1,5 % Ágar, pH 7,5) suplementado com o antibiótico para o qual o vetor de expressão confere resistência (50 µg/mL de canamicina para pET28a-Mt\_PtpA e mutantes, 100 µg/mL de ampicilina para pET14b-Mt\_PtkA e pET14b-Mt\_SapM) e mantidas a 37 °C por 15 horas (AUSUBEL et al., 1992). O vetor pET28a<sup>+</sup> 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 negativo, foi realizado o mesmo procedimento com bactérias que não receberam vetor de expressão.

### 3.5 Expressão das proteínas PtpA e mutantes

Os vetores de expressão pET28a-Mt\_PtpA e seus mutantes foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* BL21(DE3). 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 de T7. As colônias selecionadas por resistência ao antibiótico canamicina (pET28a<sup>+</sup>) foram utilizadas nos pré-inóculos.

Os pré-inóculos foram realizados em 10 mL de meio LB líquido suplementado com o antibiótico correspondente e incubados a 37 °C sob agitação. 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 na temperatura de indução por 20 min. Em seguida, foi adicionado isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), para uma concentração final de 0,5 mM. O IPTG induz a expressão da RNA polimerase do fago T7, que se encontra codificada no genoma bacteriano sob controle do promotor *lac*. Como consequência, o gene contido no vetor passa a ser

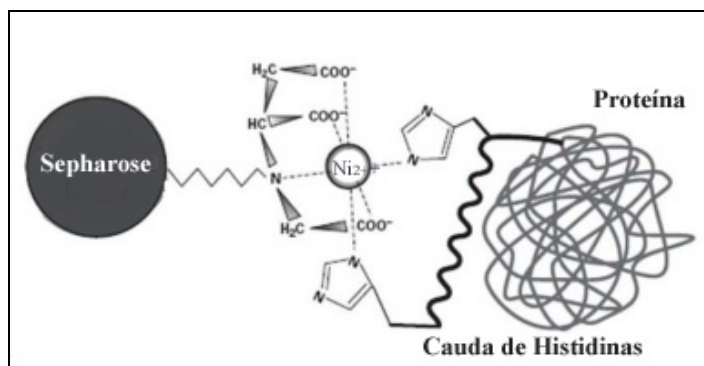


transcrito pela bactéria. O tempo e a temperatura de indução da expressão proteica de PtpA foram padronizados anteriormente em nosso laboratório, 15 °C por 15 horas (PURIFICAÇÃO, 2008).

Após a indução da expressão proteica, os cultivos foram centrifugados a 6000 x g, por 20 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 fenilmetilsulfonil, concentração final de 40µg/mL), rompidas por sonicação em gelo (sete ciclos de 20 segundos, com intervalo de 30 segundos entre cada ciclo) e centrifugadas (12000 x g, por 20 min, a 4 °C). A fração solúvel obtida foi utilizada para purificação.

### 3.6 Purificação das proteínas PtpA e mutantes

As proteínas PtpA e suas mutantes foram purificadas em condições nativas por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC). Os genes da PtpA e de suas mutantes foram inseridos no vetor pET28a<sup>+</sup>, de forma que as proteínas expressas possuem uma cauda de histidinas N-terminal. Essas histidinas expostas são capazes de coordenar o níquel imobilizado na matriz e as proteínas ligadas são eluídas pela adição de imidazol, o qual compete quimicamente com as cadeias laterais dos resíduos de histidina (Figura 8).



**Figura 8:** Cromatografia de Afinidade por Metal Imobilizado - IMAC. Esquema demonstrando a forma de interação da cauda de histidinas da proteína com o metal divalente (níquel) imobilizado no grupo iminodiacético das esferas de sephareose da resina (Adaptado de: [www.ge.com](http://www.ge.com)).

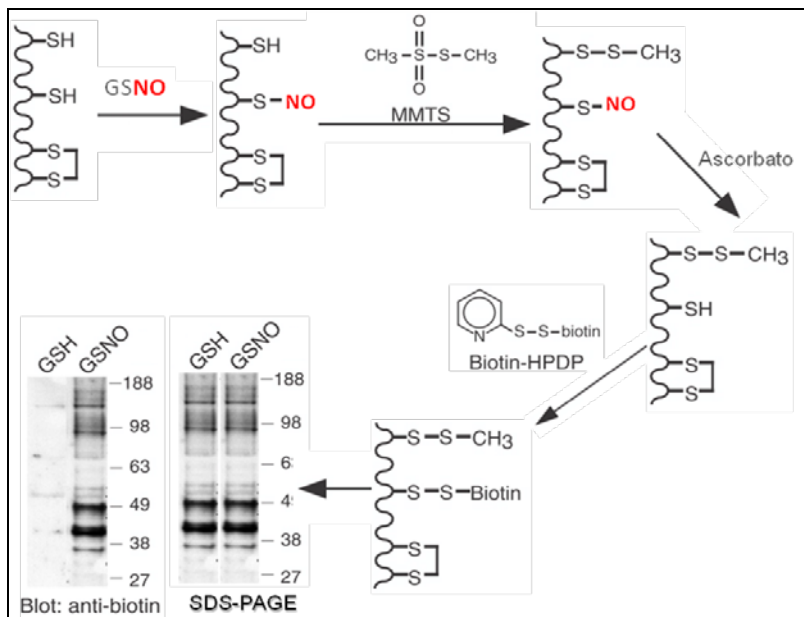
Foram utilizadas colunas *HisTrap HP* (Amersham Biosciences), carregadas com níquel, conectadas a um cromatógrafo ÄKTA (GE Healthcare). A coluna foi inicialmente equilibrada com o tampão de lise e o sobrenadante obtido após a lise e centrifugação dos cultivos foi adicionado à coluna, na temperatura ambiente de 18 °C. Em seguida, a coluna foi lavada com concentrações crescentes de imidazol, o que provoca a eluição das proteínas a esta ligadas.

Após a purificação por afinidade, as frações proteicas foram submetidas a diálises para a retirada gradual do imidazol da solução. Em seguida, as proteínas foram concentradas por centrifugação (*Amicon Ultra-15*, Millipore, membrana de poro de 10 kDa) e estocadas a -20 °C em tampão HEN (250 mM HEPES pH 7,7, 1 mM EDTA, 0,1 mM neocuproína).

As frações proteicas foram analisadas por SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), em géis de poliacrilamida 10%, sob condições desnaturantes e redutoras, corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* (SCHAGGER; VON JAGOW, 1987). A quantificação do conteúdo proteico foi realizada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976) com albumina de soro bovino como padrão, ou espectrofotometricamente a 280 nm na presença de hidrocloreto de guanidina 6M. O coeficiente de extinção molar de cada proteína foi calculado com o auxílio do programa *ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam/>).

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

Com o objetivo de investigar a S-nitrosilação das proteínas deste estudo, foram realizados ensaios de biotilação (*Biotin Switch*) segundo Jaffrey e 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 esta é posteriormente detectada por *Western blot* (Figura 9).



**Figura 9:** Representação esquemática do ensaio de *Biotin Switch*. A proteína teórica possui cisteínas na forma de tiol livre e ligação dissulfeto. A cisteína passível de S-nitrosilação forma um nitrosotiol após a reação com GSNO. Posteriormente, tióis livres são metil-tiolados pelo MMTS, tornando-os não reativos. O MMTS que não reagiu é removido por precipitação com acetona. Depois, os nitrosotíóis são reduzidos seletivamente pela ação do ácido ascórbico para formar novamente o tiol, o qual reage com a biotina-HPDP. Depois de biotinizada, a revelação é feita por *western-blot* usando anticorpos anti-biotina. Adaptado de Jaffrey e Snyder (2001).

Para realização desses experimentos, a concentração de cada proteína purificada foi ajustada até um máximo de 0,8 mg/mL e as amostras foram tratadas com 1 mM de S-nitrosoglutathiona (GSNO) por 30 min, no escuro, em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 min com quatro 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, sob agitação frequente. 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 ressolubilizadas em tampão HENS (250 mM HEPES pH 7,7, 1 mM EDTA, 0,1 mM

neocuproína, 1 % SDS). As S-nitrosilações foram novamente reduzidas com 1 mM de ascorbato de sódio por 10 min, a temperatura ambiente. Em seguida, as cisteínas livres foram biotinizadas com 2 mM de biotina-HPDP (Thermo Scientific) diluída em DMSO por 1h, a temperatura ambiente. O ascorbato reduz as S-nitrosilações, deixando os resíduos de cisteína, antes nitrosilados, livres para a ligação com a biotina-HPDP. Como controles negativos, as amostras foram tratadas com 1mM de glutatona reduzida (GSH) ao invés de GSNO.

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 de camundongo antibiotina (diluição 1:10.000) (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 do kit *Amersham ECL Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare Life Sciences), diluição 1: 30.000. Para detecção da fluorescência do anticorpo secundário foi usado o scanner de fluorescência FLA-9000 (GE Healthcare Life Sciences).

### 3.8 Espectrometria de massa

A espectrometria de massa pode ser usada tanto para confirmar a identidade de uma proteína, quanto para identificar mudanças pós-traducionais (CHOE et al., 2006), tais como fosforilação, nitrosilação e biotinilação. Dentre os diversos tipos de espectrometria de massa, a ionização por electrospray (ESI – *Electrospray Ionization*) pode ser usada na detecção da maioria das modificações pós-traducionais, já a Ionização/Dessorção por laser assistido por uma matriz (MALDI – *Matrix-assisted Laser Desorption Ionization*) não é aconselhável na detecção de algumas modificações como a S-nitrosilação (FOSTER, 2011). Isso ocorre porque o processo de ionização durante a técnica de MALDI provoca o rompimento da ligação S-NO e sua subsequente redução, o que impossibilita a detecção dessa modificação (KANEKO; WADA, 2003). Já a biotinilação é uma ligação mais forte que não é rompida durante a ionização por MALDI, o que torna possível a detecção dessa modificação por essa técnica (FOSTER, 2011).

Para confirmar a identidade das proteínas e observar possíveis mudanças pós-traducionais, as bandas obtidas na eletroforese foram cortadas e descoradas com 500 µL de solução de descoloração (25 mM

de bicarbonato de amônio, 50% (v/v) de ACN), sob agitação, até a completa descoloração do gel. Em seguida, as bandas foram desidratadas com 100  $\mu$ L de ACN por 15 min, até ficarem totalmente esbranquiçadas, então, a acetona foi removida e os resíduos remanescentes do gel foram liofilizados em sistema de centrifugação a vácuo (*Speed Vac*, Eppendorf) durante 10 min. Os fragmentos dos géis foram reidratados com uma solução de tripsina (Promega) em 25 mM de bicarbonato de amônio pH 8,0, na concentração final de 10  $\mu$ g/mL. A clivagem ocorreu a 37 °C durante cerca de 14 h. Após a digestão enzimática, os peptídeos foram eluídos da acrilamida com solução de extração contendo 50% (v/v) de ACN e 5% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA), e novamente liofilizados.

As análises de espectrometria de massa foram realizadas em um espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF/TOF modelo Autoflex III (*Bruker Daltonics, Bremen Germany*) Os peptídeos extraídos foram inicialmente solubilizados em 10  $\mu$ L 0,1 % (v/v) de TFA. Uma amostra de 1  $\mu$ L de cada banda digerida e concentrada foi homogeneizada com 1  $\mu$ L da solução saturada da matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (5 mg/mL em 50% (v/v) ACN, 0,1% (v/v) TFA). Em seguida, 1  $\mu$ L dessa mistura foi aplicada diretamente na placa do espectrômetro MALDI-TOF/TOF, na qual ocorreu a cristalização a temperatura ambiente. Após a cristalização das amostras foram realizadas as análises espectrométricas.

Os espectros gerados foram analisados e processados com o programa *FlexAnalysis 3.2* (Bruker Daltonics). As razões *m/z* dos peptídeos obtidos foram comparados aos valores teóricos calculados pelo programa *ProteinProspector – MS Digest* ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)).

### **3.9 Cálculo de atividade específica e ensaios de atividade enzimática de PtpA na presença de GSNO**

A metodologia para os testes de atividade enzimática foi adaptada da previamente descrita para PtpA por Ecco e colaboradores (2010). As atividades de PtpA e mutantes, nitrosiladas ou não, foram avaliadas a 30 e 37 °C em espectrofotômetro do tipo leitor de microplaca (*Infinite 200 Pro*, Tecan).

As reações contiveram 20 mM de imidazol pH 7,0, 100 nM de enzima e 20 mM de *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 a detecção espectrofotométrica de seu produto. A atividade específica foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de  $4938,8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (determinado experimentalmente para as condições descritas acima).

Para os ensaios de nitrosilação foi utilizado GSNO como doador de NO e GSH como controle. As enzimas foram pré-incubadas com 1 mM GSNO ou GSH por 30 min a temperatura ambiente, no escuro, e depois adicionadas à reação.

### 3.10 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Os experimentos de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) foram realizados em um espectropolarímetro JASCO J-815 equipado com um controlador de temperatura. Espectros de CD foram obtidos a 20 °C, em cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,5 mm. As leituras foram feitas em um intervalo de comprimento de onda variando de 260 a 190 nm. Para a avaliação do efeito da S-nitrosilação sobre a estrutura de PtpA foram usados 10 µM de proteína em tampão contendo 15 mM de HEPES pH 7,7, 50 µM de EDTA, 5 µM de neocuproína. Já na avaliação da estrutura de PtkA na ausência e na presença de metal foram usados 10 µM de proteína em tampão contendo Tris 2 mM (pH 8,0), NaCl 10 mM, glicerol 1 %, na ausência e presença de MgCl<sub>2</sub>. Os experimentos foram realizados com velocidade de varredura de 50 nm/min, resolução de 0,1 nm, resposta de 8 seg e largura de faixa de 1 nm. Em cada experimento, foram obtidos a média de 3 espectros. O espectro de calibração (somente o tampão) foi subtraído dos espectros das proteínas. Os cálculos das porcentagens de conteúdo de estrutura secundária foram feitos com base nos algoritmos de CONTIN e CDSSTR (SREERAMA e WOODY, 2000).

A estabilidade térmica das proteínas também foi avaliada por CD. O espectro a 222 nm foi medido na faixa de temperatura de 20 a 60 °C, com aumento gradual de 1 °C, com um período inicial de equilíbrio de 10 min a 20 °C. Os espectros foram coletados do mesmo modo que descrito acima. Nos ensaios de S-nitrosilação, as proteínas em tampão HEN foram tratadas com 1 mM de GSNO por 20 min, no escuro, em temperatura ambiente. Com o objetivo de avaliar a reversibilidade da S-nitrosilação, as proteínas foram tratadas com 1 mM de GSNO e ainda mantidas por 10 min com 5 mM de DTT nas mesmas condições. As temperaturas médias de desnaturação –  $T_M$  - para cada proteína foram

calculadas por regressão não linear (curva sigmoideal de Boltzmann) no programa *GraphPad Prism 5.0*.

### 3.11. Expressão e purificação de proteínas marcadas com $^{15}\text{N}$

Para a realização de ensaios de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), a PtpA uniformemente marcada com  $^{15}\text{N}$  foi expressa em bactérias *E. coli* BL21(DE3) em meio mínimo de cultura M9 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  17 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g/L, NaCl 0,5 g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0,5 g/L, glicose 5 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  14,7 mg/L, tiamina 1 mg/L) contendo  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  (Cambridge Isotope) como única fonte de nitrogênio, suplementado com 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de canamicina. O protocolo de expressão foi o mesmo anteriormente descrito para as proteínas expressas em meio LB, exceto pelo fato de o pré-inóculo ser realizado em 50 mL de meio a partir de aproximadamente 15 colônias de bactérias transformadas com o vetor pET28a-Mt\_PtpA selecionadas por resistência a canamicina. Cada inóculo foi feito a partir do volume de pré-inóculo suficiente para atingir uma densidade ótica de 0,1 a 600 nm em 250 mL de inóculo.

A purificação da PtpA marcada uniformemente com  $^{15}\text{N}$  foi realizada da mesma forma que as proteínas expressas em meio LB. No entanto, após dialisada para remoção do imidazol, a proteína foi incubada com cinco unidades de trombina por miligrama de PtpA, a 18 °C, por 15 horas, para clivagem da cauda de histidinas. A cauda de histidinas dificulta a aquisição dos espectros de RMN, pois gera mais sinais que não estão assinalados. Em seguida, a PtpA foi purificada por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 75 10/300 (Amersham) acoplada a um cromatógrafo ÄKTA (GE Healthcare) em tampão HEPES/EDTA (50 mM HEPES pH7,5, 1 mM EDTA).

### 3.12. Ensaios de Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizados em espectrômetro Bruker de 600 MHz equipado com criosonda de tripla ressonância de 5 mm, no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas (UFRJ, Rio de Janeiro) sob supervisão do Dr. Guilherme Razzera. Todos os experimentos foram realizados a 25 °C. As amostras foram preparadas com base no exposto por Saxena e colaboradores para o assinalamento de frequências de ressonância de PtpA de *M. tuberculosis* (SAXENA et al., 2005). A PtpA marcada uniformemente com  $^{15}\text{N}$ , sem cauda de histidina, foi

concentrada até 70  $\mu\text{M}$  em tampão HEPES/EDTA (50 mM HEPES pH7,5, 1 mM EDTA) com 10%  $\text{D}_2\text{O}$ .

As amostras da PtpA nessas condições foram utilizadas para aquisição de espectros bidimensionais de correlação heteronuclear ( $^{15}\text{N}$ -HSQC). Com o objetivo de avaliar o efeito do NO sobre a PtpA, foram adquiridos espectros antes e após a adição de GSNO à amostra (no escuro) para as seguintes concentrações: 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  e 1 mM. Em seguida, foram adicionados 10 mM DTT à proteína tratada com 1 mM de GSNO e foi adquirido um novo espectro.

Todos os espectros foram processados utilizando-se o programa *Topspin 2.1* (Bruker) e analisados através do programa CARI 1.8.4.2 (KELLER, 2004). No processamento dos espectros foi utilizado como base o assinalamento das frequências de ressonância de PtpA previamente determinado (SAXENA et al., 2005), ajustando-se os sinais de correlação por proximidade quando necessário. Os desvios do deslocamento químico para cada aminoácido foram calculados com o uso da fórmula:

$$DDQ = \sqrt{(\Delta H)^2 + (\Delta N/10)^2}$$

onde H representa o sinal do próton e N representa o sinal do nitrogênio. Para diferenciar os desvios do deslocamento químico significativos, foram calculadas a média e o desvio padrão de todos os valores obtidos. Os esquemas da estrutura tridimensional da PtpA foram construídos a partir do arquivo PDB 1U2P da PtpA de *M. tuberculosis*, com o uso do programa *PyMOL* (2006, DeLano Scientific LLC).

### 3.13. Clonagem dos genes *ptkA* e *sapM* de *M. tuberculosis*

O DNA genômico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv foi fornecido pelo professor Dr. Luiz Augusto Basso do CPBMF-PUCRS (Centro de Pesquisa em Biologia Molecular e Funcional da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul).

As sequências que codificam a PtkA - gene *Rv2232* - e a SapM - gene *Rv3310* - foram amplificadas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com oligonucleotídeos específicos desenhados com sítios de restrição apropriados flanqueando as extremidades 5' e 3' dos genes. Para PtkA, o iniciador anverso contém o sítio de restrição *NdeI* (sublinhado), (5'-AGGATTACA'TATGTCTTCGCCTCGTGAACG-3'), e o reverso contém o códon de terminação e o sítio de restrição *BamHI* (sublinhado), (5'-GTTTTCG'GATCCTCAGACACCTAGC GCCTCCCTCAGC-3'). Já para SapM, o iniciador anverso contém o

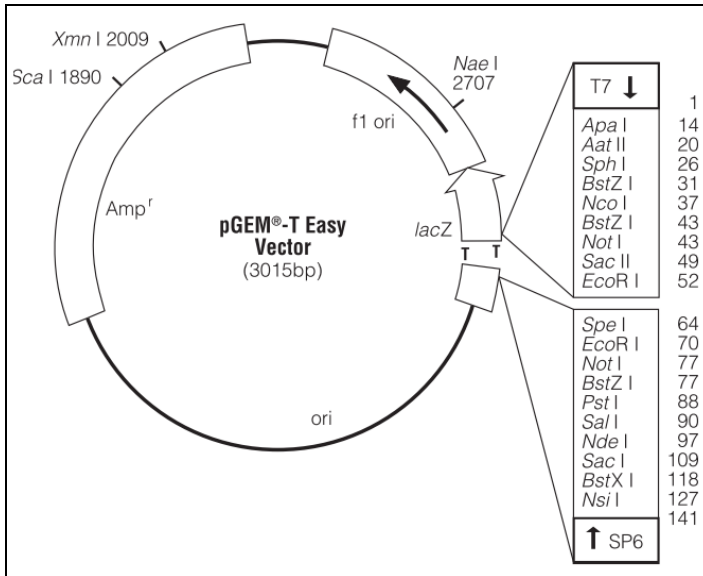


sítio de restrição *Xho*I (sublinhado), (ATTGTTCTCGAG AGTGCCCTGCCGACCTTCGCGC-3'), e o reverso contém o códon de terminação e o sítio de restrição *Bam*HI (sublinhado), (5'-ATTGACG'GATCCCTAGTCGCCCAAATATCGGTTAT-3').

A mistura de reação conteve 100 ng de DNA, 50 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador, 200 pmoles de dNTPs, 1 U de *Taq* DNA polimerase, 1,5 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 5 µL de tampão da *Taq* DNA polimerase (5x) e água ultra pura para um volume final de 25 µL. O programa do termociclador consistiu em um passo de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 s, pareamento a 50°C por 30 s, extensão a 72°C por 1 min, finalizando com um passo de extensão a 72°C por 10 min.

Os produtos de PCR foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Para isso, utilizou-se um transiluminador acoplado a um sistema de vídeo ("UVP Bioimaging System"). Os fragmentos gênicos foram purificados com o kit de purificação de DNA "Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-up System" (Promega).

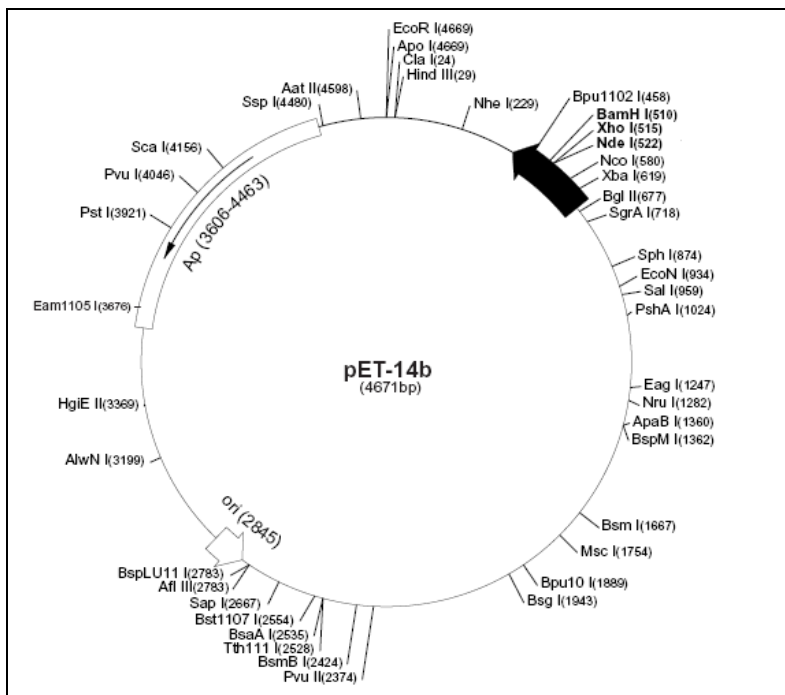
Os fragmentos amplificados, os quais contêm adeninas nas extremidades 5', foram inseridos no vetor "*pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector*" (Promega). Este é um plasmídeo linear que possui em cada uma de suas extremidades timidinas livres complementares às adeninas inseridas pela *Taq* DNA polimerase no final de cada produto de amplificação (Figura 10). Assim, as adeninas dos fragmentos amplificados paream com as timidinas do vetor. Os produtos das reações de ligação foram usados para transformar bactérias *E. coli* DH5α competentes, as quais foram usadas para propagar esse vetor com os genes de interesse, que foram posteriormente purificados com o kit "Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps" (Promega).



**Figura 10:** Mapa do vetor *pGEM<sup>®</sup>-T Easy*. Em destaque são mostradas as timidinas livres complementares às adeninas inseridas pela *Taq* DNA polimerase; origens de replicação; genes marcadores de seleção e região promotora. Fonte: <http://www.promega.com>.

Após a purificação, os vetores *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* contendo as sequências que codificam PtkA e SapM, foram digeridas com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, para PtkA, e *XhoI* e *BamHI*, para SapM. Para a separação dos produtos da digestão foram realizadas eletroforeses em géis de agarose 1% corado com brometo de etídio. Os fragmentos gênicos foram purificado com o kit de purificação de PCR “*Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-up System*” (Promega).

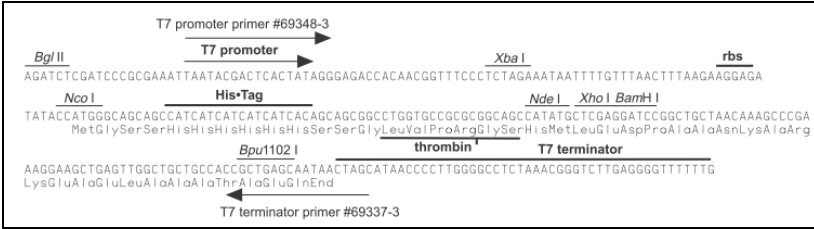
O vetor de expressão pET-14b de 4671pb da Novagen (Figura 11) também foi digerido com as endonucleases *NdeI* e *BamHI* (PtkA) e *XhoI* e *BamHI* (SapM). Os produtos das digestões foram visualizados em gel de agarose 1% e as purificações realizadas da mesma forma supracitada.



**Figura 11:** Mapa do vetor de expressão pET-14b. São mostrados os sítios de clivagem para as endonucleases *NdeI*, *BamHI* e *XhoI*, origens de replicação; genes marcadores de seleção e região promotora. Fonte: www.novagen.com.

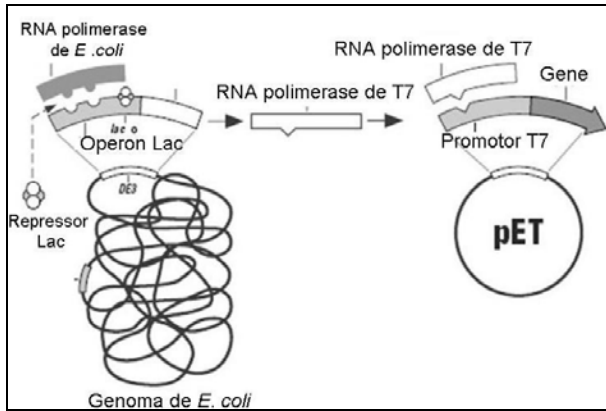
### 3.14 Construção dos vetores de expressão dos genes *ptkA* e *sapM*

Após as purificações dos fragmentos e do vetor digeridos, os mesmos foram ligados com a DNA ligase do fago T4. Os fragmentos foram inseridos posteriormente à região promotora T7 e à sequência codificante correspondente aos seguintes resíduos de aminoácidos: MGSSHHHHHSSGLVPRGSH, os quais compõem a cauda de histidinas (Figura 12).



**Figura 12:** Região de inserção no vetor pET -14b. Os sítios de clivagem para as enzimas de restrição *XhoI*, *NdeI* e *BamHI* estão destacados. O fragmento foi inserido entre ambos os sítios e aos quais foi adicionado um códon de terminação. Fonte: www.novagen.com.

Assim, os genes foram inseridos sob o controle do promotor do fago T7 e dessa forma tornam-se dependente da RNA polimerase de T7 para serem expressos. Esse se encontra no genoma da bactéria (DE3) sob a regulação do promotor do *operon lac*. O IPTG, por ser um análogo da alolactose, atua como indutor da expressão do gene da RNA polimerase de T7 e consequentemente dos genes de interesse (Figura 13).



**Figura 13:** Esquema da indução da expressão gênica no vetor pET-14b por IPTG. A RNA polimerase de T7 está sob controle do promotor do *Operon lac*. O gene de interesse está sob regulação do promotor do fago T7. (FONTE: www.novagen.com).

Os produtos das ligações dos genes de interesse nos vetores de expressão foram usados para transformar bactérias *E. coli* DH5α competentes, as quais foram usadas para propagação. Os clones

resistentes ao antibiótico foram analisados por PCR do DNA extraído da colônia bacteriana. Para isso, as colônias foram suspensas em 50 µL de água, aquecidas a 95°C por 5 min, homogêneas e centrifugadas a 10000 x g por 10 min. As reações foram realizadas com 10 µL do sobrenadante nas mesmas condições de PCR descritas acima. O DNA molde dos fragmentos gênicos que codificam PtkA e SapM foram utilizados como controles positivos.

Para confirmar a presença dos genes nos vetores, estes, depois de purificados, foram novamente digeridos com as enzimas de restrição *XhoI* ou *NdeI* e *BamHI*. Após eletroforese em gel de agarose 1%, foram observadas a presença de bandas com tamanho correspondentes aos genes *ptkA* e *sapM*, sendo que os plasmídeos que não os contêm não apresentam bandas semelhantes após a digestão.

Para confirmar a integridade do gene, os plasmídeos foram enviados para sequenciamento no Laboratório SONDA – UFRJ.

### 3.15 Teste de indução da expressão de SapM

O vetor de expressão pET14b-*Mt\_SapM* foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* BL21(DE3) e BL21(DE3) pLysS. As colônias selecionadas por resistência ao antibiótico ampicilina (pET14b<sup>+</sup>) foram utilizadas nos pré-inóculos. Para cada cepa foram testadas as temperaturas de indução da expressão de 15, 22, 30 e 37 °C, com tempos de indução de 5 e 20 horas, na concentração de 0,5mM de IPTG.

Após a indução, os cultivos foram centrifugados, as células foram homogêneas com tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl, 10 mM imidazol, 10% glicerol) suplementado com PMSF (40µg/mL), rompidas por sonicação em gelo e o homogenato foi novamente centrifugado. As frações solúvel e insolúvel foram analisadas por SDS-PAGE e a cepa/temperatura/tempo de indução que apresentou melhor expressão de SapM foi selecionada para dar continuidade à expressão e purificação dessa proteína.

### 3.16 Expressão e Purificação de SapM

Como a SapM foi expressa e permaneceu na fração insolúvel do lisado bacteriano, esta teve que ser solubilizada antes da purificação. Para isso, a fração insolúvel foi lavada com tampão Tris 20 mM (pH 8,0), sacarose 20 % (5 mL/g de células), centrifugado a 17.000 g por 30 min a 4 °C. A fração insolúvel foi solubilizada em ureia 8 M, Tris 20

mM (pH 8,0), NaCl 500 mM, imidazol 10 mM (5 mL/g de células), por 1 hora a 15 °C, sob agitação. O material solúvel foi separado por centrifugação a 27.000 g por 30 min a 4 °C (SIJWALI, BRINEN, ROSENTHAL, 2001).

A fração solúvel obtida foi utilizada para purificação em cromatógrafo ÄKTA (GE Healthcare). Foram utilizadas colunas *HisTrap HP* (Amersham Biosciences), carregadas com níquel, conectadas a um cromatógrafo ÄKTA (GE Healthcare). A coluna foi inicialmente equilibrada com o tampão de solubilização (Ureia 8 M, Tris 20 mM (pH 8,0), NaCl 500 mM, imidazol 10 mM) e as proteínas solubilizadas foram adicionadas à coluna, na temperatura ambiente de 18 °C. Em seguida, a coluna foi lavada com concentrações crescentes de imidazol para a eluição das proteínas.

Após a purificação por afinidade, as frações proteicas foram submetidas à diálise contra tampão Tris 100 mM (pH 8,0), L-arginina 250 mM, EDTA 1 mM, GSH 1 mM, glicerol 30 %. A L-arginina é um supressor da agregação proteica, o que facilita o enovelamento da proteína durante a diminuição da concentração de ureia (SIJWALI, BRINEN, ROSENTHAL, 2001).

### 3.17 Expressão e Purificação de PtkA

O vetor de expressão pET14b-*Mt\_PtkA* foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* BL21(DE3) (BACH; WONG; AV-GAY, 2009) e os cultivos celulares foram realizados conforme descrito anteriormente para PtpA, diferindo somente na temperatura de indução de 22 °C. A fração solúvel obtida foi utilizada para purificação em cromatógrafo ÄKTA (GE Healthcare).

Após a purificação por afinidade, as frações proteicas foram submetidas a diálises para a retirada gradual do imidazol da solução. Em seguida, as proteínas foram concentradas por centrifugação (*Amicon Ultra-15*, Millipore, membrana de poro de 10 kDa), quantificadas e estocadas a -20°C em tampão 50 mM Tris (pH 8,0), 300 mM NaCl, 1 mM DTT.

### 3.18 Ensaio de fosforilação de PtpA pela PtkA

Para testar a atividade enzimática da PtkA recombinante, ensaios de fosforilação foram realizados. Nestes, 200 µM de PtpA reagiram com 50 µM de PtkA em 300 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 8,0), 10 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub> e 10 mM ATP por 12 h a 4 °C (STEHLE et al., 2012).

Para detecção de proteínas fosforiladas por *Western blot*, amostras do ensaio foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para membranas de PVDF, as quais foram bloqueadas com BSA (2%) e incubadas com anticorpo de camundongo antifosfotirosina (diluição 1:20.000) (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 ligado à peroxidase do kit *Amersham ECL Western Blotting Analysis System* (GE Helthcare Life Sciences), diluição 1:30.000. Para detecção da fluorescência do anticorpo secundário foi usado o scanner de fluorescência FLA-9000 (GE Helthcare Life Sciences).

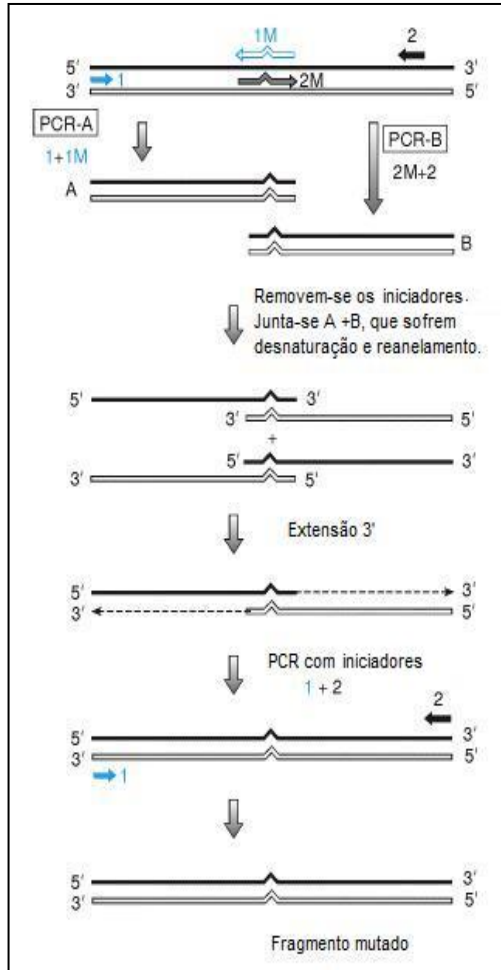
### 3.19 Modelagem estrutural

A sequência de aminoácidos de PtkA foi comparada com a base de dados de sequências não-redundantes depositadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, EUA) utilizando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al, 2005). O alinhamento de múltiplas sequências foi realizado com o programa ClustalW (THOMPSON, HIGGINS, GIBSON, 1994), sendo que as sequências das proteínas usadas nos alinhamentos foram obtidas a partir do banco de dados GenBank no NCBI. A estrutura tridimensional de PtkA foi construída utilizando-se como modelo a estrutura de uma fosfatase putativa de *Clostridium difficile* (PDB ID: 3SD7), utilizando o algoritmo I-TASSER (ZHANG, 2008; ROY, KUCUKURAL, ZHANG, 2010). O. As figuras foram geradas pelo software *PyMOL* (2003, DeLano Scientific LLC).

### 3.20 Mutação sítio-dirigida de PtkA

Com o objetivo de confirmar a nitrosilação de PtkA na Cys61, essa foi mutada para alanina. O gene mutante foi construído por mutação sítio-dirigida (HIGUCHI; KRUMMELL; SAIKI, 1988), resumida na figura 14, a partir do vetor de expressão da PtkA selvagem.

As mutações foram feitas utilizando-se oligonucleotídeos específicos contendo os códons a serem trocados sublinhados, PtkAC61A anverso: 5'- AGCGGGACCAATGCCCCGCTCCTCCA-3', PtkA C61A reverso: 5'-TGGAGGAGGCGGGGCATTGGTCCCGCT-3'



**Figura 14:** Mutação sítio-dirigida de acordo com HIGUCHI; KRUMMELL; SAIKI (1988). São feitas duas PCRs separadamente (A e B), cada uma utilizando um oligonucleotídeo iniciador contendo a muta o (1M ou 2M) e outro, que se liga   extremidade correspondente do gene (1 ou 2, respectivamente). Em seguida, os fragmentos resultantes da PCR A e B são reunidos para que sejam desnaturados, reparados e para que ocorra a extensão no sentido 3'. É feita uma nova PCR utilizando-se apenas os oligonucleotídeos iniciadores externos (1 e 2), cujo produto consiste no fragmento mutado amplificado. Adaptado de STRACHAN; READ, 1999.



Os produtos de PCR da mutação sítio-dirigida do gene foram visualizados em gel de agarose 1% por eletroforese após coloração do gel com brometo de etídio, utilizando um transiluminador acoplado a um sistema de captação de imagens (“*UVP Bioimaging System*”) e um computador. Os fragmentos foram purificados com o kit de purificação de DNA “*Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System*” (Promega).

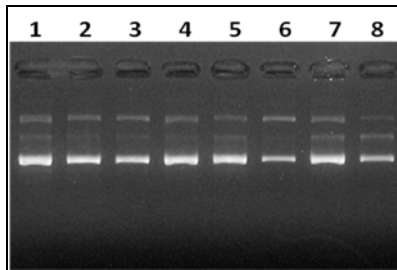
O fragmento mutado foi inserido no vetor de expressão pET-14b da mesma forma descrita anteriormente para a proteína selvagem.

A mutação foi confirmada por sequenciamento de DNA e a proteína mutante foi expressa e purificada da mesma forma que a proteína selvagem.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Construção dos plasmídeos mutantes de PtpA

Os plasmídeos mutantes - PtpA\_C11A/C16A, PtpA\_C11A/C53A, PtpA\_C16A/C53A e PtpA\_C11A/C16A/C53A - 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 15).



**Figura 15:** Eletroforese em gel de agarose 1% dos plasmídeos mutados após propagação em bactérias XL10-Gold competentes. 1. pET28a-Mt\_PtpA, 2. pET28a-Mt\_PtpAC11A, 3. pET28a-Mt\_PtpAC16A, 4. pET28a-Mt\_PtpAC53A, 5. pET28a-Mt\_PtpAC11A/C16A, 6. pET28a-Mt\_PtpAC11A/C53A, 7. pET28a-Mt\_PtpAC16A/C53A, 8. pET28a-Mt\_PtpAC11A/C16A/C53A.

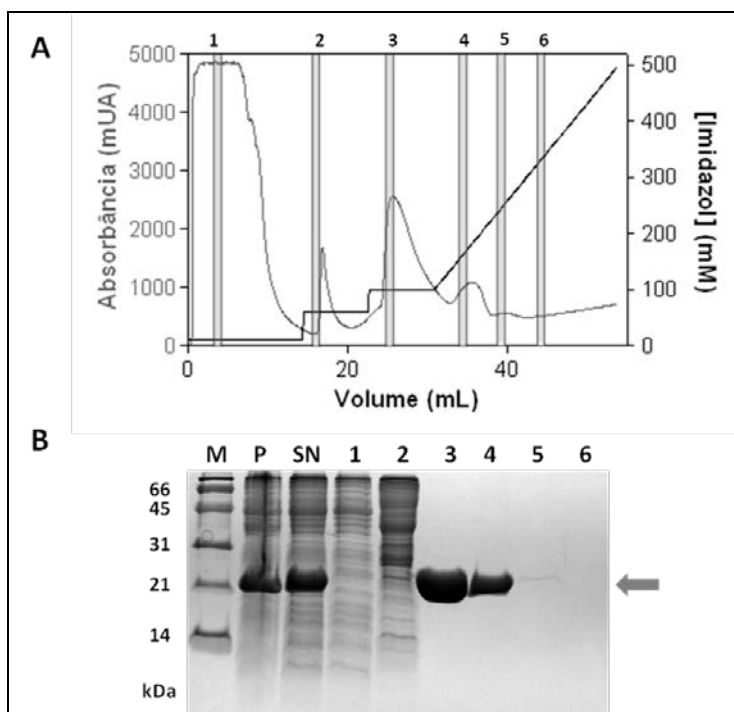
Foram obtidos plasmídeos do mesmo tamanho que o vetor pET28a-Mt\_PtpA e mutantes pET28a-Mt\_PtpAC11A, pET28a-Mt\_PtpAC16A e pET28a-Mt\_PtpAC53A, (aproximadamente 5,8 kb). As sequências dos plasmídeos foram analisadas por sequenciamento e as mutações foram confirmadas.

### 4.2 Expressão e purificação de PtpA selvagem e mutantes

A proteína PtpA de *M. tuberculosis* e suas mutantes foram expressas em *E. coli* BL21(DE3) a partir dos vetores de expressão pET28a-Mt\_PtpA, pET28a-Mt\_PtpAC11A, pET28a-Mt\_PtpAC16A, pET28a-Mt\_PtpAC53A, pET28a-Mt\_PtpAC11A/C16A, pET28a-

Mt\_PtpAC11A/C53A, pET28a-Mt\_PtpAC16A/C53A, pET28a-Mt\_PtpAC11A/C16A/C53A.

As proteínas PtpA e mutantes contidas na fração solúvel bacteriana foram purificadas por IMAC. Essas proteínas recombinantes possuem uma cauda de histidinas na porção N-terminal (massa teórica de 20 kDa) o que permitiu serem eluídas com concentração crescente de imidazol (Figura 16, linhas 3, 4, 5 e 6). As frações eluídas da coluna *HisTrap* correspondentes à PtpA recombinante foram coletadas, reunidas e submetidas à diálise em tampão redutor para remoção do imidazol.



**Figura 16:** 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 submetida a um gradiente crescente de imidazol. Em cinza, eixo das ordenadas esquerdo, está representada a absorbância a 280 nm de cada volume de eluição. Em preto, eixo das ordenadas direito, está representada a concentração de imidazol em cada volume de eluição. As faixas cinza enumeradas são as frações eluídas,

coletadas e analisadas por 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 10%. A seta indica a banda correspondente à PtpA (20 kDa). M, marcador de massa molecular em kDa; P, fração insolúvel do lisado bacteriano; SN, fração solúvel do lisado bacteriano.

Após as diálises para retirada do imidazol, a PtpA foi mais uma vez dialisada, desta vez contra tampão HEN, concentrada e quantificada para realização dos demais experimentos. O rendimento final da purificação foi de aproximadamente 19 mg de proteína por litro de cultivo.

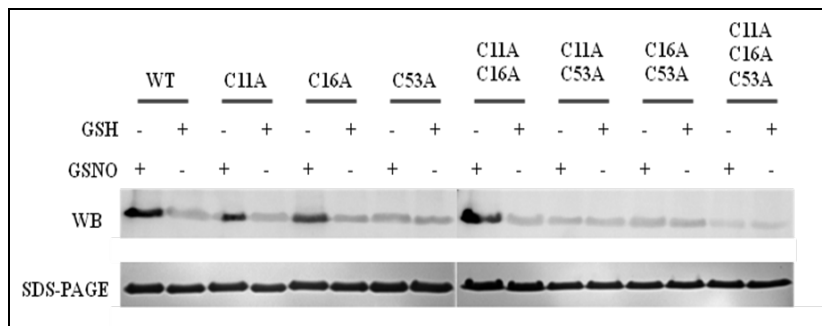
As demais mutantes apresentaram o mesmo perfil de purificação da PtpA selvagem. O rendimento médio de cada mutante, por litro de cultivo, foi de 18 mg para C11A, 20 mg para C16A, 21 mg para C53A, 13 mg para C11A/C16A, 21 mg para C11A/C53A, 24 mg para C16A/C53A e 15 mg para C11A/C16A/C53A.

### 4.3 Ensaios de biotilação para detecção de proteínas S-nitrosiladas

Com o objetivo de confirmar que a PtpA sofre S-nitrosilação por ação do NO na cisteína 53, as proteínas purificadas, selvagem e mutantes, em tampão HEN, foram submetidas a ensaios de biotilação para detecção de proteínas S-nitrosiladas. 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, esta é detectada por *Western blot*.

Quando a PtpA selvagem, PtpA\_C11A, PtpA\_C16A e PtpA\_C11A/C16A foram tratadas com 1 mM de GSNO (doador de NO), detectou-se uma banda intensa no *Western blot* correspondente a essa proteína biotilada, com cerca de 20 kDa (Figura 17). Nos controles negativos realizados (quando as proteínas foram tratadas com 1 mM de GSH em lugar do GSNO) foi detectada uma banda de intensidade muito menor. Já quando as mutantes PtpA\_C53A, PtpA\_C11A/C53A, PtpA\_C16A/C53A e PtpA\_C11A/C16A/C53A foram submetidas ao *biotin switch*, não houve diferença na intensidade das bandas tratadas com GSNO ou GSH indicando que essas proteínas não estão biotiladas. Em todos os casos, as proteínas estavam presentes em quantidades semelhantes, conforme mostra o SDS-PAGE (Figura 17), o que confirma que as bandas detectadas pelo *Western blot* no tratamento com GSNO são devido à presença de NO. Esses

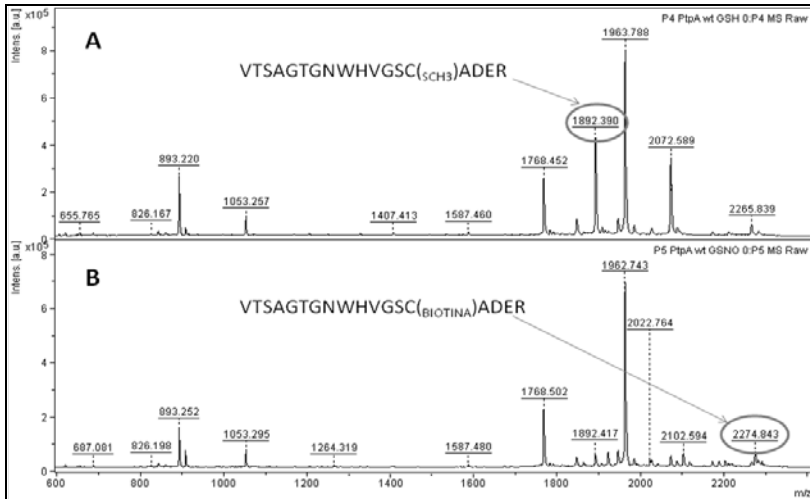
resultados demonstram que a PtpA é S-nitrosilada na presença de GSNO somente na cisteína 53, sendo que as outras cisteínas, 11 e 16, não são nitrosiladas nem exercem influência sobre a nitrosilação da cisteína 53.



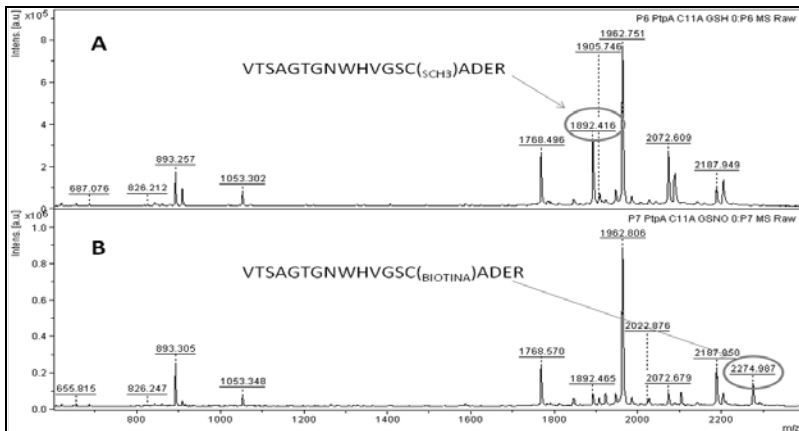
**Figura 17:** Ensaio de biotinação de PtpA e mutantes para detecção de proteínas S-nitrosiladas. A PtpA e mutantes em tampão HEN foram tratadas com 1 mM de GSNO (doador de NO) ou 1 mM de GSH (controle negativo). Em seguida, as amostras foram incubadas com MMTS para bloqueio dos resíduos de cisteínas livres, reduzidas com ascorbato de sódio e posteriormente submetidas à biotinação. Em WB está a revelação do *Western blot* com anticorpo anti-biotina e abaixo está a SDS-PAGE das mesmas amostras.

#### 4.4 Confirmação da biotinação por espectrometria de massa MALDI-TOF

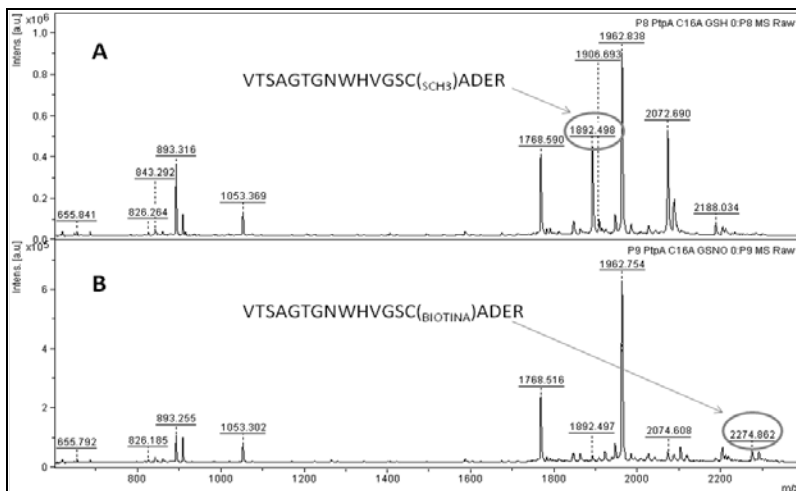
Além do *western blotting*, a biotinação da C53 pôde ser confirmada por espectrometria de massa MALDI-TOF. Nas amostras tratadas com GSNO, ocorre a adição da biotina, razão massa/carga ( $m/z$ ) de 428 Da. Já nas amostras tratadas com GSH, ocorre o bloqueio das cisteínas livres pela reação com MMTS, o que leva a um aumento da  $m/z$  de 46 Da (SCH<sub>3</sub>). Dessa maneira, a análise dos fragmentos trípticos da PtpA selvagem e mutantes por MALDI-TOF revelou que, quando as proteínas são S-nitrosiladas e biotiniladas pela técnica de *biotin switch*, o peptídeo contendo a C53 tem sua  $m/z$  aumentada em 382 Da.- tal valor corresponde à diferença entre o acréscimo de  $m/z$  da biotina de 428 Da. e do grupo SCH<sub>3</sub> de 46. Essa adição de  $m/z$  confirma a biotinação do resíduo C53 na PtpA selvagem (Figura 18), PtpA C11A (Figura 19), e PtpA C16A (Figura 20). Já na mutante PtpA C53A não ocorre deslocamento da  $m/z$  quando as amostras são tratadas com GSNO em vez de GSH (Figura 21). O peptídeo contendo C11 e C16 não foi encontrado nos espectros.



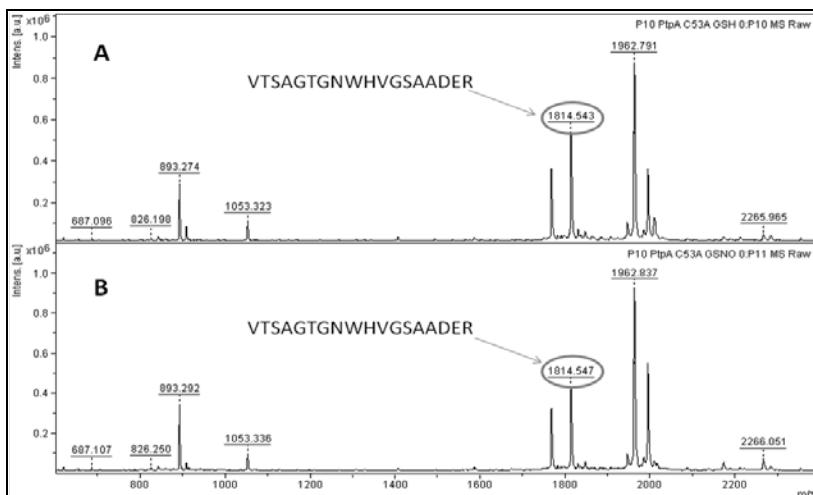
**Figura 18:** Espectro MALDI-TOF de PtpA selvagem. **A**, na proteína tratada com GSH, observa-se o pico correspondente ao peptídeo contendo C53 ( $m/z$  1892). **B**, na proteína tratada com GSNO, o pico correspondente a C53 diminui consideravelmente de intensidade ao mesmo tempo em que surge outro correspondente à C53 biotilada ( $m/z$  2274).



**Figura 19:** Espectro MALDI-TOF de PtpA C11A. **A**, na proteína tratada com GSH, observa-se o pico correspondente ao peptídeo contendo C53 ( $m/z$  1892). **B**, na proteína tratada com GSNO, o pico correspondente a C53 diminui consideravelmente de intensidade ao mesmo tempo em que surge outro correspondente à C53 biotilada ( $m/z$  2274).



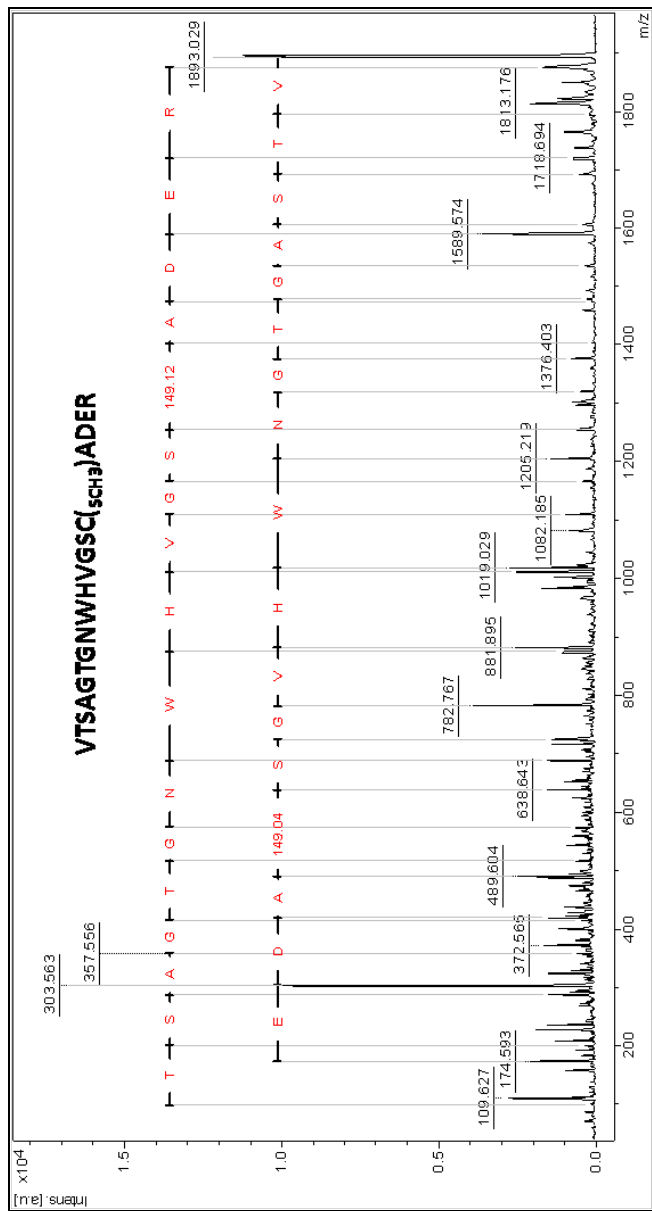
**Figura 20:** Espectro MALDI-TOF de PtpA C16A. **A**, na proteína tratada com GSH, observa-se o pico correspondente ao peptídeo contendo C53 ( $m/z$  1892). **B**, na proteína tratada com GSNO, o pico correspondente a C53 diminui consideravelmente de intensidade ao mesmo tempo em que surge outro correspondente à C53 biotinizada ( $m/z$  2274).



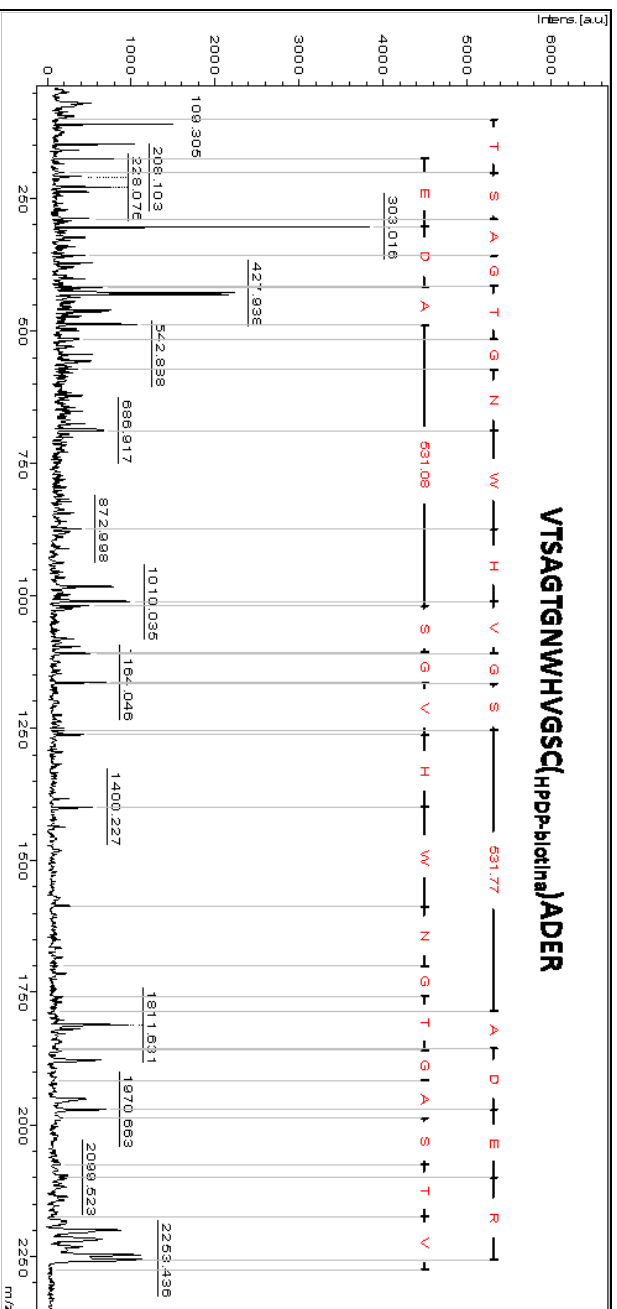
**Figura 21:** Espectro MALDI-TOF de PtpA C53A. Em **A**, a proteína foi tratada com GSH e, em **B**, com GSNO. Ambos os espectros são idênticos, uma vez que, substituindo o resíduo de cisteína por alanina, não ocorre nitrosilação nem biotinação da proteína.

O sequenciamento de peptídeos por MALDI/TOF-TOF confirmaram a biotilação do resíduo C53 na PtpA após tratamento com GSNO (Figura 22), enquanto a proteína tratada com GSH não foi biotilada (Figura 23).

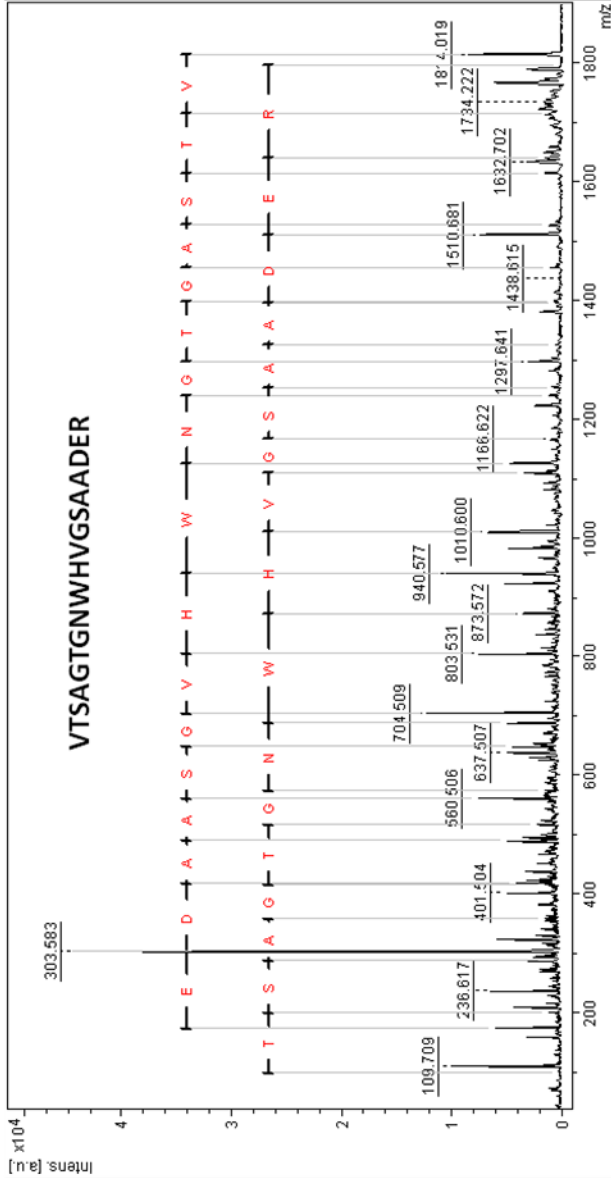




**Figura 22:** Espectro TOF-TOF do precursor de  $m/z$  1893. O sequenciamento confirma a sequência de aminoácidos VTSAGTGNWHVGS(C<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>)ADERA na amostra tratada com GSH. O fragmento de  $m/z$  149,04 corresponde à C53 metil-tiolada pela ação do MMTS.



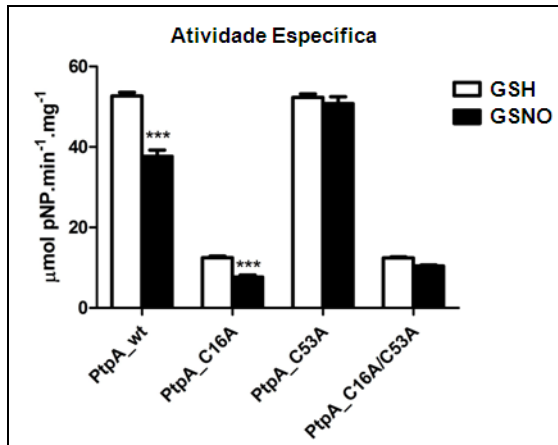
**Figura 23:** Espectro TOF-TOF do precursor de  $m/z$  2275. O sequenciamento confirma a sequência de aminoácidos VTSAGTGNWHVGS<sub>(HPpP-Biotina)</sub>A<sub>DERA</sub> na amostra tratada com GSNO. O fragmento de  $m/z$  531,06 corresponde à C53 biotinilada.



**Figura 24:** Espectro TOF-TOF do precursor de  $m/z$  1814. O sequenciamento confirma a sequência de aminoácidos VTSAGTGNWHVGSAAADER na amostra tratada com GSH e GSNO. A presença desse fragmento confirma a mutação C53A.

#### 4.5 Ensaios de atividade enzimática de PtpA, PtpA\_C16A, PtpA\_C53A, PtpA\_C16A/C53A na ausência e presença de GSNO.

Após a confirmação da S-nitrosilação da C53 na PtpA selvagem e mutantes, a atividade específica destas foi mensurada para elucidar a contribuição de cada resíduo de cisteína no efeito da S-nitrosilação sobre a atividade de PtpA e assim complementar nossos dados originais (ECCO et al., 2010). No trabalho anterior, foi mostrado que a mutante C53A apresenta atividade catalítica similar à enzima selvagem, a mutante C16A possui atividade menor quando comparada à selvagem, e a mutante C11A não apresenta atividade. Foi mostrado também que as atividades da PtpA selvagem e mutante C16A são reduzidas após o tratamento com doador de NO, enquanto a atividade da mutante C53A permanece similar à forma não tratada com doador de NO (ECCO et al., 2010). Neste trabalho, as atividades das demais duplas e tripla mutantes foram avaliadas. A atividade de C16A/C53A é semelhante à C16A e, assim como a C53A, não é inibida pela S-nitrosilação (Figura 25). As demais mutantes foram testadas, porém, por não possuírem a cisteína catalítica C11, não apresentam atividade.



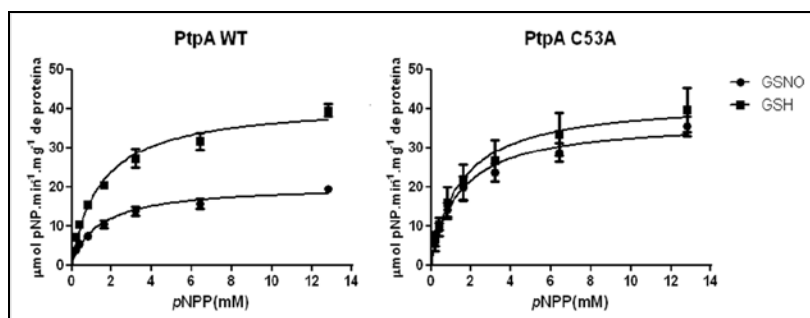
**Figura 25:** Atividade de fosfatase da proteína Ptpa e mutantes em resposta ao NO. As barras indicam a atividade específica das proteínas tratadas com GSH (branco) ou GSNO (preto). Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata. *Two-Way ANOVA* (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

Podem ser observadas diferenças significativas na atividade da PtpA selvagem e mutante C16A em presença de GSNO (nitrosilada) e GSH

(não-nitrosilada). As mutantes C53A e C16A/C53A apresentaram a mesma atividade específica quando tratadas ou não com doador de NO. Esse resultado está de acordo com encontrado para outras PTPs, nas quais a incubação com 1 mM de GSNO inibiu a atividade da PTP1B em cerca de 60% (LI; WHORTON, 2003) e a PTEN teve sua atividade diminuída 40 % (YU; LI; WHORTON, 2005). Comparar inibições.

#### 4.6 Determinação dos parâmetros cinéticos – $V_{\text{máx}}$ , $K_M$ e $k_{\text{cat}}$ – de PtpA selvagem e mutante C53A na ausência e presença de GSNO

As velocidades iniciais das reações com diversas concentrações de pNPP foram mensuradas (Figura 26). Os dados analisados resultaram em  $K_M$  de  $1,44 \pm 0,14$  mM para a enzima selvagem e  $1,44 \pm 0,26$  mM para a mutante C53A. Para a PtpA selvagem, os parâmetros  $V_{\text{máx}}$  e  $k_{\text{cat}}$  foram  $41,15 \pm 1,23$   $\mu\text{mol pNP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  e  $13,73 \pm 0,41$   $\text{sec}^{-1}$ , respectivamente, enquanto a mutante C53A apresentou valor de  $V_{\text{máx}}$  de  $41,88 \pm 2,36$   $\mu\text{mol pNP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  e um valor de  $k_{\text{cat}}$  de  $13,97 \pm 0,79$   $\text{sec}^{-1}$ . Desse modo, a mutação C53A não afeta os parâmetros cinéticos da enzima. Por outro lado, quando PtpA selvagem é S-nitrosilada,  $V_{\text{máx}}$  e  $k_{\text{cat}}$  são reduzidos pela metade ( $20,12 \pm 0,62$   $\mu\text{mol pNP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  e  $6,71 \pm 0,21$   $\text{sec}^{-1}$ , respectivamente), enquanto o valor de  $K_M$  permanece o mesmo ( $1,33 \pm 0,13$  mM). Diferentemente, a mutante C53A não sofre mudanças nos parâmetros cinéticos –  $K_M$  ( $1,38 \pm 0,17$  mM),  $V_{\text{máx}}$  ( $36,70 \pm 1,40$   $\mu\text{mol pNP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) e  $k_{\text{cat}}$  ( $12,24 \pm 0,47$   $\text{sec}^{-1}$ ) – depois da adição de doador de NO (Figura 26 e Tabela 1).



**Figura 26:** Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática de PtpA selvagem e mutante C53A tratadas com GSH ou GSNO. Os experimentos foram realizados em quadruplicata.

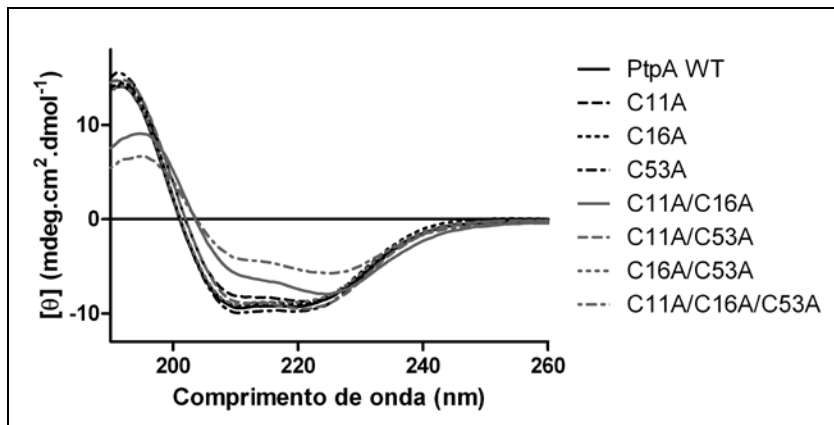
**Tabela 1.** Parâmetros cinéticos ( $V_{\text{máx}}$ ,  $K_M$  e  $k_{\text{cat}}$ ) de PtpA selvagem e mutante C53A depois do tratamento com GSH ou GSNO.

	$V_{\text{máx}}$ ( $\mu\text{mol } p\text{NP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )	$K_M$ (mM)	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{sec}^{-1}$ )
<b>PtpA + GSH</b>	41,15 ± 1,23	1,44 ± 0,14	13,73 ± 0,41
<b>PtpA + GSNO</b>	20,12 ± 0,62	1,33 ± 0,13	6,71 ± 0,21
<b>PtpA C53A + GSH</b>	41,88 ± 2,36	1,44 ± 0,26	13,97 ± 0,79
<b>PtpA C53A + GSNO</b>	36,70 ± 1,40	1,38 ± 0,17	12,24 ± 0,47

A diminuição de  $V_{\text{máx}}$  e  $k_{\text{cat}}$  da proteína selvagem na presença de NO e a permanência desses valores na mutante C53A confirma que a S-nitrosilação ocorre especificamente na cisteína não catalítica C53, e essa alteração não afeta a afinidade pelo substrato, uma vez que  $K_M$  permanece constante.

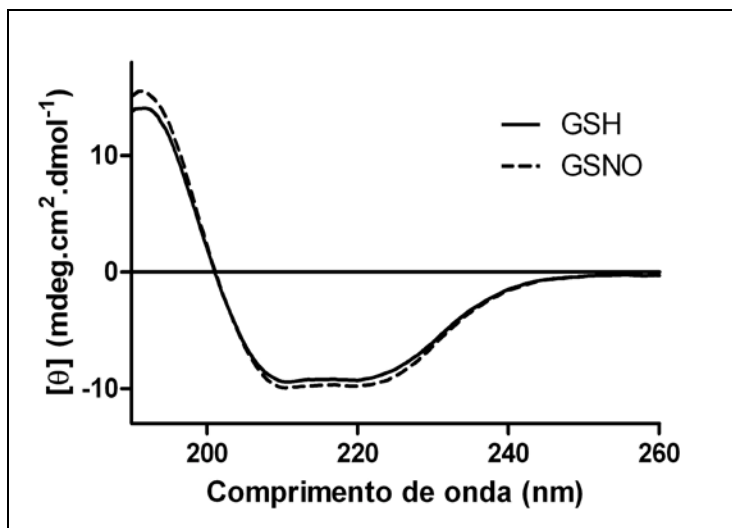
#### 4.7 Análise da estrutura secundária de PtpA e mutantes por CD

Com o objetivo de avaliar a estabilidade estrutural da PtpA frente à S-nitrosilação, experimentos de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) foram realizados com a proteína selvagem e mutantes das cisteínas. Os dados de CD obtidos para PtpA selvagem exibem um perfil de estrutura secundária típico de  $\alpha$ -hélice com picos mínimos em 208nm e 222nm. O espectro deconvoluído obtido por CDSSTR sugere uma mistura de conteúdo de  $\alpha$ -hélice (56%) e folha- $\beta$  (11%). O método de Contin também indica valores similares, com 53%  $\alpha$ -hélice e 5% folha- $\beta$  (SREERAMA e WOODY, 2000). Esses dados estão de acordo com a estrutura cristalizada, na qual PtpA possui 51 % de  $\alpha$ -hélice e 13 % de folha- $\beta$  (MADHURANTAKAM et al., 2005). Foi observado que as mutantes C11A, C16A, C53A, C11A/C53A e C16A/C53A apresentaram o mesmo conteúdo de estrutura secundária da enzima selvagem, enquanto C11A/C16A e C11A/C16A/C53A não estão enveloados da mesma maneira (Figura 27). Nessas dupla e tripla mutantes ocorre uma redução de 30% no conteúdo de  $\alpha$ -hélice. Essa redução realça a importância dos resíduos C11/C16 na estrutura secundária de PtpA.



**Figura 27:** Espectroscopia de dicroísmo circular, na região espectral de UV-distante, de PtpA selvagem e mutantes.

Quando o doador de NO (GSNO) foi adicionado à PtpA selvagem, o espectro total UV-distante é muito similar (Figura 28), indicando que a S-nitrosilação não afeta o perfil de estrutura secundária.



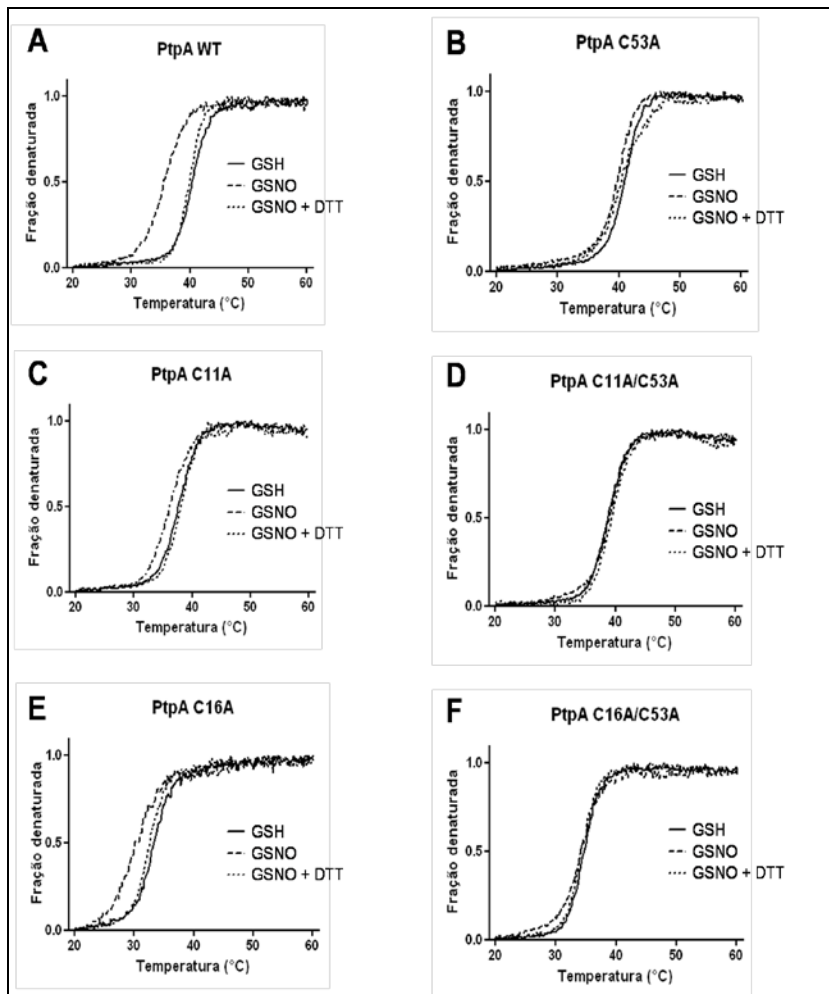
**Figura 28:** Espectroscopia de dicroísmo circular, na região espectral de UV-distante, de PtpA selvagem depois do tratamento com GSH e GSNO.

#### 4.8 Análise da estabilidade térmica de PtpA e mutantes

O perfil de desnaturação térmica de PtpA apresenta uma temperatura de desnaturação ( $T_M$ ) de 40,4 °C. A mutante C53A apresenta uma  $T_M$  muito próxima, 40,8 °C, enquanto as mutantes C11A, C16A, C11A/C53A e C16A/C53A possuem menor estabilidade térmica ( $T_M$  de 37,6, 33,3, 38,7 e 34,6 °C, respectivamente).

Por outro lado, quando a PtpA selvagem é S-nitrosilada, a  $T_M$  diminui  $4,2 \pm 0,6$  °C quando comparada com a enzima não nitrosilada. É importante mencionar que, depois do tratamento com agente redutor DTT, o perfil de desnaturação original de PtpA tratada com GSNO é restaurado, demonstrando a reversibilidade da S-nitrosilação da C53 (Figura 29A). Para confirmar que essa menor estabilidade térmica da PtpA resulta da modificação por NO na C53, as mutantes da PtpA também foram avaliadas. O perfil de desnaturação da C53A em presença de GSNO foi similar à forma não tratada sugerindo que efeitos mínimos na estabilidade da proteína podem ocorrer quando a cisteína 53 é mutada para alanina (Figura 29B). As mutantes C11A (Figura 29C) e C16A (Figura 29E) também têm valor de  $T_M$  diminuído depois do tratamento com GSNO em comparação com a forma não nitrosilada das mutantes ( $T_M$  de 36,1 e 30,1 °C respectivamente), enquanto as mutantes C11A/C53A (Figura 29D) e C16A/C53A (Figura 29F) não têm diferença significativa entre as amostras tratadas e não tratadas com GSNO ( $T_M$  de 38,9 e 34,1 °C respectivamente).



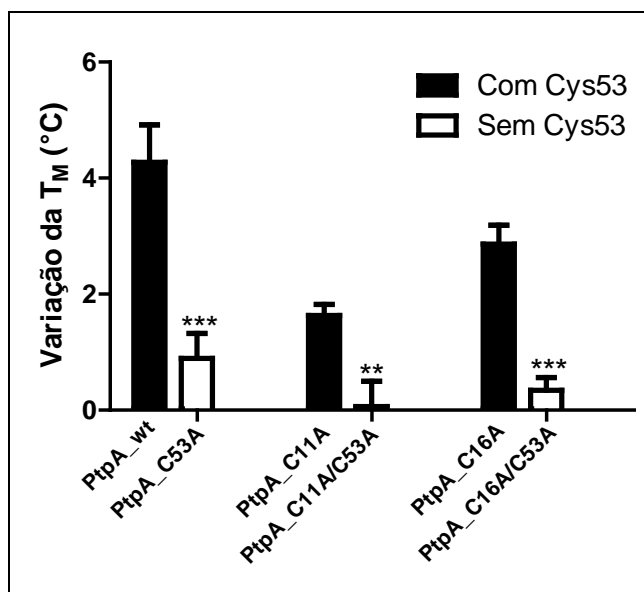


**Figura 29:** Perfil de desnaturação térmica de PtpA selvagem (A) e mutantes (B - F) após tratamento com GSH (linha sólida), GSNO (linha tracejada) ou GSNO e DTT (linha pontilhada). Os experimentos foram realizados em triplicata.

De modo geral, as diferenças observadas nos valores de  $T_M$  sugerem que a S-nitrosilação de PtpA afeta a estabilidade da proteína através da modificação da C53 (Tabela 2 e Figura 30).

**Tabela 2.** Valores médios das temperaturas de desnaturação ( $T_M$ ) em °C de PtpA e mutantes após tratamentos com GSH (1 mM), GSNO (1 mM) e GSNO (1 mM) + DTT (1 mM).

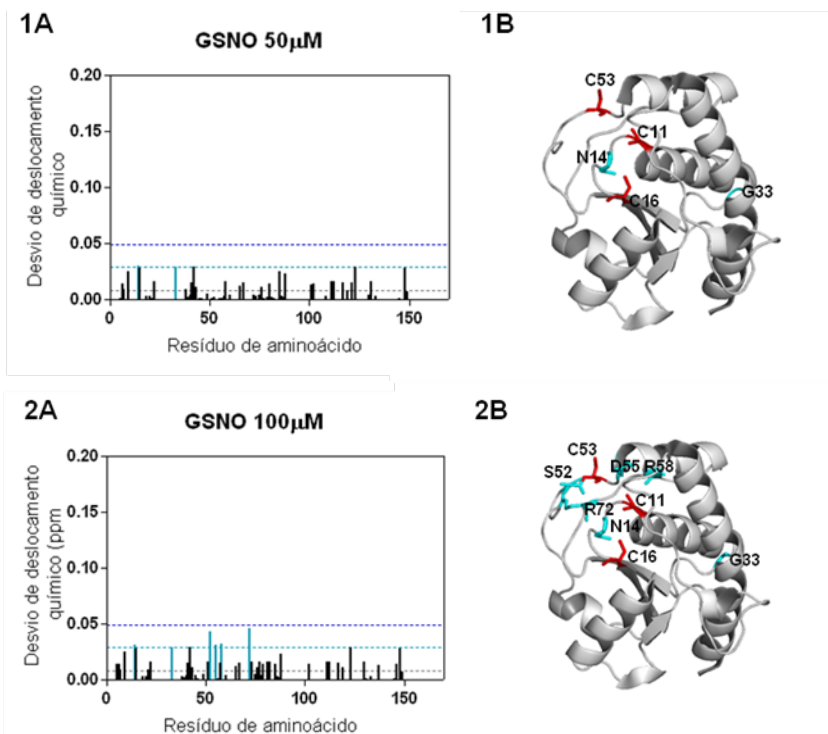
	GSH	GSNO	GSNO + DTT
<b>PtpA</b>	40,4 ± 1,2	35,6 ± 0,4	39,9 ± 1,0
<b>PtpA C53A</b>	40,8 ± 0,6	39,7 ± 0,5	40,4 ± 0,3
<b>PtpA C11A</b>	37,6 ± 0,1	36,1 ± 0,1	37,9 ± 0,5
<b>PtpA C11A/C53A</b>	38,7 ± 0,4	38,9 ± 0,2	39,2 ± 0,1
<b>PtpA C16A</b>	33,3 ± 0,3	30,1 ± 0,1	32,6 ± 0,3
<b>PtpA C16A/C53A</b>	34,6 ± 0,3	34,1 ± 0,2	34,3 ± 0,2

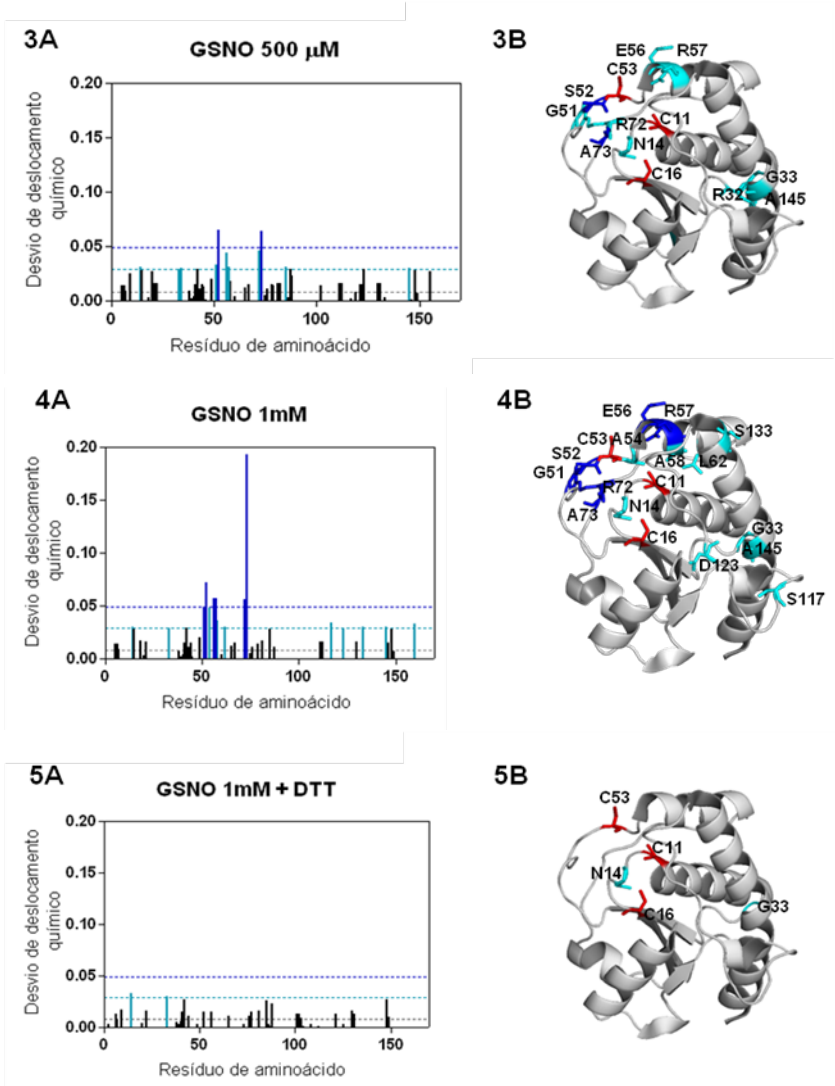


**Figura 30:** Variação da  $T_M$  de PtpA selvagem e mutantes depois do tratamento com GSNO. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. *Two-Way ANOVA* (\*\*\*)  $p < 0.001$ , (\*\*)  $p < 0.01$ .

## 4.9 Ensaios de Ressonância Magnética Nuclear da PtpA

Com o objetivo de avaliar possíveis mudanças na estrutura terciária decorrente da S-nitrosilação da C53 de PtpA, foram realizados espectros bidimensionais de correlação heteronuclear ( $^{15}\text{N}$ -HSQC) com a PtpA marcada uniformemente com  $^{15}\text{N}$ . Perturbações dos deslocamentos químicos foram calculadas usando como referência o assinalamento depositado no BMRB (ID: 6722) (SAXENA, 2005). A maioria dos desvios de deslocamentos químicos foram identificados na PtpA, exceto os resíduos L99 e V140. O assinalamento de todos os demais resíduos foi confirmado pelo experimento de HNCA. A proteína marcada foi titulada com concentrações crescentes de GSNO (50  $\mu\text{M}$  a 1mM) e foram comparados com o espectro na ausência do doador de NO. Os desvios do deslocamento químico de cada aminoácido para cada concentração do doador de NO foram medidos e colocados nos gráficos em função do resíduo de aminoácido (Figura 31).





**Figura 31:** Desvios do deslocamento químico observados em espectros bidimensionais de correlação heteronuclear ( $^{15}\text{N}$ -HSQC) da PtpA submetida a diferentes concentrações de GSNO. Para cada concentração de GSNO indicada, estão mostrados o gráfico de desvio do deslocamento químico em função do aminoácido e a estrutura da PtpA (PDB 1U2P). Nos gráficos, a linha pontilhada em cinza representa a média das variações (0,0084 ppm), a linha azul claro

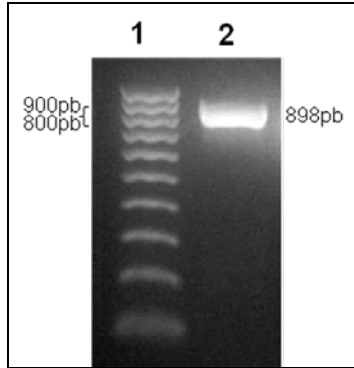
representa a média somada a um desvio padrão (0,029 ppm) e a linha azul escuro representa a média somada de dois desvios padrão (0,049 ppm). Os desvios do deslocamento químico que atingiram valores maiores que a média somada de um desvio padrão foram coloridos com a cor correspondente. Nas figuras da estrutura, os resíduos com variação significativa observados no gráfico estão identificados e coloridos com o tom de azul correspondente. Os resíduos de Cys também estão identificados e apresentam-se coloridos em vermelho.

Na concentração de 1 mM de GSNO, os resíduos G51, S52, E56, R57, R72 e A73 apresentaram desvios dos deslocamentos químicos maiores que a média acrescida de dois desvios padrões. Menores perturbações - maiores que a média mais um desvio - foram também identificadas nos resíduos A54, A58, L62, S117, D123, S133 e A145. Mesmo em baixas concentrações (100  $\mu$ M), foi observado que os resíduos S52, D55, R57 e A58 foram afetados pelo NO - maioria dos resíduos localizados no *loop* variável em torno da C53. Para verificar se os resíduos foram realmente afetados pelo NO, a amostra titulada com GSNO foi quimicamente reduzida com DTT com o intuito de romper a ligação cisteína-NO. A reversibilidade das perturbações de deslocamentos químicos após a adição de DTT confirmou que o NO modifica os resíduos adjacentes a C53 (Figura 31).

#### **4.10 Clonagem do gene que codifica a PtkA**

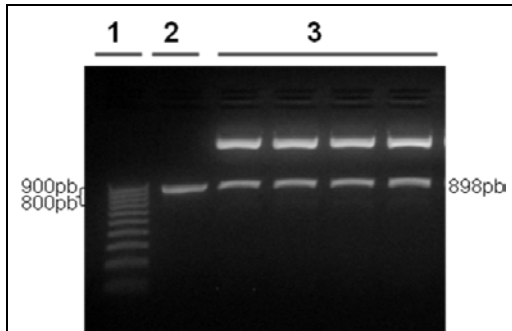
Recentemente, Bach, Wong e Av-Gay (2009) mostraram que a PtpA é fosforilada por uma tirosina cinase, a PtkA. Além de fosforilar a PtpA em dois resíduos de tirosinas adjacentes – Y128 e Y129 – a PtkA também se autofosforila na Y262. Segundo análise de sua sequência primária, a PtkA é um membro da superfamília HAD (*Haloacid Dehalogenase-like hydrolase*) (COLE et al., 1998; COLE et al., 2002).

O fragmento gênico correspondente ao gene *Rv2232* que codifica a proteína PtkA foi obtido na reação de amplificação a partir do DNA genômico de *M. tuberculosis*. A banda observada está entre os marcadores de 800 e 900 pb, valor condizente com o valor teórico esperado de 898 pb do fragmento (Figura 32).

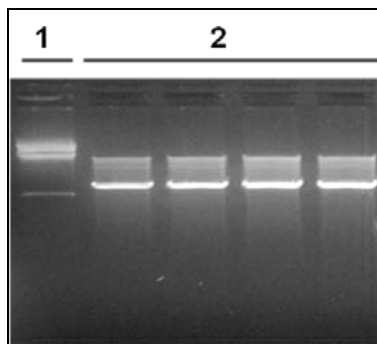


**Figura 32:** Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação do gene que codifica PtkA de *M. tuberculosis*. **1.** Marcador de massa molecular. **2.** Banda correspondente ao fragmento amplificado de 898 pb do gene *Rv2232* que codifica a proteína PtkA.

Após a ligação do fragmento gênico ao *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector*, este foi digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* (Figura 33). Essa reação possibilitou a formação do fragmento gênico com extremidades coesivas que permitem o pareamento da região codificante do gene com o vetor de expressão pET14b, uma vez que este também foi digerido com as mesmas endonucleases (Figura 34).

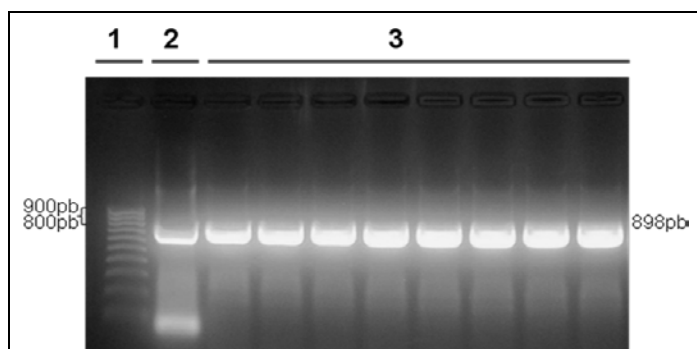


**Figura 33:** Clivagem do vetor *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* liberando o fragmento gênico que codifica a PtkA. **1,** marcador de massa molecular; **2,** inserto controle, **3,** plasmídeos digeridos. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.



**Figura 34:** Digestão do vetor de expressão pET-14b com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*. **1.** Vetor não digerido. **2.** Vetor digerido. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

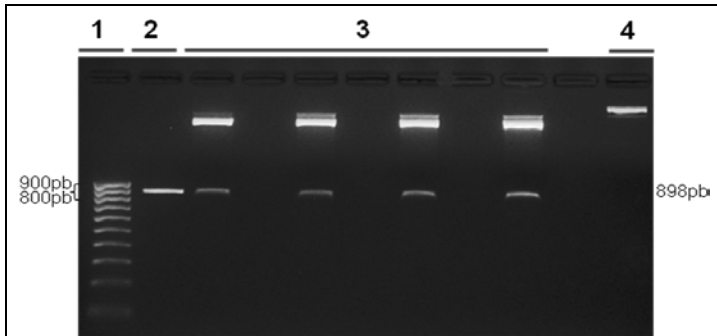
O fragmento gênico que codifica PtkA foi ligado ao vetor pET-14b e o produto dessa reação foi usado para transformar bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$ . Com o intuito de verificar a presença do plasmídeo com o gene de interesse nas colônias bacterianas, foi feito PCR do DNA extraído das colônias transformadas. Os fragmentos amplificados apresentaram cerca de 898pb que correspondem ao fragmento do gene inserido ao vetor (Figura 35).



**Figura 35:** PCR do DNA extraído das colônias de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas com o vetor ligado ao fragmento. **1.** Marcador de massa molecular; **2.** PCR do fragmento que codifica PtkA; **3.** PCR das colônias - bandas correspondentes ao fragmento de 898 pb são observadas. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

As colônias positivas foram cultivadas e foi realizada a extração dos plasmídeos conforme instruções do kit comercial. Após a extração,

os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* (Figura 36) para confirmar se os fragmentos estavam inseridos nos vetores. A digestão liberou um fragmento de massa próxima à esperada, de 898 pb.



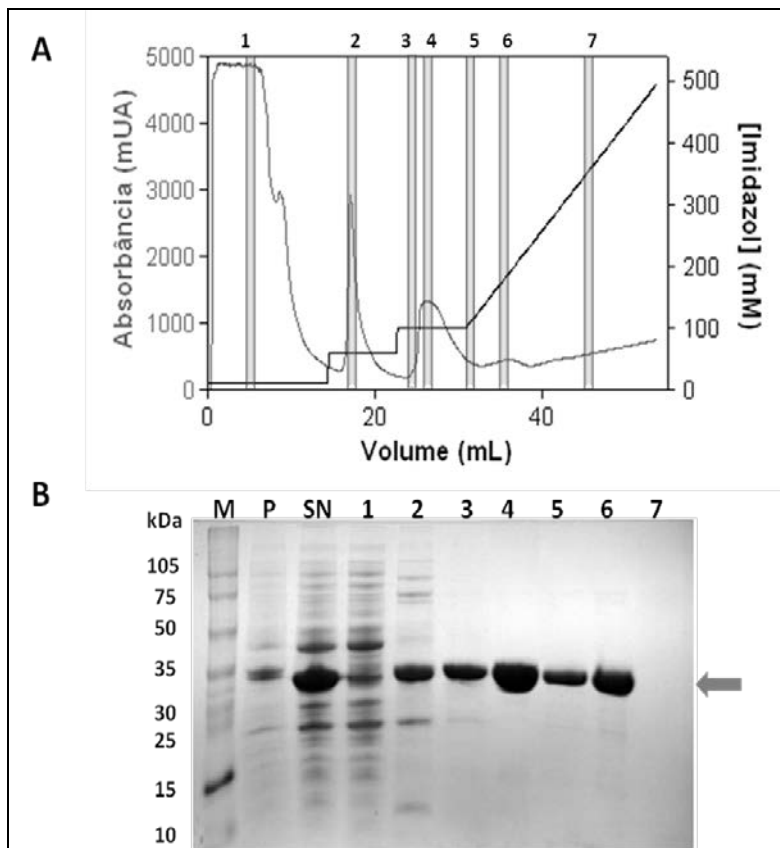
**Figura 36:** Digestão dos plasmídeos pET14b-*Mt\_PtkA* com as enzimas *NdeI* e *BamHI*. Fragmento de 898 pb (inserto) liberado após a clivagem pelas enzimas confirma a inserção do gene de interesse nos plasmídeos. **1**, marcador de massa molecular; **2**, inserto controle, **3**, plasmídeos digeridos; **4**, plasmídeo não digerido. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Os plasmídeos foram sequenciados e foi confirmada a presença do gene que codifica a PtkA.

#### 4.11 Expressão e purificação de PtkA recombinante

A proteína PtkA de *M. tuberculosis* foi expressa em *E. coli* BL21(DE3) a partir do vetor de expressão pET14b-*Mt\_PtkA*. A proteína recombinante com cauda de histidinas na porção N-terminal (massa teórica de 32 kDa), contida na fração solúvel bacteriana, foi purificada por IMAC e eluída com concentração crescente de 100 mM a 300 mM de imidazol (Figura 37, linhas 3, 4, 5 e 6). As frações eluídas da coluna *HisTrap* correspondentes à PtkA recombinante foram coletadas, reunidas e submetidas à diálise em tampão redutor para remoção do imidazol.



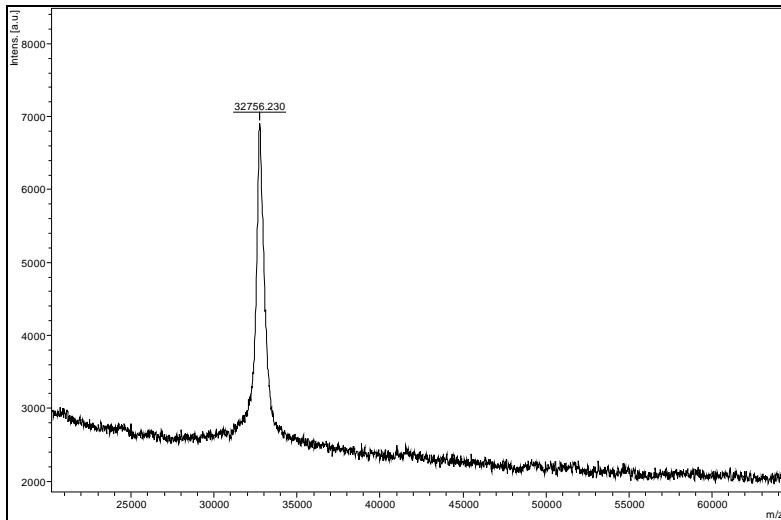


**Figura 37:** Purificação da PtkA recombinante por IMAC em cromatógrafo ÄKTA. **A.** Gráfico da eluição das proteínas com concentrações crescentes de imidazol. A fração solúvel do lisado bacteriano (contendo a PtkA recombinante com cauda de histidinas N-terminal) foi aplicada à coluna *HisTrap* e a coluna foi lavada com concentrações crescentes de imidazol. Em cinza, no eixo das ordenadas esquerdo, está representada a absorbância a 280 nm de cada volume de eluição. Em preto, no eixo das ordenadas direito, está representada a concentração de imidazol em cada volume de eluição. As faixas cinza enumeradas são as frações eluídas, coletadas e analisadas no SDS-PAGE mostrado em B. **B.** SDS-PAGE da purificação da PtkA. As frações bacterianas e as frações coletadas (1-7) foram analisadas em SDS-PAGE 10%. A seta indica a banda correspondente à PtkA (32,7 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 PtkA foi concentrada, quantificada e armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  para realização dos demais experimentos. O rendimento final de cada purificação foi de aproximadamente 5 mg de proteína por litro de cultivo.

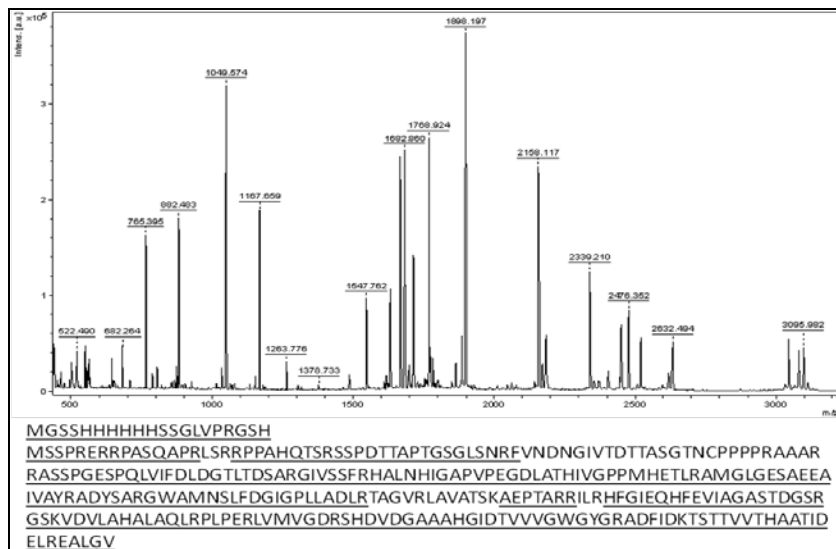
#### 4.12. Análise por espectrometria de massa da proteína PtkA

A identidade da proteína PtkA purificada foi confirmada por espectrometria de massa da proteína digerida com a enzima tripsina e da não digerida - massa intacta. No espectro da proteína intacta foi encontrada uma massa de 32.756 Da, valor semelhante ao teórico de 32.727 Da (Figura 38).



**Figura 38:** Espectro MALDI-TOF de PtkA intacta, no qual foi observada uma massa de 32.756 Da.

No espectro da proteína digerida com tripsina, foram observados os peptídeos correspondentes da PtkA, sendo que 85% da sequência de aminoácidos foi confirmada (Figura 39).

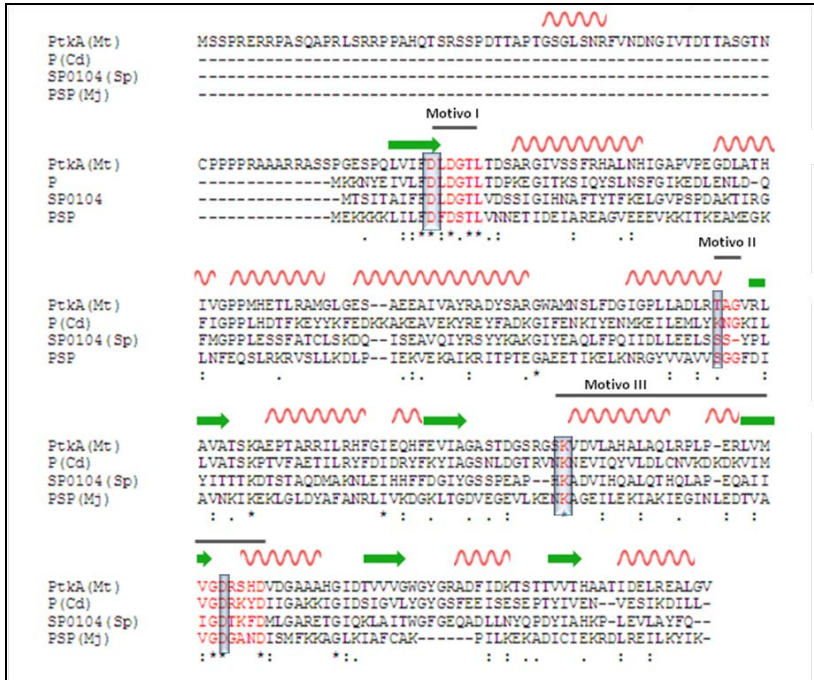


**Figura 39:** Identificação de PtkA por espectrometria de massa MALDI-TOF. Acima, espectro obtido da proteína digerida com tripsina. Abaixo, sequência de aminoácidos de PtkA, na qual os peptídeos identificados encontram-se sublinhados.

#### 4.13 Modelagem molecular por homologia estrutural de PtkA

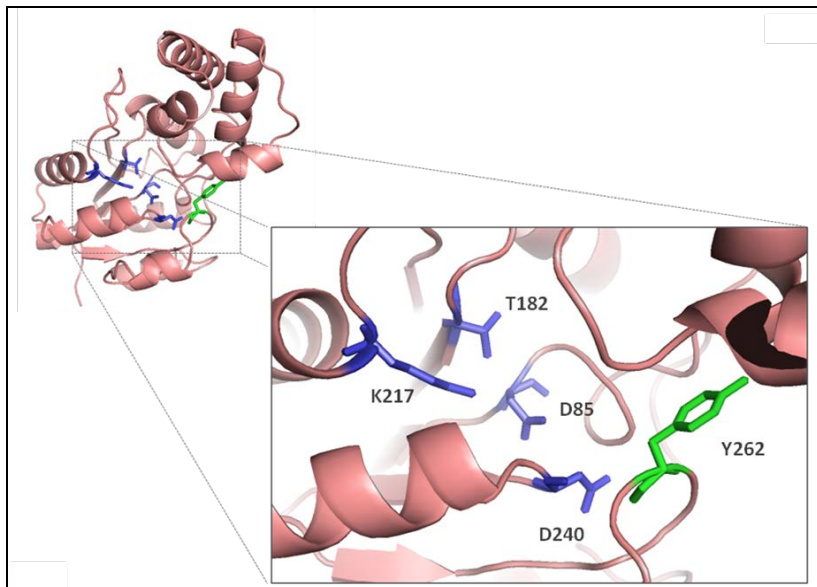
O modelo estrutural de PtkA foi construído a partir de uma fosfatase putativa de *Clostridium difficile* (PDB ID: 3SD7), a qual apresenta 33 % de similaridade com a PtkA de *M. tuberculosis*. Ambas pertencem à classe HAD, uma superfamília de hidrolases que compreende fosfatases, epóxido-hidrolases e dehalogenases (WANG et al, 2001).

As enzimas dessa superfamília contêm três motivos de sequências altamente conservadas: O motivo I: DXDX[T/V][L/V]; motivo II: [S/T]XX, e motivo III: K-[G/S][D/S]XXX[D/N] (Figura 40) O sítio ativo é formado pelos três motivos de sequência conservada e pela ligação do  $Mg^{2+}$  e do fosfato na estrutura (WANG et al, 2001). De acordo com a comparação de estrutura dos membros dessa família com a de PtkA, os resíduos catalíticos são o aspartato 85 (motivo I), treonina 182 (motivo II), lisina 217 e aspartato 240 (motivo III), mostrados na figura 41.



**Figura 40:** Alinhamento da sequência de PtkA de *M. tuberculosis* com seus homólogos. P(Cd) – fosfatase putativa de *Clostridium difficile* -, SP0104 (Sp) – hidrolase de *Streptococcus pneumoniae* -, PSP (Mj) – fosfoserina fosfatase de *Methanococcus jannaschii*. As espirais vermelhas indicam aminoácidos que se encontram em  $\alpha$ -hélices, a seta verde indica fita- $\beta$ . Os motivos conservados estão em vermelho e nomeados acima. Os aminoácidos catalíticos (D85, T182, K217 e D240 para PtkA) estão sublinhados em azul.

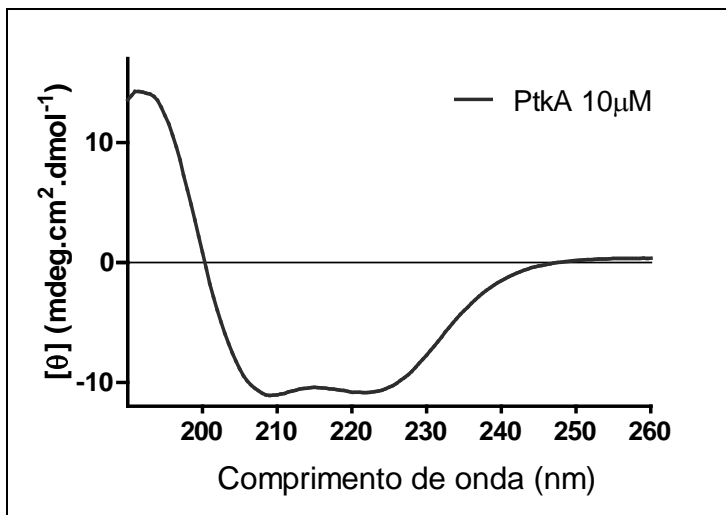
No alinhamento da estrutura primária de PtkA com outros membros da família, pode ser observado que a PtkA possui uma sequência N-terminal incomum às demais proteínas. Essa sequência não pôde ser modelada (Figura 41) e não se sabe a importância dela na enzima.



**Figura 41:** Modelo estrutural de PtkA de *M. tuberculosis*. A modelagem molecular foi construída a partir da estrutura de uma fosfatase putativa de *Clostridium difficile* (PDB ID: 3SD7). Em azul, estão destacados os resíduos do sítio ativo, D85, T182, K217 e D240, em verde a tirosina que sofre autofosforilação (Y262).

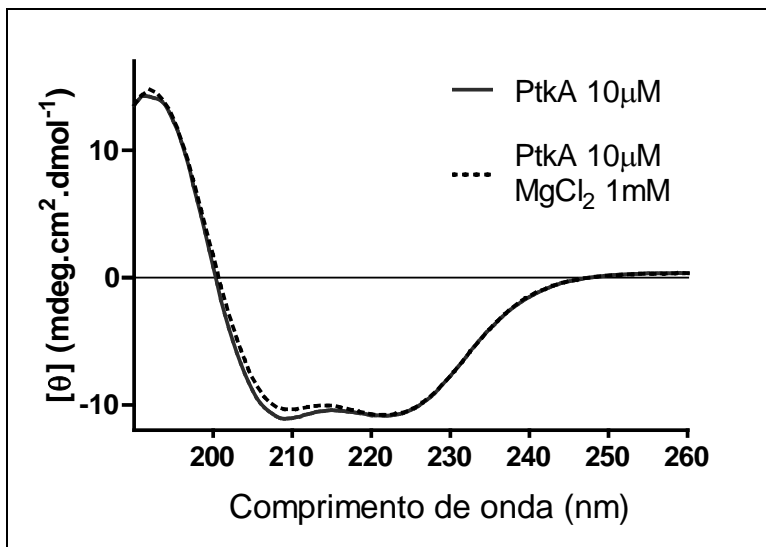
#### 4.14 Análise da estrutura secundária de PtkA recombinante por Dicroísmo Circular (CD)

Com o objetivo de avaliar o conteúdo de estrutura secundária de PtkA recombinante, experimentos de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) foram realizados. Os dados de CD obtidos para PtkA selvagem exibem um perfil de estrutura secundária típico de  $\alpha$ -hélice com picos mínimos em 208nm e 222nm. O espectro deconvoluído obtido por CDSSTR sugere uma mistura de conteúdo de  $\alpha$ -hélice (50%) e folha- $\beta$  (14%). O método de Contin também indica valores similares, com 42%  $\alpha$ -hélice e 7% folha- $\beta$  (SREERAMA; WOODY, 2000). (Figura 42). Esses valores são similares aos propostos na modelagem molecular, de  $\alpha$ -hélice (40%) e folha- $\beta$  (9%), o que sugere que a proteína recombinante está corretamente enovelada.

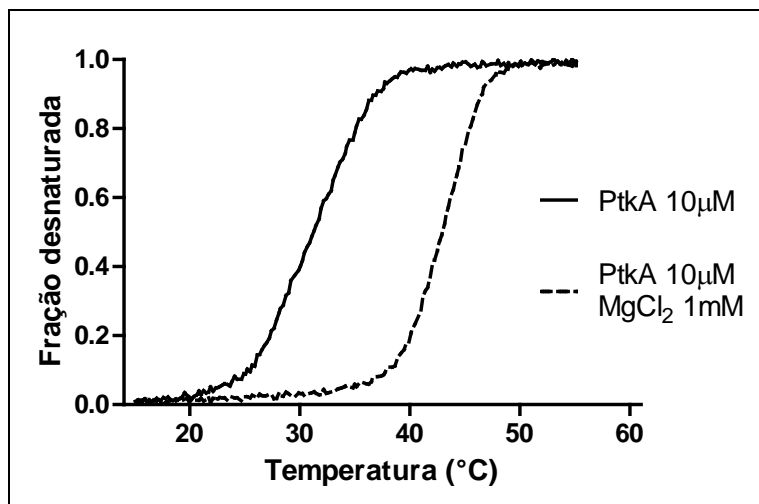


**Figura 42:** Espectroscopia de dicroísmo circular, na região espectral de UV-distante, de PtkA selvagem.

As proteínas da família HAD requerem  $\text{Mg}^{2+}$  para a hidrólise do ATP. Dessa forma, foi analisada a influência do metal na estrutura secundária. O espectro de CD apresentou o mesmo perfil na ausência e presença de  $\text{MgCl}_2$ , o que sugere que a ligação do metal ao sítio catalítico não altera o conteúdo de estrutura secundária (Figura 43). Porém, quando a enzima é submetida à desnaturação térmica, é observado que a  $T_M$  aumenta consideravelmente na presença do metal, de 31 °C para 43 °C (Figura 44). Assim, a ligação do metal ao sítio ativo, estabiliza a estrutura terciária da proteína.



**Figura 43:** Espectroscopia de dicroísmo circular, na região espectral de UV-distante, de PtkA selvagem sem adição de MgCl<sub>2</sub>, linha preta, e em presença de 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, tracejado.



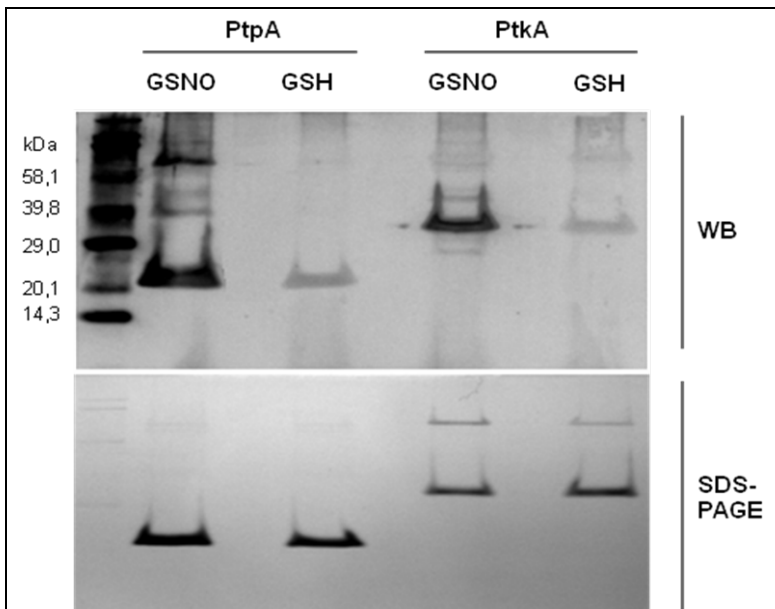
**Figura 44:** Perfil de desnaturação térmica de PtkA selvagem sem adição de MgCl<sub>2</sub>, linha preta, e em presença de 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, tracejado.

#### 4.15 Ensaio de fosforilação de PtpA pela PtkA

Não foi observada a fosforilação de PtpA nem a autofosforilação de PtkA como descrito anteriormente (BACH; WONG; AV-GAY, 2009). Assim, deve-se ainda otimizar as condições para essa reação.

#### 4.16 Ensaio de biotilação de PtkA

Com o objetivo de avaliar se PtkA, assim como PtpA, é S-nitrosilada, o ensaio de *biotin switch* foi realizado com alíquotas de ambas as proteínas puras (Figura 45). Como pode ser observado, a PtkA também é S-nitrosilada pela ação do doador de óxido nítrico, GSNO.

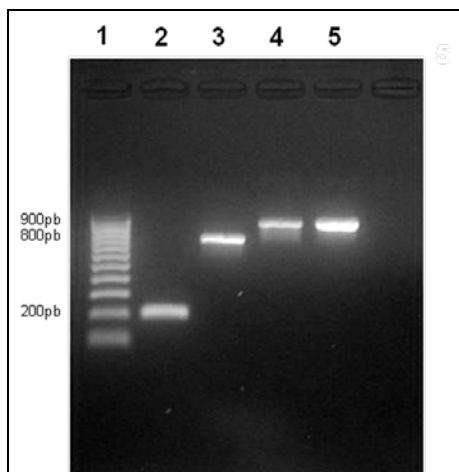


**Figura 45:** Ensaio de biotilação de PtkA selvagem para a detecção de proteínas S-nitrosiladas. A PtpA (controle positivo) e PtkA em tampão HEN foram tratadas com 1 mM de GSNO (doador de NO) ou 1 mM de GSH (controle negativo). Em WB está a revelação do *Western blot* com anticorpo anti-biotina e abaixo está a SDS-PAGE das mesmas amostras.



#### 4.17 Mutação sítio-dirigida de PtkA

Para confirmar a S-nitrosilação de PtkA, seu único resíduo de cisteína foi mutado para alanina. Os fragmentos gênicos da mutação sítio dirigida PtkA C61A mostraram na eletroforese em gel de agarose tamanhos condizentes ao esperado (Figura 46). A banda do fragmento A está próxima de 200 pb quando o valor teórico é de 208 pb. A banda do fragmento B está entre 700 e 800 pb, sendo o valor teórico 723 pb. Depois de formados os fragmentos A e B, estes foram unidos o que deu origem ao fragmento mutado PtkA C61A. A banda observada está entre os marcadores de 800 e 900pb, valor condizente com o valor teórico esperado de 898 pb do fragmento, e do mesmo tamanho do fragmento da PtkA selvagem.

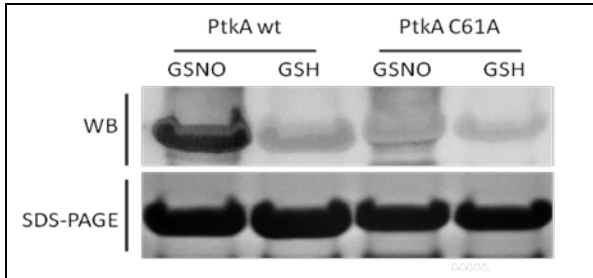


**Figura 46:** Mutação sítio-dirigida PtkA C61A. 1. Marcador de massa molecular. 2. Fragmento A da mutação sítio-dirigida, 208 pb. 3. Fragmento B da mutação sítio-dirigida, 723 pb. 4. Fragmento mutado, união de A e B, 898 pb. 5. Fragmento da PtkA selvagem, 898 pb. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

Depois de obtido o fragmento mutado, este foi ligado ao vetor de expressão pET-14b da mesma forma que o fragmento selvagem. A mutação sítio-dirigida foi confirmada por sequenciamento de DNA no qual foi observada a troca da cisteína 61 por uma alanina.

#### 4.18 Ensaio de biotilação de PtkA selvagem e mutante C61A

O ensaio de *biotin switch* foi novamente realizado, agora com PtkA selvagem e mutante C61A (Figura 47).



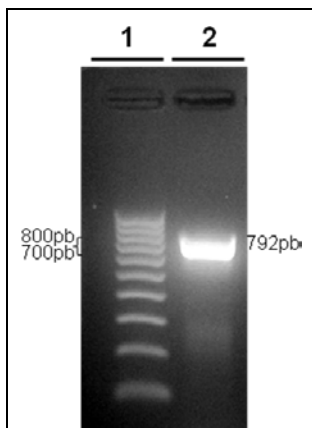
**Figura 47:** Ensaio de biotilação de PtkA e mutante C61A para detecção de proteínas S-nitrosiladas. As proteínas, em tampão HEN foram tratadas com 1 mM de GSNO (doador de NO) ou 1 mM de GSH (controle negativo). Em WB está a revelação do *Western blot* com anticorpo anti-biotina e abaixo está a SDS-PAGE das mesmas amostras.

A mutante desprovida da C61 não foi biotinilada, o que confirmou a S-nitrosilação da PtkA nesse resíduo de aminoácido.

#### 4.19 Clonagem do gene que codifica SapM de *M. tuberculosis*

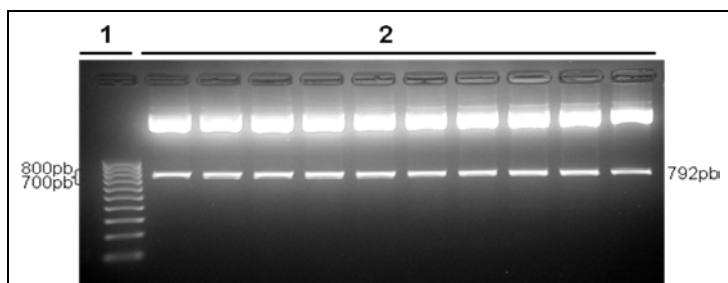
Uma terceira proteína do *M. tuberculosis* foi estudada neste trabalho, a SapM (*Secreted acid phosphatase of M. tuberculosis*). Assim como a PtpA, a SapM também é secretada por esse micro-organismo e um importante fator de virulência. A biologia dessa proteína ainda é muito pouco conhecida, porém já é apontada como um provável alvo terapêutico no combate à tuberculose tendo em vista sua importância na infecção.

O fragmento gênico correspondente ao gene *Rv3310* que codifica a proteína SapM, foi obtido na reação de amplificação a partir do DNA genômico de *Mycobacterium tuberculosis*. A banda observada está entre os marcadores de 700 e 800pb, valor condizente com o valor teórico esperado de 792 pb do fragmento.

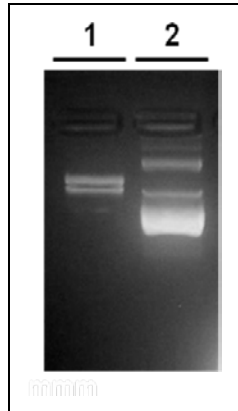


**Figura 48:** Eletroforese em gel de agarose 1 % da amplificação do gene que codifica a proteína SapM de *Mycobacterium tuberculosis*. **1.** Marcador de massa molecular. **2.** Banda correspondente ao fragmento amplificado de 792 pb do gene *Rv3310* que codifica a proteína SapM.

Após a ligação do fragmento gênico ao vetor *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector*, este foi digerido com as enzimas de restrição *XhoI* e *BamHI* (Figura 49). Essa reação possibilitou a formação do fragmento gênico com extremidades coesivas que permitem o pareamento da região codificante do gene com o vetor de expressão pET14b, uma vez que este também foi digerido com as mesmas enzimas (Figura 50).

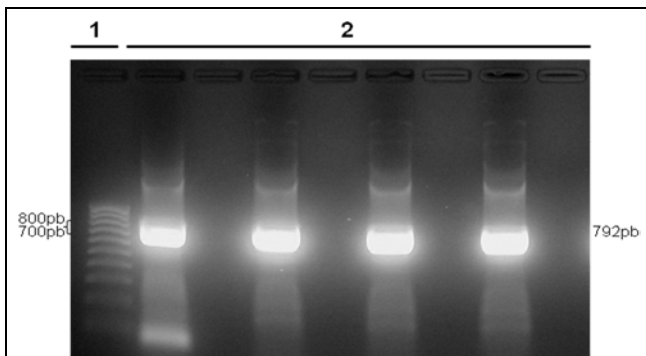


**Figura 49:** Clivagem do vetor *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* com as enzimas de restrição *XhoI* e *BamHI* liberando o fragmento gênico que codifica a SapM. **1,** marcador de massa molecular; **2,** plasmídeos digeridos. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.



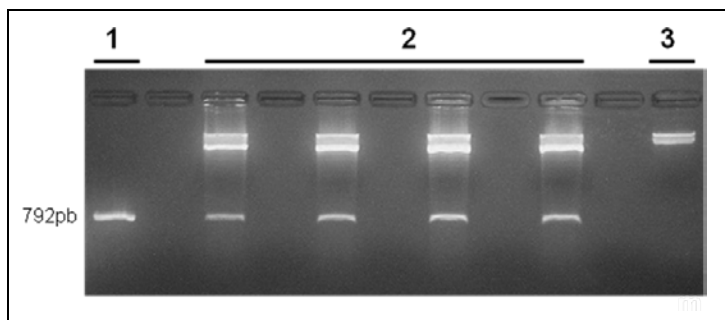
**Figura 50:** Digestão do vetor de expressão pET-14b com as enzimas de restrição *Xho*I e *Bam*HI. **1.** Vetor não digerido. **2.** Vetor digerido. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

O fragmento gênico que codifica SapM foi ligado ao vetor pET-14b e o produto dessa reação foi usado para transformar bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$ . Com o intuito de verificar a presença do plasmídeo com o gene de interesse nas colônias bacterianas, foi feito PCR diretamente das colônias transformadas. Os fragmentos amplificados apresentaram os cerca de 792 pb que correspondem ao fragmento do gene inserido ao vetor (Figura 51).



**Figura 51:** PCR do DNA extraído das colônias de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas com o vetor ligado ao fragmento. **1,** Marcador de massa molecular; **2,** PCR das colônias - bandas correspondentes ao fragmento de 792 pb são observadas. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

As colônias positivas foram cultivadas e foi realizada a extração dos plasmídeos conforme instruções do kit comercial. Após a extração, os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição *XhoI* e *BamHI* (Figura 52) para confirmar se os fragmentos estavam inseridos nos vetores. A digestão liberou um fragmento de cerca de 792 pb conforme o esperado.

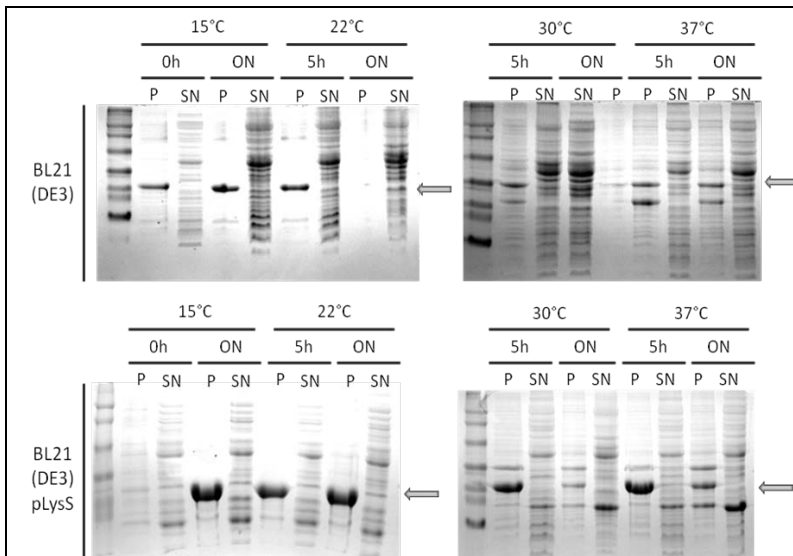


**Figura 52:** Digestão dos plasmídeos pET14b-Mt\_SapM com as enzimas *XhoI* e *BamHI*. Fragmento de 792 pb (inserto) liberado após a clivagem pelas enzimas confirma a inserção do gene de interesse nos plasmídeos. **1**, fragmento de DNA que codifica SapM (controle); **2**, plasmídeos digeridos; **3**, plasmídeo não digerido. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Os plasmídeos foram sequenciados e foi confirmada a presença do gene que codifica a SapM.

#### 4.20 Teste de indução da expressão de SapM recombinante

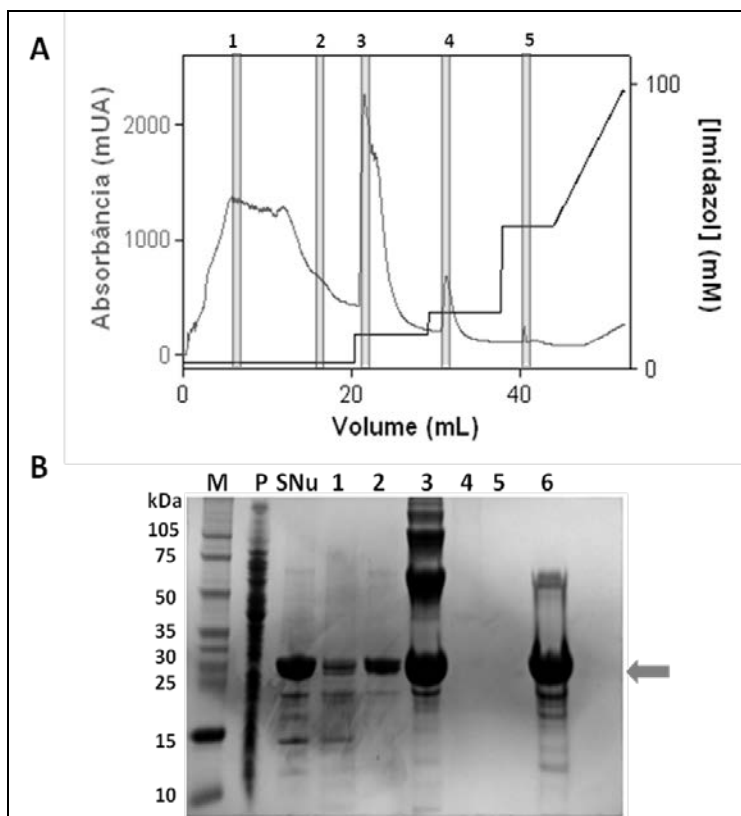
A SapM permaneceu na fração insolúvel do lisado bacteriano em todas as condições de expressão. Pôde-se observar também que a SapM foi expressa em maior quantidade em cepas *E. coli* BL21 (DE3) pLysS do que em *E. coli* BL21 (DE3) e que a temperatura ótima de expressão foi 15 °C durante 20 horas (ON) (Figura 53).



**Figura 53:** Teste de indução da expressão de SapM. P, *pellet*, fração insolúvel do lisado; SN, *sobrenadante*, fração solúvel do lisado; ON, *overnight*, 20 horas de indução. A seta cinza indica a banda correspondente à SapM. A proteína é melhor expressa em cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, a 15°C, por 20 horas, com 0,5 mM de IPTG.

#### 4.21 Purificação de SapM recombinante

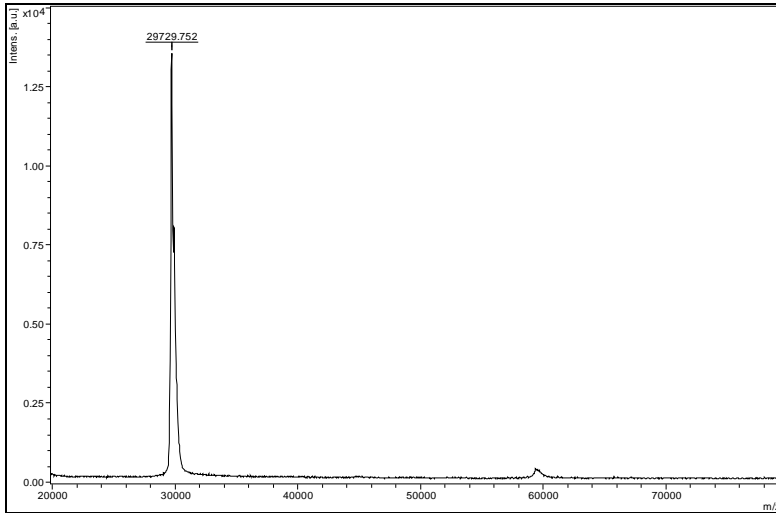
A proteína recombinante com cauda de histidinas na porção N-terminal (massa teórica de 29,7 kDa), contida na fração insolúvel bacteriana, foi solubilizada com ureia 8 M e purificada por IMAC. A proteína foi eluída com concentração crescentes de imidazol (Figura 54). As frações eluídas da coluna *HisTrap* correspondentes à SapM recombinante foram coletadas e reunidas. Para a retirada da ureia e renovelamento, SapM foi diluída e dialisada contra tampão Tris 100 mM (pH 8,0), L-arginina 250 mM, EDTA 1 mM, GSH 1 mM, glicerol 30 %, quantificada e armazenada a -20°C para realização dos demais experimentos. O rendimento final de cada purificação foi de aproximadamente 13 mg de proteína por litro de cultivo.



**Figura 54:** Purificação da SapM recombinante por IMAC em cromatógrafo ÄKTA. **A.** Gráfico da eluição das proteínas com concentrações crescentes de imidazol. A fração do lisado bacteriano solubilizada com ureia (contendo a SapM recombinante com cauda de histidinas N-terminal) foi aplicada à coluna *HisTrap* e a coluna foi lavada com concentrações crescentes de imidazol. Em cinza, eixo das ordenadas esquerdo, está representada a absorbância a 280 nm de cada volume de eluição. Em preto, eixo das ordenadas direito, está representada a concentração de imidazol em cada volume de eluição. As faixas cinza enumeradas são as frações eluídas, coletadas e analisadas na SDS-PAGE mostrada em B. **B.** SDS-PAGE da purificação da SapM. As frações bacterianas e as frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE 10%. A seta indica a banda correspondente à SapM (29,7 kDa). M, marcador de massa molecular; P, fração insolúvel do lisado bacteriano; S, Nu, fração do lisado bacteriano solubilizada com ureia 8 M. A fração 6 corresponde à proteína dialisada contra tampão redutor.

#### 4.22 Análise por espectrometria de massa da proteína SapM

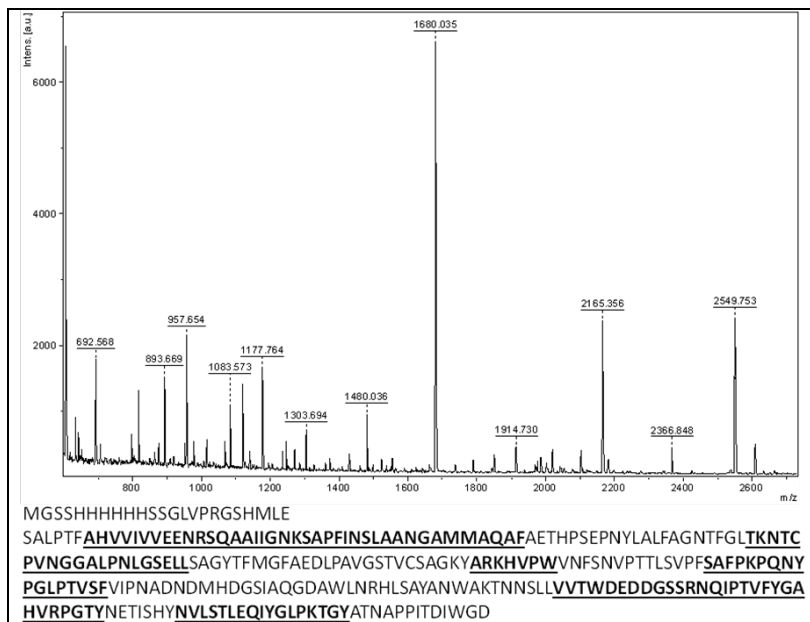
A identidade da proteína SapM purificada foi confirmada por espectrometria de massa da proteína digerida com a enzima tripsina e da não digerida - massa intacta. No espectro da proteína intacta foi encontrada uma massa de 29.729 Da, valor semelhante ao teórico de 29.700 Da (Figura 55).



**Figura 55:** Espectro MALDI-TOF de SapM. Foi observada uma massa de 29.729 Da.

No espectro da proteína digerida com tripsina, foram observados os peptídeos correspondentes da SapM, sendo que 50% da sequência de aminoácidos foi confirmada (Figura 56).





**Figura 56:** Identificação de SapM por espectrometria de massa MALDI-TOF. Acima, espectro obtido da proteína digerida com tripsina. Abaixo, sequência de aminoácidos de SapM, na qual os peptídeos identificados encontram-se sublinhados.

#### 4.23 Análise da estrutura secundária de SapM recombinante por CD

Com o objetivo de avaliar o conteúdo de estrutura secundária de SapM recombinante por CD, a proteína foi dialisada contra diversos tampões com concentrações reduzidas de sais. Baixas concentrações de sais e tampões são preconizados para experimentos de CD, uma vez que estes aumentam a voltagem do sistema, o que interfere na aquisição dos dados (KELLY et al., 2005). Contudo, em todas as condições testadas a proteína precipitou, o que impossibilitou a realização do experimento.

## 5. DISCUSSÃO

A PtpA de *M. tuberculosis* é secretada no citosol dos macrófagos, sendo essencial para o sucesso da infecção em humanos (COWLEY; BABAKAIFF; AV-GAY, 2002; BACH et al., 2008; GRUNDNER; COX; ALBER, 2008). Recentemente foi mostrado que a PtpA sofre S-nitrosilação e essa modificação ocorre na C53. Como consequência, a S-nitrosilação na C53 de PtpA diminui sua atividade fosfatase (ECCO et al., 2010). 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 (C11). Dessa maneira, este trabalho contribui para um melhor entendimento do efeito dessa modificação pós-traducional da estrutura, estabilidade e na atividade enzimática de PtpA.

### 5.1 A S-nitrosilação da C53 não altera a afinidade de PtpA pelo substrato

Nos ensaios de atividade enzimática foi observada diferença significativa na atividade da PtpA selvagem e mutante C16A nitrosiladas quando comparadas à forma não-nitrosilada. Em contrapartida, as mutantes C53A e C16A/C53A apresentaram a mesma atividade específica quando tratadas ou não com doador de NO. Esse resultado está de acordo com o exposto previamente para PtpA, no qual a S-nitrosilação da C53 diminui cerca de 40 % a atividade fosfatase (ECCO et al., 2010) e o encontrado para outras PTPs, nas quais a incubação com 1 mM de GSNO inibiu a atividade da PTP1B em cerca de 60% (LI; WHORTON, 2003) e a PTEN teve sua atividade diminuída 40 % (YU; LI; WHORTON, 2005).

A diminuição dos valores de  $V_{m\acute{a}x}$  e  $k_{cat}$  da proteína selvagem na presença de NO e a permanência desses valores na mutante C53A confirma que a S-nitrosilação ocorre especificamente na cisteína não catalítica C53, e essa alteração não afeta diretamente o sítio catalítico uma vez que a constante de afinidade ao substrato -  $K_M$  - mantém-se constante.

## 5.2 A S-nitrosilação da C53 diminui a estabilidade térmica de PtpA

A S-nitrosilação não afeta o perfil de estrutura secundária de PtpA. Porém, quando a proteína selvagem é nitrosilada pelo GSNO, a  $T_M$  diminui cerca de 4 °C, enquanto na mutante C53A não é observada diferença significativa. Após tratamento com DTT, a nitrosilação é desfeita e o perfil de PtpA é restaurado. As mutantes C16A e C11A também possuem menor  $T_M$  após tratamento com GSNO em relação ao tratamento com GSH. Já as mutantes C16A/C53A e C11A/C53A não apresentam variação da  $T_M$ , assim como C53A. Essas diferenças observadas nos valores da  $T_M$  sugerem que a S-nitrosilação da cisteína 53 afeta a estabilidade térmica da proteína.

A S-nitrosilação já foi associada à estabilidade em algumas proteínas, como na fosfatase PTEN (KWAK et al., 2010), no fator de transcrição de *E. coli* OxyR (KIM et al., 2002) e na proteína do canal intracelular de cálcio CLIC4 (MALIK et al., 2010). No caso de CLIC4, a S-nitrosilação altera a conformação dessa proteína e afeta a sua interação com outras proteínas, as quais medeiam a translocação desta do citoplasma para o núcleo. Esse estudo também avaliou a estabilidade de CLIC4 por CD e, da mesma forma que para a PtpA, a  $T_M$  de CLIC4 S-nitrosilada é menor que a da proteína não modificada. Curiosamente, a taxa de redução da  $T_M$  de CLIC4 é semelhante à observada para a PtpA, com  $\Delta T_M = 3,4$  °C.

## 5.3 A S-nitrosilação da C53 provoca mudança conformacional na região em torno da modificação

Na presença de 1 mM de GSNO, os resíduos na região do V-loop em torno da C53 foram os que apresentaram maiores desvios dos deslocamentos químicos. Essas perturbações de deslocamentos químicos foram revertidas após a adição de DTT, o que confirma que a S-nitrosilação da C53 modifica a conformação dos seus resíduos adjacentes.

Além de serem estruturalmente próximos da cisteína 53 nitrosilada, alguns dos aminoácidos (ou resíduos adjacentes) que sofrem deslocamentos são importantes na estabilização e ligação do substrato. Acredita-se que a H49 e a S52 são importantes na determinação da especificidade do substrato. Além disso, os resíduos N14, S18, S42 e H71 formam uma rede de pontes de hidrogênio que estabilizam a estrutura do P-loop catalítico, o que permite a ligação do substrato e estabiliza o intermediário da reação (MADHURANTAKAM et al.,

2005). As mudanças desses aminoácidos ajudam a explicar a redução de atividade observada em decorrência da S-nitrosilação.

Até hoje, há poucos estudos de mudanças estruturais envolvendo S-nitrosilação. Em relação a modificações estruturais terciárias, Schreler e colaboradores (2007) demonstraram haver uma mudança conformacional da miosina de *Thunnus atlanticus* quando a mesma é S-nitrosilada. Há uma modificação dos resíduos próximos à Cys10 nitrosilada, causando a movimentação do *loop* que contém essa cisteína e das duas hélices adjacentes ao *loop*. A determinação por cristalografia da estrutura da tioredoxina nitrosilada também demonstrou leves mudanças conformacionais na região das Cys62 e Cys69 nitrosiladas, (WEICHSEL; BRAILEY; MONTFORT, 2007). Além disso, estudos de RMN com a proteína p21Ras GTPase demonstraram que a S-nitrosilação altera os deslocamentos químicos dos resíduos próximos estruturalmente da Cys118 nitrosilada. No entanto, nesse caso, não há outras grandes alterações estruturais (WILLIAMS; PAPPU; CAMPBELL, 2003).

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

Durante a infecção, o *M. tuberculosis* é exposto a mecanismos de defesa do hospedeiro como a produção de ERN e ERO. O papel do óxido nítrico no combate ao *M. tuberculosis* ainda é discutido. Enquanto alguns trabalhos destacam o papel microbicida do NO e outras ERN (CHAN et al., 1992; RICH et al., 1997; ZAHRT; DERETIC, 2002), outros argumentam que o NO não elimina completamente o patógeno, já que este 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).

Dessa maneira, é possível formular duas hipóteses para o 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* (ECCO, 2010). De forma análoga ao que ocorre com a proteína humana CLIC4 (MALIK et al., 2010), a S-nitrosilação da PtpA poderia interferir no transporte de PtpA para o citoplasma do macrófago, podendo alterar sua interação com proteínas de transporte (ECCO, 2010). A PtpA atua no macrófago e sua secreção é aumentada em decorrência do processo de infecção (COWLEY; BABAKAIAFF; 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. Stehle e colaboradores (2012) mapearam por RNM os resíduos de aminoácidos de PtpA que sofrem deslocamentos químicos quando a proteína é titulada com PtkA. Foi observado que alguns resíduos do *P-loop*, *V-loop*, *PDYY-loop* e hélice 5 foram os mais afetados pela interação. Como observado no presente trabalho, a S-nitrosilação provoca modificações estruturais na região em torno da C53, no *V-loop*. Assim, supõe-se que a S-nitrosilação, além de interferir na atividade e estabilidade térmica de PtpA, possa afetar a interação de PtpA com a PtkA. Pode-se ainda supor que haja uma relação entre a S-nitrosilação e a fosforilação de PtpA, sendo que uma modificação pode interferir na outra ou ainda que as duas juntas tenham um efeito inesperado. Dessa forma, torna-se fundamental o melhor entendimento da interação de PtpA com a PtkA, assim como e o efeito do NO sobre cada uma das enzimas e sobre a interação de ambas.

### **5.5 O íon $Mg^{2+}$ é importante para a estabilidade térmica de PtkA de *M. tuberculosis***

A PtkA é a única cinase pertencente à superfamília de hidrolases HAD. As enzimas dessa superfamília contêm três motivos de sequências altamente conservadas, também presentes na PtkA como observado no alinhamento com sequências de proteínas da mesma classe. De acordo com a comparação de estrutura dos membros dessa família com a de PtkA, os resíduos catalíticos são o aspartato 85 (motivo I), treonina 182 (motivo II), lisina 217 e aspartato 240 (motivo III). O sítio ativo das proteínas dessa superfamília é formado pelos três motivos conservados e pela ligação coordenada do  $Mg^{2+}$  e do fosfato, sendo que o  $Mg^{2+}$  participa da hidrólise do ATP (WANG et al, 2001)

Neste trabalho, foi analisada a influência do metal na estrutura secundária de PtkA. Foi observado que a ligação do metal ao sítio catalítico não altera o conteúdo de estrutura secundária, porém, quando

a enzima é submetida à desnaturação térmica, é observado que a  $T_M$  aumenta consideravelmente na presença do metal, de 31 °C para 43 °C. Logo, a ligação do metal ao sítio ativo estabiliza a estrutura terciária da proteína. Tais resultados corroboram os dados obtidos para outros membros da família HAD, como a fosfoserina fosfatase (PSP) de *Methanococcus jannaschii*, na qual foi observada, por cristalografia, a presença do íon  $Mg^{2+}$  coordenado aos resíduos do sítio catalítico e uma molécula de fosfato. Nesse trabalho, também foi mostrado que o metal é essencial para a atividade fosfatase dessa proteína (WANG et al., 2001).

Outro estudo mostrou por CD a interação entre o íon  $Mg^{2+}$  com uma proteína, o hormônio do crescimento humano (hGH). Nesse trabalho, foi observado que a ligação do magnésio também aumentou a estabilidade térmica da proteína, porém, diferentemente da PtkA, esse aumento da estabilidade térmica veio acompanhado com o aumento do conteúdo de  $\alpha$ -hélice e diminuição de folhas- $\beta$  e estruturas aleatórias (SABOURY et al., 2006).

Devido a falta de dados a respeito da atividade cinase de PtkA, este trabalho não pôde confirmar a importância do íon  $Mg^{2+}$  para a sua atividade enzimática. As condições do ensaio de fosforilação devem ser otimizadas com o intuito de verificar a atividade da cinase e confirmar a necessidade do metal para a hidrólise do ATP.

## 5.6 A PtkA de *M. tuberculosis* é S-nitrosilada na C61

Os resultados dos ensaios de biotinylação demonstraram que, assim como a PtpA, a PtkA de *M. tuberculosis* é susceptível à S-nitrosilação. Mutação sítio-dirigida na única cisteína da estrutura primária - C61A - seguida de novos ensaios de biotinylação confirmaram que a S-nitrosilação ocorre na cisteína 61 de PtkA.

A S-nitrosilação também tem sido associada a perda de atividade de algumas cinases. Segundo Hess e Stamler (2012) essa inibição pode ser exercida diretamente através da supressão da atividade cinase ou por interferir na interação com o substrato. Como exemplo, um estudo revelou que a S-nitrosilação da creatina cinase em tecidos de miocárdio de camundongos suprimiu a contração do tecido (ARSTALL et al., 1998). A S-nitrosilação e consequente inibição de cinases da família Src também têm sido associada à progressão e metástases de células cancerígenas (WANG, 2012).

Devido à falta de dados de atividade enzimática, não se pôde analisar as consequências dessa modificação pós-traducional sobre a

atividade de PtkA. Como mencionado anteriormente, a importância biológica da interação de PtkA e PtpA ainda é muito pouco conhecida e o estudo do efeito do NO sobre a estrutura, atividade e interação dessas duas enzimas torna-se fundamental para a compreensão das complexas relações entre o *M. tuberculosis* e seu hospedeiro durante o processo infeccioso.

### **5.7 A SapM de *M. tuberculosis* permaneceu na fração insolúvel do lisado bacteriano**

Além de PtpA e PtkA de *M. tuberculosis*, uma terceira proteína desse micro-organismo foi estudada, a SapM. Assim como a PtpA, a SapM também é secretada pelo *M. tuberculosis* e um importante fator de virulência. A biologia dessa proteína ainda é muito pouco conhecida, porém já é apontada como um provável alvo terapêutico no combate à tuberculose tendo em vista sua importância na infecção.

Neste trabalho a SapM foi clonada e expressa em cepas de *E. coli*, sendo que em todas as condições de expressão testadas a proteína permaneceu na fração insolúvel. A expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* pode frequentemente levar à formação de agregados insolúveis de proteínas, denominados corpos de inclusão (VALLEJO e RINAS, 2004). Essa formação depende de diversos fatores, tais como: a natureza intrínseca da proteína recombinante, a taxa de expressão proteica, a composição e o pH do meio de cultivo, a temperatura de crescimento e a localização celular da proteína expressa (MARCO et al., 2005). Algumas vantagens são encontradas na formação de corpos de inclusão, como a facilidade de isolamento, proteção contra proteases, inatividade da proteína (o que poderia ser prejudicial à célula de expressão) e obtenção de altas concentrações de proteínas. Contudo, o re-novelamento e a recuperação da atividade biológica requerem condições especiais, o que pode tornar o processo muito oneroso (HANNIG; MAKRIDES, 1998). Neste trabalho, a proteína foi solubilizada dos corpos de inclusão pela ação da ureia, depois purificada por IMAC, porém as etapas seguintes de diálise para retirada da ureia e re-novelamento ainda devem ser otimizadas visto que nos presentes experimentos ainda ocorreu precipitação da proteína purificada. Após a otimização dessa etapa, os experimentos de caracterização estrutural e funcional devem continuar a fim de se obter um maior conhecimento a respeito desse provável alvo terapêutico para o combate à tuberculose.

## 6. CONCLUSÕES

Quanto à PtpA de *M. tuberculosis*:

- A S-nitrosilação ocorre especificamente na C53 e não afeta diretamente o sítio catalítico uma vez que a constante de afinidade ao substrato –  $K_M$  - mantém-se constante apesar da diminuição da  $V_{máx}$  e  $k_{cat}$ ;
- A S-nitrosilação não afeta o conteúdo de estrutura secundária da enzima. Porém, quando esta é submetida ao aumento gradual da temperatura, a estabilidade térmica diminui consideravelmente na proteína S-nitrosilada na C53;
- A S-nitrosilação provoca mudanças conformacionais crescentes na região tridimensional próxima à C53 (*V-loop*), o que confirma o efeito do NO sobre essa cisteína. Essas mudanças podem ser responsáveis pela diminuição da atividade enzimática e pela diminuição da estabilidade térmica da proteína.

Quanto à PtkA de *M. tuberculosis*:

- A PtkA de *M. tuberculosis* foi clonada, expressa e purificada por IMAC, com um rendimento de 5 mg de proteína por litro de cultivo;
- A identidade de PtkA foi confirmada por espectrometria de massa da proteína intacta e digerida com tripsina;
- A proteína recombinante está corretamente enovelada uma vez que os dados do espectro de CD deconvoluído apresentaram valores similares aos propostos na modelagem estrutural;
- A ligação do  $Mg^{2+}$  ao sítio ativo estabiliza a estrutura terciária de PtkA, sendo que a  $T_M$  aumenta de 31 °C para 43 °C na presença do metal;
- Não foi observada a fosforilação de PtpA nem a autofosforilação de PtkA em nenhum dos experimentos, sendo ainda necessário otimizar as condições para essa reação;
- A PtkA também é passível de S-nitrosilação, porém o efeito dessa modificação pós-traducional sobre a atividade e estrutura da proteína ainda é desconhecido.



Quanto à SapM de *M. tuberculosis*:

- A sequência de DNA que codifica SapM também foi inserida no vetor de expressão pET-14b.
- A condição que apresentou maior expressão de SapM foi em bactérias *E. coli* BL21 (DE3) pLysS na temperatura e tempo de indução de 15 °C por 20 horas.
- Após a solubilização dos corpos de inclusão com ureia 8 M, SapM pôde ser purificada por IMAC, obtendo-se um rendimento de 13 mg de proteína por litro de cultivo.
- A identidade de SapM foi confirmada por espectrometria de massa da proteína intacta e digerida com tripsina.
- As condições para o correto re-enovelamento ainda devem ser otimizadas para que os demais experimentos de caracterização prossigam.

## 7. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; WOOTTON, J. C.; GERTZ, E. M., AGARWALA, R., MORGULIS, A.; SCHÄFFER, A. A.; YU, Y. K. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. **FEBS**, v. 272, n. 20, p. 5101–5109, 2005.

AOYAMA, H.; SILVA, T. M. A.; MIRANDA, M. A.; FERREIRA, C. V. Proteínas Tirosina Fosfatases: Propriedades e funções biológicas. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 890-900, 2003.

ARSTALL, M. A.; BAILEY, C.; GROSS, W. L.; BAK, M.; BALLIGAND, J. L.; KELLY, R. A. Reversible S-nitrosation of creatine kinase by nitric oxide in adult rat ventricular myocytes. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 30, n. 5, p. 979-988, 1998.

ASTIER, J.; RASULA, S.; KOENA, E.; MANZOORA, H.; BESSON-BARDA, A.; LAMOTTEA, O.; JEANDROZB, S.; DURNERC, J.; LINDERMAYRC, C.; WENDEHENNE, D. S-nitrosylation: An emerging post-translational protein modification in plants. **Plant Science**, v. 181, n. 5, p. 527–533, 2011.

ATTARIAN, R.; BENNIE, C.; BACH, H.; AV-GAY, Y. Glutathione disulfide and S-nitrosoglutathione detoxification by Mycobacterium tuberculosis thioredoxin system. **FEBS Letters**, v. 583, n. 19, p. 3215-3220, 2009.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short protocols in molecular biology**, 2 ed., p. 1.24 -1.27, 1992.

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.

BARRETT D. M.; BLACK, S. M.; TODOR, H.; SCHMIDT-ULLRICH, R. K.; DAWSON, K. S.; MIKKELSEN, R. B. Inhibition of Protein-tyrosine Phosphatases by Mild Oxidative Stresses Is Dependent on S-Nitrosylation. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 280, n. 15, p. 14453–14461, 2005.

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.

BUCCIANTINI, M.; CHIARUGI, P.; CIRRI, P.; TADDEI, L.; STEFANI, M.; RAUGEI, G.; NORDLUND, P.; RAMPONI, G. The low  $M_r$  phosphotyrosine protein phosphatase behaves differently when phosphorylated at Tyr<sup>131</sup> or Tyr<sup>132</sup> by Src kinase. **FEBS Letters**, v. 456, n. 1, p. 73-78, 1999.

CASELLI, A.; CAMICI, G.; MANAO, G.; MONETI, G.; PAZZAGLI, L.; CAPPUGI, G.; RAMPONI, G. Nitric oxide causes inactivation of the low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 40, p. 24878-24882, 1994.

CHAMPION, P. A. D.; COX, J. S. Protein secretion systems in Mycobacteria. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 1376-1384, 2007.

CHAN, J.; XING, Y.; MAGLIOZZO, R. S.; BLOOM, B. R. 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.; WONG, D.; ZHENG, X.; POIRIER, V.; BACH, H.; HMAMA, Z.; AV-GAY, Y. 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.; HUANG, Y. F.; KHOO, K. H.; MENG, T. C. Mass spectrometry-based analyses for identifying and characterizing S-nitrosylation of protein tyrosine phosphatases. **Methods**, v. 42, n. 3, p. 243-249, 2007.

CHEN, Y. Y.; CHU, H. M.; PAN, K. T.; TENG, C. H.; WANG, D. L.; WANG, A. H.; KHOO, K. H.; MENG, T. C. 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.

CHOE, L. H.; WERNER, B. G.; LEE, K. H. Two-dimensional Protein Electrophoresis: From molecular pathway discovery to biomarker discovery in neurological disorders. **The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics**, v. 3, p. 327-335, 2006.

COLE, S. T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C. E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537-544, 1998.

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

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.

DARWIN, K. H.; EHRT, S.; GUTIERREZ-RAMOS, J. C.; WEICH, N.; NATHAN, C. F. 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.; RUFFINO-NETTO, A.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. The resumption of consumption - A review on tuberculosis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7, p. 697-714, 2006.

ECCO, G. Efeito da S-nitrosilação nas enzimas tirosina fosfatases PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis*. 2010. 58 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

ECCO, G.; VERNAL, J.; RAZZERA, G.; MARTINS, P. A.; MATIOLLO, C.; TERENZI, H. *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase A (PtpA) activity is modulated by S-nitrosylation. **Chemical Communications**, v.46, n. 40, p. 7501-7503, 2010.

EHRlich, K. C.; MONTALBANO, B. G.; MULLANEY, E. J.; DISCHINGER, H. C.; ULLAH, A. H. J. An acid phosphatase from *Aspergillus ficuum* has homology to *Penicillium chrysogenum* PhoA. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 204, n. 1, p. 63–68, 1994.

FERMINAN, E.; DOMINGUEZ, A. The *KIPHO5* gene encoding a repressible acid phosphatase in the yeast *Kluyveromyces lactis*: cloning, sequencing and transcriptional analysis of the gene, and purification and properties of the enzyme. **Microbiology**, v. 143, n.8, p. 2615–2625, 1997.

FESTJENS, N.; BOGAERT, P.; BATNI, A.; HOUTHUYS, E.; PLETS, E.; VANDERSCHAEGHE, D.; LAUKENS, B.; ASSELBERGH, B.; PARTHOENS, E.; DE RYCKE, R.; WILLART, M. A.; JACQUES, P.; ELEWAUT, D.; BROUCKAERT, P.; LAMBRECHT, B. N.; HUYGEN K.; CALLEWAERT, N. Disruption of the SapM locus in *Mycobacterium bovis* BCG improves its protective efficacy as a vaccine against *M. tuberculosis*. **EMBO Mol Med**, v. 3, n. 4, p. 222–234, 2011.

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.

FOSTER, M. W. Methodologies for the characterization, identification and quantification of S-nitrosylated proteins. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1820, n. 6, p. 675-683, 2011.

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.

GUPTA, R. K.; KUMAR, S. Central Nervous System Tuberculosis. **Neuroimaging Clinics of North America**, v. 21, n. 4, p. 795–814, 2011.

HAAS, H.; REDL, B.; FRIEDLIN, E.; STÖFFLER, G. Isolation and analysis of the *Penicillium chrysogenum* *phoA* gene encoding a secreted phosphate-repressible acid phosphatase. **Gene**, v. 113, n. 1, p. 129–133, 1992.

HANNIG, G., MAKRIDES, S. C. 1998. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. **Trends Biotechnol.**, v. 16, n. 2, p. 54-60,1998.

HESS, D. T.; MATSUMOTO, A.; KIM, S. O.; MARSHALL, H. E.; STAMLER, J. S. Protein S-nitrosylation: Purview and parameters. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 2, p. 150-166, 2005.

HESS, D. T.; STAMLER, J. S. Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification. **J Biol Chem.**, v. 287, n. 7, p. 4411-4418, 2012.

HIGUCHI, R.; KRUMMEL, B.; SAIKI, R. K. A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. **Nucleic Acid Res.**, v. 16, n. 15, p. 7351 – 7367, 1988.

HOUBEN, E. N.; NGUYEN, L.; PIETERS, J. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 76-85, 2006.

JAFFREY, S. R.; SNYDER, S. H. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. **Sci STKE.**, v. 2001, n. 86, 2001.

KANEKO, R. R.; WADA, Y. Y. Decomposition of protein nitrosothiolsin matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.**, v. 38, n. 5, p. 526-530, 2003.

KELLER, R. **The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial first edition.** CANTINA Verlag. 2004.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005.

KIM, S. O.; MERCHANT, K.; NUDELMAN, R.; BEYER, W. F.; KENG, T.; DE ANGELO, J.; HAUSLADEN, A.; STAMLER, J. S. OxyR: a molecular code for redox-related signaling. **Cell**, v. 109, n. 3, p. 383-96, 2002.

KOUL, A.; CHOIDAS, A.; TREDER, M.; TYAGI, A. K.; DRLICA, K.; SINGH, Y.; ULLRICH, A. Cloning and characterization of secretory tyrosine phosphatases of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 19, p. 5425-5432, 2000.

- KOUL, A.; HERGET, T.; KLEBL, B.; ULLRICH, A. Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 189-202, 2004.
- KOUL, A.; ARNOULT, E.; LOUNIS, N.; GUILLEMONT, J.; ANDRIES K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. **Nature**, v. 469, n. 1, p. 483 – 490, 2011.
- KUMAR, A.; TOLEDO, J. C.; PATEL, R. P.; LANCASTER, J. R.; STEYN, A. J. *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.
- KWAK, Y. D.; MA, T.; DIAO, S.; ZHANG, X.; CHEN, Y.; HSU, J.; LIPTON, S. A.; MASLIAH, E.; XU, H.; LIAO, F. F. NO signaling and S-nitrosylation regulate PTEN inhibition in neurodegeneration. **Mol Neurodegener.**, v. 5, n. 49, p. 1-12, 2010.
- LAMATTINA, L.; GARCÍA-MATA, C.; GRAZIANO, M.; PAGNUSSAT, G. Nitric Oxide: The Versatility of an Extensive Signal Molecule. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 109-136, 2003.
- LI, S.; WHORTON, A. R. Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B in intact cells by S-nitrosothiols. **Arch Biochem Biophys**, v. 410, n. 2, p. 269-279, 2003.
- MADHURANTAKAM, C.; RAJAKUMARA, E.; MAZUMDAR, P. A.; SAHA, B.; MITRA, D.; WIKER, H. G.; SANKARANARAYAN, R.; DAS, A. K. Crystal structure of low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.9-Å resolution. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 6, p. 2175-2181, 2005.
- MALIK, M.; SHUKLA, A.; AMIN, P.; NIEDELMAN, W.; LEE, J.; JIVIDEN, K.; PHANG, J. M.; DING, J.; SUH, K. S.; CURMI, P. M.; YUSPA, S. H. S-nitrosylation regulates nuclear translocation of chloride intracellular channel protein CLIC4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 31, p. 23818-23828, 2010.
- MARCO, A.; VIGH, L.; DIAMANT, S.; GOLOUBINOFF, P. Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in *Escherichia coli* by osmolytes, plasmid- or benzyl alcohol-overexpressed molecular chaperones. **Cell Stress Chaperones**, v. 10, n.4, p. 329-339, 2005.

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.; CHIARADIA, L. D.; VERNAL, J.; VILLARINO, A.; GUIDO, R. V.; PERIZZOLO, P.; POIRIER, V.; WONG, D.; MARTINS, P. G.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; ANDRICOPULO, A. D.; AV-GAY, Y.; TERENZI, H. 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.

MEHTA, P. K.; RAJ, A.; SINGH, N.; KHULLER, G. K. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 66, n. 1, p. 20-36, 2012.

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

OMS. Global Tuberculosis Control. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf). Acesso em: 30 outubro 2012.

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.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; NATHAN, C. F. 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.; TORRES, M.; SADA, E.; FINEGAN, C. K.; HAMILTON, B. D.; TOOSI, Z. *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.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols**, v. 5, n. 4, p. 725-738, 2010.

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.

SABOURY, A. A.; ATRI, M. S.; SANATI, M. H.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; HAKIMELAHI, G. H.; SADEGHI, M. A. Thermodynamic Study on the Interaction Between Magnesium Ion and Human Growth Hormone. **Biopolymers.**, v. 81, n. 2, p. 120-126, 2006.

SAIKOLAPPAN, S.; ESTRELLA, J.; SASINDRAN, S. J.; KHAN, A.; ARMITIGE, L. Y.; JAGANNATH, C.; DHANDAYUTHAPANI, S. The *fbpA/sapM* Double Knock Out Strain of *Mycobacterium tuberculosis* Is Highly Attenuated and Immunogenic in Macrophages. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, p. 1-10, 2012.

SALEH, M. T.; BELISLE, J. T. Secretion of an Acid Phosphatase (SapM) by *Mycobacterium tuberculosis* That Is Similar to Eukaryotic Acid Phosphatases. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 23, p. 6850-6853, 2000.

SAXENA, K. et al. Backbone NMR assignment of the low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase (MPtpA) from *Mycobacterium tuberculosis* [3]. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 33, n. 2, p. 136, 2005.

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.

SCHWARZER, D.; ZHANG, Z.; ZHENG, W.; COLE, P. A. Negative Regulation of a Protein Tyrosine Phosphatase by Tyrosine Phosphorylation. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 128, n. 13, p. 4192-4193, 2006.

SIJWALI, P. S.; BRINEN, L. S.; ROSENTHAL, P. J. Systematic Optimization of Expression and Refolding of the *Plasmodium falciparum* Cysteine Protease Falcipain-2. **Protein. Expr. Purif.**, v. 22, n. 1, p. 128-134, 2001.

SMITH, C. Cloning and mutagenesis: tinkering with the order of things. **Nature Methods**, v. 4, p. 455 - 461, 2007.

SREERAMA, N.; WOODY, R.W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set, **Anal. Biochem.**, v.287, p. 252-260, 2000.

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

STEHLE, T.; SREERAMULU, S.; LÖHR, F.; RICHTER, C.; SAXENA, K.; JONKER, H. R.; SCHWALBE, H. The Apo-structure of the Low Molecular Weight Protein-tyrosine Phosphatase A (MtpA) from *Mycobacterium tuberculosis* Allows for Better Target-specific Drug Development. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 41, p. 34569-82, 2012.

STRACHAN, T.; READ, A. **Human Molecular Genetics** 2. 2 ed. John Wiley & Sons Inc, 1999.

SUN, J.; XIN, C.; EU, J. P.; STAMLER, J. S.; MEISSNER, G. Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 98, n. 20, p. 11158-11162, 2001.

TABERNERO, L.; ARICESCU, A. R.; JONES, E. Y.; SZEDLACSEK, S. E. Protein tyrosine phosphatases: Structure-function relationships. **FEBS Journal**, v. 275, n. 5, p. 867-882, 2008.

TAILOR, P.; GILMAN, J.; WILLIAMS, S.; COUTURE, C.; MUSTELIN, T. Regulation of the Low Molecular Weight Phosphotyrosine Phosphatase by Phosphorylation at Tyrosines 131 and 132. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 9, p.5371-5374, 1997.

TAKAKURA, K.; BECKMAN, J. S.; MACMILLAN-CROW, L. A.; CROW, J. P. Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine

phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by peroxynitrite. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 369, n. 2, p. 197-207, 1999.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

TU, Z.; HE, G.; LI, K. X.; CHEN, M. J.; CHANG, J.; CHEN, L.; YAO, Q.; LIU, D. P.; YE, H.; SHI, J.; WU, X. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 114-120, 2005.

TUTEJA, N.; CHANDRA, M.; TUTEJA, R.; MISRA, M. K. Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2004, n. 4, p. 227-237, 2004.

VALLEJO, L. F.; RINAS, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. **Microb. Cell Fact.**, v. 3, n. 11, p. 1-12, 2004.

VERGNE, I.; CHUA, J.; LEE, H.; LUCAS, M.; BELISLE, J.; DERETIC, V. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. **PNAS**, v. 102, n. 11, p. 4033–4038, 2005.

WANG, W.; KIM, R.; JANCARIK, J.; YOKOTA, H.; KIM, S. Crystal Structure of Phosphoserine Phosphatase from *Methanococcus jannaschii*, a Hyperthermophile, at 1.8 Å Resolution. **Structure**, v. 9, n. 1, p. 65–71, 2001.

WANG, Z. Protein S-nitrosylation and cancer. **Cancer Letters**, v. 320, n. 2, p. 123–129, 2012.

WEICHSSEL, A.; BRAILEY, J. L.; MONTFORT, W. R. Buried S-nitrosocysteine revealed in crystal structures of human thioredoxin. **Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1219-1227, 2007.

WILLIAMS, J. G.; PAPPU, K.; CAMPBELL, S. L. Structural and biochemical studies of p21RAS S-nitrosylation and nitric oxide-mediated guanine nucleotide exchange. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 100, n. 11, p. 6376-6381, 2003.

WONG, D.; BACH, H.; SUN, J.; HMAMA, Z.; AV-GAY, Y. *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase (PtpA)

excludes host vacuolar-H<sup>+</sup>-ATPase to inhibit phagosome acidification. **PNAS**, v. 108, n. 48, p. 19371-19376, 2011.

WONG, D.; CHAO, J. D.; AV-GAY, Y. *Mycobacterium tuberculosis*-secreted phosphatases: from pathogenesis to targets for TB drug development. **Trends Microbiol.**, in press, 2012.

XIAN, M.; WANG, K.; CHEN, X.; HOU, Y.; MCGILL, A.; ZHOU, B.; ZHANG, Z. Y.; CHENG, J. P.; WANG, P. G. 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.

YU, C. X.; LI, S.; WHORTON, A. R. Redox regulation of PTEN by S-nitrosothiols. **Mol. Pharmacol.**, v. 68, n. 3, p. 847-854, 2005.

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, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 40, 2008.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbapap



## S-nitrosylation of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase A (PtpA) induces its structural instability

Camila Matiollo<sup>1</sup>, Gabriela Ecco<sup>1</sup>, Angela Camila Orbem Menegatti<sup>1</sup>, Guilherme Razzera<sup>1</sup>, Javier Vernal<sup>1</sup>, Hernán Terenzi<sup>\*</sup>

Centro de Biología Molecular Estructural-INREB, Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 22 August 2012  
Received in revised form 4 October 2012  
Accepted 7 October 2012  
Available online xxxxx

**Keywords:**  
Tyrosine phosphatase A  
*Mycobacterium tuberculosis*  
Circular dichroism  
S-nitrosylation

### ABSTRACT

S-nitrosylation is associated with signal transduction and microbicidal activity of nitric oxide (NO). We have recently described the S-nitrosylation of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase A, PtpA, an enzyme that plays an important role in mycobacteria survival inside macrophages. This post-translational modification decreases the activity of the enzyme upon modification of a single Cys residue, C53. The aim of the present work was the investigation of the effect of S-nitrosylation in PtpA kinetic parameters, thermal stability and structure. It was observed that the  $K_M$  of nitrosylated PtpA was similar to its unmodified form, but the  $V_{max}$  was significantly reduced. In contrast, treatment of PtpA C53A with GSNO, did not alter either  $K_M$  or  $V_{max}$ . These results confirmed that PtpA S-nitrosylation occurs specifically in the non-catalytic C53 and that this modification does not affect substrate affinity. Using circular dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy techniques it was shown that PtpA S-nitrosylation decreased protein thermal stability and promoted a local effect in the surroundings of the C53 residue, which interfered in both protein stability and function.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The protein tyrosine phosphatase superfamily comprises several groups of proteins that are involved in post-translational modification activity [1–3]. The deregulation of these proteins in eukaryotes is associated with various diseases, including Alzheimer, diabetes, obesity and cancer [4–6].

In *Mycobacterium tuberculosis* two secreted tyrosine phosphatases, PtpA and PtpB, were identified and associated to the infection process and disease [7]. PtpA inactivation attenuates *M. tuberculosis* growth in human macrophages. Furthermore, it was shown that PtpA interferes with host signaling pathways within infected macrophages [8]. For example, PtpA participates in the inhibition of mycobacterial phagosomal acidification due to the interaction with subunit H of the macrophage vacuolar-H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) located in the phagosomal membrane [9].

PtpA is classified as a low molecular weight (LMW) tyrosine phosphatase based on crystallographic data, and presents a classic Rossmann fold, with two right-handed  $\beta\alpha\beta$  motifs contributing to the central four-stranded parallel  $\beta$ -sheet. PtpA exhibits the common catalytic mechanism of dephosphorylation involving the conserved active-site sequence motif C(X)5R(S,T), which is called the protein

tyrosine phosphate-binding loop (PTP loop). By comparison with mammalian low molecular weight phosphatases, it was speculated that PtpA phosphate-binding loop seems to be less stable than in mammalian PTPs. There are considerable evidences that the variable loop plays a key role in determining the nature of the substrate, so that it might help the enzyme to recognize different types of substrates [10].

Regarding post-translational modification, tyrosine phosphatases can be reversibly S-nitrosylated by nitric oxide (NO), the covalent addition of a NO moiety to the sulfur atom of a cysteine residue. Reactive nitrogen species (RNS) may function as typical second messengers to transiently control the activity of signaling modulators [1]. NO has been also shown to modulate cGMP-independent pathways by modifying a multitude of cellular biomolecules containing reactive metal centers, as well as cysteine residues [11].

The post-translational modification by NO has been recently investigated in several proteins at the structural level. High-resolution crystal structures have been solved for a number of heme proteins [12], PTP1B [1] and thioredoxin [13]. Although NO is able to modulate the activity of tyrosine phosphatases, the molecular basis of NO modification and the subsequent effect on enzyme activity are not completely understood.

NO is believed to exert its effects on proteins by direct modification of a residue important for protein structure or enzymatic catalysis [1]. We have recently reported, using a molecular biology approach, that PtpA non-catalytic cysteine (C53) is modified by NO. 84

\* Corresponding author. Tel.: +55 483721 6426.

E-mail address: hernan.terenzi@ufsc.br (H. Terenzi).

<sup>1</sup> Tel.: +55 483721 6426.

85 However, the mechanism through which this modification affects  
86 PtpA activity has not yet been assessed [14]. No complete NMR struc-  
87 ture for PtpA has been published, although sequential backbone reso-  
88 nance assignments are available (BMRB ID: 6722) [16]. In this paper  
89 we show that the S-nitrosylation of a non-catalytic cysteine is able  
90 to modify the stability and the function of PtpA, and we suggest a  
91 mechanism to explain its catalytic activity inhibition.

## 92 2. Material and methods

### 93 2.1. Site-directed mutagenesis

94 The site-directed mutagenesis of PtpA was carried out as described in  
95 [14]. The following double and triple mutants were obtained: C11A/  
96 C16A, C11A/C53A, C16A/C53A and C11A/C16A/C53A. These mutations  
97 were verified by DNA sequencing.

### 98 2.2. Biotin switch assay and mass spectrometry

99 The biotin switch technique was carried out on purified proteins as  
100 described in [14]. In-gel digestion of the protein spots was carried out  
101 according to [17] with some modifications. Gel spots of biotinylated  
102 and non-biotinylated proteins were repeatedly destained in 25 mM  
103 ammonium bicarbonate in 50% acetonitrile until gel slices became color-  
104 less. The gel pieces were dehydrated with 100  $\mu$ l of 100% acetonitrile.  
105 The gel pieces were then dried under a vacuum system (Eppendorf,  
106 Hamburg, Germany). After drying, gel fragments were rehydrated  
107 on ice in 10  $\mu$ l of sequencing grade modified trypsin (10  $\mu$ g/ml in  
108 25 mM ammonium bicarbonate) (Promega, Madison, WI) and incubated  
109 for 16 h at 37 °C. The tryptic peptides were extracted with  
110 two washing steps containing 45  $\mu$ l of 50% acetonitrile in 5%  
111 trifluoroacetic acid (TFA) for 30 min. Then, the concentrated peptide  
112 extracts were dried under a vacuum system. Extracted peptides were  
113 resuspended in 10  $\mu$ l 0.1% TFA and a sample of 1  $\mu$ l of concentrated digest  
114 was mixed with 1  $\mu$ l of a saturated matrix solution of  $\alpha$ -cyano  
115 4-hydroxycinnamic acid (5 mg/ml in 0.1% TFA and 50% acetonitrile).  
116 This mixture was spotted on the MALDI target plate (Bruker Daltonics,  
117 Bremen, Germany) and allowed to crystallize at room temperature.  
118 MS and MS/MS analyses were performed on a MALDI-TOF/TOF Autoflex  
119 III Smartbeam mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).  
120 The MS spectra were acquired in positive ion mode, using an accelerat-  
121 ing voltage of 20 kV and laser frequency of 200 Hz. LIFT mass spectra  
122 were acquired in the positive ion mode. Metastable fragmentation  
123 was induced by a nitrogen laser (337 nm), accelerated to 6 kV and se-  
124 lected in a timed ion gate. In the LIFT-cell the fragments were further ac-  
125 celerated to 19 kV. External calibration was performed using peptide  
126 standards. The spectra generated were analyzed by the FlexAnalysis  
127 3.3 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

### 128 2.3. Enzyme assays

129 The phosphatase activity of wild-type PtpA and mutants was  
130 assayed as described in [14]. In order to determine the kinetic param-  
131 eter values ( $K_m$ ,  $V_{max}$ , and  $k_{cat}$ ) of PtpA wild-type and mutant C53A in the  
132 presence or absence of NO, a range of pNPP concentrations (0.2, 0.4, 0.8,  
133 1.6, 3.2, 6.4 and 12.8 mM) was used. The standard reaction was carried out  
134 in a final volume of 200  $\mu$ l containing 20 mM imidazole pH 7.0,  
135 50 nM of enzyme and 20 mM *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP) at  
136 37 °C. The assays were started by the addition of the substrate and the  
137 release of *p*-nitrophenol (pNP) was determined from the  $A_{410}$  detected  
138 for 10 min using a microplate spectrophotometer (Tecan Infinite  
139 M200). The molar absorptivity of pNP under these assay conditions  
140 was 3061.99 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. The spontaneous hydrolysis of pNPP was  
141 subtracted from each reaction. The effect of nitrosylation on protein ac-  
142 tivity was assayed using S-nitrosoglutathione (GSNO) as a NO donor,  
143 and glutathione as a negative control. In this case, the enzymes were

pre-incubated with 1 mM GSNO or GSH for 30 min at 25 °C in the  
144 dark. The enzymatic hydrolysis of pNPP in the presence of GSNO or  
145 GSH was determined as described above. The specific activity was de-  
146 fined as the release of 1  $\mu$ mol pNP min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> of protein at 37 °C.  
147 The kinetic constants were evaluated by fitting the data to the  
148 Michaelis–Menten equations using non-linear regression analysis in  
149 GraphPad Prism 5.0 software package. All reactions were performed  
150 in quadruplicate. 151

### 2.4. Circular dichroism spectroscopy 152

The PtpA wild type and mutant forms at 10  $\mu$ M were dialyzed  
153 against buffer (10 mM Hepes, pH 7.4). Spectroscopic analyses were  
154 carried out in a JASCO J-815 spectropolarimeter equipped with a  
155 Peltier temperature control unit. Circular dichroism was measured  
156 in a 0.05 cm pathlength cuvette (50 nm/min scan speed, response  
157 time 8 s, bandwidth 2 nm, and data pitch 0.1 nm s<sup>-1</sup>) with an average  
158 of 3 scans for each spectrum in a wavelength range from 190 nm  
159 to 260 nm. Thermal unfolding was carried out at 20  $\mu$ M protein con-  
160 centration by increasing the temperature of the cuvette from 20 °C to  
161 60 °C, and monitoring the 222 nm peak. The effect of nitrosylation on  
162 protein thermal stability was assayed using GSNO as a NO donor, and  
163 glutathione as a negative control. The enzymes were pre-incubated  
164 with 1 mM GSNO or GSH for 30 min at 25 °C in the dark. In order to  
165 verify the reversibility of PtpA C53 S-nitrosylation, the samples  
166 were incubated with 1 mM DTT after GSNO treatment. 167

### 2.5. Nuclear magnetic resonance analysis 168

The double labeled recombinant PtpA was expressed in  
169 *Escherichia coli* BL21(DE3) as a fusion tagged protein as described  
170 [14]. For structure analysis experiments isotopically labeled mole-  
171 cules (<sup>15</sup>N and <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C at 100  $\mu$ M) were prepared in 50 mM Hepes,  
172 pH 7.5, 1 mM EDTA containing 10% D<sub>2</sub>O. NMR experiments for assign-  
173 ment verification were acquired at 298 K using a Bruker Avance  
174 DRX 600 MHz equipped with a three-axis gradient 5 mm cryoprobe.  
175 The 3D triple-resonance spectrum HNCA was collected to confirm  
176 the previous reported sequential backbone resonance assignments  
177 (BMRB ID: 6722). 178

PtpA–GSNO chemical shift perturbation was monitored by <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N  
179 HSQCs experiments (1024 × 256 points) using 100  $\mu$ M PtpA and differ-  
180 ent concentrations of GSNO, titrated from 0 to 1 mM. Evaluation of  
181 GSNO effect was based on chemical shift deviations compared to a con-  
182 trol sample without GSNO. To avoid any interference from the medium,  
183 all experiments were conducted in the same buffer conditions. The  
184 chemical shift perturbations (CSPs) from the 2D <sup>15</sup>N–<sup>1</sup>H HSQC NMR ex-  
185 periments were used to identify the GSNO effect upon PtpA structure  
186 using the following equation: CSP = [(( $\Delta$ NH)<sup>2</sup> + ( $\Delta$ <sup>15</sup>N/10)<sup>2</sup>]<sup>1/2</sup>. The  
187  $\Delta$ NH is the difference between free and bound <sup>1</sup>H amide chemical shifts  
188 (ppm) and the  $\Delta$ <sup>15</sup>N is the difference between free and bound <sup>15</sup>N  
189 chemical shifts (ppm). 190

## 3. Results 191

In our previous work [14], PtpA mutants C11A, C16A and C53A  
192 were screened to evaluate their S-nitrosylation potential upon treat-  
193 ment with different NO donors. In order to clarify the involvement  
194 of C53 in S-nitrosylation and its effects on structure–function rela-  
195 tionship, in the present work double and triple mutants were pro-  
196 duced. These double and triple mutants were obtained by site-  
197 directed mutagenesis and were subjected to the biotin switch assay.  
198 Using the biotin switch assay, it was confirmed that the absence of  
199 C53 residue in mutants C53A, C53A/C11A, C53A/C16A and C53A/  
200 C11A/C16A resulted in proteins unable to be S-nitrosylated and  
201 hence, biotinylated (Fig. S1). Peptide sequencing using MALDI/  
202 TOF-TOF confirmed the biotinylation of C53 residue in PtpA after 203

GSNO treatment, while the protein treated with GSH was not biotinylated (Fig. S2). We also checked if other GSNO potential modifications of Cys residues beyond S-nitrosylation, for example, sulfenylation, were occurring upon treatment. Mass spectrometry indicated that only nitrosylation is observed, without other detectable modifications (not shown).

The specific enzymatic activities of double and triple cysteine mutants were measured to evaluate the contribution of each cysteine to the nitrosylation effect on PtpA, and to further support and complement our original data [14]. In our previous work, it was shown both that the single mutant C53A presents a catalytic activity similar to that of wild type, and that the single mutant C16A presents a lower activity when compared to PtpA wild type. In addition, the single mutant C11A is inactive [14]. We also showed that wild type PtpA and the single mutant C16A activities are reduced upon GSNO treatment while the single mutant C53A activity remained similar to the untreated form. We now assessed the activity of the double and triple cysteine mutants and we observed that the double mutant C16A/C53A activity is similar to the single mutant C16A activity and, in the same way as C53A, it is not inhibited by S-nitrosylation (Fig. S3).

Initial reaction rates at various pNPP concentrations were measured (Fig. 1). Data curve fitting resulted in a  $K_M$  of  $1.44 \pm 0.14$  mM for the wild type and  $1.44 \pm 0.26$  mM for the C53A mutant. For wild type PtpA the parameters  $V_{max}$  and  $k_{cat}$  were  $41.15 \pm 1.23$   $\mu\text{mol pNP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  and  $13.73 \pm 0.41$   $\text{s}^{-1}$  respectively, while C53A mutant shows a  $V_{max}$  value of  $41.88 \pm 2.36$   $\mu\text{mol pNP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  and a  $k_{cat}$  value of  $13.73 \pm 0.41$   $\text{s}^{-1}$ . Thereby, the C53A mutation does not affect the kinetic parameters of the enzyme. On the other hand, when PtpA wild type is S-nitrosylated,  $V_{max}$  and  $k_{cat}$  were reduced by half ( $20.12 \pm 0.62$   $\mu\text{mol pNP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  and  $6.71 \pm 0.21$   $\text{s}^{-1}$  respectively), while the  $K_M$  value remained unchanged ( $1.33 \pm 0.13$  mM). In contrast, the C53A mutant did not suffer significant changes in the kinetic parameters upon addition of NO donor —  $K_M$  ( $1.38 \pm 0.17$  mM),  $V_{max}$  ( $36.70 \pm 1.40$   $\mu\text{mol pNP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) and  $k_{cat}$  ( $12.24 \pm 0.47$   $\text{s}^{-1}$ ) (Fig. 1 and Table 1). These results indicate a direct effect of S-nitrosylation on the catalytic activity of PtpA rather than on substrate binding affinity.

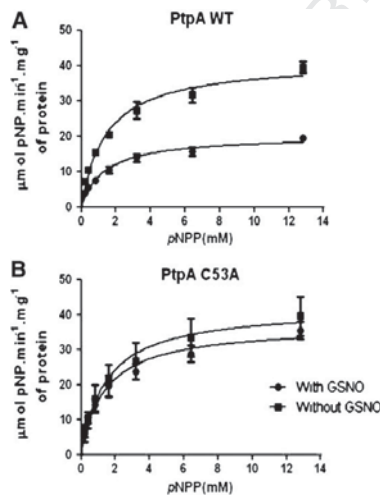


Fig. 1. Kinetics of PtpA wild type and C53A, respectively, is shown. All experiments were performed in quadruplicate, (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

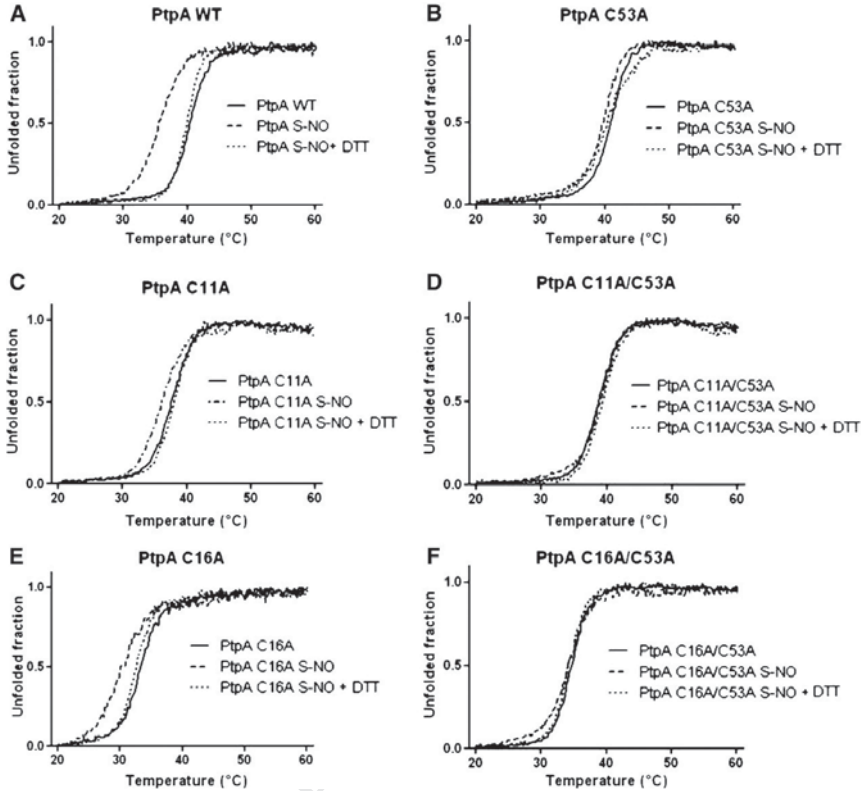
**Table 1**  
Catalytic activity parameters of PtpA ( $V_{max}$ ,  $K_M$  and  $k_{cat}$ ) after GSNO treatment.

	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol pNP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )
PtpA WT	$41.15 \pm 1.23$	$1.44 \pm 0.14$	$13.73 \pm 0.41$
PtpA WT + GSNO	$20.12 \pm 0.62$	$1.33 \pm 0.13$	$6.71 \pm 0.21$
PtpA C53A	$41.88 \pm 2.36$	$1.44 \pm 0.26$	$13.97 \pm 0.79$
PtpA C53A + GSNO	$36.70 \pm 1.40$	$1.38 \pm 0.17$	$12.24 \pm 0.47$

In order to evaluate the structural stability of PtpA upon S-nitrosylation, circular dichroism (CD) analysis was carried out with wild type PtpA and the cysteine mutants. The CD data obtained for wild-type PtpA suggests a typical  $\alpha$ -helical secondary structure profile with minimal peaks at 208 nm and 222 nm. The deconvoluted spectrum obtained by CDSSTR analysis of wild type PtpA suggests a mixed content of  $\alpha$ -helical (56%) and  $\beta$ -sheet (11%) secondary structures [15]. The CONTIN method also indicated similar values, with 53% of  $\alpha$ -helices and 5% of  $\beta$ -sheets [15]. It was observed that C11A, C16A, C53A, C11A/C53A and C16A/C53A mutants have the same content of secondary structure than wild type PtpA, while C11A/C16A and C11A/C16A/C53A mutants present an apparently different fold (Fig. S4). In these double and triple mutants a reduction of about 25% in the  $\alpha$ -helical secondary structure content was observed (according to CDSSTR and CONTIN methods). This reduction highlights the importance of C11/C16 residue pair to the PtpA fold. When the NO donor (GSNO) was added to wild type PtpA, the overall far-UV spectrum was very similar (Fig. S5), indicating that S-nitrosylation of PtpA does not affect the secondary structure profile.

The thermal denaturation profile of PtpA, detected by changes in CD upon thermal treatment, shows a melting temperature ( $T_M$ ) of  $40.4$  °C. The C53A mutant shows a similar  $T_M$ ,  $40.8$  °C, while C11A, C16A, C11A/C53A and C16A/C53A mutants have lower thermal stability ( $37.6$ ,  $33.3$ ,  $38.7$  and  $34.6$  °C respectively). On the other hand, when PtpA wild type was S-nitrosylated, the thermal denaturation profile indicated a decrease of  $4.2 \pm 0.6$  °C in the melting temperature when compared to the non-nitrosylated enzyme. It is important to note that after DTT treatment, the original denaturation profile of the wild type PtpA treated with GSNO is restored, demonstrating the reversibility of C53 S-nitrosylation (Fig. 2A). To confirm that this lower PtpA thermal stability resulted from C53 modification by NO, the PtpA mutants were also evaluated in this regard. The denaturation profile of C53A mutant in the presence of GSNO was similar to the untreated form suggesting that, indeed, C53 is the nitrosylation target (Fig. 2B). The C11A (Fig. 2C) and C16A (Fig. 2E) mutants have also a lower  $T_M$  value after GSNO treatment, in comparison to the non-nitrosylated forms ( $36.1$  and  $30.1$  °C respectively), while C11A/C53A (Fig. 2D) and C16A/C53A (Fig. 2F) mutants do not show significant differences between treated and untreated samples with GSNO ( $38.9$  and  $34.1$  °C respectively). Altogether, the differences observed in  $T_M$  values suggest that the addition of NO to PtpA affects protein stability through C53 modification (Table 2 and Fig. 3).

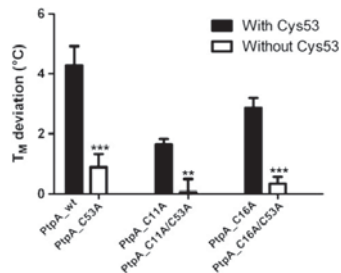
In order to further analyse C53 nitrosylation and to evaluate which surrounding residues are affected by this modification, triple resonance NMR experiments using  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  samples were carried out. Chemical shift assignments deposited in the BMRB (ID: 6722) [16] were used as a reference to re-assign the PtpA backbone through triple resonance experiments. The majority of chemical shift assignments reported were identified in PtpA, except for the residues Leu 99 and Val 140. The assignment of all residues was also confirmed through HNCA experiment. The doubly labeled PtpA was titrated with GSNO (100  $\mu\text{M}$  to 1 mM) and the chemical shift deviation was evaluated by comparison with the untreated control. At 1 mM GSNO concentration, residues G51, S52, R57, R72 and A73 presented chemical shift deviation higher than the mean plus two standard deviations. Minor disturbances higher than



**Fig. 2.** Thermal denaturation profile of PtpA wild type (A) and C53A mutant (B), upon GSNO treatment. When GSNO was added to PtpA, the  $T_M$  decreased  $4.2 \pm 0.6$  °C, while significant difference in C53A mutant was not observed ( $0.9 \pm 0.4$  °C). After DTT treatment the wild type PtpA-NO of the original denaturation profile is restored. The C16A (C) and C11A (E) mutants also show a lower  $T_M$  value after GSNO comparing to an untreated form while C16A/C53A (D) and C11A/C53A (F) mutants do not show this change.

295 the mean plus one standard deviation were also identified in the residues  
 296 A54, A58, L62, S117, D123, S133 and A145. Even with lower GSNO concentration (100  $\mu$ M), it was also observed that residues S52,  
 297 D55, R57 and A58 were affected by NO. The majority of residues were  
 298 located in the variable loop around C53 (Fig. S5). To verify if the modified residues were indeed affected by NO, the GSNO-treated PtpA was  
 299 chemically reduced with DTT in order to disrupt the Cys-NO link.  
 300 After 1 mM GSNO treatment of PtpA followed by DTT addition, the  
 301  
 302

reversibility of chemical shift values upon DTT treatment was observed, 303  
 confirming that NO is modifying the surrounding residues of C53 304  
 (Fig. 4). 305

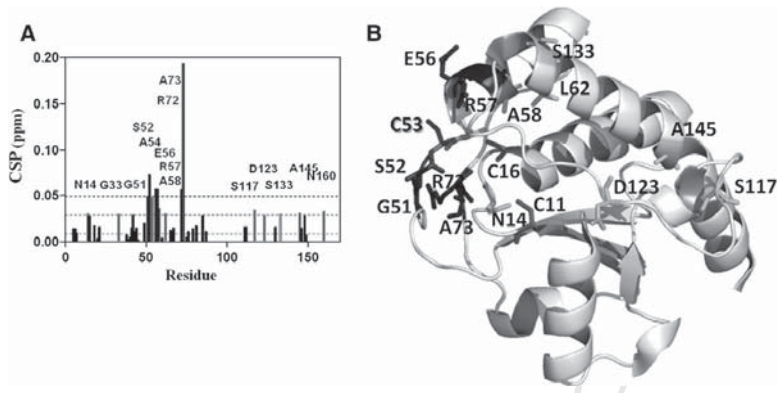


**Fig. 3.**  $T_M$  deviation of PtpA wild type and mutants after GSNO treatment. The differences observed in  $T_M$  values suggest that the S-nitrosylated C53 affects protein thermal stability. All experiments were performed in triplicate. (\*\*\*)  $p < 0.001$ , (\*\*)  $p < 0.01$ .

**Table 2**  
 Average values of  $T_M$  (°C) of PtpAwt and mutants after GSH (1 mM), GSNO (1 mM) and GSNO (1 mM) + DTT (1 mM) treatment.

	GSH	GSNO	GSNO + DTT
PtpA WT	40.4 $\pm$ 1.2	35.6 $\pm$ 0.4	39.9 $\pm$ 1.0
PtpA C53A	40.8 $\pm$ 0.6	39.7 $\pm$ 0.5	40.4 $\pm$ 0.3
PtpA C11A	37.6 $\pm$ 0.1	36.1 $\pm$ 0.1	37.9 $\pm$ 0.5
PtpA C11A/C53A	38.7 $\pm$ 0.4	38.9 $\pm$ 0.2	39.2 $\pm$ 0.1
PtpA C16A	33.3 $\pm$ 0.3	30.1 $\pm$ 0.1	32.6 $\pm$ 0.3
PtpA C16A/C53A	34.6 $\pm$ 0.3	34.1 $\pm$ 0.2	34.3 $\pm$ 0.2





**Fig. 4.** Effect of GSNO treatment on wild type PtpA chemical shifts monitored by  $^{15}\text{N}$  HSQC. In panel A, chemical shift perturbation (CSP) after 1 mM GSNO addition. The higher deviations are colored in blue, surrounding the Cys53. Minor effects are shown in cyan. In panel B, amino acid three-dimensional locations depicted on PtpA structure (PDB: 1U2P). Cysteine residues are highlighted in red color. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

#### 4. Discussion

The catalytic site of PTPs usually contains a cysteine residue whose SH-group exists in the thiolate state ( $\text{S}^-$ ) to enable catalysis. The catalytic cysteines usually present  $\text{pK}_a$  values ranging from 4 to 6 and this fact has been associated to higher susceptibility to oxidation and nitrosylation [18]. The results presented in this paper corroborate the results obtained in our previous work, and confirm that the catalytic cysteine residue of PtpA (C11) from *M. tuberculosis*, which functions as a phosphate acceptor in the first step of catalysis, is not directly involved in the nitrosylation signaling. The non-catalytic C53 is the best candidate to play this role in PtpA. Nevertheless, the protein enzymatic activity is clearly affected by GSNO. In order to further investigate the role of S-nitrosylation on PtpA activity, in the present work our focus was directed toward the study of its kinetic parameters and structural stability.

It was observed that the  $K_M$  of nitrosylated PtpA ( $1.4 \pm 0.1$  mM) was similar to its unmodified form ( $1.3 \pm 0.1$  mM), but the  $V_{\text{max}}$  was reduced from  $41.2 \pm 1.2$  to  $20.1 \pm 0.6$   $\mu\text{mol pNP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  after GSNO treatment. In contrast, C53A treated with GSNO showed a  $V_{\text{max}}$  similar to the untreated form,  $36.7 \pm 1.4$  and  $41.8 \pm 2.4$   $\mu\text{mol pNP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , respectively (Table 1). These results confirm that S-nitrosylation occurs specifically in the non-catalytic C53 and this modification does not affect substrate affinity.

According to the reported 3D PtpA structure (PDB ID: 1U2P) [10], the protein exhibits a classic Rossmann fold, an  $\alpha/\beta$  motif with two right-handed  $\beta\alpha\beta$  motifs contributing to the central four-stranded parallel  $\beta$ -sheet. The deconvoluted spectrum obtained by CDSTR analysis [15] with the WT PtpA suggests a mix content of  $\alpha$ -helical (56%) and  $\beta$ -sheet (11%) secondary structures, in agreement with proteins belonging to the tyrosine phosphatase fold [10] and with the *M. tuberculosis* PtpA structure that shows about 40%  $\alpha$ -helices and 12%  $\beta$ -sheets [10]. The structural information obtained by CD spectroscopy indicates that C53, when nitrosylated by GSNO, affects the PtpA protein stability (Fig. 2). When the PtpA structure is inspected we observe that C11 and C16 are located in the catalytic loop and C53 is in the surface of the so-called variable loop. The low  $\text{pK}_a$  value of the catalytic cysteine is usually attributed to the increased reactivity with NO [18,19], but the existence of a typical chemical environment condition or a structural motif that promotes this interaction is unknown. Recently, Marino and Gladyshev [19] showed that the proximal acid–base motif, low

cysteine  $\text{pK}_a$ , hydrophobicity or sulfur atom exposure do not define the specificity of S-nitrosylation. In PtpA, the cysteine residue affected, outside of the catalytic loop, is in the vicinity of residues associated to ligand binding and accessibility. The amino acid residue D123, which may form electrostatic or hydrogen bond interaction with R17 (a key residue for catalysis) [10], presents chemical shift deviations upon GSNO treatment in PtpA, suggesting a direct influence in the catalytic site. In *Bacillus subtilis* PTP, the loop with the homologous residue D115 is involved in substrate binding [20]. It is important to note that the affinity constant of nitrosylated PtpA has shown similar values to the unbound pNPP substrate form, which suggests, at least for this substrate, that the ligand accessibility is not critical to nitrosylated PtpA. As demonstrated by Williams and co-workers [11] using NMR technique, the NO modification of p21<sup>ras</sup>, a guanine nucleotide-binding protein, does not support a relevant conformational change, but, as also shown in PtpA, affects the protein activity. When the amino acid sequences from several LMW PTPs are analyzed, it becomes clear that the C53 position is unusual [10]. The reduced stability and activity of S-nitrosylated PtpA occurs through a non-conserved residue modification in the variable loop, which indicates that this phenomenon may not be extended as a general rule in PTPs.

According to our data, a reasonable factor that explains the reduced activity upon PtpA nitrosylation is the protein instability, which results in less active sites available for substrate binding.

#### Acknowledgements

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

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.10.007>.

#### References

- Y.Y. Chen, H.M. Chu, K.T. Pan, C.H. Teng, D.L. Wang, A.H. Wang, K.H. Khoo, T.C. Meng, Cysteine S-nitrosylation protects protein-tyrosine phosphatase 1B against oxidation-induced permanent inactivation, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 352–365.

- 380 [2] A. Caselli, G. Camici, G. Manao, G. Moneti, L. Pazzagli, G. Cappugi, G. Ramponi,  
381 Nitric oxide causes inactivation of the low molecular weight phosphotyrosine  
382 protein phosphatase, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 248–278.
- 383 [3] M. Xian, K. Wang, X. Chen, Y. Hou, A. McGill, B. Zhou, Z.Y. Zhang, J.P. Cheng, P.G.  
384 Wang, Inhibition of protein tyrosine phosphatases by low-molecular-weight  
385 S-nitrosothiols and S-nitrosylated human serum albumin, *Biochem. Biophys.*  
386 *Res. Commun.* 268 (2000) 310–314.
- 387 [4] F. Ahmad, P.-M. Li, J. Meyerovitch, B.J. Goldstein, Osmotic loading of neutralizing  
388 antibodies demonstrates a role for protein-tyrosine phosphatase 1B in negative  
389 regulation of the insulin action pathway, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 20503–20508.
- 390 [5] Z.Y. Zhang, Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate  
391 specificity and inhibitor development, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42 (2002)  
392 209–234.
- 393 [6] S.K. Sastry, L.A. Elferink, Checks and balances: interplay of RTKs and PTPs in can-  
394 cer progression, *Biochem. Pharmacol.* 82 (2011) 435–440.
- 395 [7] A. Koul, A. Choidas, M. Tredler, A.K. Tyagi, K. Drlica, Y. Singh, A. Ullrich, Cloning and  
396 characterization of secretory tyrosine phosphatases of *Mycobacterium tuberculosis*,  
397 *J. Bacteriol.* 182 (2000) 5425–5432.
- 398 [8] J. Chao, D. Wong, X. Zheng, V. Poirier, H. Bach, Z. Hmama, Y. Av-Gay, Protein ki-  
399 nase and phosphatase signaling in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and  
400 pathogenesis, *Biochim. Biophys. Acta* 1804 (2009) 620–627.
- 401 [9] D. Wong, H. Bach, J. Sun, Z. Hmama, Y. Av-Gay, *Mycobacterium tuberculosis*  
402 inhibit tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H<sup>+</sup>-ATPase to  
403 inhibit phagosome acidification, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011)  
404 19371–19376.
- 405 [10] C. Madhuranatakam, E. Rajakumara, P.A. Mazumdar, B. Saha, D. Mitra, H.G. Wiker,  
406 R. Sankaranarayanan, A.K. Das, Crystal structure of low-molecular-weight protein  
407 tyrosine phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.9-Å resolution,  
408 *J. Bacteriol.* 187 (2005) 2175–2181.
- 409 [11] J.G. Williams, K. Pappu, S.L. Campbell, Structural and biochemical studies of P<sup>85A5</sup>  
410 S-nitrosylation and nitric oxide-mediated guanine nucleotide exchange, *Proc.*  
411 *Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 6376–6381.
- 412 [12] E.R. Schreiber, M.M. Rodríguez, A. Weichsel, W.R. Montfort, J. Bonaventura,  
413 S-nitrosylation-induced conformational change in blackfin tuna myoglobin,  
414 *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 19773–19780.
- 415 [13] A. Weichsel, J.L. Brailey, W.R. Montfort, Buried S-nitrosocysteine revealed in crys-  
416 tal structures of human thioredoxin, *Biochemistry* 46 (2007) 1219–1227.
- 417 [14] G. Ecco, J. Vernal, G. Razzera, P.A. Martins, C. Matiollo, H. Terenzi, *Mycobacterium*  
418 *tuberculosis* tyrosine phosphatase A (PtpA) activity is modulated by S-nitrosylation,  
419 *Chem. Commun.* 46 (2010) 7501–7503.
- 420 [15] N. Sreerama, R.W. Woody, Estimation of protein secondary structure from circular  
421 dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods  
422 with an expanded reference set, *Anal. Biochem.* 287 (2000) 252–260.
- 423 [16] K. Saxena, B. Elshorst, H. Berk, M. Betz, S. Grimme, T. Langer, B. Pescatore, U.  
424 Schieboert, M. Vogtherr, H. Schwalbe, Backbone NMR assignment of the  
425 low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase (MPTpA) from *Mycobacterium*  
426 *tuberculosis*, *J. Biomol. NMR* 33 (2005) 136.
- 427 [17] A.C.O. Menegatti, C.P. Tavares, J. Vernal, C.S. Klein, L. Huergo, H. Terenzi, First partial  
428 proteome of the poultry pathogen *Mycoplasma synoviae*, *Vet. Microbiol.* 145  
429 (2010) 134–141.
- 430 [18] D. Spadaro, B.W. Yun, S.H. Spoel, C. Chu, Y.Q. Wang, G.J. Loake, The redox switch:  
431 dynamic regulation of protein function by cysteine modifications, *Physiol. Plant.* 431  
432 138 (2010) 360–371.
- 433 [19] S.M. Marino, V.N. Gladyshev, Structural analysis of cysteine S-nitrosylation: a  
434 modified acid-based motif and the emerging role of trans-nitrosylation, *J. Mol.*  
435 *Biol.* 395 (2010) 844–859.
- 436 [20] H. Xu, B. Xia, C. Jin, Solution structure of a low-molecular-weight protein tyrosine  
437 phosphatase from *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.* 4 (2006) 1509–1517.
- 438

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

Gabriela Ecco, Javier Vernal, Guilherme Razera, Priscila Alves Martins, Camila Matioli 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.

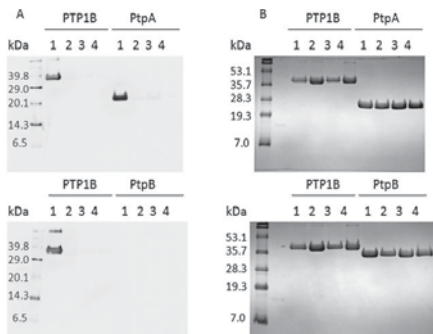
NO and other RNS are important molecules in cell signaling events, protein function regulation and host defense mechanisms.<sup>11</sup> Among Ptps, several of these enzymes were shown to be nitrosylated as a consequence of NO action, which results in loss of activity or protection from oxidation.<sup>12</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: herenzi@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

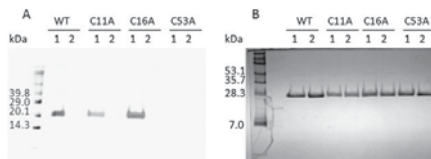


**Fig. 1** S-Nitrosylation of NO-treated PTP1B, PtpA and PtpB. Twenty micrograms of purified recombinant proteins PTP1B, PtpA or PtpB were treated separately with 1 mM GSNO (1), 1 mM GSH (2) or 10 mM DTT after GSNO treatment (3), respectively. Then, proteins were labelled with biotin using the biotin 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.

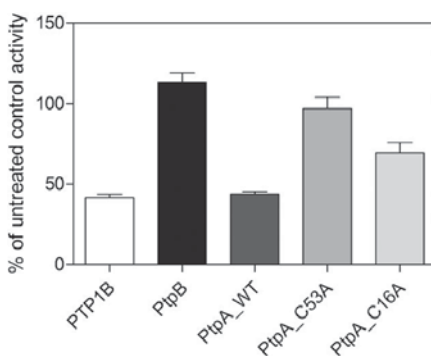
same occurred when biotin was not added to the samples. The same pattern observed for PtpA was displayed in PTP1B positive controls. These results demonstrate that PtpA is S-nitrosylated while PtpB does not undergo S-nitrosylation.

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.



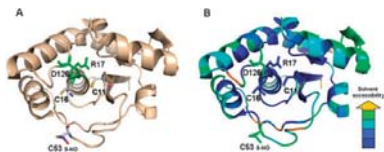
**Fig. 3** NO action on Ptps activity. Enzymes were incubated in the presence of GSNO for 30 min and enzyme activity was measured as described in materials and methods. Each bar represents the relative activity of the enzymes when compared to the corresponding untreated control. All assays were performed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