

MODULAÇÃO CINÉTICA POR EQUILÍBRIO REDOX DE UMA PIROFOSFATASE
INORGÂNICA SOLÚVEL

EVENILTON PESSOA COSTA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MAIO 2013

TESE DE DOUTORADO

MODULAÇÃO CINÉTICA POR EQUILÍBRIO REDOX DE UMA PIROFOSFATASE
INORGÂNICA SOLÚVEL

EVENILTON PESSOA COSTA

“Tese apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia, da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das
exigências para a obtenção do título
de Doutor em Biociências.”

Campos dos Goytacazes

Maio 2013

TESE DE DOUTORADO

MODULAÇÃO CINÉTICA POR EQUILÍBRIO REDOX DE UMA PIROFOSFATASE
INORGÂNICA SOLÚVEL

EVENILTON PESSOA COSTA

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências.”

Aprovado em 16 de Maio de 2013

Banca Examinadora

Prof. Dr. Carlos Jorge Logullo de Oliveira (Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos – UENF) ORIENTADOR

Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha (Laboratório de Biologia Celular e Tecidual – UENF) COORIENTADOR

Prof. Dr. Lev Okorokov (Laboratório de Fisiologia e Biologia de Microrganismos – UENF)

Prof^a. Dr^a. Nelilma Correia Romeiro (NUPEM – UFRJ / Campus Macaé)

Prof. Dr. Rafael Dias Mesquita (Instituto de Química – UFRJ)

DEDICATÓRIA

Ao meu filho Miguel e a minha esposa Elane por todo o seu apoio, dedicação e amor!

*“... eu deveria ter estudado mais, arriscado mais, trabalhado menos e ter visto o sol
se por.”*

Epitáfio (Titãs)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo o apoio, incentivo e as palavras sábias que ajudaram a forjar o meu caráter.

Aos amigos Helga (pós-doc), Jorge, Eldo e Wagner atualmente professores na UFRJ Macaé, por proporcionarem um ótimo ambiente de discussão e de trabalho e por terem influenciado positivamente na minha formação acadêmica.

Aos professores e funcionários do Centro de Biociências e Biotecnologia que, direta ou indiretamente, contribuíram para o bom desenvolvimento deste projeto, em especial: Maurício Falcão, Gerusa, Rogéria, Beatriz, Marlene, Rogério, Cristóvão e Isabela.

Aos amigos do laboratório: Luizinho, Josias, Bárbara, Mariana, Jhenifer, Newton, Daniele, Leonardo, Renato, Ana Cristina, Christiano, Luan, Yolanda, Daniela, Raquel, Bete, Maurício Mongolon, Claudinha e Marilena por proporcionarem um ótimo ambiente de trabalho e de descontração.

A Adriana (Drika), secretária do Prof. Carlos Logullo, por nos ajudar a por ordem no laboratório, pela amizade e por proporcionar um ótimo ambiente de descontração.

Ao Prof. Arnoldo pelo profissional surpreendente, pelos ensinamentos e pela visão crítica.

Ao Prof. Carlos Logullo (amigo e orientador), por me permitir explorar coisas que estavam além da minha compreensão, pela sua incansável luta para termos ótimas condições de trabalho, interações com outros grupos de pesquisa, por tudo, obrigado!

Ao Prof. Itabajara (UFRGS), por todo o suporte e ensinamentos com relação à biologia molecular.

A Prof^a. Glória Braz (UFRJ-IQ) pelas dicas, pelos ensinamentos com bioinformática e pela amizade!

Aos Profs. Konai, Murata e Ohashi da Hokkaido University, por me receberem em seu laboratório e terem me dado todas as condições necessárias para o desenvolvimento do meu projeto durante o estágio Doutorado Sanduíche financiado pela CAPES.

A amiga Elisabete Kasuya, pela acolhida no Japão e por toda a sua ajuda no país dos outros!

Ao Padre Manfred, pela acolhida, pelos ensinamentos, pelas palavras de sabedoria e pelos passeios no Japão.

A Prof^a. Flávia B. Mury (UFRJ) por ter aceitado revisar esta tese.

A UENF por todo esse tempo (10 anos) e as agências de fomento: FAPERJ, CAPES, CNPq e INCT – Entomologia Molecular.

SUMÁRIO

Resumo	xi
Abstract	xii
1. Introdução	1
1.1 A pirofosfatase inorgânica	1
1.2 Aspectos funcionais das pirofosfatases inorgânicas	3
1.3 Pontes dissulfeto reversíveis como um “interruptor” redox em proteínas citosólicas	5
1.4 Controle metabólico durante o desenvolvimento embrionário de artrópodes	9
1.5 O carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> como modelo	11
2. Objetivo geral	13
2.1 Objetivos específicos	13
3. Material e Métodos	14
3.1 Clonagem do cDNA da BmPPase e análise da sequência de aminoácidos	14
3.2 Obtenção do mutante 1 C339A	14
3.3 Reação de ligação do inserto ao vetor de clonagem	14
3.4 Transformação das <i>E. coli</i> DH5 α	14
3.5 Reação de PCR para a checagem das colônias transformadas	14
3.6 Extração do DNA plasmidial	15
3.7 Sub-clonagem do inserto para BmPPase wt e Mut1 C339A em vetor de expressão procarioto	15
3.8 Ensaio de expressão e purificação	15
3.9 Avaliação dos parâmetros cinéticos da rBmPPase wt e Mut1 C339A	16
3.10 Ensaio químico para a glutationilação da rBmPPase wt	16
3.11 Dot-blotting	17
3.12 Mutação sítio-dirigido	18
3.13 Modelagem por homologia e testes <i>in silico</i>	18
4. Resultados	19
4.1. Clonagem, subclonagem, obtenção dos mutantes e sequenciamento	19
4.2 Teste de expressão dos recombinantes BmPPase wt e Mut1	23

4.3 Clonagem, sequenciamento e análises das sequências de aminoácidos das PPases dos carrapatos <i>Ixodes persulcatus</i> (Ip) e <i>Rhipicephalus appendiculatus</i> (Ra)	24
4.4 Parâmetros cinéticos da rBmPPase wt e do Mut C339A e perfil de sensibilidade a inibidores clássicos como fluoreto e cálcio	26
4.5 Modulação da atividade pirofosfatásica via oxidação e redução dos resíduos de cisteína	29
4.6 Parâmetros cinéticos da rBmPPase wt em função da modulação dos agentes oxidantes e redutores	31
4.7 S-Glutationilação da rBmPPase wt	33
4.8 Análise do modelo estrutural e da região de interface entre as subunidades	34
4.9 Relação entre os estados redox, com a substituição de aminoácidos e parâmetros físicos	40
4.10 Parâmetros cinéticos preliminares da pirofosfatase hidrolisando polifosfato	41
5. Discussão	43
6. Conclusões	52
7. Referência Bibliográfica	53
Anexos	67

RESUMO

A pirofosfatase inorgânica citosólica (PPase; EC 3.6.1.1) é uma hidrolase dependente de metal que converte pirofosfato (PPi) em ortofosfato (Pi) numa reação altamente exergônica. Esta reação é muito importante termodinamicamente, pois garante a estabilidade dos produtos de muitas reações biossintéticas que geram PPi como um sub-produto. Nossas análises indicaram que as cisteínas 167 e 295 estão presentes em alças próximas ao sítio ativo e, de alguma forma, elas poderiam interferir com a atividade da enzima. As cisteínas 138 e 339 estão localizadas na interface do dímero e, por isso, podem estar desempenhando outros papéis. A derivatização das cisteínas mais expostas na estrutura da BmPPase gerou uma perturbação estrutural que desencadeou uma perda de função. Também demonstrou-se que: a rBmPPase wt foi regulada por oxidação e redução, comprovando a reversibilidade do fenômeno; que ela pode ser glutacionilada, embora os seus efeitos na enzima não tenham sido avaliados; a aquisição de pontes dissulfeto foram do tipo "alostéricas" e, assim, a sua atividade foi diminuída e, posteriormente, após a redução das pontes dissulfeto, a sua atividade foi recuperada; moléculas fisiológicas com função antioxidante, tais como glutatona reduzida e ácido ascórbico, regularam positivamente a atividade da rBmPPase wt; o peróxido de hidrogênio, a concentrações fisiológicas, diminuiu a afinidade da rBmPPase wt pelo seu substrato (PPi), provavelmente por induzir a formação de pontes dissulfeto; a Cys339, localizada na interface do homodímero, desempenha um importante papel na manutenção da cooperatividade entre as subunidades. A sua substituição por alanina afetou, severamente, a reversibilidade da enzima durante o estresse oxidativo e a insensibilidade aos inibidores clássicos (fluoreto e cálcio). Demonstrou-se ainda que a BmPPase é uma enzima multifuncional, uma vez que ela reconheceu moléculas de polifosfatos de diferentes tamanhos (de 3 e 15 resíduos), sugerindo-se que essa enzima de carrapato pode estar desempenhando um importante papel tanto no metabolismo de polifosfato quanto no de pirofosfato. Os carrapatos compartilham essas mesmas cisteínas em localizações estratégicas. Portanto, o mecanismo de regulação redox em PPases dentro desse grupo pode estar conservado. Nesta tese, demonstramos que os resíduos de cisteína presentes em posições estratégicas na PPase podem ser alvos para diferentes tipos de regulação e desempenharem diferentes papéis em função de sua localização.

ABSTRACT

Inorganic pyrophosphatase (PPase; EC 3.6.1.1) is an essential metal-dependent enzyme that converts pyrophosphate (PPi) into orthophosphate (Pi). This reaction is highly exergonic and provides a thermodynamic pull for many biosynthetic reactions that yield pyrophosphate as a byproduct. Our analysis indicated that cysteines 167 and 295 are present in loops near the active site and, somehow, they could interfere with the enzyme activity. The cysteines 138 and 339 are located at the dimer interface and, therefore, may perform other roles. The derivatization of the most exposed cysteines on the BmPPase structure generated a structural perturbation that triggered a loss of function. We also demonstrated that rBmPPase wt was regulated by oxidation and reduction, confirming the reversibility of the phenomenon; it can be glutathionylated, although its effects on the enzyme activity have not been evaluated; the acquisition of disulfide bridges were of the "allosteric" type and, thus, its activity was decreased and recovered after disulfide bridges reduction. The rBmPPase wt activity was upregulated by physiological molecules with antioxidant function, such as reduced glutathione and ascorbic acid. The physiological concentrations of hydrogen peroxide decreased the affinity of rBmPPase wt for its substrate (PPi), probably by inducing the disulfide bridges formation. Cys339 is located at the homodimer interface, playing an important role by keeping the cooperativity between the subunits. Cys339 replacement by alanine affected the cooperativity, the enzyme reversibility during oxidative stress and insensitivity to classical inhibitors (fluoride and calcium) severaly. We demonstrated that BmPPase is a multifunctional enzyme, since it recognized the polyphosphate molecules of different sizes (3 and 15 residues). This suggests that tick PPase may be playing an important role either in the polyphosphate or/and the pyrophosphate metabolism. Ticks share these same cysteines at strategic positions. Therefore, the redox regulation of PPase activity within this group may be conserved. In this thesis, we showed that the cysteine residues in strategic positions in the cytosolic inorganic pyrophosphatase could be targets for many regulatory mechanisms and play different roles depending on their position.

1. Introdução

1.1 A pirofosfatase inorgânica

A pirofosfatase inorgânica citosólica (PPase, EC 3.6.1.1) catalisa a hidrólise de moléculas de pirofosfato (PPi), produzindo ortofosfato inorgânico (Pi). As PPases, além de controlarem as concentrações de PPi intracelular, também desempenham um importante papel no anabolismo celular, balanceando termodinamicamente reações biossintéticas desfavoráveis como as reações de síntese de DNA, RNA, hormônios e proteínas (Kornberg, 1962) sendo, então, considerada essencial para a manutenção da vida. Duas famílias de PPases, não homólogas, são conhecidas até o momento: PPases da família I são amplamente encontradas em todos os tipos de organismos; PPases da família II têm sido encontradas em arqueobactéria (*Sulfolobus acidocaldarius* [Meyer *et al.*, 1995]), em bactérias como *Bacillus subtilis* (Ahn *et al.*, 2001) e em bactérias patogênicas (*Streptococcus gordonii* [Ahn *et al.*, 2001] e *Streptococcus mutans* [Merckel *et al.*, 2001]). As PPases citosólicas mais estudadas são a homohexamérica de *Escherichia coli* (**Fig. 1A**) e a homodimérica de *Saccharomyces cerevisiae* (**Fig. 1B**). Estas enzimas foram intensivamente estudadas por cristalografia de raios-X (Heikinheimo *et al.*, 1996; Harutyunyan *et al.*, 1997) e mutações sítio-dirigidas, além de terem sido descritos todos os passos do mecanismo de hidrólise da molécula de pirofosfato dentro do sítio-ativo da enzima (Oksanen *et al.*, 2007).

As PPases da família I de arqueobactérias (termófilos) podem ocorrer como homohexamémeros ou como homotetrâmeros. A massa molecular das subunidades das PPases hexaméricas e diméricas da família I varia entre 19-22 kDa e 31-40 kDa, respectivamente (Tammenkosky *et al.*, 2005). Todas as PPases da família I têm seu sítio ativo composto pelos mesmos 13 resíduos polares funcionalmente importantes, o qual se reflete na conservação do mecanismo catalítico (Harutyunyan *et al.*, 1996). As PPases da família II frequentemente são encontradas como homodímeros (Zyryanov *et al.*, 2004) e cada subunidade com massa molecular de aproximadamente 34 kDa (Kuhn e Ward, 1998; Shintani *et al.*, 1998). Apesar das duas famílias apresentarem uma baixa identidade na sequência de aminoácidos entre si, há uma impressionante similaridade no arranjo espacial de seis resíduos chaves do sítio ativo, conferindo um bom exemplo de evolução convergente de enzimas (Ahn *et al.*, 2001).

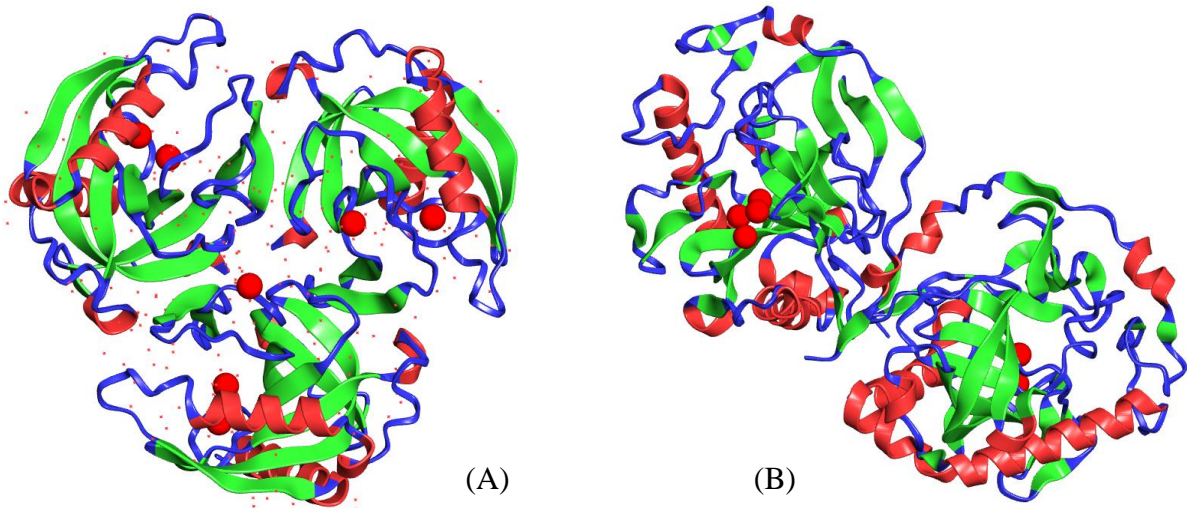


Figura 1. Estruturas 3D de pirofosfatases inorgânicas solúveis. (A) EcPPase (*E. coli*, homotrímico; número de acesso: PDB 1OBW). (B) ScPPase (*S. cerevisiae*, homodímico; número de acesso: PDB 1M38). As esferas em vermelho representam os átomos de magnésio. As estruturas secundárias alfa-hélices e folhas-beta estão representadas pelas cores magenta e verde, respectivamente. As regiões não estruturadas estão em azul.

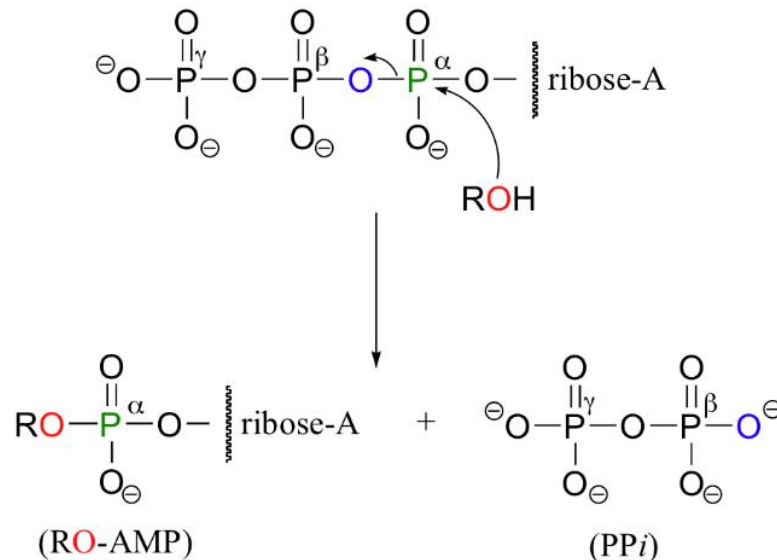


Figura 2. Da molécula de ATP ao pirofosfato. Três fatores contribuem para a grande quantidade de energia liberada durante a hidrólise das ligações fosfoanidras do ATP e PPi: repulsão eletrostática, efeito de solvatação e estabilização por ressonância. Adaptado de Machado e Nome (1999).

O pirofosfato é uma molécula simples constituída por 2 átomos de fósforo unidos por uma ligação fosfoanidra rica em energia. Este é produzido em aproximadamente 190 reações reversíveis dependentes de nucleosídeos 5'-trifosfato (Heinonen, 2001). A razão pela qual as ligações fosfoanidras nas moléculas de ATP e PPi são classificadas como "ricas em energia" ocorre devido a uma repulsão eletrostática muito forte entre os oxigênios vizinhos carregados negativamente (**Fig. 2**) (Machado e Nome, 1999). Contudo, segundo de Meis (1993), a energia de

hidrólise de um composto fosfatado é determinada pelas diferenças nas energias de solvatação entre reagentes e produtos.

1.2 Aspectos funcionais das pirofosfatases inorgânicas

O Mg^{2+} é o melhor cofator para as PPases da família I mas ele também atua em proporções equivalente as PPases da família II, contudo, o Mn^{2+} confere uma atividade 20 vezes maior para as PPases da família II quando comparado ao Mg^{2+} (Parfenyev *et al.*, 2001; Zyryanov *et al.*, 2004). Assim, a família II também difere da família I pela sua preferência ao metal cofator. Embora todas as PPases da família I estudadas até o momento sejam dependentes de cátions metálicos como cofatores estas são fortemente inibidas por Ca^{2+} a concentrações fisiológicas (Felix e Fleisch, 1975; Kurilova *et al.*, 1984; Mitchell e Minnick, 1997; Yang e Wensel, 1991). Seu mecanismo de inibição baseia-se no fato do íon Ca^{2+} impedir o ataque nucleofílico da molécula de água que participa da rede de coordenação ao pirofosfato (Samygina *et al.*, 2001).

Acredita-se que a diferença na especificidade ao cofator ocorra devido a presença de resíduos de histidina no sítio ativo das PPases da família II. São 3 resíduos, dois agindo como ligantes que coordenam o íon metálico e um terceiro que coordena o pirofosfato (Merckel *et al.*, 2001; Ahn *et al.*, 2001). Até 2005 nenhum resíduo de histidina havia sido encontrado no sítio ativo de qualquer uma das seis PPases da família I, cujas estruturas haviam sido resolvidas por Cristalografia de raios-X (Heikinheimo *et al.*, 1996; Kankare *et al.*, 1994; Teplyakov *et al.*, 1994; Leppanen *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2004). Tammenkosky e colaboradores (2005), descreveram estruturalmente uma PPase de *Mycobacterium tuberculosis*, a qual mesmo pertencendo a família I, apresentou dois resíduos de histidina (His^{21} e His^{86}) em seu sítio ativo. Contudo, sua principal atividade ocorreu na presença de Mg^{2+} como cofator.

As primeiras PPases da família I monoméricas foram descritas em algas verdes (*Chlamydomonas reinhardtii*). Estas enzimas estavam localizadas na mitocôndria e no cloroplasto (Gómez-Garcia *et al.*, 2006). Ambas as enzimas são dependentes de Mg^{2+} e possuem os mesmos resíduos de aminoácidos conservados importantes para a hidrólise do pirofosfato (Lahti *et al.*, 1990; Cooperman *et al.*, 1992; Baykov *et al.*, 1999).

As PPases podem representar de 0,1 a 0,5% do total de proteína celular. As concentrações de pirofosfato citosólico em tecidos vegetais fotossintéticos são mantidas a concentrações milimolares (0,2-0,5), claramente superior quando comparado as leveduras (0,002-0,005 mM), sugerindo que essas enzimas podem estar compartimentalizadas ou serem fortemente reguladas. Isso também sugere que o pirofosfato pode ter um importante papel como um doador de energia no metabolismo vegetal (Heikinheimo *et al.*, 1996). De modo geral, grande parte dos trabalhos publicados exploram o envolvimento da próton-pirofosfatase (H^+ -PPase) com relação ao desenvolvimento de resistência a estresse salino e seca (Zhang *et al.*, 2011), solo deficiente em fósforo (Gaxiola *et al.*, 2012) e melhoria da eficiência do uso de nitrogênio (Paez-Valencia *et al.*, 2013). Em estudos realizados com mutantes de *Arabidopsis thaliana* foi possível avaliar os efeitos de ganho e perda de função da H^+ -PPase e da PPase solúvel. Neste trabalho foi demonstrado que o acúmulo excessivo de PPi no citoplasma inibiu a gliconeogênese e prejudicou a síntese de sacarose (Ferjani *et al.*, 2011).

De modo geral, as PPases são transcritas constitutivamente (Vener *et al.*, 1990). No entanto, poucos trabalhos elucidando os mecanismos reguladores de sua atividade são encontrados. Vener e colaboradores (1986) mostraram que a PPase de *E. coli* tem a sua atividade aumentada 1,5X quando fosforilada por ATP num sistema livre de proteínas cinases. O mesmo fenômeno foi observado em PPase de levedura, com um aumento de 200% na atividade da enzima (Vener, 1989). Ao comparar este fenômeno de ativação por ATP da PPase de fígado de rato não foi observado nenhum efeito em sua atividade, embora tenha sido confirmado que a enzima estava fosforilada. Contudo, quando fosforilada por uma proteína cinase dependente de cAMP (PKA, EC 2.7.11.11), no resíduo de serina, foi observado um aumento considerável na atividade da PPase. Estes resultados permitiram aos autores especularem que em organismos multicelulares a PPase pode ter a sua atividade regulada de uma forma mais controlada e/ou mais específica, em outras palavras, isto sugere que esta enzima, em organismos superiores, possui um papel mais relevante do que exclusivamente impulsionar termodinamicamente reações de biossíntese (Vener *et al.*, 1990).

Nos últimos 20-30 anos alguns grupos começaram a mostrar que fatores de transcrição e proteínas transmembranas poderiam estar respondendo a um tipo de regulação que até então não era compreendido e que estava envolvida com a

variação de potencial redutor do ambiente ao qual aquela proteína estivesse inserida (Freedman e Hawkins, 1977; Creighton *et al.*, 1980). A primeira quebra de paradigma foi com relação à formação de pontes dissulfeto, pois era assumido que proteínas presentes no ambiente redutor do citosol não possuíam pontes dissulfeto. Ainda naquela época, esse tipo de modificação pós-traducional acontecia exclusivamente em proteínas que eram exportadas com o propósito de acentuar a estabilidade estrutural. Com a descoberta de que um grande número de proteínas citosólicas usavam ligações dissulfeto específicas e reversíveis como um mecanismo regulador funcional, a visão bioquímica engessada sobre o assunto precisou ser revista.

1.3 Pontes dissulfeto reversíveis como um “interruptor” redox em proteínas citosólicas

O resíduo de cisteína (Cys) tem uma característica notável de reagir e ser modificado pelo seu ambiente. Diferente da histidina, que possui uma cadeia lateral com um valor de pKa (6,00) próximo ao neutro, e por isso, torna-se ionizável mediante a variações no pH fisiológico, o resíduo de Cys (pKa 8,18 da cadeia lateral) também pode funcionar como sensor de pH em sua proteína residente. O papel desempenhado pelas histidinas como "interruptores" sensíveis a variação de pH é bem conhecido. As histidinas desencadeiam a principal mudança conformacional na hemaglutinina do vírus influenza quando exposta a mudanças no pH durante o tráfego nos endossomas (Bullough *et al.*, 1994). Muitos outros casos de mudanças conformacionais dependentes de pH mediadas por histidinas têm sido documentadas (Achilonu *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012; Abdul-Wahab *et al.*, 2013). Por outro lado, investigações sobre o papel de resíduos de Cys atuando em mudanças conformacionais dependentes de pH são pouco exploradas (Neujahr, 1988; Griffiths *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2012).

Os resíduos de Cys também são sensíveis a uma variedade de modificações por espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (Finkel, 2011). A Cys pode ser nitrosilada, glutationilada (Martinez-Ruiz e Lamas, 2007) e ainda pode formar ligações covalentes com outra Cys (**Fig. 3**). Um RNS como o óxido nítrico (NO) pode mediar a S-nitrosilação e produzir um S-nitrosotiol (RSNO) (Forrester *et al.*, 2009). Outro RNS como o peroxinitrito (ONOO⁻), pode também mediar a S-nitração para produzir S-nitrosotióis (RSNO₂). A oxidação

sequencial do grupamento tiol das Cys gera ácido sulfênico (-SOH), sulfínico (-SO₂H) e/ou sulfônico (-SO₃H) (Hugo *et al.*, 2009). A reação dos grupamentos tíois das proteínas com tíois de baixo peso molecular, como a glutathiona reduzida, pode gerar mistos de ligações dissulfeto. De outro modo, a oxidação por ROS e RNS pode resultar na formação de ligações dissulfeto entre dois tíois dentro de uma mesma cadeia proteica ou entre cadeias proteicas. A propriedade de sensor de pH e a sua tendência a modificações reforçam a ideia de que as Cys participam desses “interruptores” redox.

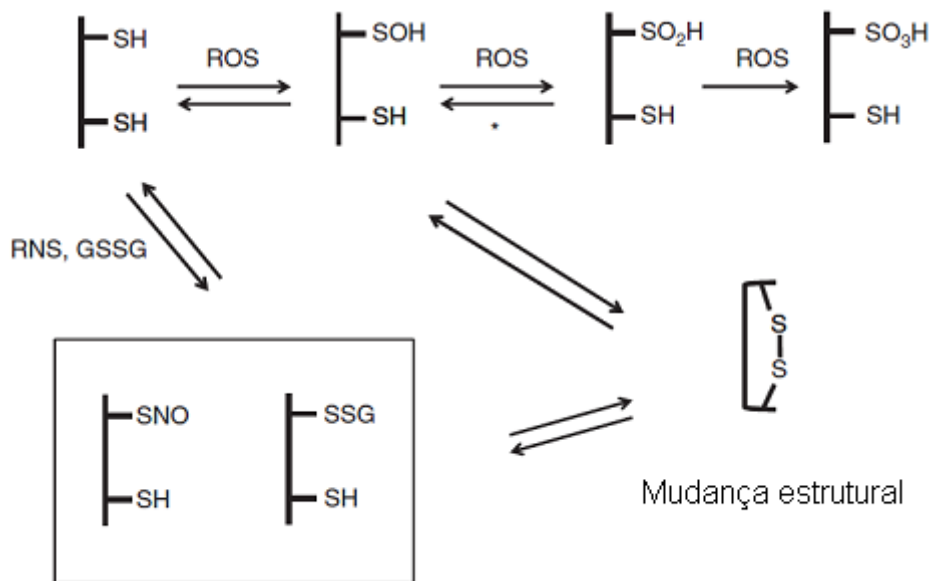


Figura 3. Modificação oxidativa de cisteínas e formação de ligação dissulfeto. O grupamento sulfidril (SH) da cisteína é sequencialmente oxidado pelo ROS a ácido sulfênico (SOH), ácido sulfínico (SO₂H) e ácido sulfônico (SO₃H). O RNS e a glutathiona oxidada (GSSG) podem oxidar o grupamento sulfidril da cisteína a S-nitrosotiol (SNO) e S-glutationilação (SSG). Essa oxidação intermediária pode levar a formação de ligações dissulfeto e mudanças estruturais quando a distância entre os dois sulfidris é maior do que a ligação dissulfeto resultante. O asterisco indica que a formação de ácido sulfínico, em peroxiredoxinas, pode ser revertido a ácido sulfênico por uma sulfiredoxina específica. Retirado de Ryu (2012).

É importante destacar que a formação de ligações dissulfeto em proteínas é, na maioria das vezes, dependente do potencial redox do ambiente a sua volta, portanto, a sua distribuição dentro da célula é bastante desigual. Além disso, a formação de ligações dissulfeto, como uma modificação pós-traducional, é bastante rara num ambiente redutor como o do citosol. Por outro lado, a oxidação de Cys a ligações dissulfeto é favorecida em compartimentos com um ambiente oxidante, por

exemplo: em procariotos, espaço periplasmático (Messens *et al.*, 2007); em eucariotos, retículo endoplasmático (Sitia e Braakman, 2003), no espaço intermembrana da mitocôndria (Chacinska *et al.*, 2004; Naoe *et al.*, 2004; Mesecke *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2008; Banci *et al.*, 2009) e em cloroplastos de plantas verdes (Kieselbach, 2013 IN PRESS). Nestes compartimentos, as oxidoredutases responsáveis pela formação de ligações dissulfeto são: periplasma (“disulfide bond protein A” [DsbA], DsbB, DsbC, DsbG, e DsbD), retículo endoplasmático (“protein disulfide isomerase” [PDI] e “endoplasmatic reticulum oxidoreductin 1” [Ero1]), no espaço intermembrana da mitocôndria (“Mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40” [Mia40] e a “protein essential for respiration and vegetative growth” [Erv1]) e, finalmente, em cloroplastos (“proteins' low quantum yield of Photosystem II 1” [LQY1], “snowy cotyledon 2” [SCO2], “Lumen thiol oxidoreductase 1” [LTO1] e a “protein disulfide isomerase 1-3” [PDIL1-3]).

O papel das ligações dissulfeto tem sido redefinido nos últimos 30 anos ainda quando estas ligações eram classificadas como “dissulfetos estruturais” por conferirem estabilidade às estruturas terciárias e quaternárias de proteínas exportadas (Darby e Creighton, 1995; Wedemeyer *et al.*, 2000). No entanto, este conceito foi revisto quando a formação de ligações dissulfeto foi identificada em outros três âmbitos, como: parte de um mecanismo de reação catalítica em oxidoredutases (Freedman e Hawkins, 1977; Creighton *et al.*, 1980); um mecanismo para transportar equivalentes redutores (Carmel-Harel e Storz, 2000) e um importante regulador de processos transcripcionais e pós-traducionais (Pomposiello e Demple, 2001). Além disso, nos últimos anos têm surgido evidências de uma nova categoria de ligações dissulfeto que podem controlar a função de proteínas citosólicas (**Fig. 4.1 e 4.2**) por desencadear uma alteração conformacional quando se rompe e/ou se forma, portanto, sendo considerada como um “dissulfeto alostérico” (Hogg, 2003; Schmidt *et al.*, 2006). Por conseguinte, os “dissulfetos alostéricos” são modulados pelos “dissulfetos catalíticos” das oxidoredutases (Azimi *et al.*, 2011; Cook e Hogg, 2013 IN PRESS).

Deste modo, os “dissulfetos alostéricos” regulam muitas proteínas (fatores de transcrição, transdutores de sinal, choque térmico, canais de membrana [Miki e Funato, 2012]) com resíduos de Cys que podem ser oxidados reversivelmente, ocasionando uma ativação ou inibição da função celular da proteína correspondente (Antelmann e Helmann, 2011) (**Fig. 4.1 e 4.2**).

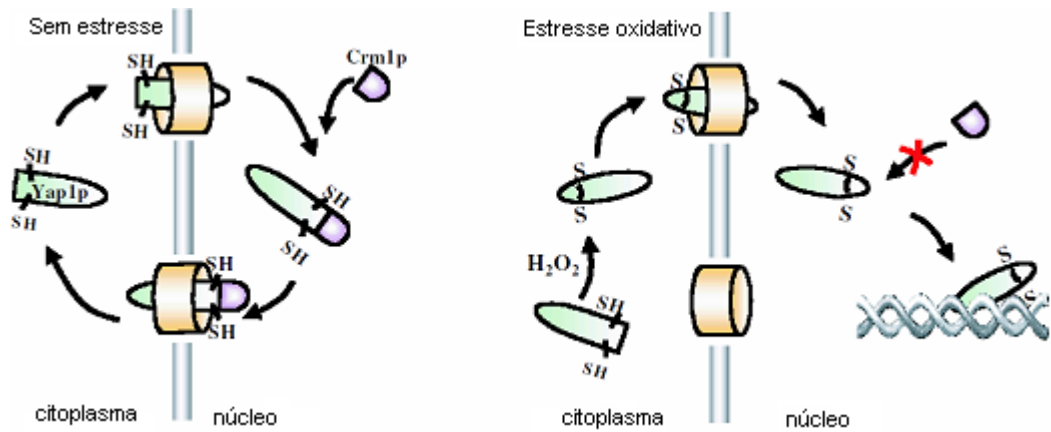


Figura 4.1. Ciclo de translocação da Yap1p. O fator de transcrição Yap1p é regulado por oxidação e redução e é mantido reduzido pela Tioredoxina sob condições normais de crescimento. Sob estresse oxidativo, uma ou mais ligações dissulfeto são formadas. Ambas as espécies reduzidas e oxidadas migram do citoplasma para o núcleo. Contudo, a translocação de volta ao citoplasma é seletiva. Somente a forma reduzida pode formar um complexo com o receptor de exportação Crm1p e ser transportado de volta ao citoplasma. A(s) ligação(ões) dissulfeto na espécie oxidada abolem a habilidade do Yap1p de interagir com o Crm1p e, assim, o Yap1p oxidado se acumula no núcleo e dá início a transcrição de seus genes alvo. Retirado de Linke e Jakob (2003).

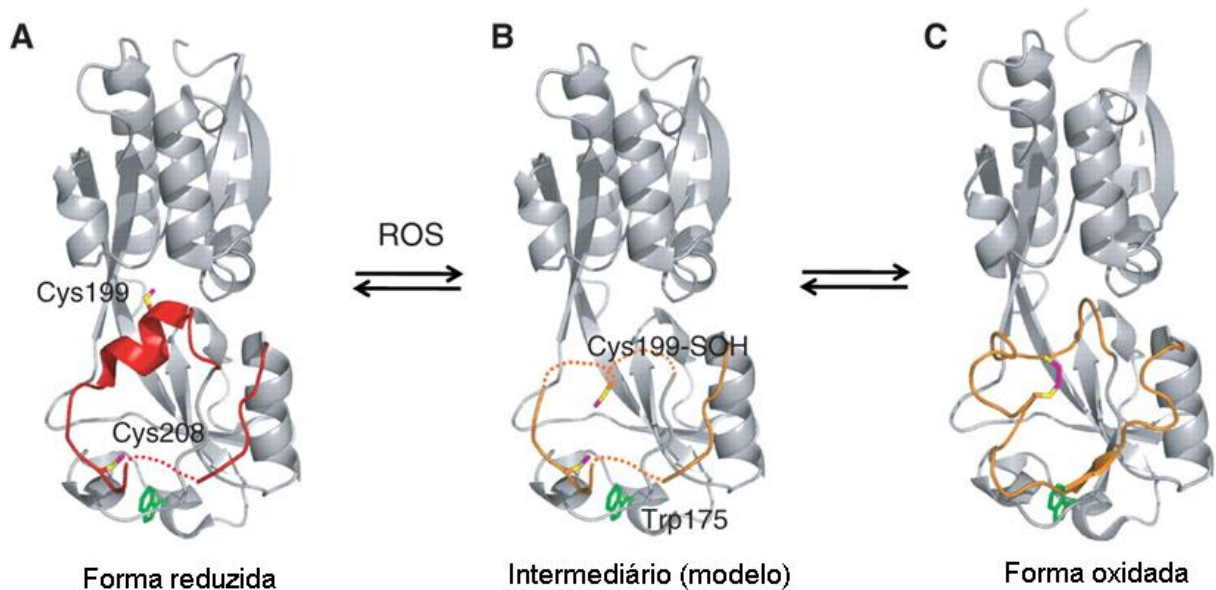


Figura 4.2. Mudanças estruturais dependentes de oxidação e redução na OxyR. As formas reduzida (A), intermediária (B) e oxidada (C) foram obtidas a partir dos PDBs 1I69 e 1I6A. Na forma reduzida, os resíduos 195-204 foram mostrados em vermelho e as cadeias laterais das cisteínas redox ativas 199 e 208 foram mostrados em magenta (enxofre) e amarelo (carbono beta). O Trp175 gera fluorescência. Quando a cisteína 199 redox ativa foi oxidada, o ácido sulfênico (Cys199-SOH) foi formado e ejetado do bolsão hidrofóbico original. A ejeção da Cys199-SOH tornou a região flexível e as chances de encontrar a Cys208 no outro loop flexível foi aumentada (B). Quando a Cys199-SOH encontra-se com a Cys208 uma ligação dissulfeto é formada e um rearranjo estrutural ocorre. Retirado de Ryu 2012.

1.4 Controle metabólico durante o desenvolvimento embrionário de artrópodes

O embrião em desenvolvimento requer uma alta demanda energética. Esta energia é obtida pelo catabolismo de biomoléculas como carboidratos e lipídeos. O metabolismo energético de um embrião em desenvolvimento é fortemente regulado (Moraes *et al.*, 2007), principalmente em indivíduos que estão sendo desenvolvidos num sistema fechado quase autossuficiente (ovos cleidóicos [Rombough, 2011]) como é o caso de artrópodes, reptéis e aves onde as quantidades de nutrientes e energia são limitados. Como demonstrado por Campos e colaboradores (2006), a mobilização coordenada das principais fontes de energia e o aumento do consumo de oxigênio são bem definidas em função do crescimento e das mudanças morfogenéticas que ocorrem durante a embriogênese do carrapato *R. microplus*. No ano seguinte, Moraes e colaboradores (2007) demonstraram que os conteúdos de glicose e glicogênio são mobilizados e resintetizados em momentos distintos durante a embriogênese do *R. microplus*. Além disso, após a celularização do embrião, há um aumento considerável na atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, fato que justifica o direcionamento da glicose-6-fosfato formado pela hexocinase para via das pentoses fosfato.

A descrição clássica sobre ovogênese propõe que são armazenadas grandes quantidades de proteínas, lipídeos e glicídeos para o crescimento dos ovócitos. A principal proteína de reserva dos ovos de artrópodes é a vitelina, a qual é derivada de um precursor no corpo gorduroso, a vitelogenina. A vitelogenina é adquirida pelos ovócitos através de endocitose mediada por receptor (Sappington e Raikhel, 1998) e é acumulada em estruturas chamadas grânulos de vitelo e recebe o nome de vitelina (Fagotto, 1990; Yamamoto e Takahashi, 1993; Logullo *et al.*, 1998). Vitelinas de todos os grupos de artrópodes são lipoglicoproteínas fosforiladas de alta massa molecular. No entanto, a mais peculiar característica das vitelinas de carrapatos é a presença de heme associada à proteína, dando aos ovos a sua cor marrom (Boctor e Kamel, 1976; Rosell e Coons, 1991). Assim, além de prover aminoácidos para o embrião, como são classicamente descritas, as vitelinas provavelmente são proteínas de reserva de heme usada para o crescimento de carrapatos (Logullo *et al.*, 2002).

O desenvolvimento dos embriões do carrapato bovino se dá de forma semelhante ao da *D. melanogaster*. Depois da fertilização e da fusão dos núcleos do espermatozóide e do óvulo, o núcleo do zigoto passa por uma série de rápidas

divisões mitóticas, ao contrário da maioria dos embriões de animais, não há clivagem do citoplasma. O resultado é um sincício onde muitos núcleos estão presentes em um citoplasma comum. O embrião essencialmente permanece como uma única célula durante o seu desenvolvimento inicial (Wolpert *et al.*, 2000).

Nosso grupo mostrou os momentos morfológicos mais marcantes na embriogênese do *R. microplus*, como a formação de um blastoderma sincicial no terceiro dia (**Fig. 5C**), do blastoderma celular no quinto dia (**Fig. 5D**) e a completa segmentação do embrião no sétimo dia do desenvolvimento (**Fig. 5F**) (Campos *et al.*, 2006).

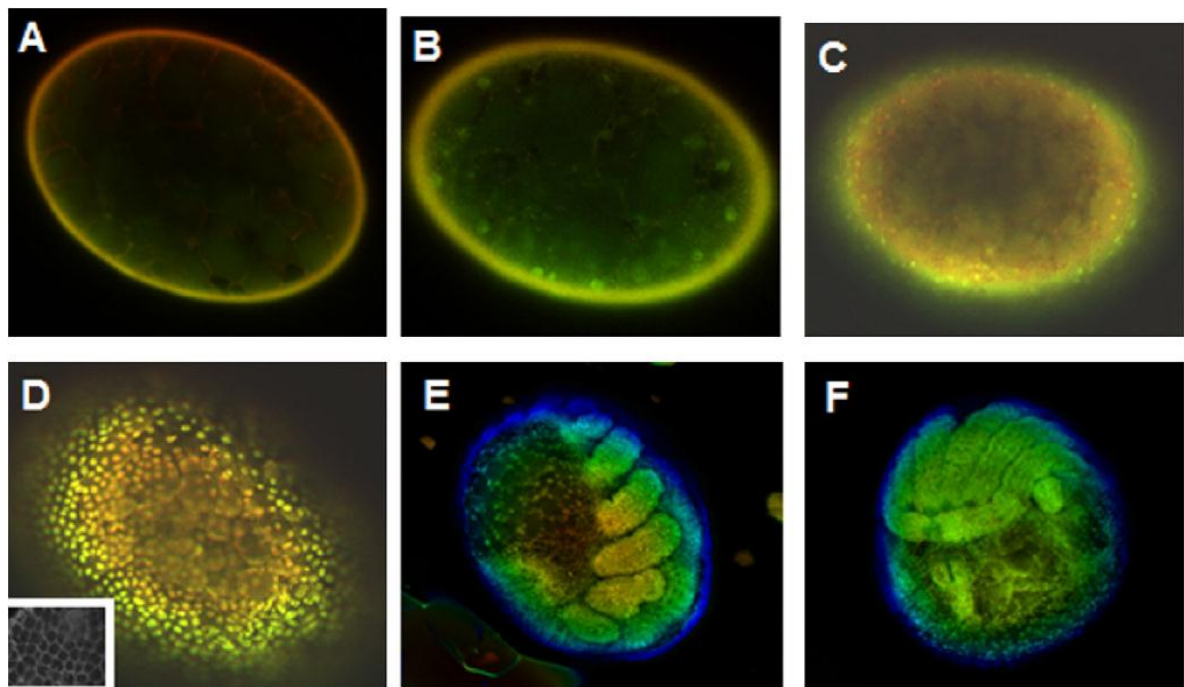


Figura 5. Morfologia dos embriões do *R. microplus*. Ovos permeabilizados com diferentes dias de ovoposição foram submetidos à microscopia confocal a laser. (A) Sem marcação (somente auto-fluorescência); (B-F) Marcação com laranja de acridina; (E) Marcação com azul de Evans. (A, D, E) 6 dias; (B) 1 dia; (C) 4 dias; (F) embrião de 7 dias. Uma projeção em preto e branco de uma reconstrução tridimensional é mostrada de um embrião segmentado no painel “F”. Note que somente o córion é auto-fluorescente (painel “A”). As marcações com laranja de acridina e azul de Evans mostram: o núcleo e a célula, respectivamente (retirado de Campos *et al.*, 2006).

1.5 O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* como modelo

O carrapato é um artrópode ectoparasita hematófago obrigatório que infesta um grande número de espécies de vertebrados terrestres. Já foram descritas 866 espécies de carrapatos (Horak *et al.*, 2002) e estes são vetores mais versáteis que os mosquitos, pelo fato de poderem transmitir uma maior quantidade de organismos patogênicos tais como vírus, fungos, rickettsiae, bactéria e protozoários durante o processo de alimentação (Sonenshine, 1991). Até o momento foram descritas três famílias. Contudo, duas famílias são consideradas as mais importantes, devido ao seu maior número de espécies: a *Argasidae* (carrapatos duros) e a *Ixodidae* (carrapatos moles).

Os argasídeos alimentam-se do sangue dos seus hospedeiros vertebrados, repetidas vezes, abandonando-os em seguida (Sonenshine, 1991). As fêmeas efetuam várias posturas, alternando com a alimentação sangüínea. Cada postura não ultrapassa 150 ovos, sendo um número pequeno, quando comparado aos cerca de 3000-4000 ovos dos ixodídeos (**Fig. 6B**). Nos ixodídeos, a alimentação é prolongada, ingerindo grandes quantidades de sangue do seu hospedeiro vertebrado, alcançando até 100 vezes a sua massa corporal inicial (Sonenshine, 1991). O sangue é a sua única fonte de energia para o desenvolvimento. Grande parte do sangue é: processado, transferido e armazenado nos ovos. Estes irão apresentar uma cor amarronzada que é devido à presença de vitelina, que em carrapatos é classicamente descrita como uma heme-proteína (Boctor e Kamel, 1976; Rosell e Coons, 1991; James e Oliver Jr, 1997).

O *R. microplus* originou-se provavelmente na Ásia, quando mamíferos e pássaros substituíram, já no período terciário, os répteis como vertebrados dominantes (Hoogstraal, 1985; Rocha, 1999). Adaptou-se perfeitamente ao clima dos países tropicais, onde o calor e a umidade proporcionaram condições favoráveis à sobrevivência e a manutenção de sua espécie (Powel e Reid, 1982; Rocha 1999). O *R. microplus* (**Fig. 6A**) é o ectoparasita do bovino de maior importância econômica e médico-veterinária no hemisfério sul.

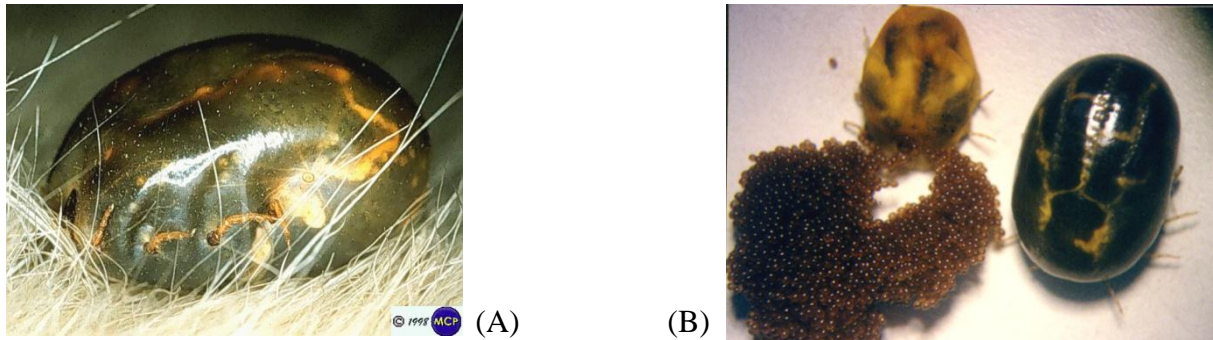


Figura 6. O carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. (A) parasitando o seu hospedeiro vertebrado e em (B) a fêmea no momento da ovopostura. Foto “A” retirada de <http://icb.usp.br/~marcelcp/Imagens/carr7.jpg> (disponível *on line* em 02/2009) e foto “B” retirada de <http://www.ufrgs.br/depbiot/201/images/postura.jpg> (disponível *on line* em 02/2009).

Diversos grupos de pesquisa têm estudado métodos alternativos de controle ao *R. microplus* a fim de que possam ser combinados e/ou substituídos ao método químico (acaricidas) usado até os dias atuais. Dentre essas alternativas, apresenta-se a seleção de bovinos resistentes, uso de conhecimentos da ecologia do carrapato, desenvolvimento de vacinas e controle biológico utilizando patógenos ou predadores de carrapatos. O nosso grupo de pesquisa tem dedicado grandes esforços em identificar novos alvos moleculares a fim de interferir na proliferação de novos indivíduos. A caracterização bioquímica e molecular de enzimas envolvidas, direta ou indiretamente, com a embriogênese deste ectoparasita pode contribuir para a seleção de novos alvos para desenho racional de fármacos e/ou desenvolvimento de vacinas.

Anteriormente, Costa e colaboradores (2012) demonstraram que a PPase do carrapato *R. microplus* possui resíduos de cisteína (Cis₁₃₈-Cis₃₃₉ e Cis₁₆₇-Cis₂₉₅) que podem ser alvos para o controle da atividade desta enzima. Além disso, estes mesmos sítios podem ser alvos para regulação pós-traducional e assim diminuir a atividade da enzima. Nesta tese, os ensaios com as proteínas recombinantes e mutantes nos permitiram testar outras hipóteses e propor um modelo no qual essa enzima pode ser modulada em função dos diferentes momentos da embriogênese.

2. Objetivo geral

O presente trabalho visa investigar um novo mecanismo de modulação cinética por equilíbrio redox de uma pirofosfatase inorgânica solúvel do carrapato bovino *R. microplus*.

2.1 Objetivos específicos

I. Caracterização molecular da pirofosfatase de embriões do *R. microplus*.

- A. Clonagem do cDNA que codifica a pirofosfatase em vetor de expressão;
- B. Superexpressão da enzima BmPPase recombinante (rBmPPase);
- C. Purificação da rBmPPase;

II. Avaliação de parâmetros cinéticos da rBmPPase.

- A. Determinação da atividade da pirofosfatase;
- B. Determinação dos V_{max} e K_m ;
- C. Avaliação do efeito de agentes oxidantes: glutatona oxidada, peróxido de hidrogênio e indutor de formação de ponte dissulfeto [Cu^{2+} -(1,10-fenantrolina)₃]; e agentes redutores (DTT e Glutatona reduzida) sobre a atividade e estrutura da rBmPPase;

III. Produção de mutantes da rBmPPase substituindo os resíduos de cisteína 138, 167, 295 e 339 por alaninas.

- A. Superexpressão das enzimas recombinantes;
- B. Purificação;
- C. Avaliação dos efeitos dos agentes oxidantes e redutores sobre a atividade das enzimas mutadas.

3. Material e Métodos

3.1 Clonagem do cDNA da BmPPase e análise da seqüência de aminoácidos

Este procedimento se encontra no **ANEXO 1**.

3.2 Obtenção do mutante 1 C339A

O resíduo de cisteína C339 é o terceiro aminoácido antes do códon de parada. Dessa forma, a estratégia utilizada se baseou no desenho de um primer reverso (**ANEXO 3**) com uma substituição do códon que codifica para cisteína por alanina, usando como molde o inserto BmPPase wt já clonado em pGEM-T Easy (Promega, cat # A1360). Foi realizada a extração do DNA plasmidial de cinco clones positivos e estes foram sequenciados 5 vezes em ambos os sentidos.

3.3 Reação de ligação do inserto ao vetor de clonagem

Este procedimento foi realizado seguindo as recomendações do fabricante do kit de clonagem pGEM-T Easy Vector System (Promega, cat # A1360).

3.4 Transformação das *E. coli* DH5 α quimicamente competentes

Alíquotas contendo 100 μ L de células de *E. coli* DH5 α , quimicamente competentes, armazenadas em freezers -80°C foram utilizadas para a transformação por choque térmico para todas as construções produzidas nesta tese. O procedimento foi realizado da seguinte maneira: foram adicionadas 10 μ L da reação de ligação na alíquota de células competentes. Esta mistura foi mantida em gelo por 20 min e então submetida a choque térmico (banho seco) a 42 °C por 45 seg e retornando ao gelo por 2 min. Em seguida foram adicionados 500 μ L do meio de cultura SOC e estes foram colocados em agitação orbital por 1h30min a 37 °C. Ao fim desta incubação, foram transferidos entre 100-150 μ L desta suspensão para placas de petri com meio de cultura LB-Agar suplementado com ampicilina a 100 μ g/mL.

3.5 Reação de PCR para a checagem das colônias transformadas

Após a transformação das *E.coli* DH5 α , pelo menos 20 clones brancos foram transferidos para uma segunda placa contendo o meio de cultura LB-Agar suplementado com 100 μ g/mL de ampicilina. Os primers (**ANEXO 3**) utilizados para

a obtenção dos insertos para clonagem da BmPPase wt e Mut1 foram utilizados para esta reação de checagem do inserto.

3.6 Extração do DNA plasmidial

Este procedimento foi realizado seguindo as recomendações do fabricante do QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, cat # 27106).

3.7 Sub-clonagem do inserto para BmPPase wt e Mut1 C339A em vetor de expressão procarioto

As construções plasmidiais (pGEM-BmPPase wt e pGEM-BmPPase Mut1 C339A) foram utilizadas como molde para obtenção de seus respectivos produtos com sítios de restrição para NdeI (forward) e EcoRI (reverso) (desenho dos primers **ANEXO 3**). Após este procedimento, os produtos foram ligados ao vetor de expressão procarioto pCold-TF DNA (Takara-JPN) que foi aberto nos mesmos sítios de restrição desenhados para os primers forward e reverso. A principal característica deste vetor de expressão procarioto é a sua regulação a baixas temperaturas. Dessa forma, foi possível realizar os ensaios de expressão a 15 °C, minimizando as chances de a proteína recombinante ir para corpos de inclusão. Foram realizadas as extrações do DNA plasmidial de cinco clones positivos referentes a cada construção e estes foram sequenciados 5 vezes em ambos os sentidos.

3.8 Ensaio de expressão e purificação das proteínas recombinantes

As construções plasmidiais (pGEM-BmPPase wt e pGEM-BmPPase Mut1 C339A) foram utilizadas para transformar cepas de *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) pLyS (Novagen, USA). As células transformadas cresceram sob agitação (180 RPM) até alcançarem uma D.O.₆₀₀ = 0,4-0,6 a 37 °C em meio de cultura LB suplementado com 100 µg/ml de ampicilina. Para induzir a expressão da proteína recombinante, IPTG foi adicionado a uma concentração final de 1 mM e a cultura ficou sob agitação (150 RPM) por 24 h a 15 °C. Em seguida, as *E. coli* foram coletadas por centrifugação (2700 x g por 10 min). Os passos seguintes foram realizados como recomendado pelo fabricante da coluna de purificação de proteínas Ni-Sepharose 6 Fast Flow (Amersham). As células foram ressuspensas no tampão de ligação da coluna: 100 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 25 mM Imidazol e 500 mM NaCl. Em seguida, as células foram rompidas usando o Desruptor de Células Ultrasônico (QSonica,

mod. Q55A) cuja potência foi ajustada entre 25-35% por 10 ciclos de 30 seg com intervalos de 30 segundos e a amostra sempre mantida em gelo. O lisado celular foi centrifugado a 10.000 x g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e então aplicado na coluna de purificação citada anteriormente. O passo de lavagem foi estabelecido pelo uso de 500 mL do tampão de ligação. Em seguida, a proteína recombinante foi eluída num único passo usando o tampão de eluição 100 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 500 mM Imidazol e 500 mM NaCl. Foram coletadas 30 frações de 1 mL logo após a aplicação do referido tampão. A quantidade de proteína eluída foi determinada pelo método de Bradford (1976) usando ovoalbumina (Sigma) como proteína de referência. Além disso, todas as frações também foram checadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em gradiente de 5-12% na presença de SDS (Laemmli, 1970).

3.9 Avaliação dos parâmetros cinéticos da rBmPPase wt e Mut1 C339A

A atividade da rBmPPase foi determinada espectrofotometricamente pela mensuração de ortofosfato inorgânico, usando um ensaio colorimétrico baseado no método de Fiske e Subbarow (1925) com algumas modificações. A leitura da solução de coloração foi realizada a 750 nm no espectrofotômetro Shimadzu UV-Visível – 1240.

O tampão de reação contém Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) sendo posteriormente suplementado com 1,0 mM MgCl₂ e 400 µM Na₄PPi. A atividade pirofosfatásica foi considerada após a incubação do material a 30 °C por 10 min.

Os valores de V_{max} e K_m das enzimas foram determinados por regressão não linear e os gráficos de Michaelis-Menten foram construídos. As concentrações dos substratos estão indicadas em cada figura.

Os agentes redutores e oxidantes foram preparados em solução tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), ao abrigo da luz e mantidos refrigerados, exceto o agente oxidante cobre-fenantrolina (CuPh) que foi solubilizado numa solução contendo 50% (v/v) de etanol e foi mantido estocado a 4 °C.

3.10 Ensaio químico para a glutathionilação da rBmPPase wt

Este procedimento foi realizado seguindo a metodologia estabelecida por Cheng e colaboradores (2005) com algumas adaptações. Foi preparada uma solução contendo 500 µg da proteína recombinante purificada, 10 mM de glutathiona

reduzida (GSH), 100 mM de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, finalmente, avolumado com água destilada até o volume final de 100 μ L. Além do H_2O_2 também foi testado o agente oxidante cobre-fenantrolina (CuPh) a uma concentração final de 50 μ M. Como controle foi utilizado 100 μ g BSA nas mesmas concentrações utilizadas para a proteína recombinante. Após a incubação por 15 min a 37 °C, a reação foi lavada e filtrada usando o sistema de diálise Amicon Ultra 50 kDa (Millipore-MERCK) seguindo as recomendações do fabricante.

3.11 Dot-blotting

A análise da proteína recombinante BmPPase glutationilada foi realizada pelo método de *Dot-blotting*. Foram recortados pedaços circulares, medindo 1,5 cm de diâmetro, de membrana de nitrocelulose e colocados em poços separados numa placa de cultura de célula. O experimento foi organizado do seguinte modo: Controle positivo (BSA oxidada com peróxido de hidrogênio e com cobre-fenantrolina [CuPh]); a amostra da proteína recombinante BmPPase glutationilada (aplicados 2 μ L contendo 249 μ gPTN/ μ L) e o branco da amostra (amostra da BmPPase na ausência dos anticorpos).

Após a secagem das amostras em temperatura ambiente, as membranas foram bloqueadas com 1 mL de tampão bloqueador (Tampão PBS contendo 2% de leite em pó desnatado, pH 7,6) por 2 h em temperatura ambiente. Após o bloqueio as membranas foram lavadas 10 vezes com tampão PBS (fosfato de sódio 100 mM e cloreto de sódio 500 mM, pH 7,6) e então incubadas com o primeiro anticorpo anti-GSH produzido em coelho, diluído em tampão bloqueador (diluições de 1:50; 1:100; 1:500 e 1:1000) por 2 h em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi novamente lavada com tampão PBS por 10 vezes e incubada com o segundo anticorpo anti-IgG de coelho complexado a peroxidase diluído em tampão bloqueador (1:2000) por 2 h em temperatura ambiente. Após a incubação, as membranas foram lavadas com tampão PBS mais 10 vezes e então reveladas com uma solução reveladora composta de 5 mg de diaminobenzeno (DAB) dissolvidos em 5 mL de uma solução contendo 100 μ L de tampão Tris-HCl 2 M pH 7,5; 300 μ L de imidazol 0,1 M; 4,9 mL de água destilada e 5 μ L de H_2O_2 . A solução reveladora foi deixada em contato com a membrana, na ausência de luz, até o aparecimento das marcações. A reação foi parada lavando-se a membrana com água destilada.

3.12 Mutação sítio-dirigido

Para a construção dos demais mutantes (Mut2 C295A, Mut3 C138A C339A e Mut4 C167A C295A) foram utilizados como molde as construções pCold-BmPPase wt e Mut1. Foi utilizado o kit QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, cat# 200524) e o experimento foi realizado seguindo as recomendações do fabricante. O desenho dos primers para a obtenção de cada mutante se encontra no **ANEXO 3**.

3.13 Modelagem por homologia e testes *in silico*

A estrutura tridimensional da BmPPase foi obtida por modelagem por homologia usando como molde a estrutura da PPase citosólica de levedura (PDB 1M38) resolvida por cristalografia de raios-X e disponível no *RCSB Protein Data Bank*. Critérios como: maior proximidade filogenética e/ou maior percentual de identidade ($\pm 50\%$) em relação à sequência primária do *R. microplus* foram utilizados para seleção da proteína molde. Os procedimentos de implementação do modelo tridimensional foram realizados com o programa Modeller9v4 (Sali e Blundell, 1993) e visualizados pelo NOC v3.0.7. O arranjo espacial dos carbonos alfa e a qualidade estéreoquímica global da estrutura da proteína foram calculados pela análise dos ângulos de torção phi (Φ) e psi (ψ) pelo programa Procheck (Laskowski *et al.*, 1993) e confirmado pelo gráfico estatístico de Ramachandran (**ANEXO 4**). Foram estabelecidos 4 modelos estruturais para testar as nossas hipóteses: BmPPase wt (reduzido e oxidado) e BmPPase Mut1 C339A (reduzido e oxidado). Os estados reduzidos e oxidados são baseados nos resíduos de cisteína alvos do nosso estudo. As análises de bioinformática referentes às interações na interface proteína-proteína, detalhamento dos contatos e as estatísticas foram realizadas no database PDBsum (Laskowski *et al.*, 1997).

4. Resultados

4.1. Clonagem, subclonagem, obtenção dos mutantes e sequenciamento

Como descrito no **ANEXO 1**, o RNA total de embriões com 6 dias de desenvolvimento foi extraído e o cDNA foi obtido por transcrição reversa. A sequência codificante completa para pirofosfatase inorgânica solúvel foi amplificada usando primers específicos (**ANEXO 3**), inserida no vetor de clonagem pGEM-T Easy. A cepa *E. coli* DH5 α (quimicamente competente) foi utilizada para a propagação da construção pGEM-BmPPase wt. As colônias bacterianas de cor branca foram repicadas para uma nova placa e estas foram testadas por PCR a fim de confirmar a presença da construção plasmidial de interesse. Para a construção pGEM-BmPPase wt foram testados 20 clones e 19 eram positivos (**Fig. 7**). Foram selecionados 4 clones com a maior intensidade de banda para a extração plasmidial e sequenciamento. Com a confirmação da integridade da sequência da BmPPase, utilizamos o primer reverso (**ANEXO 3**) contendo a substituição do códon de cisteína para alanina na posição 339 referente a sequência de aminoácidos. Os mesmos procedimentos citados anteriormente foram seguidos para obtenção da construção pGEM-BmPPase C339A. A confirmação dos transformantes para esta construção é mostrada na **Figura 8**. A subclonagem da BmPPase wt e Mut1 C339A para o vetor de expressão foi confirmada por PCR como mostrada nas **Figuras 9 e 10**, respectivamente. Em seguida foi realizado o sequenciamento para confirmar a integridade dos insertos. A substituição do códon de cisteína para alanina foi confirmada por sequenciamento. A construção pCold-BmPPase wt serviu de molde para a obtenção do mutante pCold-BmPPase Mut2 C295A (**Fig. 11**), o pCold-Mut1 C339A serviu de molde para o duplo mutante pCold-Mut3 C138A C339A (**Fig. 12**) e o pCold-Mut2 C295A serviu de molde para o duplo mutante pCold-Mut4 C167A C295A (**Fig. 13**). A integridade de todas as construções foi confirmada por sequenciamento sendo ilustrado como alinhamento múltiplo na **Figura 14**.

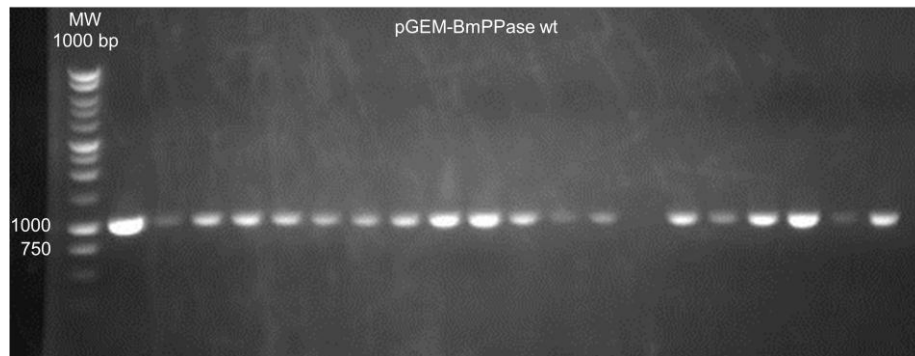


Figura 7. PCR de checagem do inserto. Os clones obtidos após transformação das células competentes *E. coli* DH5 α com a construção plasmidial pGEM-BmPPase wt.

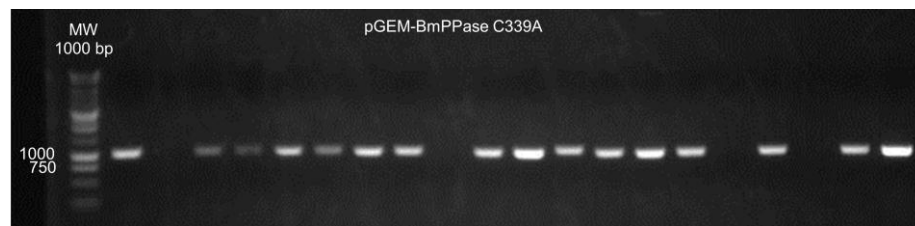


Figura 8. PCR de checagem do inserto. Os clones obtidos após transformação das células competentes *E. coli* DH5 α com a construção plasmidial pGEM-BmPPase C339A.



Figura 9. PCR de checagem do inserto. Os clones obtidos após transformação das células competentes *E. coli* DH5 α com a construção plasmidial pCold-BmPPase wt.

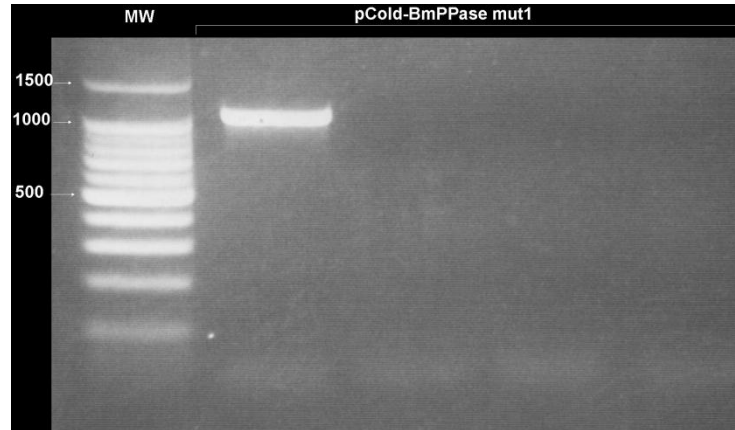


Figura 10. PCR de checagem de inserto. Os clones obtidos após transformação das células competentes *E. coli* DH5 α com a construção plasmidial pCold-BmPPase Mut1 C339A.



Figura 11. PCR de checagem de inserto. Os clones obtidos após transformação das células competentes *E. coli* DH5 α com a construção plasmidial pCold-BmPPase Mut2 C295A.

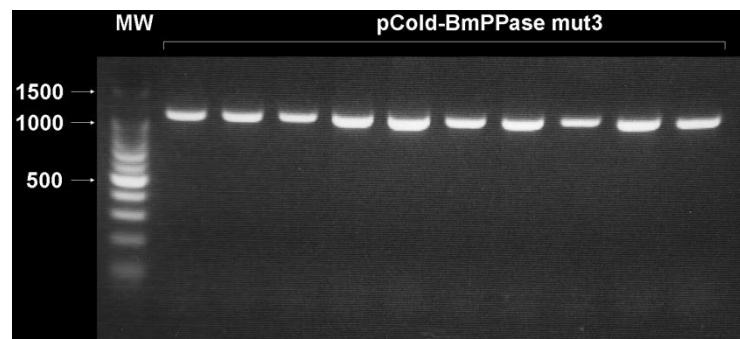


Figura 12. PCR de checagem de inserto. Os clones obtidos após transformação das células competentes *E. coli* DH5 α com a construção plasmidial pCold-BmPPase Mut3 C138A C339A.

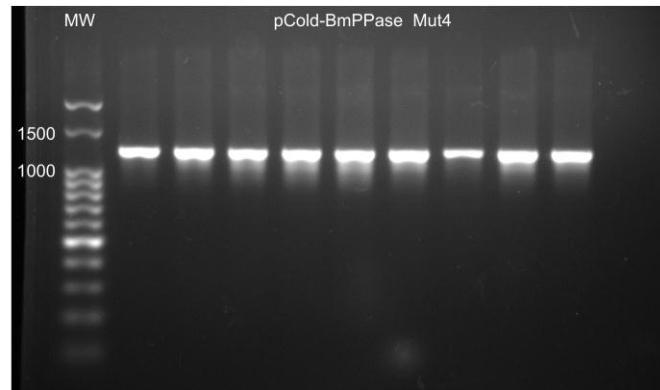


Figura 13. PCR de checagem do inserto. Os clones obtidos após transformação das células competentes *E. coli* DH5 α com a construção plasmidial pCold-BmPPase Mut4 C167A C295A.

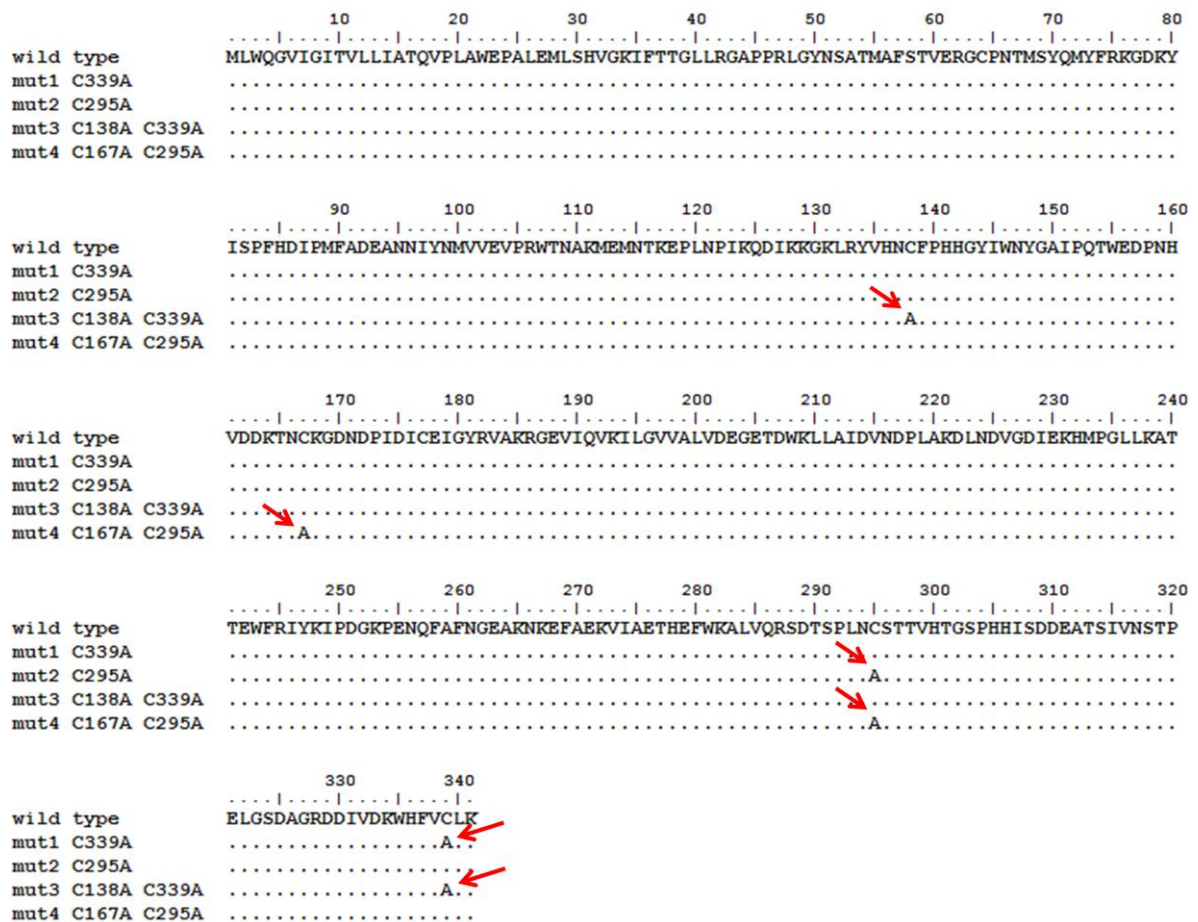


Figura 14. Alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos. As setas em vermelho destacam os resíduos de cisteína que foram substituídos por alanina. Todas as construções foram confirmadas por sequenciamento.

4.2 Teste de expressão dos recombinantes BmPPase wt e Mut1

Após a transformação por choque térmico e confirmação por PCR de duas cepas de *E. coli* (AD494 e Origami) responsáveis pela produção das proteínas recombinantes foram testadas as condições para a indução de expressão. A incubação ocorreu por 24 h a 15 °C com 1 mM IPTG sob agitação orbital a 150 RPM como recomendado pelo fabricante do vetor de expressão. Após esse período, as células foram sedimentadas (2700 x g por 10 min) e lisadas usando uma solução comercial chamada BugBuster® (Novagen) seguindo as recomendações do fabricante. Aproximadamente 500 µg de proteína foram aplicadas e analisadas em SDS-PAGE 12% marcadas com azul de Coomassie G-250. A seta vermelha indica a rBmPPase com cauda de histidina e a proteína de fusão TF, totalizando ± 100 kDa. Foram analisadas as frações solúvel e insolúvel. A maior parte da proteína recombinante se encontra na fração solúvel (**Fig. 15**) o que nos permitiu prosseguir com os experimentos.

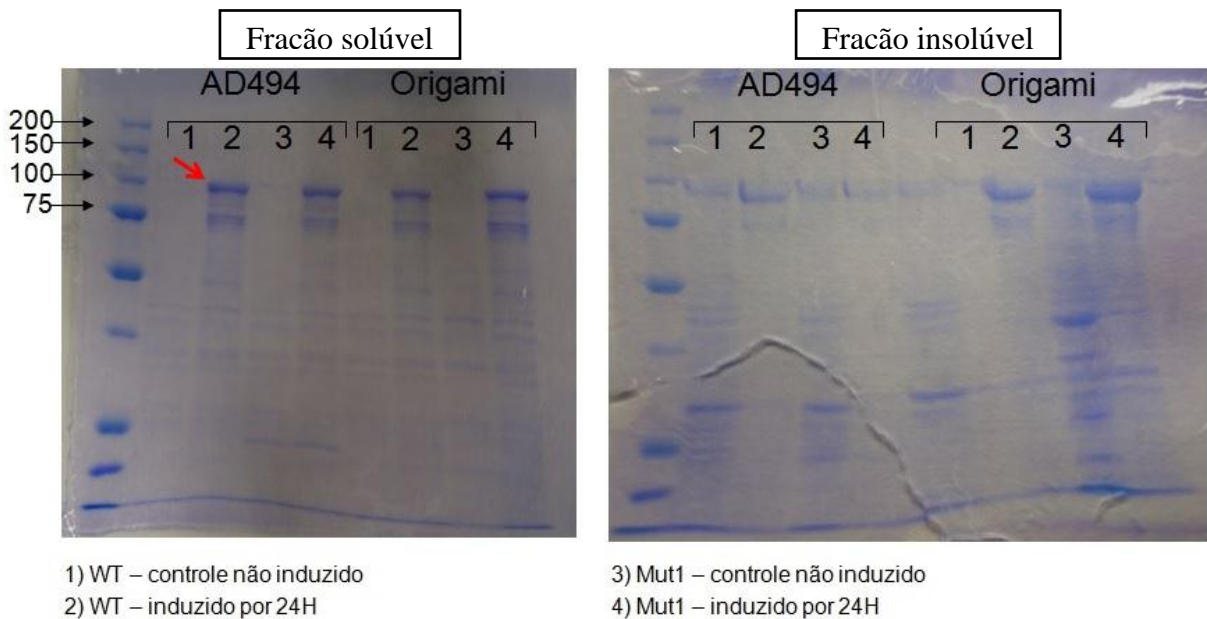


Figura 15. Ensaio de expressão da proteína recombinante. A rBmPPase wt e Mut1 (C339A) em 2 cepas de *E. coli* BL21 (DE3). As cepas AD494 e Origami foram transformadas com as construções plasmidiais pCold-BmPPase wt e pCold-BmPPase Mut1 (C339A).

4.3 Clonagem, sequenciamento e análises das sequências de aminoácidos das PPases dos carrapatos *Ixodes persulcatus* (Ip) e *Rhipicephalus appendiculatus* (Ra)

Foram desenhados diversos primers e alguns com degenerações a fim de obter o maior fragmento possível referente à PPase dos carrapatos *I. persulcatus* e *R. appendiculatus*. Após várias tentativas de ajuste das condições da reação de PCR e do próprio gel de agarose foram observadas várias amplificações. As setas grandes azuis (**Fig. 16**) indicam que estes fragmentos são os mais representativos e possuem aproximadamente 91% de todo o cDNA para a PPase do *R. microplus* e *I. scapularis*, carrapatos que possuem o genoma parcial e completamente sequenciados, respectivamente.

Como mostrado no alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos (**Fig. 17**) das PPases dos carrapatos *R. microplus*, *R. appendiculatus*, *I. scapularis* e *I. persulcatus* os resíduos de cisteína focados neste trabalho possuem um alto grau de conservação entre as espécies estudadas. Infelizmente, não foi possível inferir sobre a última cisteína (339) pelo fato de não termos conseguido clonar esta região próxima ao códon de parada. Com relação ao N-terminal de *R. appendiculatus* e *I. persulcatus* ficaram faltando aproximadamente 27 aminoácidos e para o C-terminal 4 aminoácidos para ambas as espécies. Já na **Tabela 1** a menor relação de grau de identidade compartilhado entre essas PPases é de 73% o que reforça o observado no alinhamento.

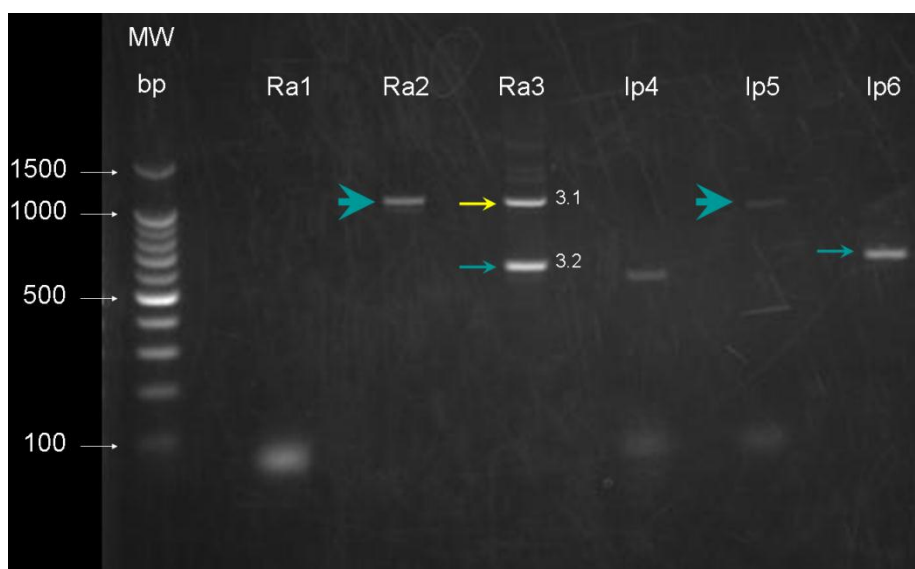


Figura 16. Amplificação das PPases de *R. appendiculatus* e *I. persulcatus*. Todos os fragmentos sinalizados com setas foram clonados e sequenciados. O fragmento indicado pela seta amarela foi descartado após análise da seqüência.

<i>Bmicroplus</i>	-MLWQGVIGITVLLIATQVPLAWEPALEMLSHVVKIFTTGLLRG--APPRLGYN SATMAF	57
<i>Rappendicu</i>	-----F---TS-----	30
<i>Iscapulari</i>	LCYRG.HLKPADCRFFR.LATL.D-SAP.....SF...TP.STV..PVCR....	59
<i>Ipersulcat</i>	-----SF...TP.TTV..PVCR....	32
<i>Bmicroplus</i>	STVERGCPNTMSYQMYFRKGDKYISPFHDIPMFADEANNIYNMVVEVPRWTNAKMEMNTK	117
<i>Rappendicu</i>H.....I...	90
<i>Iscapulari</i>S..SLD.RV...Q.G.....P.KRV.....IA..	119
<i>Ipersulcat</i>S..SLD.RV...Q.G.....PTKRV.....IA..	92
<i>Bmicroplus</i>	EPLNPIKQDIKKGKLRVHNC ^{C138} FPHHGYIWNYGAI ^{C167} PQTWEDPNHVDDKTNCKRGDNDPIDIC	177
<i>Rappendicu</i>	L.....V.....Y..N.....	150
<i>Iscapulari</i>T..N.....S.....G.I.NN.....	179
<i>Ipersulcat</i>T..N.....S.....G.I.NN.....	152
<i>Bmicroplus</i>	EIGYRVAKRGEVIQVKILGVVALVDEGETDWKLLAIDVNDPLAKDLNDVGDIEKHMPELL	237
<i>Rappendicu</i>I.....	210
<i>Iscapulari</i>	...F.....L..V..M.....IR...NE.....	239
<i>Ipersulcat</i>	...F.....L..V..M.....IR...NE.....	212
<i>Bmicroplus</i>	KATTEWFRIYKIPDGKPENQFAFNGEAKNKEFAEKVIAETHEFWKALVQRSDTSPLNC ^{C295} ST	297
<i>Rappendicu</i>I.....DH.....H.....	270
<i>Iscapulari</i>R.....I.....TY.E..M..A.....	299
<i>Ipersulcat</i>R.....I.....TY.E..M..A.....	272
<i>Bmicroplus</i>	TVHTGSPHHISDDEATSIVNSTPELGS DAGRDDIVDKWHFV ^{C339} LK	341
<i>Rappendicu</i>T.....H.P.....	310
<i>Iscapulari</i>	VTLE.NA.Q.....N...A...F.P...EA.....	343
<i>Ipersulcat</i>	VTLE.NA.Q.....N...T...F.P...EA.....	312

Figura 17. Alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos. Foram destacados os resíduos de cisteína número 138 e 339 (cor vermelha) e com cor amarela as cisteínas 167 e 295. Segundo o modelo criado por homologia, os resíduos em amarelo estão mais expostos ao solvente do que os vermelhos. Interessante notar o alto grau de conservação dos resíduos de cisteínas destacados no alinhamento.

Tabela 1. Relação (%) entre a identidade sequencial das pirofosfatases inorgânicas citossólicas dos carrapatos.

Espécies	<i>B. microplus</i>	<i>R. appendiculatus</i>	<i>I. scapularis</i>	<i>I. persulcatus</i>
<i>B. microplus</i>	100	85,9	75,2	73,1
<i>R. appendiculatus</i>	85,9	100	73,1	80,4
<i>I. scapularis</i>	75,2	73,1	100	90,0
<i>I. persulcatus</i>	73,1	80,4	90,0	100

4.4 Parâmetros cinéticos da rBmPPase wt e do C339A e perfil de sensibilidade a inibidores clássicos como fluoreto e cálcio

A fim de determinar os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} tanto da rBmPPase wt e Mut C339A e, desta forma, poder avaliar possíveis alterações nos padrões de cada recombinante foram realizadas curvas de concentração de pirofosfato (PPi) de 0 a 400 μM (**Fig. 18**). Foi observado que Mut C339A apresentou valores de K_m e V_{max} na ordem de 2,1X e 2,4X, respectivamente, maiores que os do WT. Embora o Mut C339A tenha uma afinidade de 2,1X menor ao substrato ele o hidrolisa 2,4X mais rápido. O fato é um tanto quanto surpreendente, pois a C339 não está localizada no sítio-ativo da enzima e sim na interface do dímero.

A segunda curva de concentração que varia entre 200 a 2200 μM (**Fig. 19**) atinge o platô a 400 μM . Observa-se também que a partir de 600 μM o excesso de substrato inibe a atividade enzimática, o qual atinge o menor valor a 1600 μM .

A sensibilidade aos inibidores clássicos (**Fig. 20A-B**) foi verificada a concentrações micromolares (μM) para o NaF e nanomolares (nM) para CaCl_2 . Com relação à rBmPPase wt foi observado que ela é muito mais sensível ao fluoreto do que o Mut C339A (**Fig. 20A**). As concentrações utilizadas de fluoreto foram 50, 100, 500 e 1000 μM . Os percentuais de inibição para o WT foram 76, 88, 100 e 100%, respectivamente. Para o Mut C339A os percentuais de inibição foram 32, 52, 82 e 88%, respectivamente. Com relação ao cálcio (**Fig. 20B**), foram utilizadas as concentrações: 10, 50, 100 e 500 nM, sendo observado as seguintes taxas de inibição para a rBmPPase wt: 32, 28, 48 e 50%, respectivamente. Surpreendentemente, o Mut C339A não foi sensível ao cálcio.

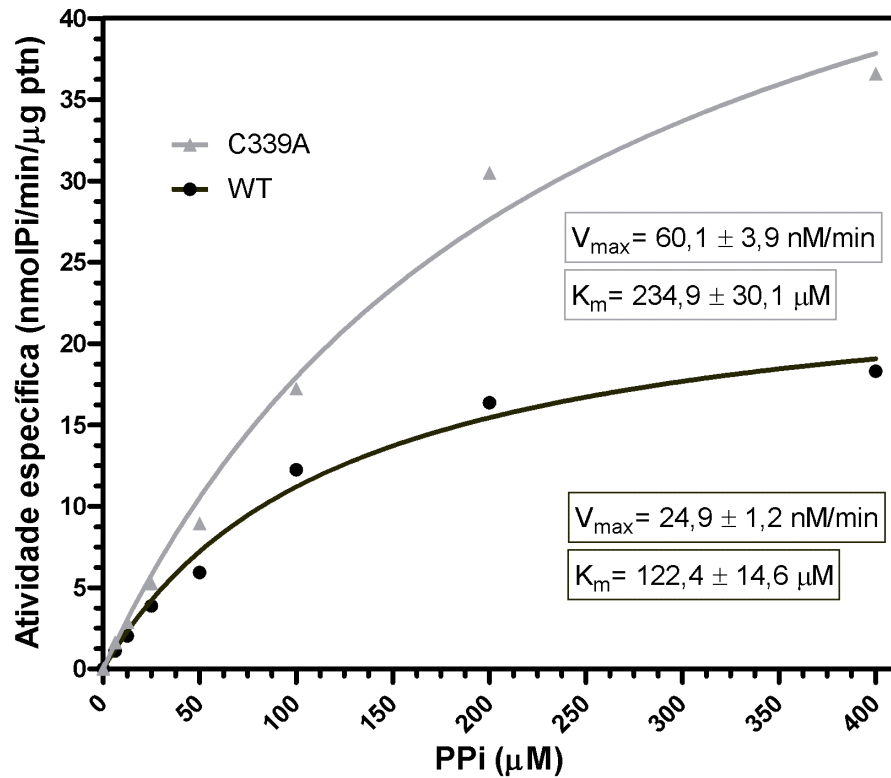


Figura 18. Parâmetros cinéticos da rBmPPase wt e do C339A. Os valores de K_m e V_{max} foram obtidos a partir de uma curva de concentração do PPI (5-400 μM). Os valores de K_m e V_{max} foram obtidos a partir da análise por regressão não linear aplicada as equações de Michaelis-Menten. É mostrada a melhor curva de tendência a partir de 2 experimentos independentes realizados em quadruplicata.

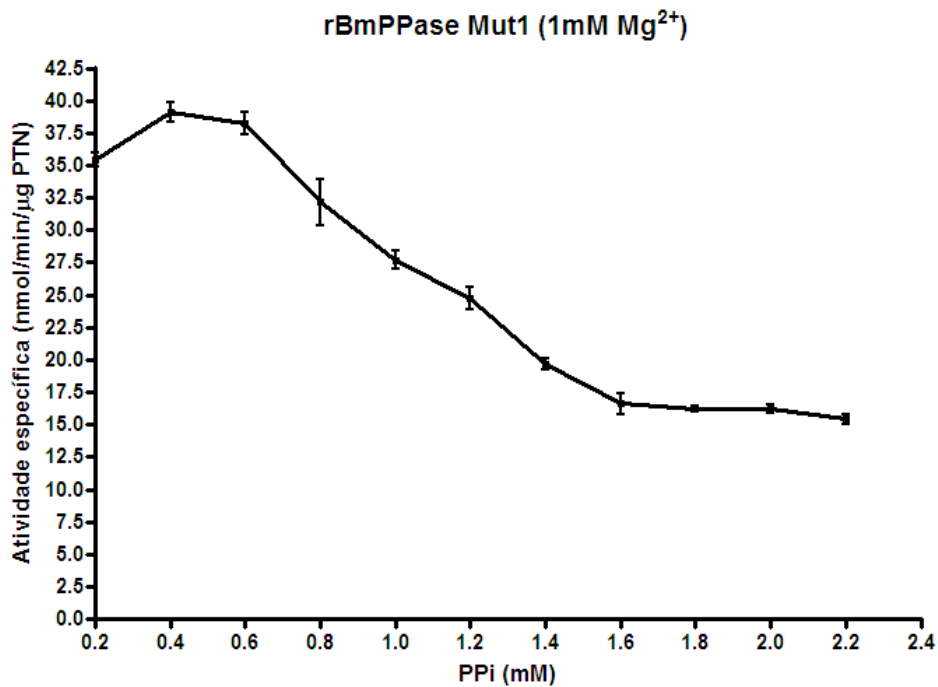


Figura 19. Perfil de atividade da rBmPPase C339A em função do aumento de concentração do pirofosfato. Os resultados são expressos como média \pm o erro padrão de 2 experimentos independentes realizados em quadruplicata.

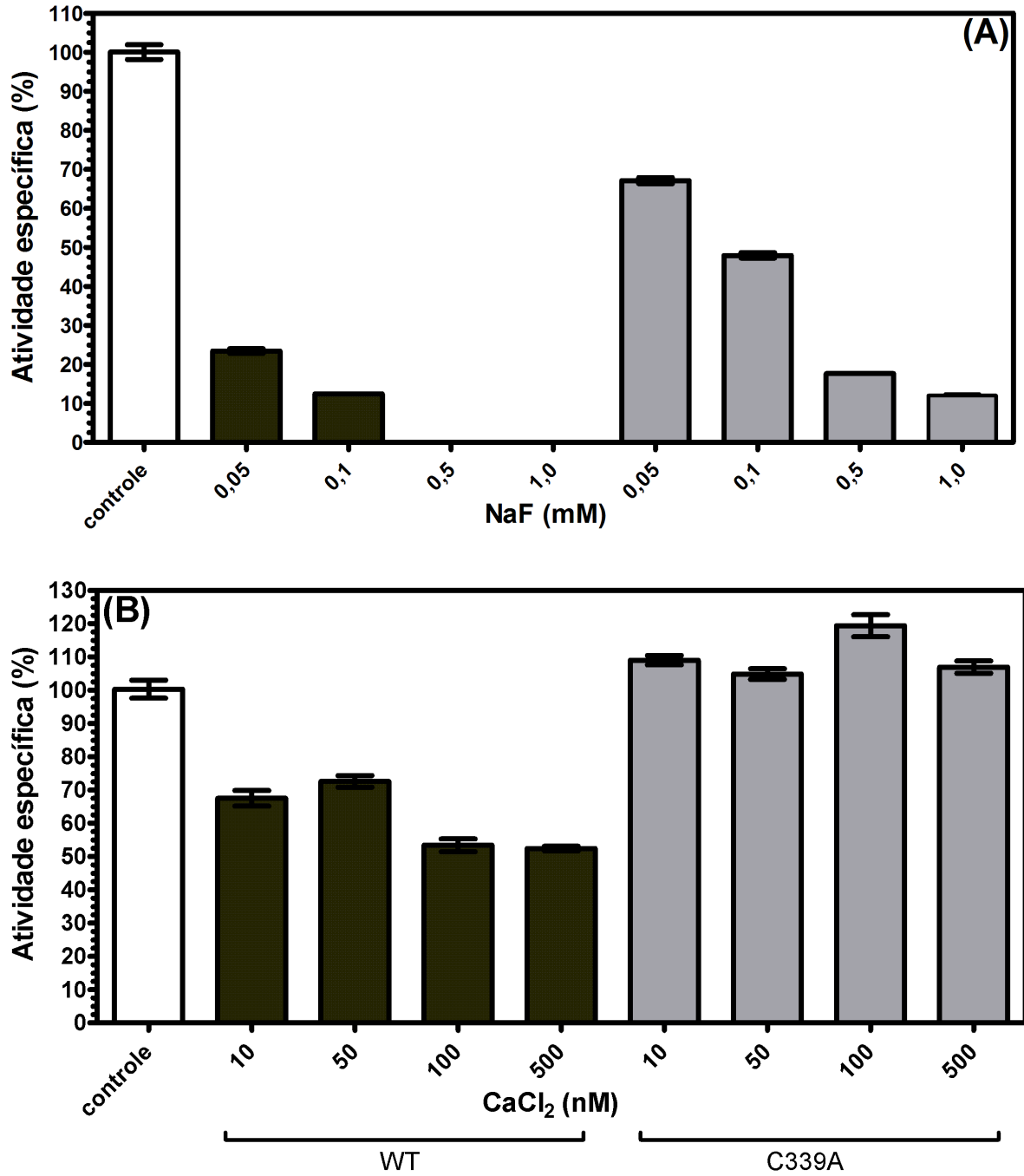


Figura 20. Efeito de inibidores clássicos sob a atividade da rBmPPase wt e C339A. Fluoreto (A) e cálcio (B) foram utilizados para definir o perfil de inibição na rBmPPase wt (barra preta) e Mut C339A (barra cinza). Os resultados são expressos como média \pm o erro padrão de 2 experimentos independentes realizados em quadruplicata.

4.5 Modulação da atividade pirofosfatásica via oxidação e redução dos resíduos de cisteína

A fim testar a hipótese de a rBmPPase ser sensível a agentes moduladores do estado redox de resíduos de cisteína, a WT e o Mut C339A foram tratados com cobre-fenantrolina (CuPh), um indutor de formação de pontes dissulfeto (Mimura *et al.*, 2005), a uma concentração de 0,2 mM por 10 min. Em seguida, os recombinantes foram tratados com 10 mM de DTT por 10 min. Foi observado que tanto o WT quanto o Mut C339A foram sensíveis ao agente oxidante CuPh e que o percentual de inibição atingiu aproximadamente 90% (**Fig. 21**). Em seguida, ao tratar os recombinantes no estado oxidado com DTT observamos que somente o WT recuperou a sua atividade, em torno de 70%, contudo o mesmo não foi observado para o Mut C339A (**Fig. 21**).

Além disso, foi verificado a cinética de inibição da atividade da rBmPPase wt por H₂O₂ (0,3 mM final) em função do tempo (**Fig. 22**). Com 5 min de incubação, observamos que a atividade da enzima foi inibida em 10%, com 10 e 15 min uma inibição de 15% e, finalmente, com 20 min uma inibição de 30%.

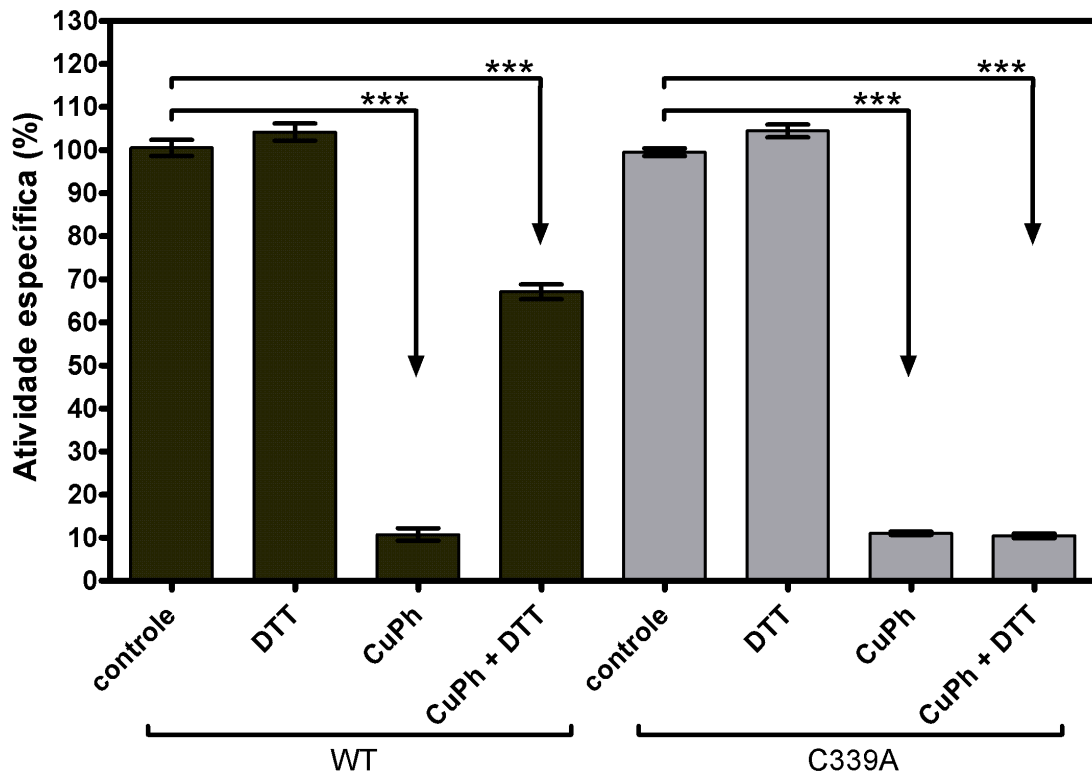


Figura 21. Efeitos do CuPh e do DTT sob a atividade da rBmPPase wt e C339A. Os efeitos de oxidação e redução sob a atividade pirofosfatásica foram determinados como se segue: controle (sem tratamento); incubação com 10 mM DTT (10 min); 0,2 mM CuPh (10 min); e 0,2 mM CuPh seguido por 10 mM DTT (10 min). Barra preta (WT) e barra cinza (Mut C339A). Os resultados são expressos como média \pm o erro padrão de 2 experimentos independentes em quadruplicata.

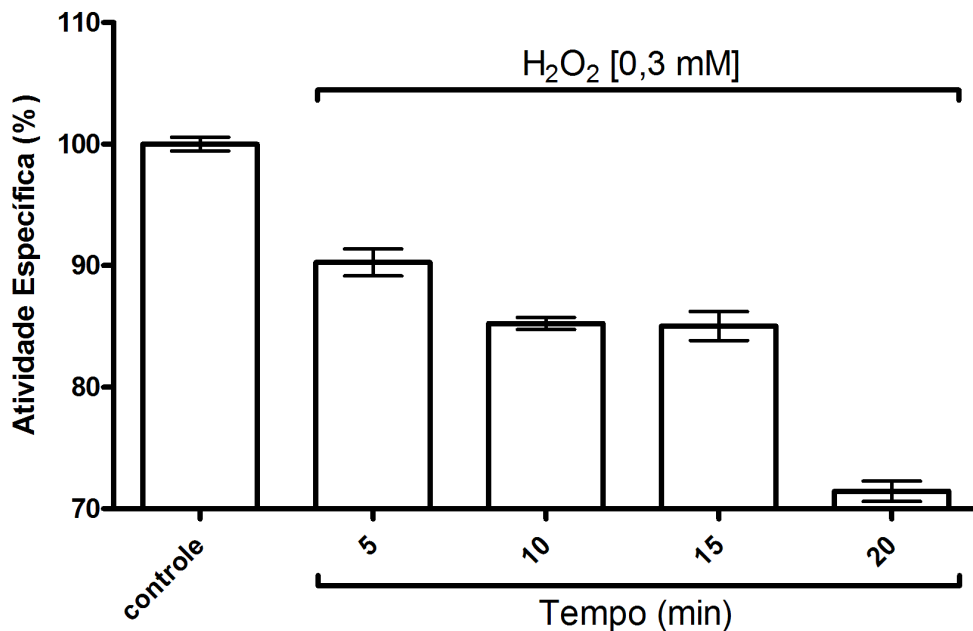


Figura 22. Efeito do peróxido de hidrogênio sobre a atividade da rBmPPase wt. Incubação realizada a 30°C. Os resultados são expressos como média \pm o erro padrão de 2 experimentos independentes realizados em quadruplicata.

4.6 Parâmetros cinéticos da rBmPPase wt em função da modulação dos agentes oxidantes e redutores

Confirmada a hipótese da modulação da atividade da pirofosfatase por oxidação e redução de seus resíduos de cisteína agora precisávamos verificar se moléculas fisiológicas com de caráter redutor como a glutathiona reduzida (GSH) e o ácido ascórbico (AsA) e com caráter oxidante como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), todos a concentrações fisiológicas, poderiam alterar os parâmetros cinéticos das PPases recombinantes. Então, foi realizada uma curva de concentração de pirofosfato que variou de 0 a 400 μ M. Foram realizados os seguintes tratamentos: incubação com 1 mM de GSH, 100 μ M de AsA e 15 μ M de H_2O_2 por 10 min. Foi observado que o tratamento com GSH (**Fig. 23A**) reduziu tanto o V_{max} quanto o K_m em 8,4 e 15%, respectivamente. Os efeitos do ácido ascórbico (**Fig. 23B**) foram ainda mais pronunciados com uma diminuição do V_{max} em 22,9% e do K_m em 30,2%. O peróxido de hidrogênio (**Fig. 23C**) também diminuiu o V_{max} em 53,4% contudo aumentou o K_m em 49,4%.

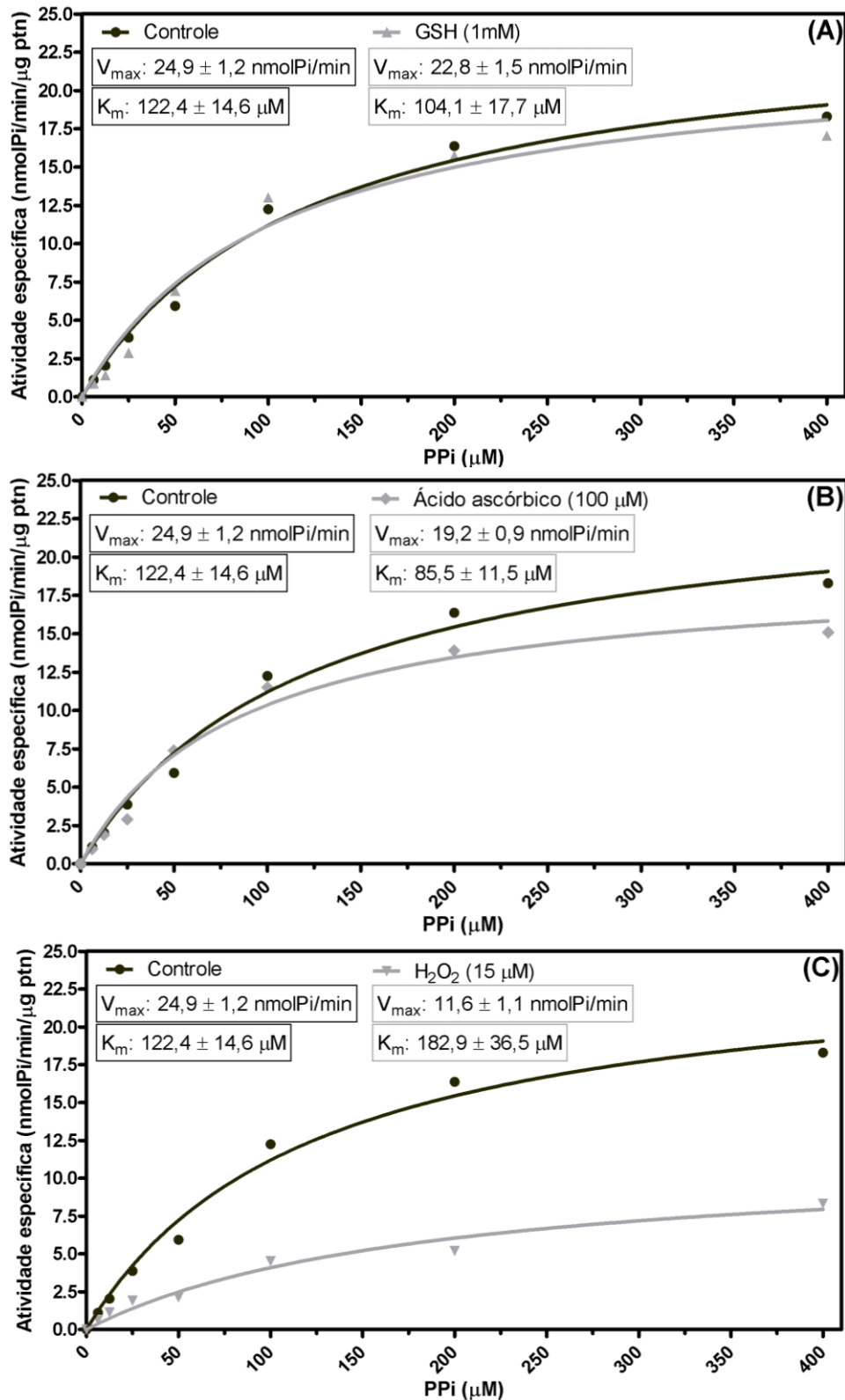


Figura 23. Modulação da atividade da rBmPPase wt por agentes redox. A enzima foi incubada com (A) 1 mM GSH, (B) 100 μM ácido ascórbico e (C) 15 μM H₂O₂ por 10 min. Após a incubação o PPI foi adicionado ao meio de reação e a atividade foi calculada como descrito no material e métodos. Os valores de K_m e V_{max} foram obtidos a partir de uma curva de concentração do PPI (5-400 μM). Os valores de K_m e V_{max} foram obtidos a partir da análise por regressão não linear aplicada as equações de Michaelis-Menten. É mostrada a melhor curva de tendência a partir de 2 experimentos independentes realizados em quadruplicata.

4.7 S-Glutationilação da rBmPPase wt

De modo geral, enzimas que são moduladas por oxidação e redução de seus resíduos de cisteína, também possuem grandes chances que terem a sua atividade regulada por uma modificação pós-traducional que liga uma molécula de GSH a um resíduo de cisteína. A este fenômeno é dado o nome de S-glutationilação. A fim de testar essa hipótese, foi realizado um *dot-blotting*. Neste ensaio o anticorpo primário reconhece *motifs* contendo uma molécula de glutatona ligada covalentemente a outro resíduo de cisteína. Observamos que a modificação pós-traducional foi confirmada em ambos os tratamentos (**Fig. 24**), sendo mais claramente evidenciado nos poços 4C e D (H_2O_2) e 6A e B (CuPh).

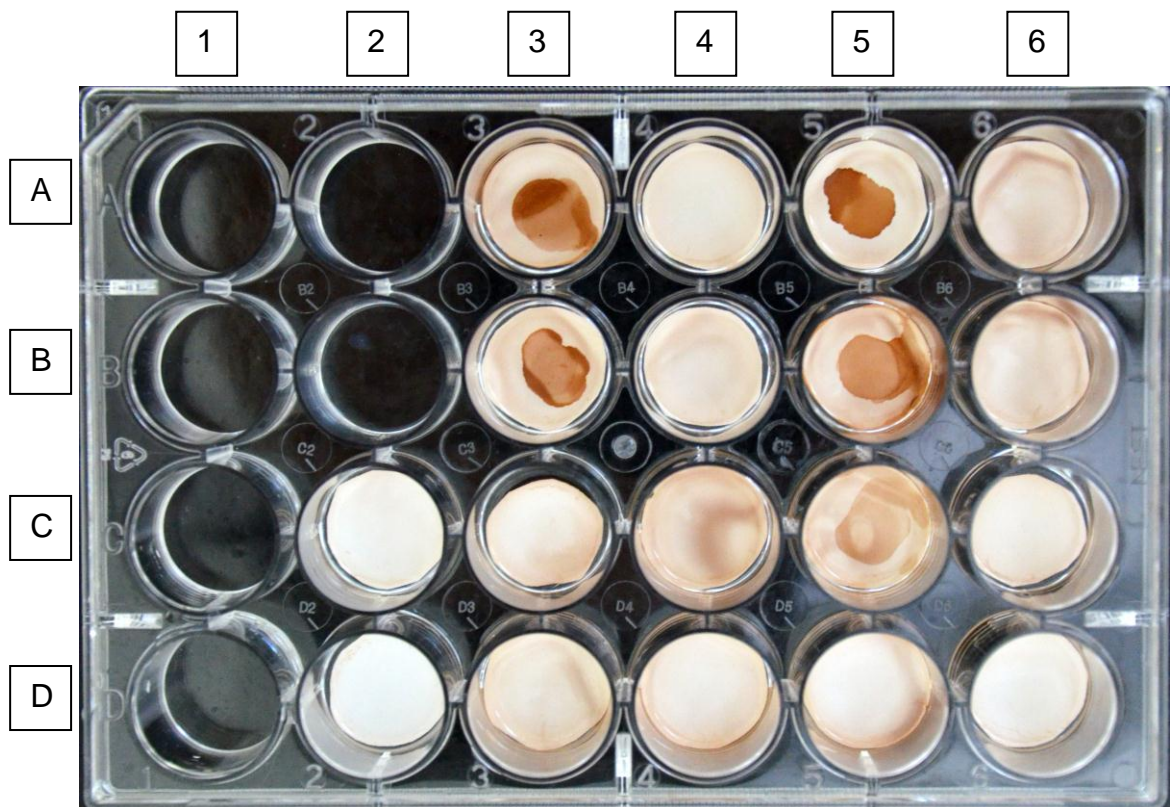


Figura 24. S-glutationilação da rBmPPase wt. Ensaio químico de glutathionilação via H_2O_2 e CuPh confirmado por dot-blotting. A coluna “2” os poços “C” e “D” representam os controles negativos do experimento. A coluna “3” e coluna “5” representam os controles positivos no qual foi utilizado BSA como proteína de referência e os agentes oxidantes H_2O_2 e CuPh, respectivamente. A coluna “4” e coluna “6” representam o desafio da S-glutationilação na rBmPPase wt frente aos agentes oxidantes H_2O_2 e CuPh, respectivamente. Da linha “A” até “D” foi realizada a diluição do anticorpo primário 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1000, respectivamente.

4.8 Análise do modelo estrutural e da região de interface entre as subunidades

Com a necessidade de análises mais detalhadas do papel desempenhado do resíduo de cisteína C339 foi desenvolvido um modelo estrutural baseado em modelagem por homologia. Conforme descrito anteriormente, este resíduo está localizado na zona de interface entre as subunidades (**Fig. 25A**). Além disso, esta região apresenta um alto grau de hidrofobicidade (**Fig. 25B**). Observamos também que os sítios ativos são ricos em aminoácidos polares carregados negativamente e alguns positivamente.

Também foram estimados os percentuais de acessibilidade de todos os resíduos de cisteína do modelo estrutural. Observamos que os dois pares resíduos de cisteínas focados neste trabalho com relação a maior (C167 e C295) e menor (C138 e C339) exposição ao solvente apresentaram uma janela de acessibilidade que variou da seguinte maneira: C167 entre 42,8 a 49,9%; C295 entre 14,6 a 19,2%; C138 entre 3,1 a 12,7%; C339 entre 5,5 a 54,1% (**Tabela 2**).

As análises da região de interface entre as subunidades foram realizadas pelo programa PDBsum. Os resultados indicaram que as interações de van der Waals (contatos não ligados) aumentaram e as ligações de hidrogênio diminuíram entre as subunidades em função da mudança do estado redox da enzima (**Fig. 26**).

Podemos observar no detalhamento das interações que estão acontecendo nessa região de contato entre as subunidades do modelo BmPPase wt reduzido que a Cys339 da cadeia A manteve interações com outros aminoácidos da cadeia B (Asp217 e Leu219). No modelo BmPPase wt oxidado a Cys339 não aparece, pois ela está interagindo com a Cys138 por ligação dissulfeto. No modelo BmPPase Mut C339A reduzido a Ala339 está interagindo com o Asp217 e quando no estado oxidado a Ala339 interage com a Leu219 (**Fig. 27**). Destacando que todos esses contatos eram mantidos por interações de van der Waals.

Quando investigada a relação entre os aminoácidos que compõem a região de contato entre as subunidades com a formação de estruturas secundárias observamos que grande parte deles não faz parte de estruturas secundárias, exceto pelos aminoácidos nas posições 236 até 242, em ambos os modelos (**Fig. 28A-B**).

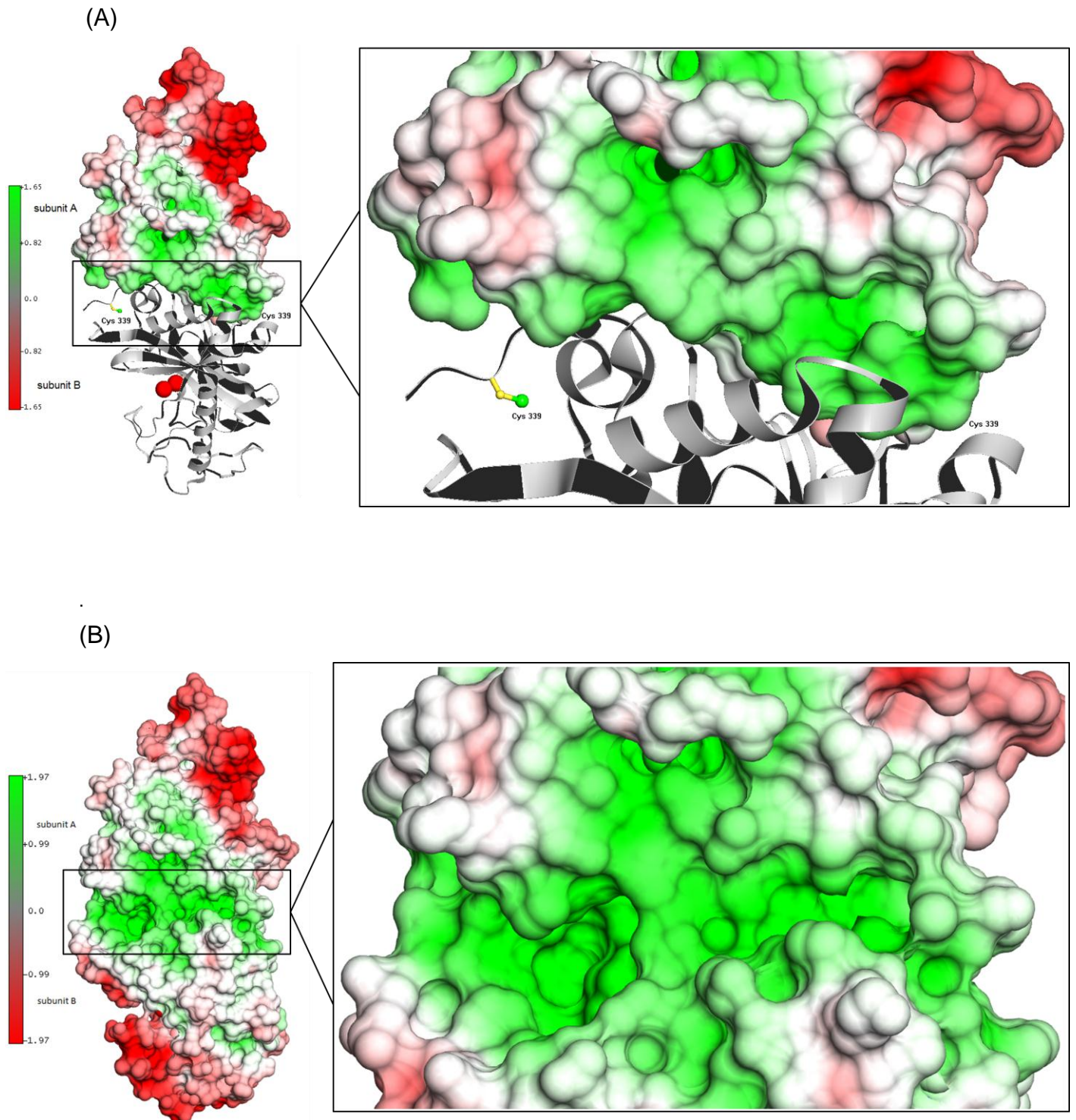


Figura 25. Modelagem por homologia e perfil de hidrofobicidade da BmPPase. (A) O resíduo C339 está localizado na zona de contato entre as subunidades. (B) Perfil de hidrofobicidade das subunidades A e B com destaque para a região de interface das subunidades. Os íons Mg^{2+} na região do sítio ativo estão sendo mostrados como esferas vermelhas. Os resíduos C339 da subunidade A e B estão destacados no modelo.

Tabela 2. Superfície de acessibilidade dos resíduos de cisteína (%) da BmPPase wt (reduzida)

Cys	monômero		homodímero	
	subunidade A	subunidade B	subunidade A	subunidade B
64	12,1	18,9	11,8	18,5
138	4,5	3,4	3,1	12,7
167	45	49,9	48,5	42,8
177	1,3	0,1	0,5	0
295	19,2	14,6	15,3	15,8
339	54,1	33,9	5,5	24,9

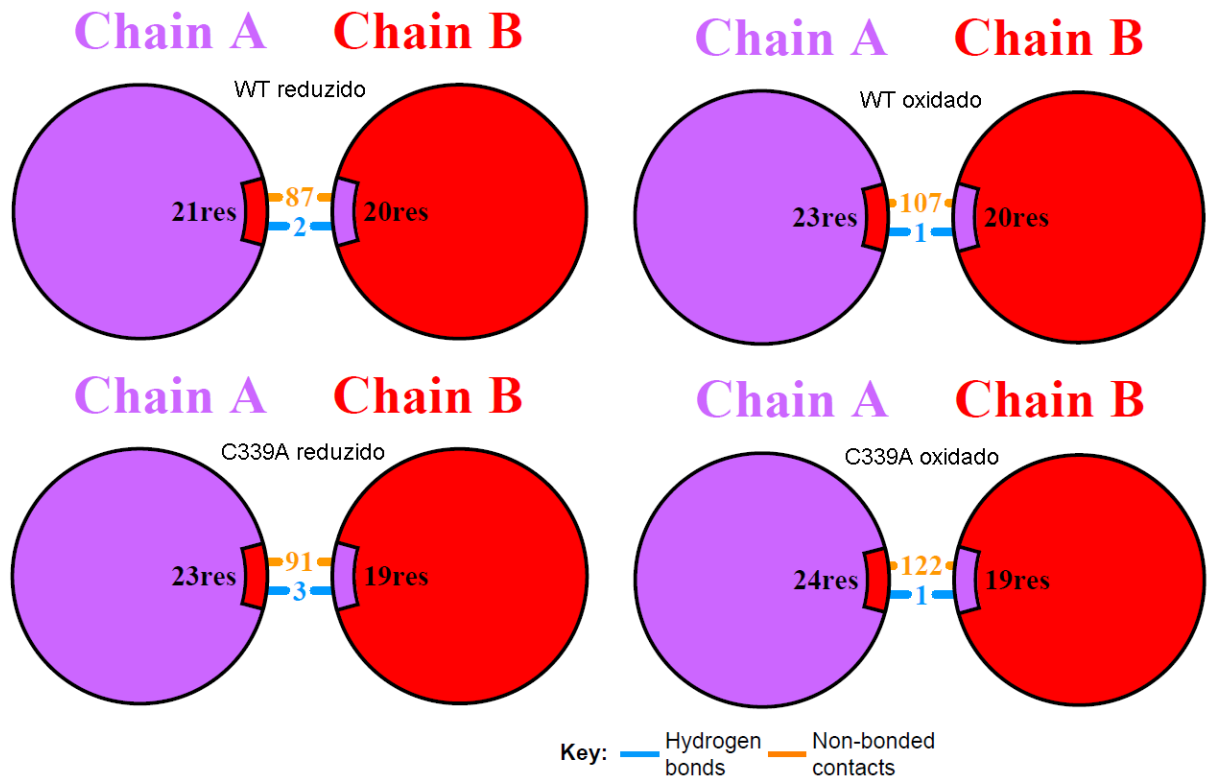


Figura 26. Diagrama esquemático de interações na região de interface entre as subunidades. As linhas coloridas representam diferentes tipos de interações, --- ligações de hidrogênio e --- contatos não ligados. A área de cada círculo é proporcional à área de superfície da subunidade da proteína correspondente.

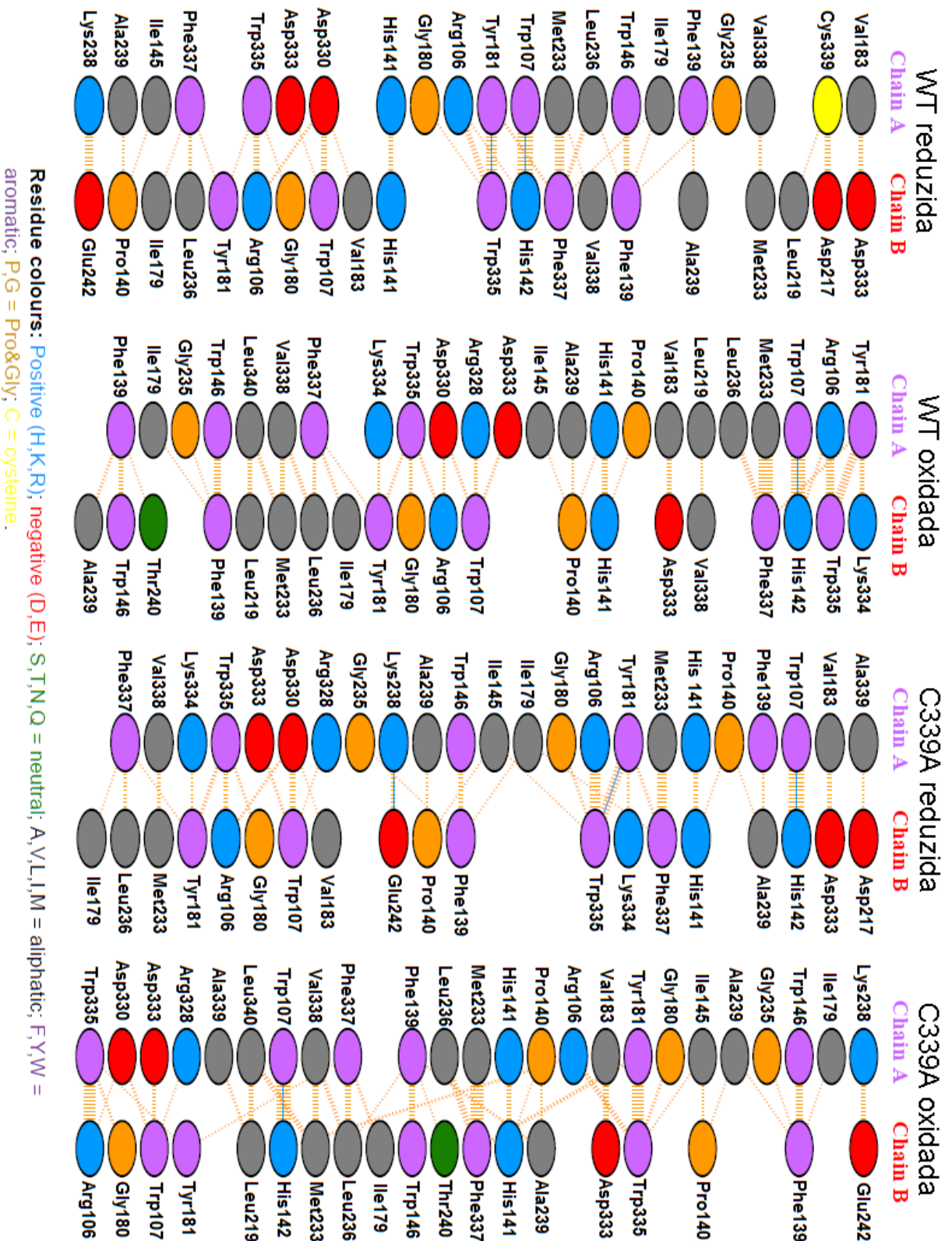


Figura 27. Diagrama esquemático detalhado das interações entre cada subunidade dos modelos 3D. O número de linhas que representam as ligações de hidrogênio (em azul) entre dois resíduos indicam o número de potenciais ligações de hidrogênio entre eles. Para os contatos não ligados, que podem ser abundantes, a largura da linha em forma de riscas é proporcional ao número de contactos atômico

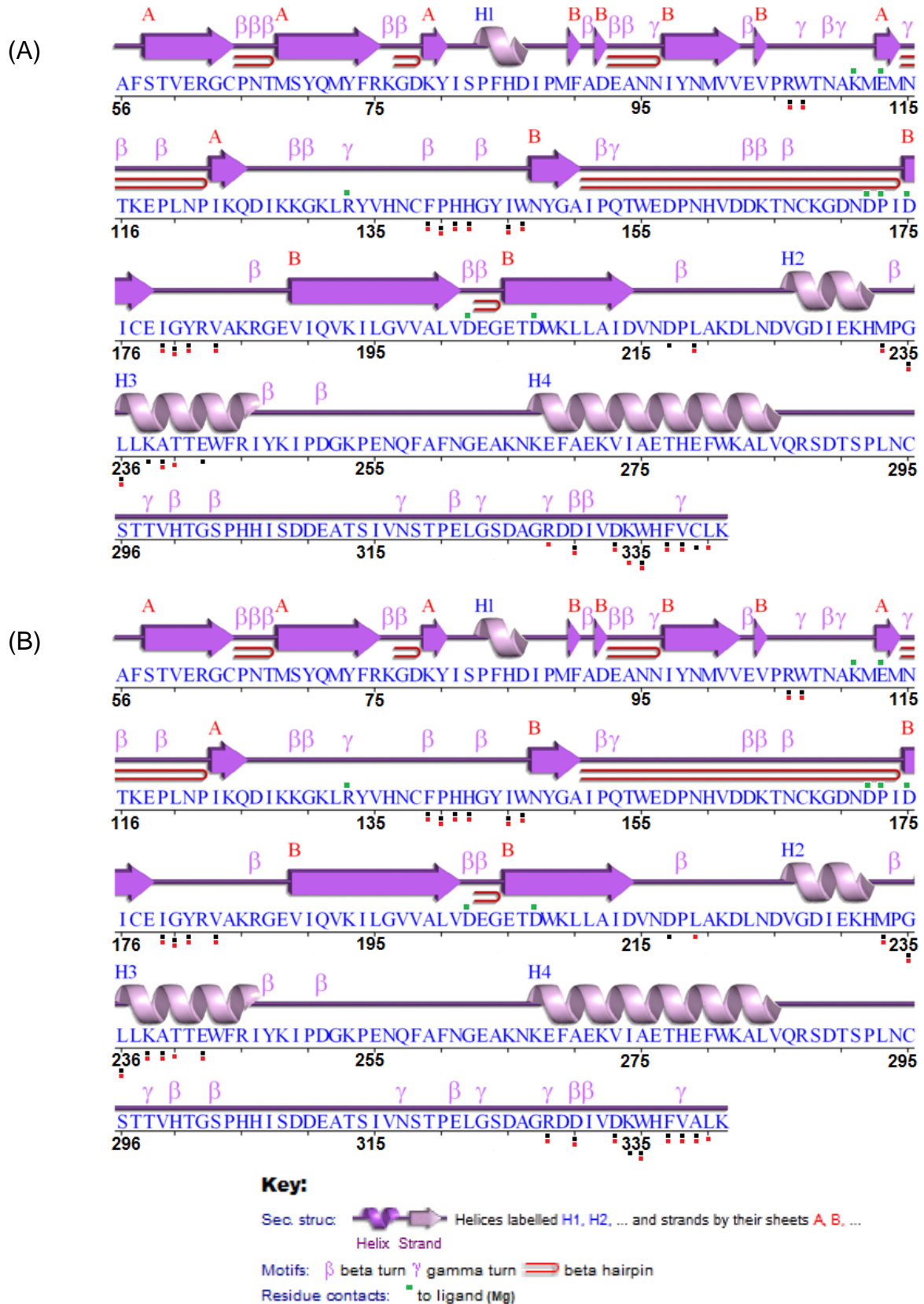


Figura 28. Diagrama esquemático relacionando a estrutura primária com as estruturas secundárias dos modelos 3D da BmPPase wt e Mut C339A. Em “A” é mostrado o detalhamento para a BmPPase wt e em “B” para o MutC339A. O símbolo “■” indica que o aminoácido em questão esta participando da rede de interações na região de interface do dímero quando a enzima possui o status de reduzida e o símbolo “■” quando o seu status é oxidado.

4.9 Relação entre os estados redox, com a substituição de aminoácidos e parâmetros físicos

Ao analisarmos os modelos estruturais do ponto de vista da mudança de estado redox, a substituição de aminoácidos e parâmetros físicos como área da interface (\AA^2) e quantidade de contatos não ligados (interações de van der Waals) foi observado um padrão entre eles. Como dito anteriormente, tanto na BmPPase wt quanto no Mut C339A há um aumento de 23 e 34%, respectivamente, nas quantidades de interações de van der Waals; uma diminuição de 50 e 67%, respectivamente, na quantidades de ligações de hidrogênio. Com relação à área de interface em \AA^2 entre as cadeias A e entre as cadeias B dos modelos WT reduzido contra o WT oxidado foi observado uma diferença de 0,5 e 2%, respectivamente. O mesmo quando calculado para o Mut C339A reduzido e oxidado foi observado uma diferença de 3 e 3%, respectivamente (**Tabela 3**).

Tabela 3. Estatística da interface do modelo 3D da BmPPase wt e Mut C339A levando em consideração o estado redox das cisteínas.

Proteína	Cadeia	Nº de resíduos na interface	Área da interface (\AA^2)	Nº de pontes salinas	Nº de ligações dissulfeto	Nº de ligações de hidrogênio	Nº de contatos não ligados
WT reduzida	A	21	1324	-	-	2	87
	B	20	1355				
WT oxidada	A	23	1318	-	-	1	107
	B	20	1330				
Mut C339A reduzida	A	23	1299	-	-	3	91
	B	19	1340				
Mut C339A oxidada	A	24	1262	-	-	1	122
	B	19	1301				

4.10 Parâmetros cinéticos preliminares da hidrólise de polifosfato pela pirofosfatase

Como já descrito por Campos e colaboradores em 2008, o carrapato *R. microplus* possui reservas de polifosfatos e estas são mobilizadas durante o seu desenvolvimento embrionário. A hipótese de trabalho era se a pirofosfatase inorgânica também poderia reconhecer e hidrolisar este substrato. Assim, curvas de concentrações com PolyP 3 (com 3 resíduos de fósforo) e com PolyP 15 (com 15 resíduos de fósforo) foram preparadas e, assim, obtidos os parâmetros cinéticos preliminares. Para a rBmPPase wt foi observado que os valores de K_m e V_{max} para PolyP 3 são 12,8% maior e 29,3% menor, respectivamente, quando comparado aos valores de K_m e V_{max} com PPI (**Fig. 29A**). Com relação a esses parâmetros usando PolyP 15 como substrato ainda não podemos tirar muitas conclusões pois a as concentrações utilizadas não foram suficientes para a obtenção de um platô na curva. Contudo, foi observado que a taxa de atividade com esse tipo de substrato foi entre 3-4X maior do que com PolyP 3 (**Fig. 29A**). Para a rBmPPase Mut C339A foi observado que tanto o seu K_m quanto o seu V_{max} para PolyP 3 são 2,3X e 9,7X menores (**Fig. 29B**) quando comparado aos seus valores com PPI. Já os valores para PolyP 15 mostram que o K_m é 1,7X maior e o V_{max} é 1,5X menor (**Fig. 29B**) quando comparado aos seus valores com PPI.

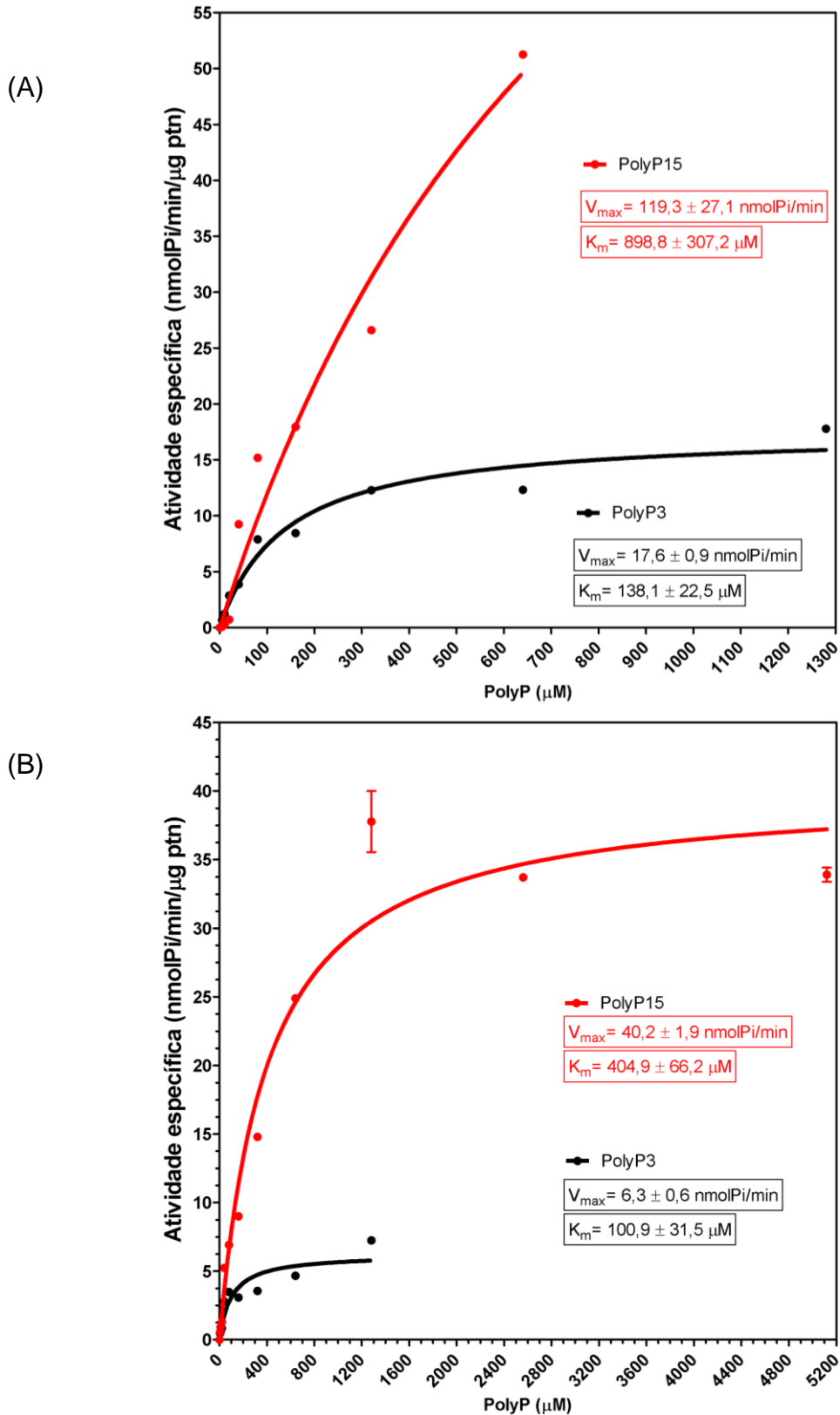


Figura 29. A rBmPPase reconhece e cliva polifosfato. (A) rBmPPase wt, as concentrações de PolyP3 variaram de 0 a 1280 μM e de PolyP15 de 0 a 640 μM. Em (B) rBmPPase Mut C339A, as concentrações de PolyP3 variaram de 0 a 1280 μM e de PolyP15 de 0 a 5120 μM. Os valores de K_m e V_{max} foram obtidos a partir da análise por regressão não linear aplicada as equações de Michaelis-Menten. É mostrada a melhor curva de tendência a partir de 2 experimentos independentes realizados em quadruplicata.

5. Discussão

O presente trabalho teve como inspiração o conceito postulado pelo Dr. Armando Gómez-Puyou que propõe o seguinte: “... se um aminoácido não conservado é fundamental para a função ou estabilidade de uma enzima a partir de uma espécie em particular, este deve ser capaz de inibir a enzima, apenas dessa espécie, utilizando um inibidor voltado para esse resíduo” (Gómez-Puyou *et al.*, 1995). Dentro deste contexto, o referido grupo estudou esta hipótese na enzima triose fosfato isomerase (TIM) de *Trypanosoma brucei*, que possui um resíduo de cisteína na posição 14 não conservado (Cys14). A TIM é uma das enzimas-chave da glicólise e gliconeogênese por catalisar a interconversão reversível da diidroxiacetona fosfato a D-gliceraldeído-3-fosfato (Moraes *et al.*, 2011). Inicialmente, a construção do mutante TIM Cys14Leu mostrou que este apresentava uma tendência a agregar, reduzida estabilidade e alterações nos parâmetros cinéticos. Posteriormente, o tratamento da recombinante tipo selvagem com o agente derivatizante de cisteínas metil metanotiosulfonato (MMTS) revelou que esta cisteína desempenha um papel importante com relação à estabilidade estrutural e à função da enzima, uma vez que ela foi totalmente inibida pelo MMTS. Finalmente, o mesmo tratamento foi realizado em 2 outras TIMs, uma de coelho e outra de levedura, já que estas não possuíam este resíduo conservado. A TIM de coelho foi 20% inibida, mas a de levedura não foi sensível. Atualmente, este conceito permitiu o desenvolvimento de estratégias de controle espécie específico de enzimas homólogas. Recentemente, Moraes e colaboradores (2011) mostraram que a TIM do carrapato bovino *R. microplus* possui 5 resíduos de cisteína não conservados e que a RmTIM também poderia ser regulada por esses resíduos. Após estas descobertas analisaram-se as mesmas características moleculares em outras enzimas de carrapatos.

A análise estrutural da BmPPase do carrapato (Costa *et al.*, 2012) revelou que esta enzima possui resíduos de cisteínas em posições estratégicas como, por exemplo, próximas ao sítio ativo (**ANEXO 1, Fig. 5**) e na interface do dímero (**Fig. 25A-B**). Sobre as cisteínas próximas ao sítio catalítico (167 e 295), estas estão posicionadas em alças que participam da abertura do sítio e, conseqüentemente, possuem um elevado grau de exposição (**Tabela 2**), quando comparados aos demais, exceto pela Cys339 que possui um máximo de acessibilidade de 54%. Além disso, observou-se que a BmPPase foi totalmente inibida pelo agente derivatizante

de cisteínas "5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid" (DTNB) o que significa que uma perturbação nestas cisteínas pode acarretar uma desestabilização estrutural com perda irreversível de função (Costa *et al.*, 2012). De fato, os resultados obtidos foram similares aos de Garza-Ramos e colaboradores (1996; 1998); Enriquez-Flores e colaboradores (2008); Moraes e colaboradores (2011) que investigaram esses aspectos em diversas TIMs de outros organismos.

Assim, sugerimos que esta enzima poderia ser regulada por mecanismos moleculares envolvendo equilíbrio redox diretamente relacionado a estes resíduos. A corroboração desta hipótese veio com o ensaio bioquímico de oxidação e redução da rBmPPase wt e mutante (**Fig. 21**). Observou-se que o agente oxidante CuPh, um forte indutor de formação de pontes dissulfeto (Mimura *et al.*, 2005), reduziu drasticamente (90%) a atividade de ambas as recombinantes. Posteriormente, o tratamento para redução das pontes dissulfeto foi efetivo para a rBmPPase wt (**Fig. 21**) recuperando-a em aproximadamente 60 pontos percentuais. Observamos também que o tratamento com H₂O₂ inibiu a atividade da enzima em até 30% (**Fig. 22**).

Os mecanismos moleculares e o processo como um todo da regulação da atividade de enzimas e proteínas via oxidação (Imlay, 2008) e redução de seus grupamentos tióis têm se tornado um assunto de grande repercussão dentro do mundo acadêmico. Um assunto muito recorrente trata da redefinição do papel das pontes dissulfeto nos últimos 30 anos (Fahey, 1977; Fahey *et al.*, 1977; Thornton, 1981; Wells e Powers, 1986; Perry e Wetzel, 1987) e a sua formação em um ambiente reduzido como o citosol, mediante ou não um estresse oxidativo (Berlett e Stadtman, 1997), emergindo assim como uma importante modificação pós-traducional para regular proteínas. Esse mecanismo regulatório foi demonstrado para fatores de transcrição: OxyR em bactérias (Kullik *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 2001), Yap1 em levedura (Kuge e Jones, 1994) e Nrf2 em mamíferos (Checker *et al.*, 2012); para chaperonas moleculares: Hsp33 em bactérias (Raman *et al.*, 2001) e Peroxiredoxina 2-Cys em humanos (Jang *et al.*, 2006); para bombas de prótons: V-ATPase de cérebro de bezerro (Feng e Forgac, 1994) e H⁺-PPase em bactéria (Mimura *et al.*, 2005); e para a fosfatase PTEN (Lee *et al.*, 2002; Leslie *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2004). O presente trabalho apresentou a primeira descrição de uma pirofosfatase inorgânica citosólica tendo a sua atividade regulada por oxidação e redução.

A atividade da rBmPPase wt é regulada negativamente por aquisição de pontes dissulfeto (**Fig. 21**), similar ao que ocorre com a V-ATPase mostrado por Feng e Forgac (1994) e a H⁺-PPase mostrado por Mimura e colaboradores 2005. A esse tipo de modificação pós-traducional que ocorre nesses 3 tipos de enzimas com o propósito de diminuir parcialmente ou totalmente a sua atividade é chamado de “pontes dissulfeto alostéricas” (Schmidt *et al.*, 2006) pois, diferentemente das pontes dissulfeto estruturais e das catalíticas, as alostéricas podem controlar a função da proteína-alvo por desencadear mudanças conformacionais em estruturas secundárias quando as ligações dissulfeto são formadas ou quebradas. Como demonstrado por Schroeder e colaboradores (2011) as β -defensinas do tipo 1 humanas são reguladas por formação de pontes dissulfeto alostéricas, uma vez que, para a ativação de seu potencial antimicrobiano é necessário que ocorra a redução dessas pontes. No caso da rBmPPase wt, a aquisição de pontes dissulfeto no par de cisteínas 167 e 295, possivelmente, diminui a movimentação das alças nas quais estes resíduos estão localizados (**Fig. 28A-B**). A alça com a Cys167 é estratégica, pois esta participa da abertura e do fechamento do sítio ativo (**ANEXO 1, Fig. 5**) e, conseqüentemente, interfere com a movimentação dos aminoácidos neste sítio e, finalmente, dificultando a entrada e a hidrólise do pirofosfato. Ainda na **Figura 28A-B**, observa-se que a maior parte dos aminoácidos que compõem a interface do homodímero não está fazendo parte de estruturas secundárias como alfa-hélices ou folhas-beta, exceto os aminoácidos L236, K238, A239, T240 e E242 de ambos os modelos já que estes fazem parte da alfa-hélice H3. Outro tipo de regulação pós-traducional baseada em oxidação e redução de grupamentos tióis com crescente relevância na transdução de sinal (Mieyal *et al.*, 2008) têm ganho muita atenção.

A S-glutathionilação, ou glutathionilação, é classificada como uma importante modificação pós-traducional dependente de oxidação e redução que pode ocorrer em grupamentos tióis sensíveis à regulação redox (Zaffagnini *et al.*, 2012). Proteínas glutathioniladas podem retornar à sua forma reduzida via uma Glutaredoxina (Grx), em um mecanismo dependente de GSH (Gallogly *et al.*, 2009). Este tipo de modificação redox promovida em resposta ao estresse oxidativo atua como um mecanismo de proteção contra oxidações irreversíveis (Zaffagnini *et al.*, 2012), o que poderia levá-las à inativação (Thomas *et al.*, 1995), mas também desempenha um importante papel modulando as funções de proteínas específicas (Rouhier *et al.*, 2008). Além disso, importantes grupos de proteínas e enzimas envolvidas com:

transcrição de genes como a p53 (Velu *et al.*, 2007); fosforilação como a PKA (Humphries *et al.*, 2002; 2005), PKC (Ward *et al.*, 2000) e Creatina cinase (Reddy *et al.*, 2000); fosfatases como a PP2A (Rao e Clayton, 2002) e PTEN (Cruz *et al.*, 2007); metabolismo energético como a ATP sintase (complexo F1 subunidade alfa) (Garcia *et al.*, 2010), Complexo I (Chen *et al.*, 2007a; Passarelli *et al.*, 2010), Complexo II (Chen *et al.*, 2007b), Complexo IV (Fratelli *et al.*, 2002), α -cetoglutarato desidrogenase (McLain *et al.*, 2011) e GAPDH (Mohr *et al.*, 1999; Bedhomme *et al.*, 2012) são descritas por terem a sua atividade diminuída após glutatilonilação, exceto o Complexo II que fisiologicamente precisa estar glutatilonilado para estar ativo. Com base em nossos resultados, demonstrou-se que a rBmPPase wt, por um ensaio químico *in vitro* (**Fig. 24**), poder sofrer glutatilonilação. Com base nos dados da literatura, hipotetizamos que a BmPPase pode ser regulada negativamente por este tipo de modificação pós-traducional, principalmente se este ocorrer nos resíduos 167 e 295, uma vez que estes são os mais expostos na estrutura da enzima. Já nas cisteínas 138 e 339, por estarem localizadas na interface do dímero, a nossa hipótese é de que isto possa provocar uma desestabilização estrutural e desfazer o homodímero (**Fig. 25A-B**).

Ainda no contexto da regulação redox, observou-se que o tratamento da rBmPPase wt com moléculas fisiológicas de caráter redutor como glutatona reduzida (GSH) e ácido ascórbico (AsA); e com caráter oxidante como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ambas a concentrações fisiológicas, foram capazes de alterar os parâmetros cinéticos da enzima (**Fig. 23A-C**). Tanto a GSH quanto o AsA aumentaram a afinidade da enzima ao substrato, sendo mais sutil o efeito promovido pela GSH (**Fig. 23A**) e muito mais pronunciado o do AsA (**Fig. 23B**). Já o H_2O_2 promoveu um efeito totalmente contrário, diminuindo a afinidade da enzima pelo substrato em aproximadamente 49% (**Fig. 23C**). Provavelmente as moléculas redutoras mantiveram os grupamentos tióis da enzima livres de oxidação durante todo o ensaio enzimático. Por outro lado, o H_2O_2 promoveu a oxidação dessas mesmas cisteínas resultando em pontes dissulfeto, principalmente entre as cisteínas 167 e 295, o que justificaria o aumento no K_m . O ácido ascórbico (vitamina C, um açúcar de 6 carbonos) é uma importante molécula redutora com atividade antioxidante essencial em diversas funções fisiológicas de organismos superiores principalmente naqueles que carecem de sua biossíntese, como os humanos (Nishikimi *et al.*, 1994) e insetos herbívoros (Goggin *et al.*, 2010). Alguns autores têm

demonstrado que o ácido ascórbico desempenha um importante papel na composição e no crescimento da cutícula da *Manduca sexta* e *Spodoptera littoralis* (Navon *et al.*, 1985), na longevidade de *Callosobruchus maculatus* (Garg e Mahajan, 1994) e em *Anopheles gambiae*, por diminuir a síntese de radicais superóxido e peróxido na hemolinfa em resposta a alimentação sanguínea (Kumar *et al.*, 2003). Entretanto, nenhum dos trabalhos citados acima trata da biossíntese do ácido ascórbico nesses artrópodes. Todas essas observações foram obtidas a partir da suplementação ou da privação desta molécula durante a alimentação. De fato, como abordado por Goggin e colaboradores (2010) até o presente momento, nenhum grupo demonstrou conclusivamente a capacidade de um inseto de sintetizar ácido ascórbico, mesmo os resultados apresentados por Shao e colaboradores (1993) são considerados “duvidosos”.

Em animais, a síntese de ácido ascórbico ocorre a partir de glicose via ácido glucorônico e L-gulono-1,4-lactona (Banhegyi *et al.*, 1997). Em plantas, glicose é epimerizada a D-manose e então a L-galactose e, finalmente, a L-galactono-1,4-lactona para então ser convertida a L-ácido ascórbico (Wheeler *et al.*, 1998). Além disso, em plantas, a síntese de ácido ascórbico pode ocorrer por 3 outros caminhos distintos segundo Goggin e colaboradores (2010): via gulose (um monossacarídeo do tipo hexose), via galacturonato (um monossacarídeo do tipo hexose) ou via mio-inositol (um poliálcool cíclico). Em leveduras, D-arabinose (um açúcar de 5 carbonos) é convertida a D-arabinono-1,4-lactona e, em seguida, é convertido a ácido eritro-ascórbico (Sauer *et al.*, 2004). Nos animais e nas plantas, o último passo da via de síntese do ácido ascórbico ocorre pelas enzimas L-gulono-1,4-lactona oxidase (EC 1.1.3.8) (Koshizaka *et al.*, 1988) e L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (EC 1.3.2.3) (Leferink *et al.*, 2008), respectivamente. Por outro lado, em leveduras, este último passo ocorre via D-arabinono-1,4-lactona oxidase (EC 1.1.3.37) (Huh *et al.*, 1994). Baseado nos resultados da **Figura 23B**, investigou-se nos bancos de sequências de nucleotídeos (Genbank, TIGR e VectorBase) pelas sequências das enzimas que estão no último passo de síntese de ácido ascórbico, tendo como referência as sequências de aminoácidos dos organismos citados acima. Surpreendente, encontramos a sequência para a enzima D-arabinono-1,4-lactona oxidase (ALO) para 3 carrapatos [*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Rhipicephalus appendiculatus* e *Ixodes scapularis*] com o genoma parcialmente sequenciado (**ANEXO 5**). Segundo as análises destas sequências, a enzima ALO de

R. microplus compartilha 61,2% de identidade com as outras ALOs dos carrapatos, 50,1% com a GLO de camundongo, 49,8% com a de bovino e 25,9% com a ALO de levedura (**ANEXO 5, Tabela 1**). Baseados neste resultado, hipotetizou-se que a ALO de carrapato sintetize ácido ascórbico (como animais e plantas) ao invés de ácido eritro-ascórbico (como leveduras). Segundo Sauer e colaboradores (2004), a ALO de leveduras é mais versátil do que as de animais e plantas, pelo fato desta ser capaz de produzir ácido ascórbico usando como precursores de 6 carbonos os substratos L-gulono-1,4-lactona (de animais) e L-galactono-1,4-lactona (de planta) além de outras lactonas estruturalmente relacionadas, em ensaios *in vitro*. Além disso, o grupo também demonstrou que ao adicionar L-galactose no meio de cultura das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailii*, estas foram capazes de sintetizar L-ácido ascórbico e acumulá-lo intracelularmente. Este resultado *in vivo* pode corroborar sobre a versatilidade da enzima ALO em reconhecer açúcares de 6 carbonos e convertê-los em L-ácido ascórbico.

A importância do resultado desta investigação em carrapatos teve como objetivo reforçar o resultado obtido da **Figura 23B**, demonstrando que o ácido ascórbico está modulando positivamente a atividade enzimática da rBmPPase wt, através da manutenção do estado reduzido da enzima, além de sugerir que o mesmo possa sintetizar tal molécula. Na hipótese do carrapato ser capaz de sintetizar ácido ascórbico, do ponto de vista evolutivo, este dado reforça o fato de que o desafio imposto pelo hábito hematófago nesses artrópodes selecionou aqueles que poderiam produzir o maior “arsenal” enzimático antioxidante para se proteger do estresse oxidativo. Por fim, estabelecendo a sua população em um nicho extremamente desafiante com poucas chances de sucesso para aqueles não preparados. Curiosamente, o tratamento do mutante C339A oxidado com CuPh não foi efetivo (**Fig. 21**). Esse “comportamento” diferenciado também foi observado nos tratamentos com inibidores clássicos de PPases da família I (**Fig. 20A-B**). A rBmPPase wt foi muito mais sensível ao fluoreto e ao cálcio do que o mutante C339A. Observamos que o tratamento com 50 μ M de fluoreto foi suficiente para inibir em 76% a atividade da rBmPPase wt enquanto que esta mesma concentração inibiu 32% a atividade do mutante C339A (**Fig. 20A**). Com relação ao tratamento com cálcio, observamos que a atividade da rBmPPase wt foi diminuída de 32 a 50% mediante as concentrações que variaram de 10 a 500 nM (**Fig. 20B**) enquanto que o mutante C339A não foi inibido em qualquer das concentrações testadas.

Diante destes resultados, novas perguntas surgiram com relação ao papel desempenhado pela Cys339 na interface do homodímero. Dentre elas, por que a substituição desta cisteína em especial modificou tanto os parâmetros cinéticos, a sua sensibilidade aos inibidores clássicos e, principalmente, a reversibilidade de seu estado oxidado para o reduzido? Assim, várias análises *in silico* foram realizadas com o intuito de responder a essa e a outras questões. Como já discutido anteriormente, a Cys339 está localizada na interface do dímero (**Fig. 25A**) e esta região possui um alto grau de hidrofobicidade (**Fig. 25B**). Algo muito similar também foi observado por Tatara e colaboradores (2005) para α -manosidase. Entretanto, uma análise mais aprofundada da interface do dímero nos permitiu observar que o principal tipo de interação que ocorre entre os aminoácidos de cada subunidade que estão envolvidos com a manutenção do homodímero são do tipo forças de van der Waals (**Fig. 26**) e uma pequena participação de ligações de hidrogênio. As análises do modelo estrutural BmPPase wt reduzido mostraram que, naquele momento e na interface do dímero, ocorriam 87 contatos do tipo forças de van der Waals e 2 do tipo ligações de hidrogênio. Quando oxidado, foram contabilizados 107 contatos do tipo forças de van der Waals e somente 1 do tipo ligações de hidrogênio. No mutante C339A reduzido, observamos 91 contatos do tipo forças de van der Waals e 3 do tipo ligações de hidrogênio. Na forma oxidada ocorreram 122 contatos do tipo forças de van der Waals e somente 1 do tipo ligações de hidrogênio. De um modo geral, foi verificado que da forma reduzida para a forma oxidada houve um aumento muito significativo do contato hidrofóbico sendo representado pela força de van der Waals e, consecutivamente, uma diminuição das ligações de hidrogênio (**Fig. 26**).

A cisteína é um aminoácido de cadeia lateral polar não carregado. Desta forma, ela pode estar contribuindo para com a diminuição da quantidade de contatos hidrofóbicos na interface do dímero. A vantagem disso, hipoteticamente, está em manter certo grau de flexibilidade entre as subunidades e assim ser mantida a cooperatividade entre elas. Então, o aumento dos contatos hidrofóbicos observados no mutante C339A e o processo de oxidação poderiam então diminuir gradativamente a cooperatividade entre as subunidades. Em nossa hipótese, a importância da Cys339 na interface do dímero pode estar relacionada com a manutenção da cooperatividade, principalmente durante a modulação de sua atividade por oxidação e redução. Ainda em maiores detalhes, foram observados na **Figura 27** quais são os aminoácidos que estão mantendo contato uns com os outros

na interface do dímero. No detalhamento da interface do modelo BmPPase wt reduzido, observou-se que a Cys339 estabelece um contato hidrofóbico mais intenso com o Asp217 e menos intenso com a Leu219. Por outro lado, no mutante C339A reduzido, a Ala339 interage fracamente com o Asp217. Este resultado reforça a hipótese da Cys339 estar envolvida com a manutenção da cooperatividade entre as subunidades, visto que, no mutante, a Ala339 não consegue estabelecer totalmente nem os contatos nem a intensidade do contato. Finalmente, resumem-se na **Tabela 3** as principais informações que foram discutidas nas **Figuras 26 e 27**.

Investigou-se ainda se o padrão de distribuição das cisteínas 138, 167, 295 e 339 poderia ser uma peculiaridade da PPase do *R. microplus* ou se essa característica estaria conservada em outras PPases de carrapatos. Assim, foram clonadas as sequências de cDNA que codificam para as PPases de *Rhipicephalus appendiculatus* e *Ixodes persulcatus* (**Fig. 16**) e confirmadas a sua integridade por sequenciamento. A sequência para a PPase de *Ixodes scapularis* está disponível no banco de dados do VectorBase pelo código de acesso ISCW000237-RA e a do *R. microplus* está depositada no NCBI com o código de acesso AEI91122.1. As nossas análises demonstraram que as cisteínas 138, 167 e 295 estão presentes em ambos os carrapatos (**Fig. 17**) e com relação a 339, esta também foi identificada do *I. scapularis*. Mesmo parciais, as sequências das PPases desses carrapatos compartilham 73% de identidade entre elas (**Tabela 1**), um alto grau de conservação. Diante destes resultados, acredita-se que a Cys339 também ocorra nos demais carrapatos. No futuro, com a obtenção das sequências completas desses outros carrapatos, poder-se-a fundamentar melhor a hipótese de que esse padrão está conservado neste grupo de organismos. Acredita-se que o posicionamento e o estado redox das cisteínas aqui discutidas, para a estrutura da BmPPase, estejam diretamente relacionados ao controle de sua atividade e função fisiológica relacionada a formação desses embriões. Neste sentido, tornou-se crucial a análise da afinidade de outros substratos além do pirofosfato.

A análise cinética utilizando diferentes polímeros de fosfato demonstrou que ambos os recombinantes foram capazes de hidrolizar polifosfatos de 3 (PolyP 3) e de 15 resíduos (PolyP 15) com afinidades diferentes (**Fig. 29A-B**). Observou-se que o mutante C339A tem uma afinidade 4 vezes maior para o PolyP 3 quando comparado ao PolyP 15. O metabolismo de polifosfato em carrapatos tem sido bastante investigado por Campos e colaboradores [2007; 2008; 2011 (**ANEXO 2**)] e

também em outros artrópodes hematófagos como *Rhodnius prolixus* (Gomes *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2011). Uma das principais enzimas desse metabolismo é a Exopolifosfatase. Essa enzima reconhece os fosfatos terminais das cadeias de polifosfatos e os hidrolisa, liberando Pi para célula. Contudo, até o presente momento, nenhum destes grupos conseguiu apresentar a sequência codificante para esta enzima nos modelos estudados. A importância destes dados está no fato de sugerir que, para o *R. microplus*, a PPase pode desempenhar uma papel duplo, entre o metabolismo de polifosfato e de pirofosfato. Este trabalho ainda propõe que a PPase do carrapato *R. microplus* é uma enzima que foi adaptada, durante a evolução, para ser modulada por mecanismos refinados presentes em fatores de transcrição e proteínas cinases descritas anteriormente. Além disso, as análises *in silico* sugerem que a BmPPase também pode ser regulada por fosforilação em resíduos de serina e tirosina (**ANEXO 6**) e, assim, aumentar a sua atividade, como demonstrado por Vener e colaboradores (1990) para a PPase de fígado de rato. Do ponto de vista evolutivo, os resultados apresentados sugerem que, diferentemente, de outras PPases consideradas como modelo, esta é mais versátil tanto no sentido de sua regulação quanto de funcionamento, atuando tanto no metabolismo de pirofosfato quanto no de polifosfato.

Do ponto de vista fisiológico, se considerarmos esses mecanismos regulatórios mais refinados e integrados nas mais diversas enzimas e proteínas, a multi-funcionalidade de algumas delas, a capacidade de síntese de uma molécula antioxidante importante e, além disso, possuir toda uma gama de enzimas antioxidantes (já descritas em trabalhos anteriores) e a estratégia de digerir a hemoglobina em organemas especializadas (hemossomos), todas essas peculiaridades juntas poderiam explicar o sucesso adaptativo deste hematófago até os dias de hoje.

6. Conclusões

- 1) A derivatização das cisteínas mais expostas na estrutura da BmPPase gera uma perturbação estrutural que desencadeia uma perda de função (**ANEXO 1**);
- 2) A rBmPPase wt é regulada por oxidação e redução, comprovando a reversibilidade do fenômeno;
- 3) A rBmPPase wt pode ser glutacionilada, embora os seus efeitos na enzima não tenham sido avaliados, testes futuros devem demonstrar isso;
- 4) A aquisição de pontes dissulfeto são do tipo "alostéricas", visto que a enzima é citosólica e o seu papel é de diminuir a sua atividade e protegê-la de graus mais elevados de oxidação;
- 5) Moléculas fisiológicas com papel redutor como glutatona reduzida e ácido ascórbico regularam positivamente a atividade da rBmPPase wt;
- 6) O Peróxido de hidrogênio, a concentrações fisiológicas, diminuiu a afinidade da rBmPPase wt pelo seu substrato (PPi), provavelmente por formação de pontes dissulfeto;
- 7) A Cys339, localizada na interface do homodímero, desempenhou um importante papel na manutenção da cooperatividade entre as subunidades. Além disso, ela também desempenhou um papel crítico na reversibilidade da enzima durante o estresse oxidativo;
- 8) Os carrapatos compartilham esse padrão de localização das cisteínas, mediante isso, o mecanismo de regulação redox em PPases pode estar conservado dentro desse grupo;
- 9) A PPase do *R. microplus* é uma enzima multifuncional e esta pode desempenhar um importante papel no metabolismo de polifosfato.

7. Referência Bibliográfica

- Abdul-Wahab, M.F., Homma, T., Wright, M., Olerenshaw, D., Dafforn, T.R., Nagata, K., Miller, A.D. 2013. The pH Sensitivity of Murine Heat Shock Protein 47 (HSP47) Binding to Collagen Is Affected by Mutations in the Breach Histidine Cluster. *J Biol Chem.* 288, 4452-4461.
- Achilonu, I., Fanucchi, S., Cross, M., Fernandes, M., Dirr, H.W. 2012. Role of individual histidines in the pH-dependent global stability of human chloride intracellular channel 1. *Biochemistry.* 51, 995-1004.
- Ahn, S., Milner, A.J., Fütterer, K., Konopka, M., Ilias, M., Young, T.W., White, S.A. 2001. The “Open” and “Closed” structures of the type-C inorganic pyrophosphatases from *Bacillus subtilis* and *Streptococcus gordonii*. *J Mol Biol.* 313, 797-811.
- Antelmann, H., Hellmann, J.D. 2011. Thiol-based redox switches and gene regulation. *Antioxid Redox Signal.* 14, 1049-63.
- Azimi, I., Wong, J.W., Hogg, P.J. 2011. Control of mature protein function by allosteric disulfide bonds. *Antioxid Redox Signal.* 14, 113-126.
- Banci, L., Bertini, I., Cefaro, C., Ciofi-Baffoni, S., Gallo, A., Martinelli, M., Sideris, D.P., Katrakili, N., Tokatlidis, K. 2009. MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria. *Nat Struct Mol Biol.* 16, 198-206.
- Banhegyi, G., Braun, L., Csala, M., Puskas, F., Mandl, J. 1997. Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Radic Biol Med.* 23, 793-803.
- Baykov, A.A., Cooperman, B.S., Goldman, A., Lahti, R. 1999. Cytoplasmic inorganic pyrophosphatase. *Prog Mol Subcell Biol.* 23, 127-150.
- Bedhomme, M., Adamo, M., Marchand, C.H., Couturier, J., Rouhier, N., Lemaire, S.D., Zaffagnini, M., Trost, P. 2012. Glutathionylation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the model plant *Arabidopsis thaliana* is reversed by both glutaredoxins and thioredoxins *in vitro*. *Biochem J.* 445, 337-347.
- Berlett, B.S., Stadtman, E.R. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 272, 20313-20316.
- Boctor, F.N., Kamel, M.Y. 1976. Purification and characterization of two lipovitellins from eggs of the tick, *Dermacentor eersoni*. *Insect Biochem.* 6, 223-240.

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.
- Bullough, P.A., Hughson, F.M., Skehel, J.J., Wiley, D.C. 1994. Structure of Influenza hemagglutinin at the pH of membrane-fusion. *Nature.* 371, 37-43.
- Campos, E., Moraes, J., Façanha, A.R., Moreira, E., Valle, D., Abreu, L., Manso, P. P.A., Nascimento, A., Pelajo-Machado, M., Lenzi, H., Masuda, A., Vaz Jr., I.S., Logullo, C. 2006. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. *Vet Parasitol.* 138, 349-357.
- Campos, E., Façanha, A., Moraes, J., da Silva Vaz, I. Jr., Masuda, A., Logullo, C. 2007. A mitochondrial exopolyphosphatase activity modulated by phosphate demand in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo. *Insect Biochem Mol Biol.* 37, 1103-7.
- Campos, E., Façanha, A.R., Costa, E.P., da Silva Vaz, I. Jr., Masuda, A., Logullo, C. 2008. Exopolyphosphatases in nuclear and mitochondrial fractions during embryogenesis of the hard tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 151, 311-6.
- Campos, E., Façanha, A.R., Costa, E.P., Fraga, A., Moraes, J., da Silva Vaz, I.Jr., Masuda, A., Logullo, C. 2011. A Mitochondrial Membrane Exopolyphosphatase Is Modulated by, and Plays a Role in, the Energy Metabolism of Hard Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Embryos. *Int J Mol Sci.* 12, 3525-35.
- Carmel-Harel, O., Storz, G. 2000. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu Rev Microbiol.* 54, 439-461.
- Chacinska, A., Pfannschmidt, S., Wiedemann, N., Kozjak, V., Sanjuan Szklarz, L.K., Schulze-Specking, A., Truscott, K.N., Guiard, B., Meisinger, C., Pfanner, N. 2004. Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *EMBO J.* 23, 3735–3746.
- Checker, R., Patwardhan, R.S., Sharma, D., Menon, J., Thoh, M., Bhilwade, H.N., Konishi, T., Sandur, S.K. 2012. Schisandrin B exhibits anti-inflammatory activity through modulation of the redox-sensitive transcription factors Nrf2 and NF-κB. *Free Radic Biol Med.* 53, 1421-1430.

- Chen, C.L., Zhang, L., Yeh, A., Chen, C.A., Green-Church, K.B., Zweier, J.L., Chen, Y.R. 2007a. Site-specific S-glutathiolation of mitochondrial NADH ubiquinone reductase. *Biochemistry*. 46, 5754-5765.
- Chen, Y.R., Chen, C.L., Pfeiffer, D.R., Zweier, J.L. 2007b. Mitochondrial complex II in the post-ischemic heart: oxidative injury and the role of protein S-glutathionylation. *J Biol Chem*. 282, 32640-32654.
- Cheng, G., Ikeda, Y., Iuchi, Y., Fujii, J. 2005. Detection of S-glutathionylated proteins by glutathione S-transferase overlay. *Arch Biochem Biophys*. 435, 42-9.
- Choi, H.J., Kim, S.J., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J.R., Storz, G., Ryu, S.E. 2001. Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell*. 105, 103-113.
- Cook, K.M., Hogg, P.J. 2013. Post-Translational Control of Protein Function by Disulfide Bond Cleavage. *Antioxid Redox Signal*. IN PRESS.
- Cooperman, B.S., Baykov, A.A., Lahti, R. 1992. Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatases. *Trends Biochem Sci*. 17, 262-266.
- Costa, E.P., Campos, E., de Andrade, C.P., Façanha, A.R., Saramago, L., Masuda, A., da Silva, I.V.Jr., Fernandez, J.H., Moraes, J., Logullo, C. 2012. Partial characterization of an atypical family I inorganic pyrophosphatase from cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol*. 184, 238-47.
- Creighton, T.E., Hillson, D.A., Freedman, R.B. 1980. Catalysis by protein-disulphide isomerase of the unfolding and refolding of proteins with disulphide bonds. *J Mol Biol*. 142, 43-62.
- Cruz, C.M., Rinna, A., Forman, H.J., Ventura, A.L.M., Persechini, P.M., Ojcius, D.M. 2007. ATP Activates a Reactive Oxygen Species-dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages. *J Biol Chem*. 282, 2871-2879.
- Darby, N., Creighton, T.E. 1995. Disulfide bonds in protein folding and stability. *Methods Mol Biol*. 40, 219-252.
- De Meis, L. 1993. The concept of energy-rich phosphate compounds: water, transport ATPases and entropic energy. *Arch Biochem Biophys*. 306, 287-296.
- Enriquez-Flores, S., Rodriguez-Romero, A., Hernandez-Alcantara, G., De la Mora-Dela Mora, I., Gutierrez-Castrellon, P., Carvajal, K., Lopez-Velazquez, G., Reyes-Vivas, H., 2008. Species-specific inhibition of *Giardia lamblia*

- triosephosphate isomerase by localized perturbation of the homodimer. *Mol Biochem Parasitol.* 157, 179-186.
- Fagotto, F. 1990. Yolk degradation in tick eggs: In Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. *Arch Insect Biochem Physiol.* 14, 217-235.
- Fahey, R.C. 1977. Biologically important thiol-disulfide reactions and the role of cyst(e)ine in proteins: an evolutionary perspective. *Adv Exp Med Biol.* 86A, 1-30.
- Fahey, R.C., Hunt, J.S., Windham, G.C. 1977. Cysteine and cystine content of proteins: Differences between intracellular and extracellular proteins. *J Mol Evol.* 10, 155-160.
- Felix, H. Fleisch, H. 1975. Properties of inorganic pyrophosphatase of pig scapula cartilage. *Biochem J.* 147, 111-118.
- Feng, Y., Forgacs, M. 1994. Inhibition of vacuolar H⁺-ATPase by disulfide bond formation between cysteine 254 and cysteine 532 in subunit A. *J Biol Chem.* 269, 13224-13230.
- Ferjani, A., Segami, S., Horiguchi, G., Muto, Y., Maeshima, M., Tsukaya, H. 2011. Keep an eye on PPI: the vacuolar-type H⁺-pyrophosphatase regulates postgerminative development in Arabidopsis. *Plant Cell.* 23, 2895-908.
- Fiske, C.F., SubbaRow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem.* 66, 375-400.
- Finkel, T. 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol.* 194, 7-15.
- Forrester, M.T., Foster, M.W., Benhar, M., Stamler, J.S. 2009. Detection of protein S-nitrosylation with the biotin-switch technique. *Free Radic Biol Med.* 46, 119-126.
- Fratelli, M., Demol, H., Puype, M., Casagrande, S., Eberini, I., Salmona, M., Bonetto, V., Mengozzi, M., Duffieux, F., Miclet, E., Bachi, A., Vandekerckhove, J., Gianazza, E., Ghezzi, P. 2002. Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99, 3505-3510.
- Freedman, R.B., Hawkins, H.C. 1977. Enzyme-catalysed disulphide interchange and protein biosynthesis. *Biochem Soc Trans.* 5, 348-357.
- Gallogly, M.M., Starke, D.W., Mieyal, J.J. 2009. Mechanistic and kinetic details of catalysis of thiol-disulfide exchange by glutaredoxins and potential mechanisms of regulation. *Antioxid Redox Signaling.* 11, 1059-1081.

- Garcia, J., Han, D., Yap, L.P., Kaplowitz, N., Cadenas, E., 2010. Regulation of mitochondrial glutathione redox status and protein glutathionylation by respiratory substrates. *J Biol Chem.* 285, 39646-39654.
- Garg, S.K., Mahajan, S. 1994. Effect of ascorbic acid on longevity and biochemical alterations in *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae). *Arch Gerontol Geriatr.* 18, 149-57.
- Garza-Ramos, G., Pérez-Montfort, R., Rojo-Domínguez, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. 1996. Species-specific inhibition of homologous enzymes by modification of nonconserved amino acids residues. The cysteine residues of triosephosphate isomerase. *Eur J Biochem.* 241, 114-120.
- Garza-Ramos, G., Cabrera, N., Saavedra-Lira, E., Tuena de Gómez-Puyou, M., Ostoa-Saloma, P., Pérez-Montfort, R., Gómez-Puyou, A. 1998. Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Eur J Biochem.* 253, 684-691.
- Gaxiola, R.A., Sanchez, C.A., Paez-Valencia, J., Ayre, B.G., Elser, J.J. 2012. Genetic manipulation of a "vacuolar" H(+)-PPase: from salt tolerance to yield enhancement under phosphorus-deficient soils. *Plant Physiol.* 159, 3-11.
- Goggin, F.L., Avila, C.A., Lorence, A. 2010. Vitamin C content in plants is modified by insects and influences susceptibility to herbivory. *Bioessays.* 32, 777-90.
- Gomes, F.M., Oliveira, D.M., Motta, L.S., Ramos, I.B., Miranda, K.M., Machado, E.A. 2010. Inorganic polyphosphate inhibits an aspartic protease-like activity in the eggs of *Rhodnius prolixus* (Stahl) and impairs yolk mobilization in vitro. *J Cell Physiol.* 222, 606-11.
- Gómez-García, M.R., Losada, M., Serrano, A. 2006. A novel subfamily of monomeric inorganic pyrophosphatases in photosynthetic eukaryotes. *Biochem J.* 395, 211-221.
- Gómez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R.A., Rojo-Domínguez, A., Pérez-Montfort, R. 1995. Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action - studies with triosephosphate isomerase. *Chem Biol.* 2, 847-855.
- Griffiths, S.W., King, J., Cooney, C.L. 2002. The reactivity and oxidation pathway of cysteine 232 in recombinant human alpha 1-antitrypsin. *J Biol Chem.* 277, 25486-25492.

- Harutyunyan, E.H., Kuranova, I.P., Vainshtein, B.K., Höhne, W.E., Lamzin, V.S., Dauter, Z., Teplyakov, A.V., Wilson, K.S. 1996. X-ray structure of yeast inorganic pyrophosphatase complexed with manganese and phosphate. *Eur J Biochem.* 239, 220-228.
- Harutyunyan, E.H., Oganessyan, V.Y., Oganessyan, N.N., Avaeva, S.M., Nazarova, T.I., Vorobyeva, N.N., Kurilova, S.A., Huber, R., Mather, T. 1997. Crystal structure of holo inorganic pyrophosphatase from *Escherichia coli* at 1.9 Å resolution: Mechanism of hydrolysis. *Biochemistry.* 36, 7754-7760.
- Heikinheimo, P., Lehtonen, J., Baykov, A., Lahti, R., Cooperman, B.S., Goldman, A. 1996. The structural basis for pyrophosphatase catalysis. *Structure.* 4, 1491-1508.
- Heinonen, J.K. 2001. *Biological Role of Inorganic Pyrophosphate.* Boston/Dordrecht/London: Kluwer Academic Publishers.
- Hogg, P.J. 2003. Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends Biochem Sci.* 28, 210-214.
- Hoogstraal, H. 1985. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Adv Parasitol.* 24, 135-238.
- Horak, I.G., Camicas, J.L., Keirans, J.E. 2002. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Exp Appl Acarol.* 28, 27-54.
- Hu, F., Schmidt-Rohr, K., Hong, M. 2012. NMR detection of pH-dependent histidine-water proton exchange reveals the conduction mechanism of a transmembrane proton channel. *J Am Chem Soc.* 134, 3703-3713.
- Hu, J., Dong, L., Outten, C.E. 2008. The redox environment in the mitochondrial intermembrane space is maintained separately from the cytosol and matrix. *J Biol Chem.* 283, 29126–29134.
- Hugo, M., Turell, L., Manta, B., Botti, H., Monteiro, G., Netto, L.E., Alvarez, B., Radi, R., Trujillo, M. 2009. Thiol and sulfenic acid oxidation of AhpE, the one-cysteine peroxiredoxin from *Mycobacterium tuberculosis*: kinetics, acidity constants, and conformational dynamics. *Biochemistry.* 48, 9416-9426.
- Huh, W.K., Kim, S.T., Yang, K.S., Seok, Y.J., Hah, Y.C., Kang, S.O. 1994. Characterization of D-arabinono-1,4-lactone oxidase from *Candida albicans* ATCC 10231. *Eur J Biochem.* 225, 1073-1079.

- Humphries, K.M., Juliano, C., Taylor, S.S. 2002. Regulation of cAMP-dependent protein kinase activity by glutathionylation. *J Biol Chem.* 277, 43505–43511.
- Humphries, K.M., Deal, M.S., Taylor, S.S. 2005. Enhanced dephosphorylation of cAMP-dependent protein kinase by oxidation and thiol modification. *J Biol Chem.* 280, 2750–2758.
- Imlay, J.A. 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem.* 77, 755-776.
- James, A.M., Oliver Jr.H. 1997. Purification and partial characterization of vitellin from the black-legged tick, *Ixodes scapularis*. *Insect Mol Biol.* 27, 639-649.
- Jang, H.H., Kim, S.Y., Park, S.K., Jeon, H.S., Lee, Y.M., Jung, J.H., Lee, S.Y., Chae, H.B., Jung, Y.J., Lee, K.O., Lim, C.O., Chung, W.S., Bahk, J.D., Yun, D.J., Cho, M.J., Lee, S.Y. 2006. Phosphorylation and concomitant structural changes in human 2-Cys peroxiredoxin isotype I differentially regulate its peroxidase and molecular chaperone functions. *FEBS Lett.* 580, 351-355.
- Kankare, J., Neal, G.S., Salminen, T., Glumoff, T., Cooperman, B.S., Lahti, R., Golsman, A. 1994. The structure of *E. coli* soluble inorganic pyrophosphatase at 2.7 Å resolution. *Protein Eng.* 7, 823-830.
- Kieselbach, T. 2013. Oxidative Folding in Chloroplasts. *Antioxid Redox Signal.* IN PRESS.
- Kornberg, A. 1962. On the metabolic significance of phosphorolytic and pyrophosphorolytic reactions. In: *Horizons in Biochemistry* (Kasha, M. e Pullman, B; Eds.) pp. 251-264, Academic Press, New York.
- Koshizaka, T., Nishikimi, M., Ozawa, T., Yagi, K. 1988. Isolation and sequence analysis of a complementary DNA encoding rat liver L-gulonogamma-lactone oxidase, a key enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis. *J Biol Chem.* 263, 1619-1621.
- Kuge, S., Jones, N. 1994. Yap1 dependent activation of Trx2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.* 13, 655-664.
- Kuhn, N.J., Ward, S. 1998. Purification, Properties, and Multiple Forms of a Manganese-Activated Inorganic Pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*. *Arch Biochem Biophys.* 354, 47-56.

- Kullik, I., Toledano, M.B., Tartaglia, L.A., Storz, G. 1995. Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: Regions important for oxidation and transcriptional activation. *J Bacteriol.* 177, 1275-1284.
- Kumar, S., Christophides, G.K., Cantera, R., Charles, B., Han, Y.S., Meister, S., Dimopoulos, G., Kafatos, F.C., Barillas-Mury, C. 2003. The role of reactive oxygen species on Plasmodium melanotic encapsulation in *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100, 14139-44.
- Kurilova, S.A., Bogdanova, A.V., Nazarova, T.I., Avaeva, S.M. 1984. Changes in the *E. coli* inorganic pyrophosphatase activity on interaction with magnesium, zinc, calcium and fluoride ions. *Bioorg Khim.* 10, 1153-1160.
- Kwon, J., Lee, S.R., Yang, K.S., Ahn, Y., Kim, Y.J., Stadtman, E.R., Rhee, S.G. 2004. Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101, 16419-16424.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lahti, R., Kolakowski, L.F., Vihinem, M., Pohjanoksa, K., Cooperman, B.S. 1990. Conservation of functional residues between yeast and *E. coli* inorganic pyrophosphatases. *Biochim Biophys Acta.* 1038, 338-345.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst.* 26, 283-291.
- Laskowski, R.A., Hutchinson, E.G., Michie, A.D., Wallace, A.C., Jones, M.L., Thornton, J.M. 1997. PDBsum: A Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. *Trends Biochem Sci.* 22, 488-490.
- Lee, S.R., Yang, K.S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., Rhee, S.G. 2002. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *J Biol Chem.* 277, 20336-20342.
- Leferink, N.G., van den Berg, W.A., van Berkel, W.J. 2008. L-Galactono-gamma-lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis. *FEBS J.* 275, 713-726.
- Leppanen, V.M., Nummelin, H., Hansen, T., Lahti, R., Schafer, G., Goldman, A. 1999. *Sulfolobus acidocaldarius* inorganic pyrophosphatase: structure,

- thermostability, and effect of metal ion in an archael pyrophosphatase. *Protein Sci.* 8, 1218-1231.
- Leslie, N.R., Bennett, D., Lindsay, Y.E., Stewart, H., Gray, A., Downes, C.P. 2003. Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *EMBO J.* 22, 5501-5510.
- Linke, K., Jakob, U. 2003. Not every disulfide lasts forever: disulfide bond formation as a redox switch. *Antioxid Redox Signal.* 5, 425-434.
- Liu, B., Bartlam, M., Gao, R., Zhou, W., Pang, H., Liu, Y., Feng, Y., Rao, Z. 2004. Crystal structure of the hyperthermophilic inorganic pyrophosphatase from the archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *Biophys J.* 86, 420-427.
- Logullo, C., Vaz Jr, I.S., Sorgine, M.H.F., Paiva-Silva, G.O., Faria, F.S., Zingali, R., Lima, M.F.R., Abreu, L., Oliveira, E.F., Alves, E.W., Masuda, H., Gonzales, J.C., Masuda, A., Oliveira, P.L. 1998. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitol.* 116, 525-532.
- Logullo, C., Moraes, J., Dansa-Petretski, M., Vaz Jr, I.S., Masuda, A., Sorgine, M.H.F., Braz, G.R., Masuda H., Oliveira, P.L. 2002. Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Insect Biochem Mol Biol.* 32, 1805-1811.
- Machado, V.G., Nome, F. 1999. Compostos fosfatados ricos em energia. *Quim Nova.* 22, 351-357.
- Martinez-Ruiz, A., Lamas, S. 2007. Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: convergences and divergences. *Cardiovasc Res.* 75, 220-228.
- Merckel, M.C., Fabrichniy, I.P., Salmimen, A., Kalkkinen, N., Baykov, A.A., Lahti, R., Goldman, A. 2001. Crystal structure of *Streptococcus mutans* pyrophosphatase: a new fold for an old mechanism. *Structure.* 9, 289-297.
- Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K., Herrmann, J.M. 2005. A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell.* 121, 1059-1069.
- Messens, J., Collet, J.F., Van Belle, K., Brosens, E., Loris, R., Wyns, L. 2007. The oxidase DsbA folds a protein with a nonconsecutive disulfide. *J Biol Chem.* 282, 31302-31307.

- Meyer, W., Moll, R., Kath, T., Schäfer, G. 1995. Purification, cloning, and sequencing of archaeobacterial pyrophosphatase from the extreme thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius*. Arch Biochem Biophys. 319, 149-56.
- McLain, A.L., Szweda, P.A., Szweda, L.I. 2011. Alpha-Ketoglutarate dehydrogenase: a mitochondrial redox sensor. Free Radic Res. 45, 29-36.
- Mieyal, J.J., Gallogly, M.M., Qanungo, S., Sabens, E.A., Shelton, M.D. 2008. Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. Antioxid Redox Signal. 10, 1941-1988.
- Miki, H., Funato, Y. 2012. Regulation of intracellular signalling through cysteine oxidation by reactive oxygen species. J Biochem. 151, 255-261.
- Mimura, H., Nakanishi, Y., Maeshima, M. 2005. Disulfide-bond formation in the H⁺-pyrophosphatase of *Streptomyces coelicolor* and its implications for redox control and enzyme structure. FEBS Lett. 579, 3625-3631.
- Mitchell, S.J., Minnick, M.F. 1997. Cloning, functional expression, and complementation analysis of an inorganic pyrophosphatase from *Bartonella bacilliformis*. Can J Microbiol. 43, 734-743.
- Mohr, S., Hallak, H., de Boitte, A., Lapetina, E.G., Brüne, B. 1999. Nitric oxide-induced S-glutathionylation and inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J Biol Chem. 274, 9427-9430.
- Moraes, J., Galina, A., Alvarenga, P.H., Rezende, G.L., Masuda, A., Vaz Jr, I.S., Logullo, C. 2007. Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *B. microplus*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 146, 528-533.
- Moraes, J., Arreola, R., Cabrera, N., Saramago, L., Freitas, D., Masuda, A., da Silva Vaz Jr., I., Tuena de Gómez-Puyou, M., Pérez-Montfort, R., Gómez-Puyou, A., Logullo, C. 2011. Structural and biochemical characterization of a recombinant triosephosphate isomerase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Insect Biochem Mol Biol. 41, 400-409.
- Naoe, M., Ohwa, Y., Ishikawa, D., Ohshima, C., Nishikawa, S., Yamamoto, H., Endo, T. 2004. Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space. J Biol Chem. 279, 47815-47821.
- Navon, A., Nesbitt, J., Henzel, W., Lipke, H. 1985. Effects of ascorbic-acid deficiency on growth and cuticle composition of *Manduca sexta* and *Spodoptera littoralis*. Insect Biochem. 15, 285-91.

- Neujahr, H.Y. 1988. Thiol- and pH-modulated slow conformational changes and cooperativity of phenol-binding sites in phenol hydroxylase. *Biochemistry*. 27, 3770-3775.
- Nishikimi, M., Fukuyama, R., Minoshima, S., Shimizu, N., Yagi, K. 1994. Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *J Biol Chem*. 269, 13685-13688.
- Oksanen, E., Ahonen, A-K., Tuominen, H., Tuominen, V., Lahti, R., Goldman, A., Heikinheimo, P. 2007. A complete structural description of the catalytic cycle of yeast pyrophosphatase. *Biochemistry*. 46, 1228-1239.
- Paez-Valencia, J., Sanchez-Lares, J., Marsh, E., Dorneles, L.T., Santos, M.P., Sanchez, D., Winter, A., Murphy, S., Cox, J., Trzaska, M., Metler, J., Kozic, A., Facanha, A.R., Schachtman, D., Sanchez, C.A., Gaxiola, R.A. 2013. Enhanced proton translocating pyrophosphatase activity improves nitrogen use efficiency in romaine lettuce. *Plant Physiol*. 161, 1557-1569.
- Parfenyev, A.N., Salminen, A., Halonen, P., Hachimori, A., Baykov, A.A., Lahti, R. 2001. Quaternary structure and metal ion requirement of family II pyrophosphatases from *Bacillus subtilis*, *Streptococcus gordonii*, and *Streptococcus mutans*. *J Mol Biol*. 276, 24511-24518.
- Passarelli, C., Tozzi, G., Pastore, A., Bertini, E., Piemonte, F. 2010. GSSG-mediated Complex I defect in isolated cardiac mitochondria. *Int J Mol Med*. 26, 95-99.
- Perry, L.J., Wetzel, R. 1987. The role of cysteine oxidation in the thermal inactivation of T4 lysozyme. *Protein Eng*. 1, 101-105.
- Pomposiello, P.J., Demple, B. 2001. Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends Biotechnol*. 19, 109-114.
- Powell, R.T., Reid, T.J. 1982. Project tick control. *Queensland Agricultural Journal*, Brisbane. 108, 279-300.
- Raman, B., Siva Kumar, L.V., Ramakrishna, T., Mohan Rao, C. 2001. Redox-regulated chaperone function and conformational changes of *Escherichia coli* Hsp33. *FEBS Lett*. 489, 19-24.
- Ramos, I., Gomes, F., Koeller, C.M., Saito, K., Heise, N., Masuda, H., Docampo, R., de Souza, W., Machado, E.A., Miranda, K. 2011. Acidocalcisomes as calcium- and polyphosphate-storage compartments during embryogenesis of the insect *Rhodnius prolixus* Stahl. *PLoS One*. 6, e27276.

- Rao, R.K., Clayton, L.W. 2002. Regulation of protein phosphatase 2A by hydrogen peroxide and glutathionylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 293, 610-616.
- Reddy, S., Jones, A.D., Cross, C.E., Wong, P.S.Y., Van Der Vliet, A. 2000. Inactivation of creatine kinase by S-glutathionylation of the active-site cysteine residue. *Biochem J.* 347, 821-827.
- Rocha, C.M.B.M. 1999. Aspectos relevantes da biologia do *Boophilus microplus* (Cannestrini, 1887). Lavras: UFLA. 20p. Boletim Técnico, 32.
- Rombough, P. 2011. The energetics of embryonic growth. *Respir Physiol Neurobiol.* 178, 22-29.
- Rosell, R., Coons, L.B. 1991. Purification and partial characterization of vitellin from the eggs of the hard tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochem Mol Biol.* 21, 871-885.
- Rouhier, N., Lemaire, S.D., Jacquot, J.P. 2008. The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu Rev Plant Biol.* 59, 143-166.
- Ryu, S.E. 2012. Structural mechanism of disulphide bond-mediated redox switches. *J Biochem.* 151, 579-588.
- Sali, A., Blundell, T.L. 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol.* 234, 779-815.
- Samygina, V.R., Popov, A.N., Rodina, E.V., Vorobyeva, N.N., Lamzin, V.S., Polyakov, K.M., Kurilova, S.A., Nazarova, T.I., Avaeva, S.M. 2001. The structures of *E. coli* inorganic pyrophosphatase complexed with Ca²⁺ or CaPPi at atomic resolution and their mechanistic implications. *J Mol Biol.* 314, 633-645.
- Sappington, T.W., Raikhel, A.S. 1998. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochem Mol Biol.* 28, 177-300.
- Sauer, M., Branduardi, P., Valli, M., Porro, D. 2004. Production of L-ascorbic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*. *Appl Environ Microbiol.* 70, 6086-91.
- Schmidt, B., Ho, L., Hogg, P.J. 2006. Allosteric disulfide bonds. *Biochemistry.* 45, 7429-7433.
- Schroeder, B.O., Wu, Z., Nuding, S., Groscurth, S., Marcinowski, M., Beisner, J., Buchner, J., Schaller, M., Stange, E.F., Wehkamp, J. 2011. Reduction of

- disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human β -defensin 1. *Nature*. 469, 419-23.
- Shao, Y.Y., Seib, P.A., Kramer, K.J., Van Galen, D.A. 1993. Synthesis and Properties of D-Erythroascorbic Acid and Its Vitamin C Activity in the Tobacco Hornworm (*Manduca sexta*). *J Agric Food Chem*. 41, 1391-1396.
- Shintani, T., Uchiumi, T., Yonezawa, T., Salminen, A., Baykov, A.A., Lahti, R. Hachimori, A. 1998. Cloning and expression of a unique inorganic pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*: evidence for a new family of enzymes. *FEBS Lett*. 439, 263-266.
- Sitia, R., Braakman, I. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature*. 426, 891-894.
- Sonenshine, D.E. 1991. *Biology of Ticks*, New York: Oxford University Press, Volume 1, New York.
- Tammenkosky, M., Benini, S., Magretova, N.N., Baykov, A.A., Lahti, R. 2005. An Unusual His-dependent Family I Pyrophosphatase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bio. Chem*. 280, 41819-41826.
- Tatara, Y., Yoshida, T., Ichishima, E. 2005. A single free cysteine residue and disulfide bond contribute to the thermostability of *Aspergillus saitoi* 1,2-alpha-mannosidase. *Biosci Biotechnol Biochem*. 69, 2101-2108.
- Teplyakov, A., Obmolova, G., Wilson, K.S., Ishii, K., Kaji, H., Samejima, T., Kuranova, I. 1994. Crystal structure of inorganic pyrophosphatase from *Thermus thermophilus*. *Protein Sci*. 3, 1098-1107.
- Thomas, J.A., Zhao, W., Hendrich, S., Haddock, P. 1995. Analysis of cells and tissues for S-thiolation of specific proteins. *Methods Enzymol*. 251, 423-429.
- Thornton, J.M. 1981. Disulfide bridges in globular proteins. *J Mol Biol*. 151, 261-287.
- Torres, M.J., Turell, L., Botti, H., Antmann, L., Carballal, S., Ferrer-Sueta, G., Radi, R., Alvarez, B. 2012. Modulation of the reactivity of the thiol of human serum albumin and its sulfenic derivative by fatty acids. *Arch Biochem Biophys*. 521, 102-110.
- Velu, C.S., Niture, S.K., Doneanu, C.E., Pattabiraman, N., Srivenugopal, K.S. 2007. Human p53 is inhibited by glutathionylation of cysteines present in the proximal DNA-binding domain during oxidative stress. *Biochemistry* 46, 7765-7780.
- Vener, A.V. 1989. Regulation of enzymatic activity by kinase-free phosphorylation. *FEBS Lett*. 244, 271-275.

- Vener, A.V., Ichetovkina, L.E., Nazarova, T.I., Avaeva, S.M. 1986. Phosphorylation as a method of regulating inorganic pyrophosphatase activity in *E. coli*. I. Phosphorylation and enzyme activation induced by ATP. *Bioorg Chem (Moscow)*. 12, 195-199.
- Vener, A.V., Smirnova, I.N., Baykov, A.A. 1990. Phosphorylation of rat liver inorganic pyrophosphatase by ATP in the absence and in the presence of protein kinase. *FEBS Lett.* 264, 40-42.
- Ward, N.E., Stewart, J.R., Ioannides, C.G., O'Brian, C.A. 2000. Oxidant-induced S-glutathiolation inactivates protein kinase C-alpha (PKC-alpha): a potential mechanism of PKC isozyme regulation. *Biochemistry*. 39, 10319-10329.
- Wedemeyer, W.J., Welker, E., Narayan, M., Scheraga, H.A. 2000. Disulfide bonds and protein folding. *Biochemistry*. 39, 4207-4216.
- Wells, J.A., Powers, D.B. 1986. In vivo formation and stability of engineered disulfide bonds in subtilisin. *J Biol Chem*. 261, 6564-6570.
- Wheeler, G.L., Jones, M.A., Smirnov, N. 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*. 393, 365-369.
- Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessel, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E. 2000. Princípios de biologia do desenvolvimento. Trad. Henrique Bunselmeyer Ferreira. Porto Alegre: Artes Médicas Sul.
- Yamamoto, Y., Takahashi, S.Y. 1993. Cysteine proteinase from *Bombyx* eggs: role in programmed degradation of yolk proteins during embryogenesis. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 106, 35-45.
- Yang, Z., Wensel, T.G. 1991. Inorganic pyrophosphatase from bovine retinal rod outer segments. *J Biol Chem*. 267, 24634-24640.
- Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Marchand, C.H., Morisse, S., Trost, P., Lemaire, S.D. 2012. Redox regulation in photosynthetic organisms: focus on glutathionylation. *Antioxid Redox Signal*. 16, 567-586.
- Zhang, H., Shen, G., Kuppu, S., Gaxiola, R., Payton, P. 2011. Creating drought- and salt-tolerant cotton by overexpressing a vacuolar pyrophosphatase gene. *Plant Signal Behav*. 6, 861-863.
- Zyryanov, A.B., Vener, A.V., Salminen, A., Goldman, A., Lahti, R., Baykov, A.A. 2004. Rates of elementary catalytic steps for different metal forms of the family II pyrophosphatase from *Streptococcus gordonii*. *Biochemistry*. 43, 1065-1074.

ANEXO 1: **Primeiro autor.** Artigo publicado no periódico “**Veterinary Parasitology**”

Partial characterization of an atypical family I inorganic pyrophosphatase from cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Evenilton P. Costa, Eldo Campos, Caroline P. de Andrade, Arnaldo R. Façanha, Luiz Saramago, Aoi Masuda, Itabajara da Silva Vaz Jr., Jorge Moraes, Carlos Logullo.

Veterinary Parasitology 184 (2012) 238-247.

ANEXO 2: **Coautor**. Artigo publicado no periódico “**International Journal of Molecular Sciences**”

A mitochondrial membrane exopolyphosphatase is modulated by, and plays a role in, the energy metabolism of hard tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryos

Eldo Campos, Arnaldo R. Façanha, **Evenilton P. Costa**, Amanda Fraga, Jorge Moraes, Itabajara da Silva Vaz Jr., Aoi Masuda, Carlos Logullo.

Int. J. Mol. Sci. 2011, 12, 3525-3535.

ANEXO 3: Desenho dos primers utilizados para clonagem, sub-clonagem em vetor de expressão e para a mutação sítio-dirigido. Os sítios de restrição estão sublinhados e o **códon de parada** em vermelho.

Clonagem do inserto no vetor **pGEM-T Easy**

For: ATGCTCTGGCAAGGCGTCATTGGG (24 b) Ta: 60 °C

Rev: CTTGAGGCACACGAAGTGCCACTTGTC (27 b) Ta: 60 °C

Primer reverso com a substituição do códon de cisteína (**C339A**) para alanina

Rev: CTTGAGGGCCACGAAGTGCCACTTGTC (27 b) Ta: 60 °C

Sub-clonagem do inserto no vetor de expressão **pCold-TF DNA**

For: GGGTTTTCATATGCTCTGGCAAGGCGTCAT (30 b) Ta: 55 °C

Rev: AAAAAGAATTCTCACTTGAGGCACACGAAGTGCC (35 b) Ta: 55 °C

Primer reverso com a substituição do códon de cisteína (**C339A**) para alanina

Rev: AAAAAGAATTCTCACTTGAGGGCCACGAAGTGC (34 b) Ta: 55 °C

Primers para a obtenção do mutante **C295A** usando como molde a construção pCold-BmPPase wt. O códon sublinhado faz referência à alanina.

For: CTTCTCCATTGAACGCGTCTACTACTGTCCAC (32 b) Ta: 55 °C

Rev: GTGGACAGTAGTAGACGCGTTCAATGGAGAAG (32 b) Ta: 55 °C

Primers para a obtenção do duplo mutante **C138A C339A** usando como molde a construção pCold-BmPPase **C339A**. O códon sublinhado faz referência à alanina.

For (C138A): CGCTATGTCCACAACGCGTTTCCCTCATCACGG (32 b) Ta: 55 °C

Rev (C138A): CCGTGATGAGGAAACGCGTTGTGGACATAGCG (32 b) Ta: 55 °C

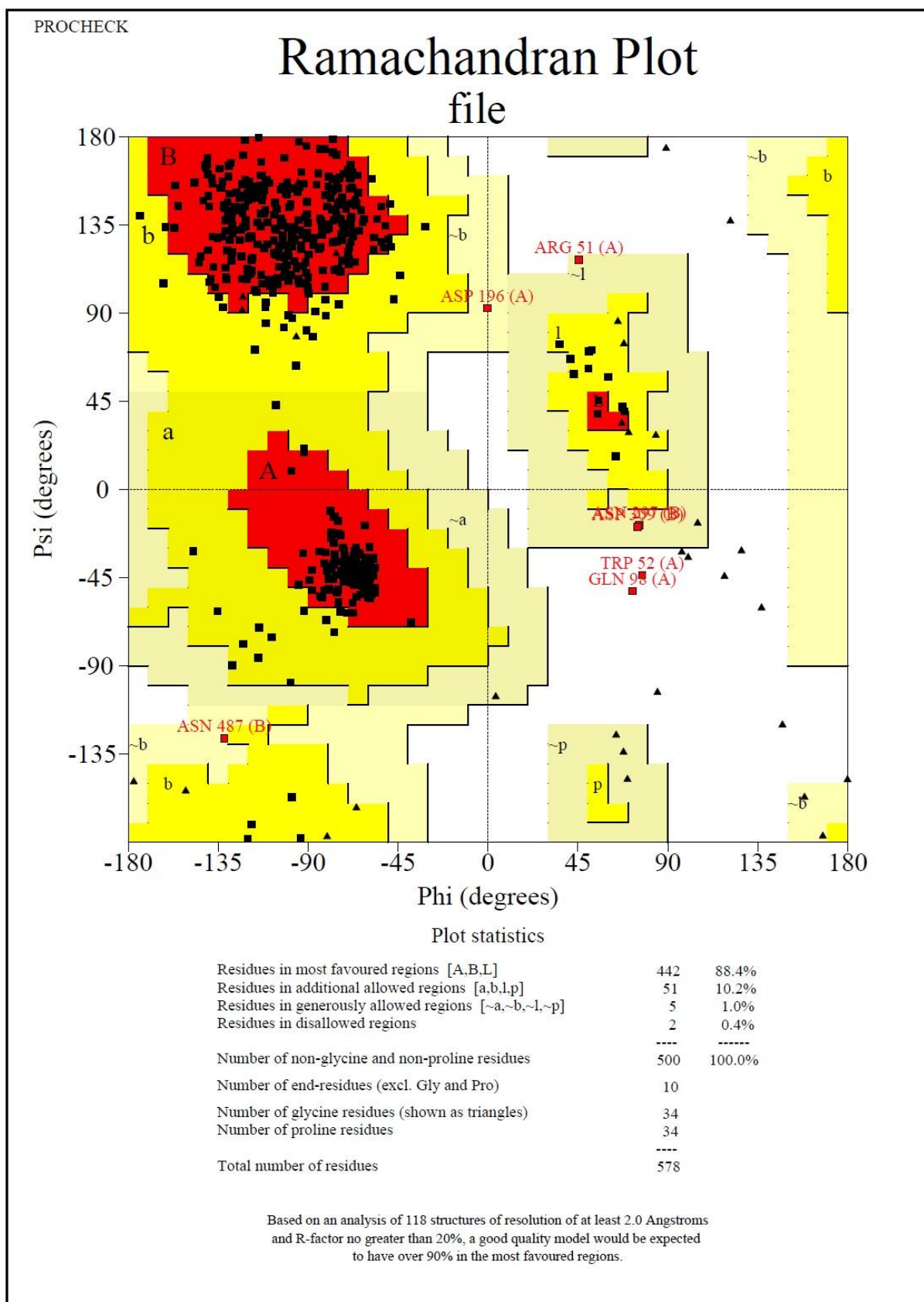
Primers para a obtenção do duplo mutante **C167A C295A** usando como molde a construção pCold-BmPPase **C295A**. O códon sublinhado faz referência à alanina.

For (C167A): GATGACAAGACCAACGCGAAGGGAGACAACGAC (33 b) Ta: 55 °C

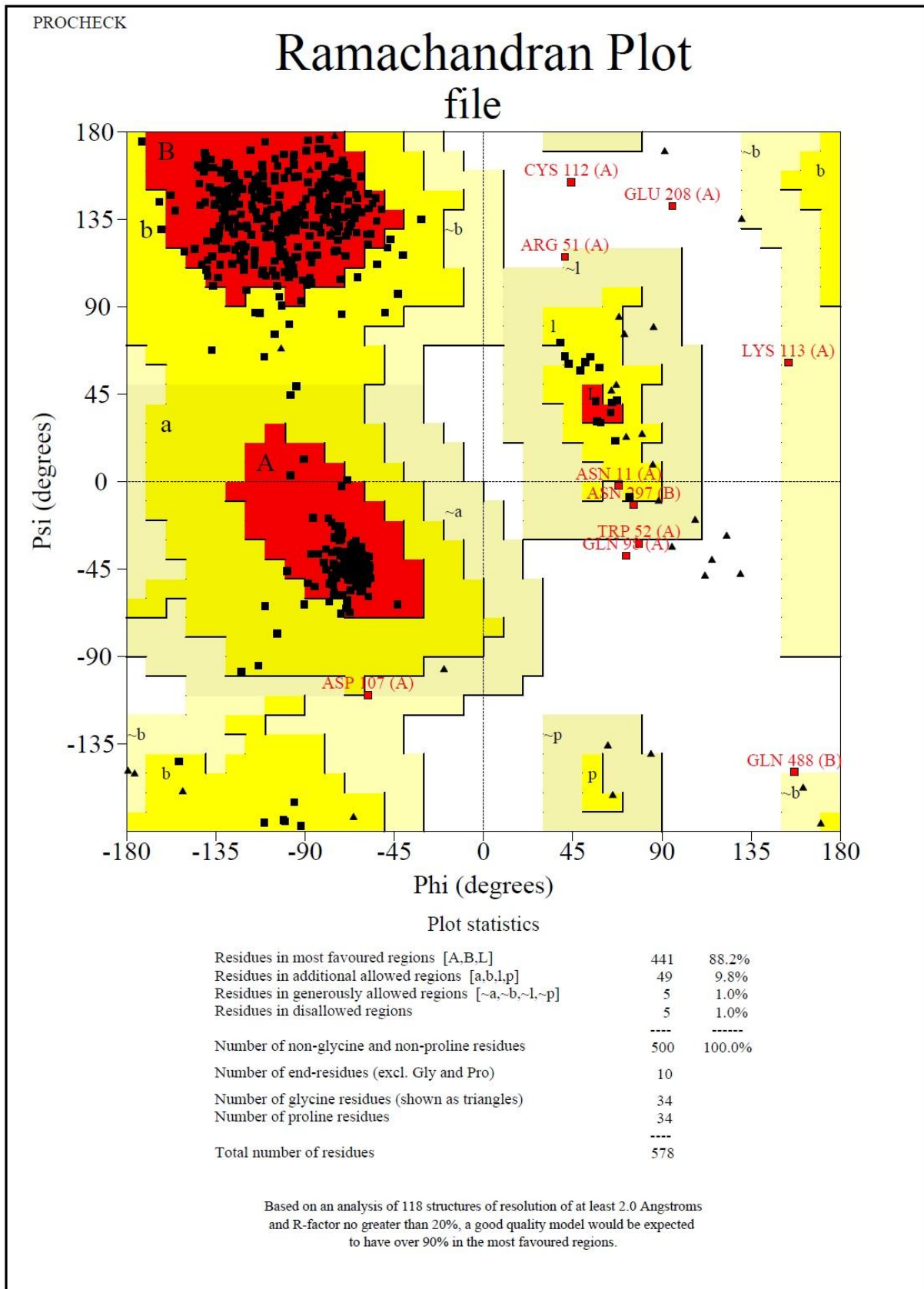
Rev (C167A): GTCGTTGTCTCCCTTGCGTTGGTCTTGTCATC (33 b) Ta: 55 °C

ANEXO 4: Gráficos estatísticos de Ramachandran obtidos pelo PDBsum.

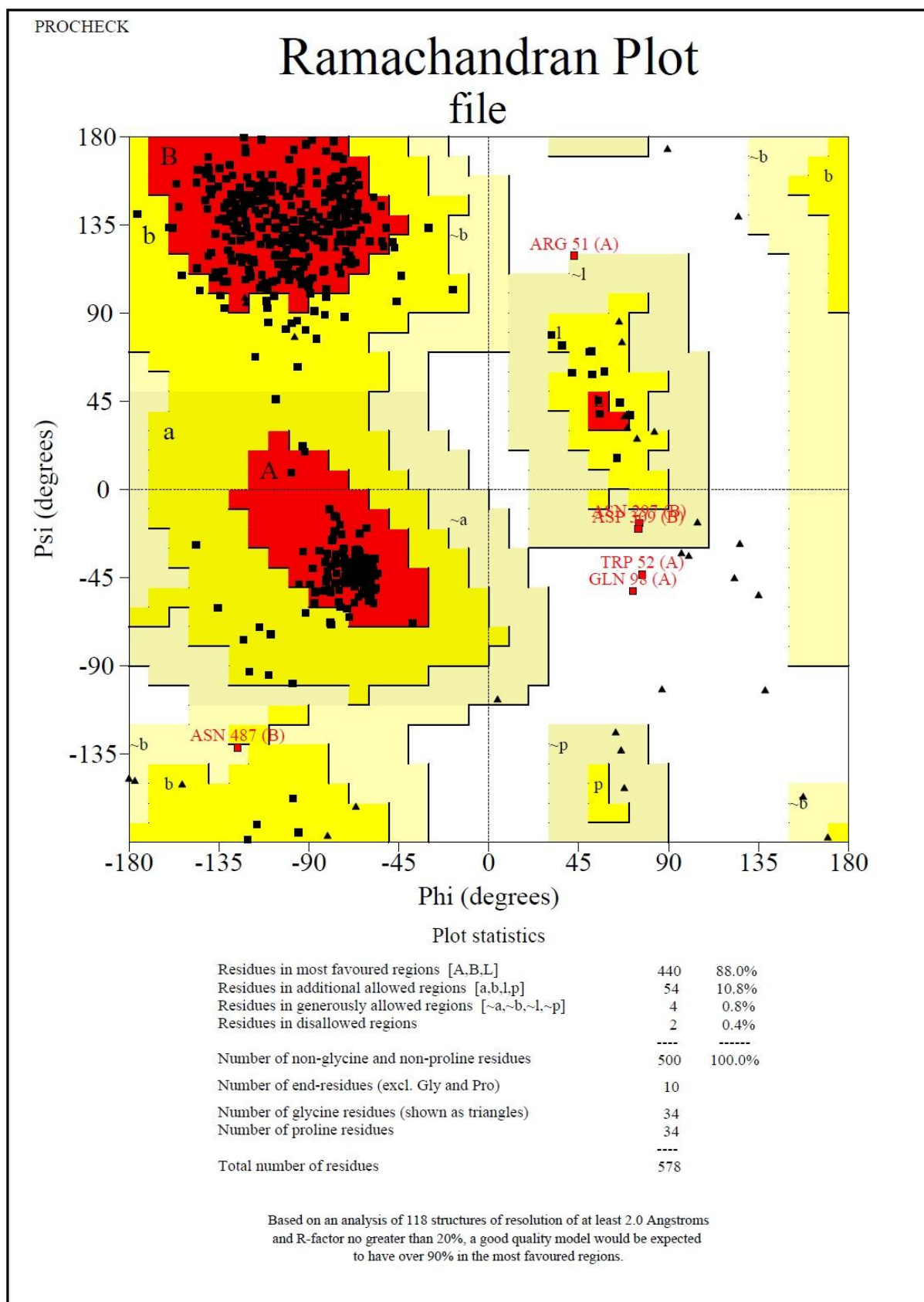
1º) BmPPase wt reduzida;



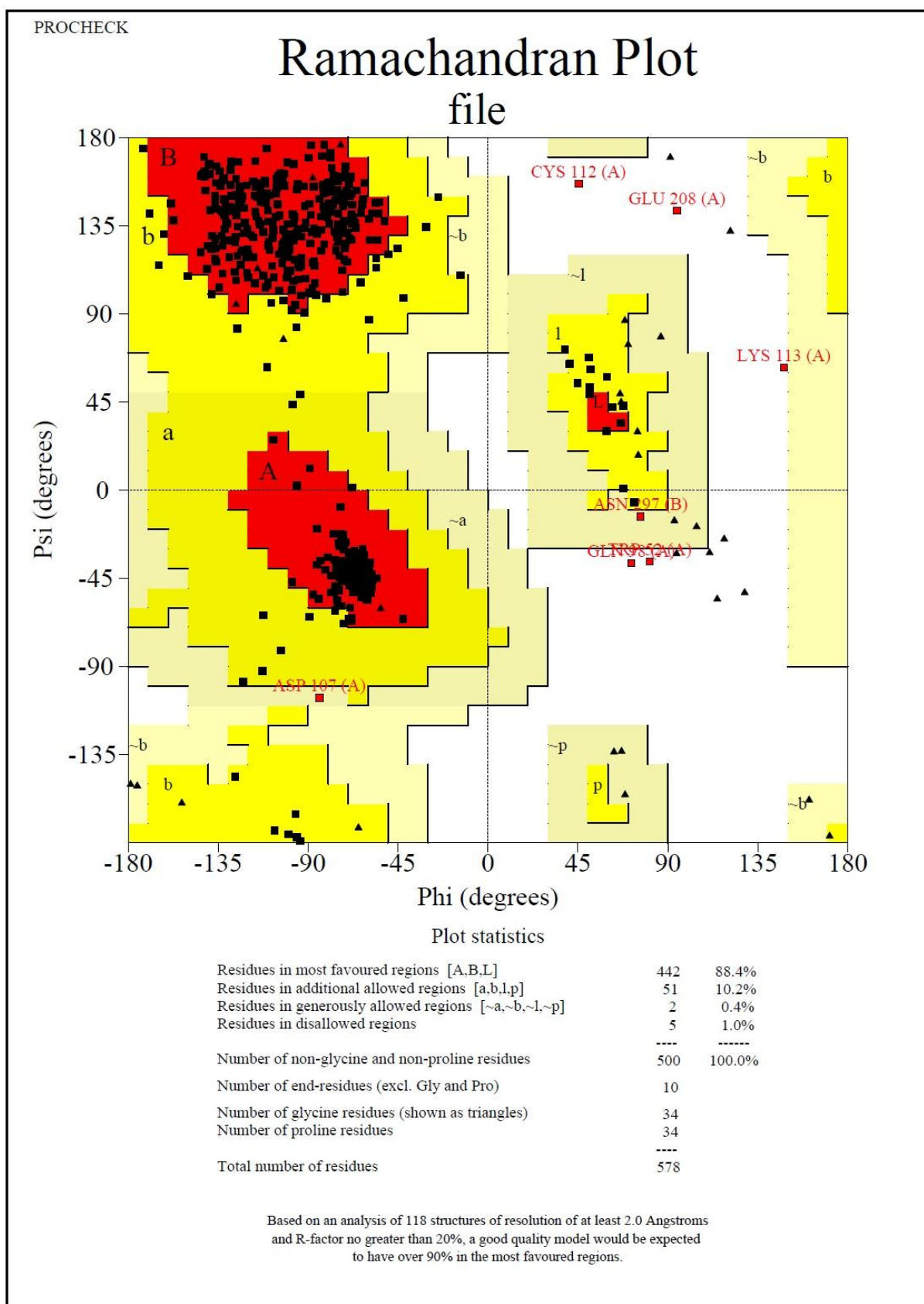
2º) BmPPase wt oxidada;



3º) BmPPase C339A reduzida;



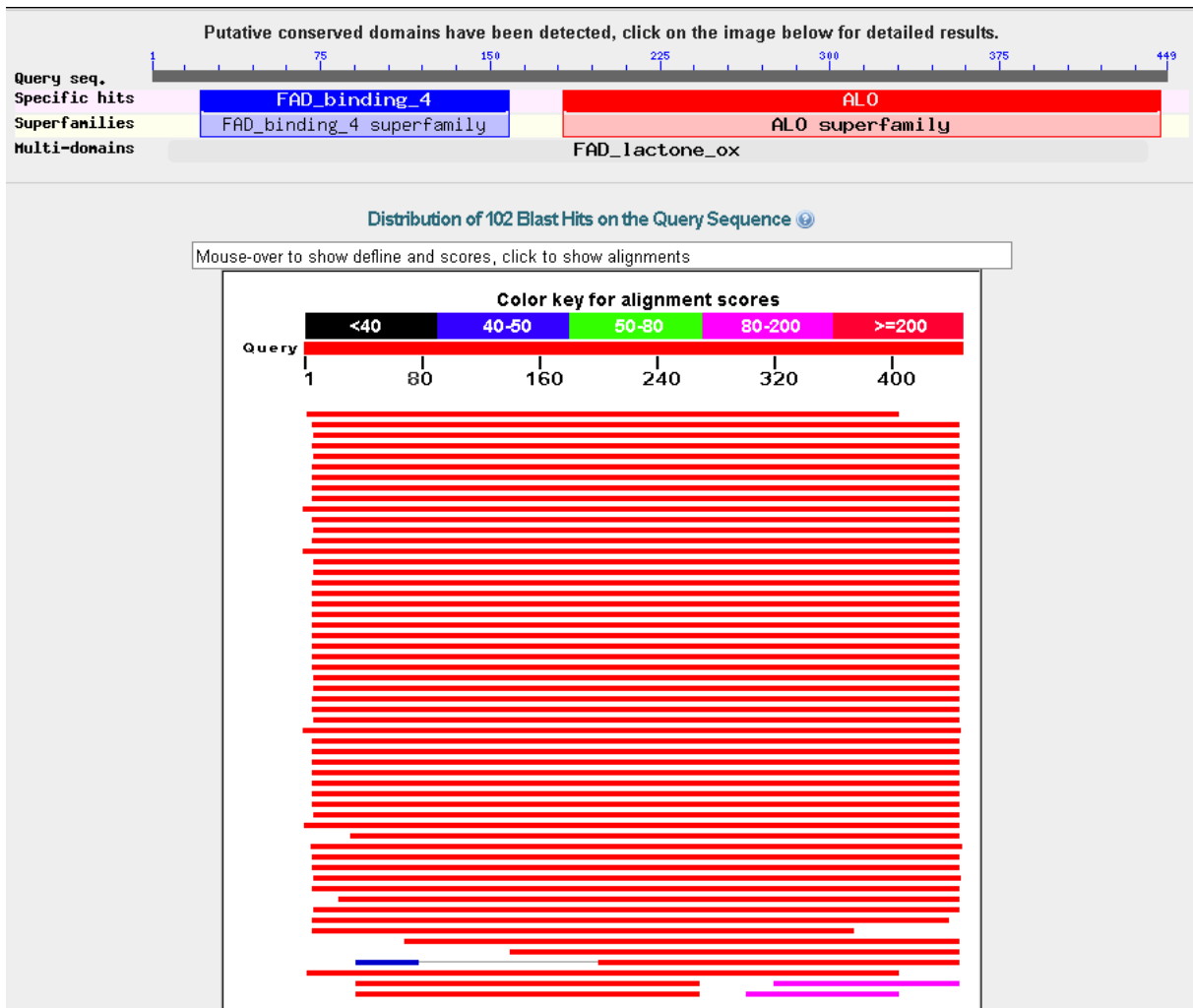
4º) BmPPase C339A oxidada;



ANEXO 5: Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da D-arabinono-1,4-lactona oxidase do *Rhipicephalus microplus* (TIGR gene index)

```
>TC24559 TC7557
CTTATCCACCGCTTCGAGCTGTGGCCTTGCAACGTTAGAGGAAAACACTGAACGTAGCCGCTGCCTCGTAGCCAAGAACG
ATCCCTCGCTATCGTTTGCTCCAGCCTCAAGGGTATCACGTTTCGAGAATTGGTCCAAGACATTTAGTTGCAAGCCTGAGT
ACTTCTTCGAACCCAAAAATCAGGATGAGCTACTCGAGGCTTGGATTTCGCCCCGACAACGCGGAAGAAAGTTCGAGTG
GTTGGTGGCGGCTTCTCGCGTCGGACATCGCATGCACGCGGAAGTGTGGTTCAGCATGTTGCAGCTCAACAAAGTCCT
GAAGGTGGATGAGGCGACTGCAACTGTGAAGGCTGAAGCTGGCGTCACATTA AAAAGACTGAATGAAGTGGAGCTCGCTC
AAAATGGCCTTGCTTTTATGAGTCTAGCTGCTCTTTCTGACATAACTGTTGGTGGGGCCATTGCCACTGGTGTCCATGGT
TCTGGCATCCACCATGGGATATTTTCAACACAGGTTCTGGAGCTTGGAGCTCATCACAGCAATGGCGAGAGGCTCCGCTG
CTCAAAGTCGGAGAATGAAGAAGTCTTTTCGAGCAGCCTGTTGTGGCTTGGGCTCGATCGGCATGTGCTTACAGCTACAG
TGCAGTGTGTCCAGCTTTCAGACTGCTAGAGACGCGATACTCACGTCCCTTGCAGGAGGTTCTAGAAAATTTGGATGTG
CATCTGCAGAGTTCAGAGCATTTTCGTTGCTTGTGGTATCCACACACGGACTCTGCGGTATGCTTTCATTTGGCAAGCAC
AAAGGACGAGATAACAAAGCCATCATTTTCGCGAAGCTCTCTACTACTGGTTTGTGGATTATGCTTTGGGTACTATGTCA
TGGAGTTTCTACTCTATCTTAGTACATGGTTTCTTCTCGGGTTCATGGCTCAATGAGCTGTTTCTCAACATAGTCTTT
GCACCACAACGCCGAAGGGTGGATTTGAGTTACCGTGTATTCAACTATGAATGCAGATTCAAGCAACATGTCAATGAATG
GTCCATTCGAAGAGAGAACACTGCCCTCGCACTGTGTAAGCTGAAGGAGTGGATCGACAACACTCCAGGTGTTTACGTGC
ACATACCTGTGGAAGTTCGTTTGTCCAAGCCGACGACATTTACCTGAGCCCTGCTTTTGGTGGGACAGGTGCTACATC
AACGTCATCATGTACAGGCCTTATGGAAAAAAGTGCCTTATGAGCATTATTTGGGCTGTTTATGAGAAAATCATGAAAAG
TTTTGGTGGTTCGACCTCACTGGGCTAAGGATTACGATGCAACTTCAAAGGAGCTCCGAGGGATGATACCCTAACTTCAGTA
AGTGGTGTCCATTTCGCGAGAAGTTGGACCCCAAGGCATGTTCTTGAATCCTTACATGGAAGAGTCCGCGCTCATGCA
AAGTAGTGTGGGGCCACGTGATGGACATTCAGTGACCTTGATACTAGGATGATTGTGATGTTTTTTTTTTGTTAAGCAG
TAGACCGTATAGTTGTGGCACGCGGAAGAAGCTGTGTACGGGTGATTTGTGTAATAAT
```

```
>TC24559 ORF 91..1440 frame +1 [Boophilus microplus] TIGR 448 aa
MVCSSLKGITFENWSKTFCKPEYFFEPKNQDELLEVLDFARQKGVVVGAGFSPSDIACPEVMVMSMLQLNKVLKVD
EATATVKAEGVTLKRLNEVELAQNGLAFMSLAALSDITVGGAIATGVHSGIHHGIFSTQVLELELITSNGERLRCSKS
ENEEVFRAACCGLSIGIVVATVQCVPAFRLLLETRYSRPLQEVLENLDVHLQSSEHFRCLWYPHTDSAVCFHLASTKDE
ITKPSFREALLYWFVDYAFGYVMEFLLYLSTWFPWPWLNLFLNIVFAPQRRRVDLSYRVFNIECRFKQHVNEWSIP
RENTALALCKLKEWIDNTPGVYVHIPVEVRFVQADDIYLSPAFGRDRCYINVIMYRYPYKVPYEHYWAYVEKIMKSF
RPHWAKDYDATSKELRGMYPNFTKWCAIREKLDPQGMFLNPYMERVLGS*
```



Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenPept](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [Multiple alignment](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> D-arabinono-1, 4-lactone oxidase, putative [Ixodes scapularis] >abi EEC00808.1 D-arabinono-1, 4-lactone oxidase, putative [Ixodes scapularis]	569	569	89%	0.0	68%	XP_002402387.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: L-gulonolactone oxidase-like [Ovis aries]	492	492	98%	3e-169	51%	XP_004004204.1
<input type="checkbox"/> L-gulono-gamma-lactone oxidase [Mauremys reevesii]	492	492	97%	3e-169	53%	AET14635.1
<input type="checkbox"/> L-gulono-gamma-lactone oxidase [Pelodiscus sinensis]	489	489	98%	3e-168	52%	AET14634.1
<input type="checkbox"/> L-gulono-gamma-lactone oxidase [Trachemys scripta]	489	489	97%	4e-168	53%	AET14636.1
<input type="checkbox"/> L-gulonolactone oxidase [Bos taurus] >sp Q3ZC33.3 GGLO_BOVIN RecName: Full=L-gulonolactone oxidase; Short=LGO; AltName: Full=L-gulono-gam	487	487	98%	2e-167	51%	NP_001029215.1
<input type="checkbox"/> L-gulonolactone oxidase [Sus scrofa] >sp Q8HW0.3 GGLO_PIG RecName: Full=L-gulonolactone oxidase; Short=LGO; AltName: Full=L-gulono-gamm	486	486	98%	8e-167	52%	NP_001123420.1
<input type="checkbox"/> L-gulonolactone oxidase [Mus musculus] >sp P58710.3 GGLO_MOUSE RecName: Full=L-gulonolactone oxidase; Short=LGO; AltName: Full=L-gulono-	484	484	98%	3e-166	51%	NP_848882.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: L-gulonolactone oxidase-like [Otolemur garnettii]	488	488	98%	7e-166	52%	XP_003794067.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: L-gulonolactone oxidase-like [Trichechus manatus latirostris]	484	484	98%	9e-166	50%	XP_004382277.1
<input type="checkbox"/> Gulonolactone (L-) oxidase [Mus musculus]	483	483	98%	1e-165	51%	AAH28822.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: L-gulonolactone oxidase-like [Meleagris gallopavo]	482	482	97%	2e-165	50%	XP_003204615.1
<input type="checkbox"/> Gulonolactone (L-) oxidase [Mus musculus]	482	482	98%	2e-165	51%	AAH19856.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: L-gulonolactone oxidase-like [Loxodonta africana]	482	482	99%	9e-165	50%	XP_003412410.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: L-gulonolactone oxidase-like [Gallus gallus]	480	480	97%	1e-164	50%	XP_001234314.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: L-gulonolactone oxidase-like [Ornithorhynchus anatinus]	486	486	97%	2e-164	51%	XP_001521601.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: L-gulonolactone oxidase-like [Orvictolagus cuniculus]	481	481	98%	2e-164	51%	XP_002709350.1
<input type="checkbox"/> L-gulono-gamma-lactone oxidase [Rousettus leschenaultii]	479	479	98%	2e-164	51%	ADP88813.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: L-gulonolactone oxidase-like [Odobenus rosmarus divergens]	479	479	98%	3e-164	50%	XP_004411725.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: L-gulonolactone oxidase-like [Orcinus orca]	479	479	98%	4e-164	51%	XP_004270744.1
<input type="checkbox"/> L-gulono-gamma-lactone oxidase [Hipposideros armiger]	478	478	98%	8e-164	51%	ADP88814.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: L-gulonolactone oxidase-like [Sarcophilus harrisii]	479	479	98%	1e-163	50%	XP_003758918.1

Tabela 1. Relação (%) entre a identidade sequencial das D-arabinono-1,4-lactona oxidases de carrapato, de levedura e da L-gulono-1,4-lactona oxidase de *Bos taurus* e de *Mus musculus*.

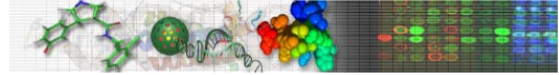
Espécies	<i>B. microplu</i> <i>s</i>	<i>R. appendiculatu</i> <i>s</i>	<i>I. scapulari</i> <i>s</i>	<i>M. musculu</i> <i>s</i>	<i>B. taurus</i> <i>s</i>	<i>S. cerevisia</i> <i>e</i>
<i>B. microplus</i>	100	69,4	61,2	50,1	49,8	25,9
<i>R. appendiculatus</i>	69,4	100	44,4	38,4	38,4	18,2
<i>I. scapularis</i>	61,2	44,4	100	44,2	44,2	22,9
<i>M. musculus</i>	50,1	38,4	44,2	100	92,2	22,9
<i>B. taurus</i>	49,8	38,4	44,2	92,2	100	23,1
<i>S. cerevisiae</i>	25,9	18,2	22,9	22,9	23,1	100

Códigos de acesso: *Boophilus microplus* (TC24559), *Rhipicephalus appendiculatus* (TC7614), *Ixodes scapularis* (ISCW015963-RA), *Mus musculus* (AAH28828.1), *Bos taurus* (NP_001029215.1) e *Saccharomyces cerevisiae* (EDN64309.1).

ANEXO 6: Predição de sítios de fosforilação em resíduos de serina e tirosina



You are at: HPRD



- Query
- Browse
- Blast
- FAQs
- Download

PhosphoMotif Finder - Results

Your query protein contains 78 Serine kinase / phosphatase motifs described in the literature and are underlined below.

MLWQGVIGITVLLIATQVPLAWEPALEMLSHVGIFTTGLLRGAPRLGYNSATMAFSTVERGCPNTMSYQMYFRKGDKYISPFHDI~~PMFADEANNIY~~NMVVVPRWINA
~~K~~EMNTKEPLNFIQDIKKLRVNCFFRHGVINYGAIPTWEDPNHVDDKTNCRGDNDPIDICEIGRVAKRGEVIQVKLGVVALVDEGETDWKLLAIDVNDELA
~~K~~DLNDVGDIERHMPGLLKATTEWFRIVKIPDGKPENQFANGEARNKEFARKVIAETHEFWKALVQRSDTSPLNCSTTVHTGSPHISDDEATSIVNSTPELGSDAGRDD
~~M~~KHWHVCLK

Sort by Position in query protein

- Human Proteinpedia
- Pathways
- PhosphoMotif Finder
- Browse a Molecule Authority

PhosphoMotif

	Position in query protein	Sequence in query protein	Corresponding motif described in the literature (phosphorylated residues in red)	Features of motif described in the literature	Link to original article describing the motif
1	27 - 30	EMLS	[E/D]XX[<u>ps/pT</u>]	Casein Kinase I substrate motif	PublQ _{ed}
2	32 - 37	VGKIFT	[M/I/L/V]X[R/K]XX[<u>ps/pT</u>]	Chk1 kinase substrate motif	PublQ _{ed}
3	32 - 39	VGKIFTTG	[M/V/L/I/F]X[R/K]XX[<u>ps/pT</u>]XX	Calmodulin-dependent protein kinase II substrate motif	PublQ _{ed}
4	34 - 37	KIFT	KXX[<u>ps/pT</u>]	PKA kinase substrate motif	PublQ _{ed}
5	34 - 37	KIFT	[R/K]XX[<u>ps/pT</u>]	PKC kinase substrate motif	PublQ _{ed}
6	34 - 38	KIFTT	KXXX[<u>ps/pT</u>]	PKA kinase substrate motif	PublQ _{ed}
7	51 - 56	NSATMA	X[<u>ps/pT</u>]XXX[A/P/S/T]	G protein-coupled receptor kinase 1 substrate motif	PublQ _{ed}
8	52 - 54	SAT	pSX[E/ <u>ps*</u> / <u>pt*</u>]	Casein Kinase II substrate motif	PublQ _{ed}
9	58 - 61	STVE	pSX[E/D]	Casein kinase II substrate motif	PublQ _{ed}
10	58 - 61	STVE	pSX[E/ <u>ps*</u> / <u>pt*</u>]	Casein Kinase II substrate motif	PublQ _{ed}
11	58 - 61	STVE	[<u>ps/pT</u>]XX[E/D]	Casein Kinase II substrate motif	PublQ _{ed}
12	58 - 61	STVE	[<u>ps/pT</u>]XX[E/D/ <u>ps*</u> / <u>py*</u>]	Casein Kinase II substrate motif	PublQ _{ed}
13	58 - 61	STVE	[<u>ps/pT</u>]XX[E/D]	Casein Kinase II substrate motif	PublQ _{ed}
14	67 - 70	TMSY	[<u>ps/pT</u>]XX[E/D/ <u>ps*</u> / <u>py*</u>]	Casein Kinase II substrate motif	PublQ _{ed}
15	79 - 82	KYIS	KXX[<u>ps/pT</u>]	PKA kinase substrate motif	PublQ _{ed}
16	79 - 82	KYIS	[R/K]XX[<u>ps/pT</u>]	PKC kinase substrate motif	PublQ _{ed}
17	80 - 83	YISP	XXpSP	GSK-3, ERK1, ERK2, CDK5 substrate motif	PublQ _{ed}
18	81 - 83	ISP	X[<u>ps/pT</u>]P	GSK-3, ERK1, ERK2, CDK5 substrate motif	PublQ _{ed}
19	82 - 83	SP	pSP	ERK1, ERK2 Kinase substrate motif	PublQ _{ed}
20	106 - 108	RWT	[R/K]X[<u>ps/pT</u>]	PKA kinase substrate motif	PublQ _{ed}
21	106 - 108	RWT	[R/K]X[<u>ps/pT</u>]	PKC kinase substrate motif	PublQ _{ed}
22	113 - 116	EMNT	[E/D]XX[<u>ps/pT</u>]	Casein Kinase I substrate motif	PublQ _{ed}
23	153 - 158	QTWEDP	X[<u>ps/pT</u>]XXX[A/P/S/T]	G protein-coupled receptor kinase 1 substrate motif	PublQ _{ed}
24	154 - 157	TWED	[<u>ps/pT</u>]XX[E/D]	Casein Kinase II substrate motif	PublQ _{ed}
25	154 - 157	TWED	[<u>ps/pT</u>]XX[E/D/ <u>ps*</u> / <u>py*</u>]	Casein Kinase II substrate motif	PublQ _{ed}
26	154 - 157	TWED	[<u>ps/pT</u>]XX[E/D]	Casein Kinase II substrate motif	PublQ _{ed}
27	162 - 165	DDKT	[E/D]XX[<u>ps/pT</u>]	Casein Kinase I substrate motif	PublQ _{ed}
28	203 - 206	EGET	[E/D]XX[<u>ps/pT</u>]	Casein Kinase I substrate motif	PublQ _{ed}
29	205 - 209	ETDWK	[E/D][<u>ps/pT</u>]XXX	b-Adrenergic Receptor kinase substrate motif	PublQ _{ed}
30	236 - 241	LLKATT	[M/I/L/V]X[R/K]XX[<u>ps/pT</u>]	Chk1 kinase substrate motif	PublQ _{ed}
31	236 - 243	LLKATTEW	[M/V/L/I/F]X[R/K]XX[<u>ps/pT</u>]XX	Calmodulin-dependent protein kinase II substrate motif	PublQ _{ed}
32	238 - 240	KAT	[R/K]X[<u>ps/pT</u>]	PKA kinase substrate motif	PublQ _{ed}
33	238 - 240	KAT	[R/K]X[<u>ps/pT</u>]	PKC kinase substrate motif	PublQ _{ed}
34	238 - 241	KATT	KXX[<u>ps/pT</u>]	PKA kinase substrate motif	PublQ _{ed}
35	238 - 241	KAITT	[R/K]XX[<u>ps/pT</u>]	PKC kinase substrate motif	PublQ _{ed}
36	239 - 242	ATTE	XX[<u>ps/pT</u>]E	G protein-coupled receptor kinase 1 substrate motif	PublQ _{ed}
37	276 - 280	ETHEF	[E/D][<u>ps/pT</u>]XXX	b-Adrenergic Receptor kinase substrate motif	PublQ _{ed}
38	285 - 290	VQRSOT	[M/I/L/V]X[R/K]XX[<u>ps/pT</u>]	Chk1 kinase substrate motif	PublQ _{ed}
39	285 - 290	VQRSOT	[M/I/L/V/F]XRX[<u>ps/pT</u>]	Calmodulin-dependent protein kinase IV substrate motif	PublQ _{ed}
40	285 - 292	VQRSOTSP	[M/V/L/I/F]X[R/K]XX[<u>ps/pT</u>]XX	Calmodulin-dependent protein kinase II substrate motif	PublQ _{ed}
41	287 - 290	RSOT	RXX[<u>ps/pT</u>]	Calmodulin-dependent protein kinase II substrate motif	PublQ _{ed}
42	287 - 290	RSOT	[R/K]XX[<u>ps/pT</u>]	PKC kinase substrate motif	PublQ _{ed}
43	287 - 292	RSOTSP	X[<u>ps/pT</u>]XXX[A/P/S/T]	G protein-coupled receptor kinase 1 substrate motif	PublQ _{ed}
44	288 - 290	SDT	pSX[E/ <u>ps*</u> / <u>pt*</u>]	Casein Kinase II substrate motif	PublQ _{ed}
45	288 - 291	SDTS	[<u>ps/pT</u>]X[S/T]	Casein Kinase I substrate motif	PublQ _{ed}
46	288 - 291	SDTS	pSX[E/ <u>ps*</u> / <u>pt*</u>]	Casein Kinase II substrate motif	PublQ _{ed}
47	288 - 291	SDTS	[<u>ps/pT</u>]XX[E/D/ <u>ps*</u> / <u>py*</u>]	Casein Kinase II substrate motif	PublQ _{ed}
48	289 - 292	DTSP	XXpSP	GSK-3, ERK1, ERK2, CDK5 substrate motif	PublQ _{ed}
49	289 - 293	DTSP	[E/D][<u>ps/pT</u>]XXX	b-Adrenergic Receptor kinase substrate motif	PublQ _{ed}
50	290 - 292	TSP	X[<u>ps/pT</u>]P	GSK-3, ERK1, ERK2, CDK5 substrate motif	PublQ _{ed}
51	291 - 292	SP	pSP	ERK1, ERK2 Kinase substrate motif	PublQ _{ed}
52	296 - 298	STT	pSX[E/ <u>ps*</u> / <u>pt*</u>]	Casein Kinase II substrate motif	PublQ _{ed}
53	296 - 301	STTVHT	X[<u>ps/pT</u>]XXX[A/P/S/T]	G protein-coupled receptor kinase 1 substrate motif	PublQ _{ed}
54	298 - 301	TVHT	[<u>ps/pT</u>]XX[S/T]	Casein Kinase I substrate motif	PublQ _{ed}
55	299 - 307	VHTGSPHHI	[M/L/V/I/F]X[R/K/H]XXSXXX[M/L/V/I/F]	HMGCoA Reductase kinase substrate motif	PublQ _{ed}
56	299 - 307	VHTGSPHHI	[M/V/L/I/F]X[R/K/H]XX[<u>ps/pT</u>]XXX[M/V/L/I/F]	AMP-activated protein kinase substrate motif	PublQ _{ed}
57	301 - 304	TGSP	XXpSP	GSK-3, ERK1, ERK2, CDK5 substrate motif	PublQ _{ed}
58	302 - 304	GSP	X[<u>ps/pT</u>]P	GSK-3, ERK1, ERK2, CDK5 substrate motif	PublQ _{ed}
59	303 - 304	SP	pSP	ERK1, ERK2 Kinase substrate motif	PublQ _{ed}
60	307 - 312	ISDDEA	X[<u>ps/pT</u>]XXX[A/P/S/T]	G protein-coupled receptor kinase 1 substrate motif	PublQ _{ed}
61	308 - 311	SDDE	pSDXE	Casein kinase II substrate motif	PublQ _{ed}
62	308 - 311	SDDE	pSX[E/D]	Casein kinase II substrate motif	PublQ _{ed}
63	308 - 311	SDDE	pS[E/D][E/D][E/D]	Casein Kinase II substrate motif	PublQ _{ed}
64	308 - 311	SDDE	pSX[E/ <u>ps*</u> / <u>pt*</u>]	Casein Kinase II substrate motif	PublQ _{ed}

65	308 - 311	SDDE	[pS/pT]XX[E/D]	Casein Kinase II substrate motif	PubMed
66	308 - 311	SDDE	[pS/pT]XX[E/D/pS*/pY*]	Casein Kinase II substrate motif	PubMed
67	308 - 311	SDDE	[pS/pT]XX[E/D]	Casein Kinase II substrate motif	PubMed
68	310 - 313	DEAT	[E/D]XX[pS/pT]	Casein Kinase I substrate motif	PubMed
69	313 - 318	TSIVNS	X[pS/pT]XXX[A/P/S/T]	G protein-coupled receptor kinase 1 substrate motif	PubMed
70	314 - 318	SIVNS	pSXXX[pS/pT]	MAPKAPK2 kinase substrate motif	PubMed
71	314 - 318	SIVNS	pSXXXpS*	GSK3 kinase substrate motif	PubMed
72	318 - 320	STP	X[pS/pT]P	GSK-3, ERK1, ERK2, CDK5 substrate motif	PubMed
73	318 - 321	STPE	pSXX[E/D]	Casein kinase II substrate motif	PubMed
74	318 - 321	STPE	pSXX[E/pS*/pT*]	Casein Kinase II substrate motif	PubMed
75	318 - 321	STPE	[pS/pT]XX[E/D]	Casein Kinase II substrate motif	PubMed
76	318 - 321	STPE	[pS/pT]XX[E/D/pS*/pY*]	Casein Kinase II substrate motif	PubMed
77	318 - 321	STPE	[pS/pT]XX[E/D]	Casein Kinase II substrate motif	PubMed
78	321 - 324	ELGS	[E/D]XX[pS/pT]	Casein Kinase I substrate motif	PubMed

* indicates the residue that has to phosphorylated already for the enzyme to recognize the motif

Human Protein Reference Database

You are at: HPRD

- Query
- Browse
- Blast
- FAQs
- Download

PhosphoMotif Finder - Results

Your query protein contains 6 Tyrosine kinase / phosphatase motifs described in the literature and are underlined below.

MLWQGVIGITVLLIATQVPLAWEPALMSLVHGKIFTTGLLRGAPPRLGYNSATMAFSTVVERGCPNTMSYQMYFRKGDKYISPFHDIEMFADEANNIYNMVVEVPRWTNA
 KMEMNTRKPLNPIKQDIKKGKLRVYHNCFFPHHGYIWNYGAIPTWEDPNHVDDKTNCRGDNDDPIDI~~CEIGYR~~VAKRGEVIQVKILGVVALVDEGETDWKLLAIDVNDPLA
 KDLNDVVDGIEKHMPGLLKATEWFRIYKIPDGKPENOQAFNGEAKNKEPAEKVIAETHEFWKALVQRSDTSPLNCSSTTVHTGSPHRISDDEATSIVNSTPELGS DAGRDD
 IVDKWHFVCLK

Sort by Position in query protein

PhosphoMotif

	Position in query protein	Sequence in query protein	Corresponding motif described in the literature (phosphorylated residues in red)	Features of motif described in the literature	Link to original article describing the motif
1	78 - 80	DKY	[E/D]XpY	SHP1 phosphatase substrate motif	PubMed
2	98 - 101	YNMV	pYXX[L/I/V]	JAK2 kinase substrate motif	PubMed
3	134 - 139	YVHNCF	pYXXXX[F/Y]	ALK kinase substrate motif	PubMed
4	148 - 149	YG	pY[A/G/S/T/E/D]	Src kinase substrate motif	PubMed
5	148 - 151	YGAI	pYXX[L/I/V]	JAK2 kinase substrate motif	PubMed
6	178 - 181	EIGY	[E/D]XXpY	ALK kinase substrate motif	PubMed

Please send any questions or comments about the Human Protein Reference Database to [help](#)

Copyright © Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics.

This is a joint project between:

