

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

Gustavo Monteiro Silva

Estudo e caracterização do processo de glutatilação e desglutatilação da unidade 20S do proteassomo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*: Implicações na regulação do metabolismo redox intracelular e na geração de peptídeos

São Paulo
2010

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

Gustavo Monteiro Silva

Estudo e caracterização do processo de glutatilação e desglutatilação da unidade 20S do proteassomo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*: Implicações na regulação do metabolismo redox intracelular e na geração de peptídeos

Study and characterization of the S-glutathiolation and deglutathiolation of the 20S proteasome core from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Implications for the intracellular redox metabolism and peptide generation.

São Paulo
2010

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

Gustavo Monteiro Silva

Estudo e caracterização do processo de glutatiolção e desglutatiolção da unidade 20S do proteassomo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*: Implicações na regulação do metabolismo redox intracelular e na geração de peptídeos

Study and characterization of the S-glutathiolation and deglutathiolation of the 20S proteasome core from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Implications on the intracellular redox metabolism and on peptide generation.

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Biologia-Genética.

Orientador:

Dr. Luis Eduardo Soares Netto
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva
Instituto de Biociências
Universidade de São Paulo

Co-orientador:

Dra. Marilene Demasi
Laboratório de Bioquímica e Biofísica
Instituto Butantan

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica

Silva, Gustavo Monteiro

“Estudo e caracterização do processo de glutatilação e desglutatilação da unidade 20S do proteassomo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*: Implicações na regulação do metabolismo redox intracelular e na geração de peptídeos.”

159 páginas

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

1. Proteassomo; 2. Glutatilação; 3. Metabolismo Redox; 4. Proteólise
I. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Marcelo D. Gomes (FMRP-USP)

Prof. Dr. Fabio C. Gozzo (IQ-Unicamp)

Prof. Dr. Francisco R. M. Laurindo (FM-USP)

Prof. Dr. Mario H. Barros (ICB-USP)

Prof. Dra. Marilene Demasi (Instituto Butantan)
Presidente

À minha mãe,
A quem devo tudo.

“A morte da interpretação é o crer que há símbolos que existem primariamente, originalmente, realmente como marcas coerentes, pertinentes e sistemáticas. A vida da interpretação, pelo contrário, é o crer que não há mais do que interpretações.”

Michel Foucault

Nietzsche, Freud e Marx/TheatrumPhilosoficum

“Tudo pode ser recriado, se acharmos que assim deve ser...”

Jurandir Freire Costa

Sem Fraude Nem Favor (1998)

Agradecimentos

À Dra. Marilene Demasi, primeiramente pela oportunidade, orientação e confiança no meu trabalho. Seu profissionalismo e sua dedicação à ciência deixaram aprendizados que carregarei por toda a vida.

Ao professor Dr. Luis Eduardo Soares Netto por seu apoio e conselhos durante todo este período. Sua competência e afabilidade inspiram a todos que almejam tornarem-se grandes cientistas.

À FAPESP e ao CNPq pelo indispensável auxílio financeiro para realização deste projeto.

À Dra. Mari Sogayar pela disponibilização irrestrita de seu laboratório e ao Dr. Marcos Demasi por toda paciência e atenção nos ensinamentos da arte dos géis 2D. A ajuda de vocês foi de outra dimensão.

Ao Dr. Fábio Cesar Gozzo e aos demais integrantes do lab. Dalton. Em especial ao Luiz Fernando Santos e ao Dr. Eduardo Pilau por serem tão prestativos e atenciosos, sempre dispostos a tirar minhas infinitas dúvidas sobre espectrometria. A colaboração de vocês além de essencial foi muito massa!

Ao Dr. Daniel Carvalho Pimenta e a Clécio Klitzke pela ajuda e discussões sobre Maldis e ToFs.

À Dra. Sylvia Carneiro e à Simone do laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, por me auxiliarem na visualização do grande proteossomo por microscopia eletrônica.

À Dra. Adriana Rios Lopes pelas diversas discussões sobre catálise e cinética enzimática.

Aos doutores Ana Marisa Chudzinski Tavassi, Ana Olivia de Souza e Ivo Lebrun, pela disponibilização de equipamentos e materiais necessários a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Paolo Di Mascio e as técnicas de seu laboratório Fernanda Prado e Isaura Toma pela ajuda nos ensaios iniciais de espectrometria de massa.

À Dra. Karen Discola, senhora Grx, por toda a ajuda e companhia agradável no lab, congressos e afins. E ainda por ter me apresentado o Mr. Ray, que deixou minha tese muito mais linda!

Às alunas que participaram e darão prosseguimento a esse projeto. À Daniéélee Silva figuraça, que implementou o 19S (apesar de multiplicar as concentrações do gel nativo) e instaurou a sessão comédia do lab na hora do café e à Vanessa Simões (Oaa Boi!), pela companhia nos dias de Unicamp, pelo trabalho nas férias e que apesar de só saber fazer contas com fósforos, revisou cuidadosamente este manuscrito.

Ao agora Doutor e antes de tudo mais que irmão Zézinho Renato Cussioli, por além da Ohr, todos os anos de convivência, amizade, abrigo, gargalhadas, discussões, shishas, trocadilhos, voltas ao mundo, baladas... Lou, ainda temos que colocar nosso plano caipira em ação!

Aos amigos do Butantan por tornarem tão agradáveis os meus dias de trabalho. Aos nossos amigos Bob e Gilberto ao mesmo tempo pelo bom humor e amizade; a Paty Gabi por sua simpatia matinal, infinitas companhias de almoço e por manter o bom andamento do lab; ao Adrian (Vai Adriaanoooo!), o filósofo tricolor mais prestativo que já conheci e ao Chiquinho, o aluno de ouro.

Sem esquecer os ex-técnicos Beatriz e Angelino que sempre colaboraram e ajudaram incondicionalmente.

À Prof. Dra. Gisele Monteiro (maMÃÃE!) por todos os ensinamentos, paciência e horas infinitas de risadas. Espelho-me e quero ser como você quando crescer, mas sem dedar os outros.

Ao Dr. Bruno Gato Horta e ao Thithi Alegria, pelas conversas, pelo companheirismo, amizade e “carinho”. Amigos que quero ter por toda vida.

Aos amigos e colegas do IB-USP da turma antiga (Andressa, Aninha, Camila, Dani, Mirian, Prof. Marcão, Rafael, Roberta, Six, Suzy, Telma e Viiiictor) e da nova (Aline, Daiane, Eduardo, Gabriel, Lucas Mica 5', Marcella ForestGump e Tati).

Aos amigos do lab. de Bioquímica e às funcionárias mais legais do Instituto Butantan, Patrícia, Silvana, Toninha e Val, sempre dispostas a ajudar no que fosse preciso e por aquele cafezinho no meio da tarde pra acordar!

À turma OON da Bio que me proporcionou a companhia mais agradável que uma classe poderia dar ao longo dessa década. E a todos os amigos que fiz ao longo da vida acadêmica. Em especial à Beka, minha filhota querida. Adoro todos vocês e Paulo.

Às famílias JogaNoPagode e Biosal, times de futebol da Biologia USP, pelos campeonatos que disputei, medalhas que ganhei, amigos que fiz e gols que perdi... Inesquecível!

Aos amigos de sempre, que me ensinaram o verdadeiro valor de uma amizade. Tranka, Bitch, Hector Fenômeno, Bonga, Zura, Fê, Gus, Lê Gordinho e Celso. Apesar de o contato ter diminuído, o sentimento se mantém inalterado e a consideração só aumenta.

Ao meu pai Carlos que apesar de não ser tão presente em minha vida, sei que torce muito pelo meu sucesso.

À trinca de tias mais legais que uma pessoa pode ter. Tia Célia, Tia Maísa (dinha), e Tia Vera, que junto com o Binho, Lauzinho e Tio Lau, viraram mais do que família. O apoio de vocês foi fundamental desde o começo de tudo.

Ao irmão que eu sempre tive, mas que só agora ganhei. Lê, é bom sentir e saber que agora eu tenho uma família (Valeu Max cunhadinha, deu um jeito no caboclo). E ao seu professor e amigo Ajarn Petchpayao, que apesar de não me ensinar muay thai, cozinhou pratos deliciosos durante o período dedicado à escrita desta tese.

À minha querida Bi, por todos esses anos de companheirismo, carinho, compreensão, apoio, amadurecimento, ajuda, sorrisos do Chandler, gaPAAO... Galega, não seria o que sou hoje sem você.

Por último e neste caso, mais importante, à minha mama Marlene, exemplo de caráter e de mulher, que, além da educação, lutou muito e me proporcionou a coisa mais importante que os pais poderiam proporcionar: A liberdade de escolha de ser o que eu quisesse. Obrigado, mãe (Mas eu ainda me lembro do avental...).

Sumário

Resumo	11
Abreviaturas e Siglas	13
I. Introdução	14
O proteassomo e a proteólise intracelular	14
Regulação da atividade catalítica do 20SPT	18
Modificações pós-traducionais do proteassomo 20S	22
Glutaciona e glutatiolação de proteínas	23
O proteassomo 20S e a geração de peptídeos intracelulares	27
II. Objetivos	29
III. Materiais e Métodos	30
Reagentes	30
Crescimento celular, extração e purificação do 20SPT	30
Ensaio de atividade do proteassomo 20S	31
Redução e glutatiolação <i>in vitro</i> do proteassomo	31
Determinação de glutaciona	31
Eletroforese bidimensional	31
Imunomarcacão anti-GSH	32
Processamento dos spots para espectrometria de massas	32
<i>Fingerprinting</i> por MALDI-TOF	33
Detecção de S-glutatiolação por LC-MS/MS	34
Linhagens bacterianas	34
Clonagem do gene GRX2	34
Indução e expressão do gene GRX2	35
Purificação e ensaio de atividade enzimática da Grx2	35
Oxidação de proteínas	36
Análise da degradação de proteínas por SDS-PAGE	36
Determinação do perfil de fragmentação de proteínas por HPLC	36
Análise do proteassomo 20S por microscopia eletrônica	37
IV. Resultados	38
Glutatiolação da unidade catalítica do proteassomo	38
Desglutatiolação do proteassomo 20S	54
Modulação da proteólise e mecanismo de hidrólise	55
Dinâmica de abertura da câmara catalítica	71
V. Discussão	74
VI. Conclusões	84
VII. Referências Bibliográficas	86
VIII. Anexos	98

Resumo

O proteassomo é o componente do sistema Ubiquitina-Proteassomo (UPS), responsável pela degradação de proteínas intracelulares marcadas com cauda de ubiquitina. No entanto, a unidade catalítica do proteassomo (20SPT), destituída de unidades regulatórias, é capaz de degradar proteínas de maneira ubiquitina-independente. Diversas modificações pós-traducionais já foram descritas para o 20SPT, incluindo a S-glutatiolação. De acordo com Demasi e col., (2003) o 20SPT da levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui a atividade tipo-quimiotripsina modulada por glutatona e o mecanismo de glutatiolação implica na formação do intermediário ácido sulfênico. No presente trabalho, identificamos por espectrometria de massas (MS/MS) um total de sete resíduos diferentes de cisteína glutatiolados no 20SPT, sendo seis *in vitro* por incubação com GSH e três *in vivo*, extraído de células crescidas até atingir fase estacionária tardia em meio rico. Analisando a estrutura 3D do 20SPT, observou-se que os resíduos de cisteína glutatiolados não estão localizados na entrada da câmara catalítica nem próximos aos sítios-ativos, indicando um mecanismo alostérico da modulação da atividade proteassomal. O proteassomo glutatiolado extraído de leveduras é capaz de degradar proteínas oxidadas de maneira mais eficiente que o proteassomo reduzido por DTT, e ainda, esta degradação gera perfis peptídicos diferenciados por utilizar distintamente as atividades sítio-específicas, como visualizado por análises de HPLC e MS/MS. Por microscopia eletrônica verificamos a conformação aberta da câmara catalítica do proteassomo glutatiolado, sendo esta imediatamente fechada pela remoção da glutatona do 20SPT na presença de DTT. Caracterizamos ainda, enzimas reponsáveis pela desglutatiolação do 20SPT, capazes de recuperar as atividades proteassomais que haviam sido diminuídas pela glutatiolação: as oxidoredutases glutarredoxina 2 e as tiorredoxinas citosólicas. O mecanismo ainda inclui a hidrólise dessas oxidoredutases, fenômeno também verificado para diversas proteínas da suprafamília tiorredoxina, provavelmente devido a propriedades estruturais desta família. A glutatiolação do proteassomo apresenta-se como uma nova modificação pós-traducional de ocorrência fisiológica dependente do estado redox celular. Esta modificação promove aumento da atividade proteolítica, sugerindo uma função antioxidante atuante na remoção de proteínas oxidadas durante desafios oxidativos.

Abstract

The proteasome is the protease of the Ubiquitin-Proteasome System (UPS) responsible for the breakdown of intracellular ubiquitin-tagged proteins. However, the catalytic particle of the proteasome (20SPT) is capable of hydrolyzing some substrates in an ubiquitin-independent fashion. The S-glutathiolation of the 20SPT was described among several post-translational modifications and according to Demasi *et. al.* (2003), the chymotrypsin-like activity of proteasome from yeast *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by glutathione. The mechanism of S-glutathiolation is dependent on the formation of the sulfenic acid intermediate in the cysteine residues of the 20SPT. In this present work, we identified *in vitro* and *in vivo*, a total of seven different S-glutathiolated proteasomal cysteine residues by mass spectrometry studies (MS/MS) and, by analyzing the 3D structure of the 20SPT, the modified cysteine residues are not located either on the entrance of the catalytic core or near to the active sites, indicating an allosteric mechanism of proteasomal modulation. During protein degradation, the natively S-glutathiolated 20SPT produces different patterns of peptide products when compared to the DTT-reduced particle through distinct site-specific cleavage of the protein substrates, as herein demonstrated by HPLC and MS/MS analyses. Furthermore, by electron microscopy, we showed that the entrance of the natively glutathiolated 20SPT is in the open conformation that immediately shifts to the closed conformation in the presence of DTT. We have also characterized the deglutathiolase role of the oxidoreductases Glutaredoxin 2 and Cytosolic Thioredoxins 1 and 2 which recover the partially inhibited 20SPT activities. The deglutathiolation mechanism also includes the oxidoreductase degradation dependent on the 20SPT activation. The proteasome S-glutathiolation emerges as a new physiological post-translational modification correlated to the cellular redox state. Moreover, the S-glutathiolation of the 20SPT increases its proteolytic activity suggesting an antioxidant role by removing oxidized proteins generated during oxidative challenges.

Abreviaturas e Siglas

19SPT	Proteassomo 19S – unidade regulatória
20SPT	Proteassomo 20S – unidade catalítica
26SPT	Proteassomo 26S – unidade regulatória acoplada à catalítica
BSA	Albumina do soro bovino
BSA _{ox}	Albumina do soro bovino oxidada por H ₂ O ₂
ChT-L	Atividade tipo-quimiotripsina do proteassomo
cTpx	Tiorredoxina peroxidase citosólica
Cys	Resíduo de cisteína
Cys-SOH	Resíduo de cisteína oxidado a ácido sulfênico
DTNB	5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) ou reagente de Ellman
DTPA	Ácido dietileno triamino pentacético
DTT	1,4-Ditiotreitól
ESI	Ionização por <i>Electrospray</i>
GSH	Glutaciona
GSSG	Glutaciona oxidada
Glr	Glutaciona redutase
Grx	Glutarredoxina
LC (HPLC/UPLC)	Cromatografia líquida (Alto/Ultra Desempenho)
MALDI	Ionização por desorção a laser auxiliada por matriz
MS	Espectrometria de massas
Ohr	Proteína recombinante "Organic Hydroperoxide Resistance"
Ova	Ovalbumina
PA	Atividade pós-acídica do proteassomo
PDB	Banco de dados de estruturas de proteínas - <i>Protein Data Bank</i>
PiPs	Proteínas que interagem com o proteassomo
PT-YPD	Proteassomo nativamente glutatiliado extraído de YPD
PT-SG	Proteassomo glutatiliado <i>in vitro</i>
PT-SH	Proteassomo reduzido com DTT
PTM	Modificação pós-traducional
Q-TOF	Quadrupolo-Tempo de Vão
T-L	Atividade tipo-tripsina do proteassomo
TFA	Ácido trifluoracético
Trr	Tiorredoxina redutase
Trx	Tiorredoxina
UPS	Sistema Ubiquitina-Proteassomo

I. Introdução

O Proteassomo e a proteólise intracelular

As células eucarióticas possuem os mais diferentes mecanismos de regulação dos processos fisiológicos. Uma enormidade de vias pode ser regulada a partir da transcrição de genes ou da tradução de proteínas efetoras, entretanto, diversos eventos celulares são modulados na esfera da degradação de proteínas pelos sistemas intracelulares de proteólise. Além da regulação de processos celulares, a proteólise intracelular está envolvida no controle de qualidade, removendo proteínas aberrantemente sintetizadas assim como as que tenham sido danificadas durante o metabolismo. A proteólise também se faz importante na manutenção do conteúdo de aminoácidos e na geração de peptídeos ativos. Outro aspecto da proteólise engloba a degradação de proteínas que variam a concentração ao longo do tempo, comumente relacionadas com vias regulatórias específicas. Entre os eventos celulares em que ocorre a participação do proteassomo podemos citar o controle do ciclo, divisão e diferenciação celular, controle da expressão gênica pela degradação de fatores de transcrição, regulação de oncoproteínas, geração de peptídeos para a apresentação antigênica, entre outros (Fanasaro e col., 2010; Gasparian e col., 2009; Chen e col., 1998; Jariel-Encontre, 1995; Kloetzel, 2004). O primeiro sistema descrito de proteólise intracelular foi o endossômico-lisossômico, no qual as proteínas endocitadas ou contidas em vesículas citoplasmáticas eram degradadas pelas proteases existentes no interior do lisossomo (de Duve e col., 1955; de Duve, 1983). Entretanto, esse sistema não era capaz de responder as questões sobre a especificidade protéica, diferenças de meia-vida intracelular e, principalmente, a observação de que algumas proteínas eram degradadas por processo dependente de ATP.

Somente no final da década de 70 que se iniciou a caracterização de uma via alternativa de degradação de proteínas que respondesse as questões apresentadas sobre a especificidade dos substratos. Esta via dependente de ATP foi descrita primeiramente em reticulócitos de coelho, eritrócitos imaturos, desprovidos de núcleo e organelas como os lisossomos (Etlinger e Goldberg, 1977). Esta nova via proteolítica denominada Sistema

Ubiquitina-Proteassomo (UPS – *Ubiquitin Proteasome System*) é composta por uma série de enzimas capaz de marcar proteínas, sinalizando-as para degradação. Esta marcação confere a especificidade aos substratos que posteriormente serão reconhecidos por um complexo protéico que promoverá a degradação destas proteínas (revisto por Nandi e col., 2006). A proteína responsável pela marcação dos substratos para degradação foi denominada ubiquitina, uma pequena proteína de 8,5 kDa, altamente conservada evolutivamente, considerada ubíqua nos diversos reinos durante sua caracterização (Schlensinger e col., 1975, Wilkinson e col., 1980). A ubiquitinação de uma proteína como sinalização para degradação envolve uma cascata de reações que compreendem três enzimas. A E1 (enzima ativadora da ubiquitina) que, a custa de ATP, ativa a molécula de ubiquitina, transferindo-a para as E2's (enzima conjugadora). As E2's interagem com diversas E3's (ubiquitina ligase), complexando a ubiquitina direta ou indiretamente em lisinas N-terminais dos substratos protéicos. Após a adição da primeira ubiquitina, novas moléculas de ubiquitina são inseridas nas moléculas já existentes, formando uma cadeia de poli-ubiquitina que atuará como sinal de reconhecimento para degradação (Revisto por Hershko e Ciechanover, 1998) (Fig. 1).

A via de ubiquitinação protéica foi descoberta praticamente uma década antes da caracterização da protease responsável pela hidrólise das proteínas ubiquitinadas (Ciechanover e col., 1978; Hershko e col., 1979; Hershko e col., 1983.). Em 1987, Hough e colaboradores caracterizaram um complexo proteolítico de alto peso molecular encarregado da degradação de proteínas poli-ubiquitinadas, que, por Arrigo e col. (1988), foi nomeado Proteassomo (*Proteasome*).

Após a descrição no final da década de 80, muito se foi investido na caracterização deste complexo de alto peso molecular e no seu envolvimento com este novo sistema proteolítico intracelular. Em 1993, Jap e colaboradores conseguiram obter os primeiros cristais para decifrar a estrutura tridimensional do proteassomo de arqueobactéria, que em 1995, pelo mesmo grupo, foi finalmente elucidada (Löwe e col. 1995). Estes trabalhos abriram diversas frentes para a caracterização desta protease e a compreensão funcional nos mais diversos organismos. Morimoto e col. (1995) caracterizaram a primeira estrutura 3D de um 20SPT de eucarioto e finalmente em 1997, foi resolvida a estrutura do 20SPT da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Groll e col., 1997).

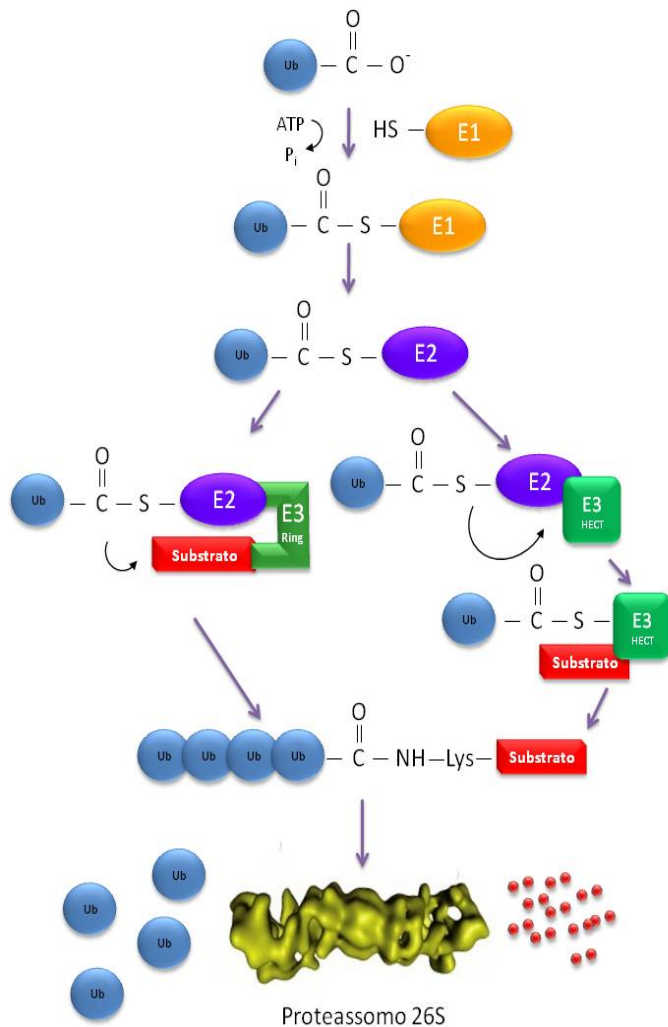


Figura 1. Via de ubiquitinação proteica.

A molécula de ubiquitina (Ub) é ativada a custo de ATP pela enzima ativadora (E1) e transferida para a enzima conjugadora (E2). A conjugadora transfere a ubiquitina diretamente para resíduos de lisinas (Lys) do substrato, associada à ligase (E3 - Ring) ou transfere para a E3 da classe HECT que reconhecerá o substrato, ubiquitinando-o. Novas moléculas de ubiquitina são adicionadas a partir de resíduos de lisina e da glicina 76 C-terminal das moléculas subsequentes. Proteínas fusionadas a cadeias de poli-ubiquitina baseadas na lisina 48 da ubiquitina serão preferencialmente reconhecidas para degradação pelo proteassomo 26S.

Estruturalmente, a unidade catalítica 20S do proteassomo (20SPT) é composta por quatro anéis heptaméricos empilhados em forma de barril. Os dois anéis idênticos externos alfa (α) contêm sete subunidades distintas (de $\alpha 1$ a $\alpha 7$) formando um portão que controla o acesso de substratos à câmara catalítica. Já cada anel interno beta (β) também heptamérico, possui três subunidades cataliticamente distintas, responsáveis pela hidrólise dos substratos (Coux e col., 1996; Jung e col., 2009). Um estreito canal isola a célula dos sítios catalíticos voltados para a face interna da câmara, evitando degradações não específicas. A estrutura tridimensional do proteassomo 20S está demonstrada na figura 2, assim como a disposição das subunidades nos anéis heptaméricos.

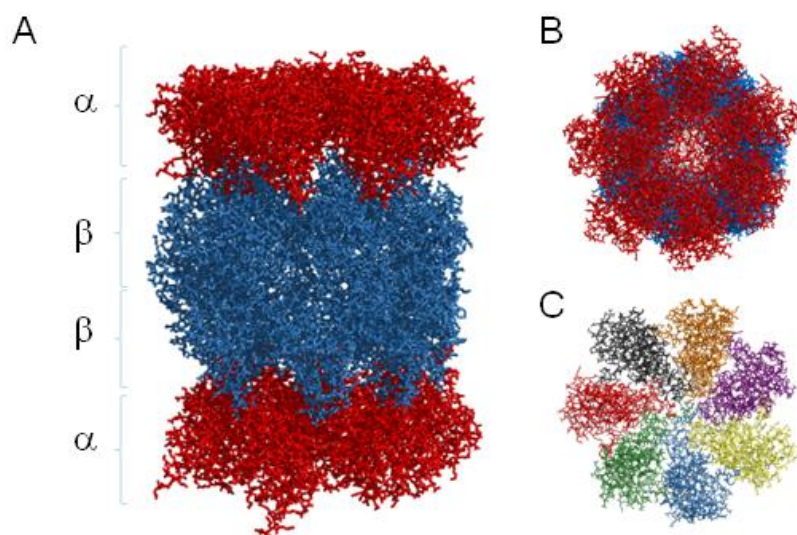


Figura 2. Estrutura tridimensional do proteassomo 20S - (A) Vista longitudinal da câmara catalítica apresentando os quatro anéis na disposição simétrica $\alpha\beta\beta\alpha$. (B) Vista frontal do proteassomo 20S demonstrando centralmente a porta de entrada da câmara catalítica. (C) A vista frontal apresentando a disposição de cada uma das sete subunidades constituintes do anel α coloridas distintamente. PDB Id: 1RYP. Imagens gráficas geradas pelo software Pymol (Delano Scientific).

As três subunidades catalíticas ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$) são expressas na forma de pré-proteínas e, após seu autoprocessamento, possuem o resíduo de treonina 1 (Thr1) como sítio-ativo (Groll e col., 1999). A hidrólise da ligação peptídica dos substratos ocorre pela ação da hidroxila da cadeia lateral da Thr1 que age como nucleófilo, no entanto, devido à características específicas do bolsão de cada sítio ativo, as três subunidades possuem atividades diferentes entre si. A subunidade $\beta 1$ possui atividade pós-acídica (PA), clivando majoritariamente após resíduos ácidos como aspartato e glutamato; a subunidade $\beta 2$ possui atividade tipo-tripsina (T-L), clivando após resíduos de aminoácidos básicos como lisina e arginina; e a subunidade $\beta 5$ tida como a mais ativa e importante, possui atividade do tipo-quimiotripsina (ChT-L), hidrolisando cadeias peptídicas após aminoácidos hidrofóbicos (Arendt e Hochstrasser, 1997; Groll e col., 1999; Heinemeyer e col., 1997; Dick e col., 1998; Nussbaum e col., 1998).

Em relação à localização subcelular, o proteassomo é abundante no núcleo e no citoplasma de células eucarióticas, co-localizado a filamentos intermediários na membrana do retículo endoplasmático e associado ao centrosomo (Rivett e col., 1992; Palmer e col., 1996, Soza e col., 1997, Wigley e col., 1999). Estudos em levedura demonstraram altas concentrações citoplasmáticas de proteassomo ao redor da rede de membranas formada

pelo envelope nuclear e pelo retículo endoplasmático (Wilkinson e col., 1998; Enenkel e col., 1998).

Regulação da atividade catalítica do 20SPT

Juntamente à unidade catalítica central 20S (20SPT), complexos protéicos regulatórios podem se associar por interação com as subunidades alfa, modulando a atividade do proteassomo. Um importante complexo regulatório denominado proteassomo 19S (19SPT) ou PA700 é composto por 19 subunidades diferentes entre si, relacionado com o reconhecimento de substratos poli-ubiquitinados, desdobramento das proteínas-alvo, desubiquitinação do substrato, abertura da câmara catalítica e a translocação de substrato para o interior do 20SPT (Glickman e col., 1998 e 1999; Navon e Goldberg, 2001; Smith e col., 2006). A partícula regulatória 19SPT acoplada ao anel alfa da unidade catalítica formam o proteassomo 26S, protease essencial do UPS, necessária para o reconhecimento e degradação de proteínas poli-ubiquitinadas.

Outros complexos regulatórios descritos mais recentemente são o proteassomo 11S ou PA26, envolvido na geração de peptídeos para a apresentação antigênica em associação ao imunoproteassomo (Li e Rechsteiner, 2001; Hill e col., 2002.) e o PA200 envolvido na estabilidade e no reparo de DNA (Ustrell e col., 2002; Blickwedehl e col., 2008). O proteassomo 11S é formado também por anéis heptaméricos que estimulam a hidrólise de peptídeos via estabilização da conformação aberta do 20SPT (Förster e col., 2003 e 2005). Em levedura ainda não foi descrita a identificação do 11SPT, porém, outro sistema regulatório do 20SPT é o Blm10, relacionado ao PA200 de mamíferos. O Blm10 é uma proteína de aproximadamente 250 kDa sem função fisiológica conhecida, entretanto, quando associada ao proteassomo, promove a estimulação da degradação de peptídeos, mas não estimula a degradação de proteínas (Sadre-Bazzaz e col., 2010). Diversos complexos regulatórios já foram caracterizados nos mais diferentes organismos como capazes de estimular a abertura da câmara catalítica e propiciar uma maior degradação dos substratos. O dinamismo da abertura da câmara catalítica devido ao acoplamento de complexos regulatórios pode ser visualizado na figura 3.

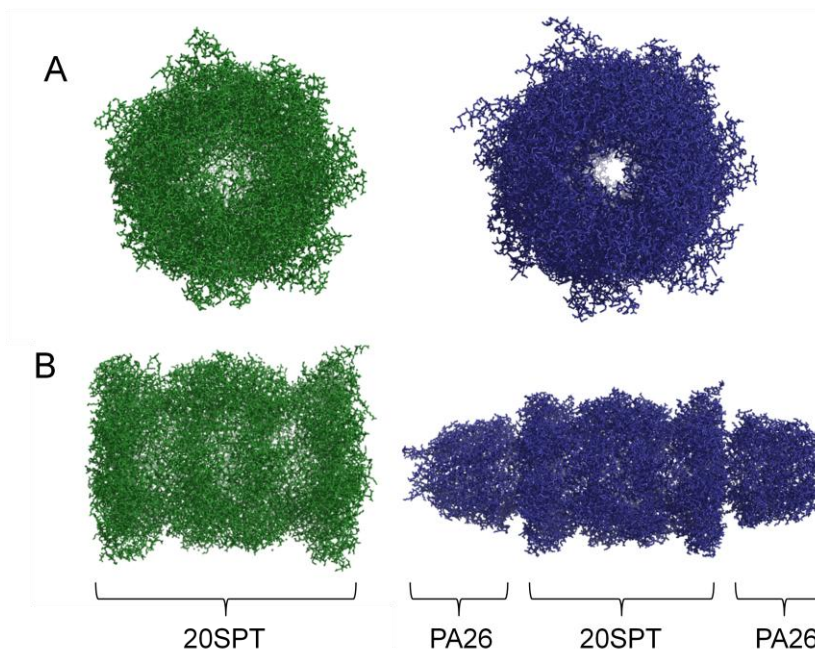


Figura 3. Efeito da abertura da câmara catalítica por complexos regulatórios. (A) Vista frontal das estruturas tridimensionais demonstra em verde, a câmara catalítica do proteassomo 20S de *Saccharomyces cerevisiae* (PDB Id: 1RYP) em sua conformação fechada e, em azul, o proteassomo de *Trypanosoma brucei* (PDB Id: 1FNT) acoplado ao complexo regulatório PA26 em sua conformação aberta. **(B)** Vista longitudinal evidenciando o complexo PA26 externamente ao 20SPT em azul. Imagens gráficas geradas pelo software Pymol (Delano Scientific).

O sistema proteassomo é encontrado em todos os organismos eucarióticos, de fungos a mamíferos. Diversas eubactérias apresentam um sistema tipo-proteassomo denominado HslUV, no qual a protease HslV possui baixa atividade peptidásica e é regulada pelos anéis ATPásicos do complexo HslU, assemelhando-se a ativação do 20SPT pelo anel ATPásico do 19SPT. Com relação à arquitetura, a HslV é composta por dois anéis hexaméricos e análises estruturais demonstraram analogia funcional com as subunidades β do 20SPT. Por outro lado, as arqueobactérias, evolutivamente mais próximas aos eucariotos, apresentam um protótipo de proteassomo que também possui a organização heptamérica $\alpha\beta\alpha$, porém, cada anel é homo-oligomérico, possuindo somente uma isoforma de subunidade alfa e uma de beta (Groll e Clausen, 2003).

Apesar da existência de diversas proteínas e complexos regulatórios, e de também possuir arquitetura, função e regulação extremamente conservadas, as células de mamíferos possuem mais de 30 % do proteassomo destituído de subunidades regulatórias, não sendo, portanto, capaz de reconhecer e degradar proteínas poli-ubiquitinadas (Tanahashi e col.,

2000; Hendil e col., 1998). Em leveduras, a parcela correspondente ao 20SPT ainda é altamente representativa, sendo ao redor de 20 a 25 % (Babbitt e col., 2005).

Comumente é relatado que o 20SPT somente é capaz de lentamente degradar peptídeos, sendo ativo proteoliticamente apenas na presença de ativadores como SDS e cardiolipina (Coux e col., 1996, Shibatani e Ward, 1995; Yamada e col., 1998; Ruiz de Mena e col., 1993). Embora não sejam conhecidos os substratos degradados *in vivo* pelo 20SPT, a grande parcela desse complexo de proteases desprovido de subunidades regulatórias deve desempenhar uma importante função intracelular. Cada vez mais na literatura são descritos exemplos de proteínas degradadas pelo proteassomo independente de ubiquitinação. Entre essas proteínas podemos citar o fator de transcrição c-Jun (Jariel-Encontre e col., 1995), a proteína ligadora de cálcio calmodulina (Tarcza e col., 2000), troponina C (Benaroudj e col., 2001), a oncoproteína p53 (Asher e col., 2002), a alfa-sinucleína (Tofaris e col., 2001) e a ornitina descarboxilase (Asher e col., 2005; Takeuchi e col., 2008). Essas proteínas, de alguma forma ainda não bem identificada, devem interagir com as subunidades alfa do proteassomo e adentrar a câmara catalítica para a degradação (Benaroudj e col., 2001; Baugh e col., 2009). Mais ainda, Baugh e col. (2009) analisando lisados de células de mamíferos, descreveram que o 20SPT é capaz de degradar especificamente, sem a necessidade de ubiquitinação, mais de 20 % das proteínas celulares.

Apesar da função intracelular do 20SPT não estar bem caracterizada, uma importante atividade atribuída ao 20PT é a de degradação de proteínas desnaturadas, com erros de tradução ou dobramento, e também, das proteínas danificadas. Estas modificações incorrem em perda de estrutura secundária e terciária, assim como em aumento de hidrofobicidade superficial, fatores responsáveis pelo reconhecimento das proteínas-alvo pelo 20SPT (Pacifici e Davies, 1990; Davies, 2001; Ferrington e col., 2001, Varshavsky, 2005, Jung e col., 2009). Entre as proteínas danificadas, uma importante parcela corresponde às proteínas danificadas oxidativamente. O processo de oxidação de proteínas é um fenômeno constante, presente em todas as células. As proteínas podem ser oxidadas durante o ciclo catalítico de enzimas, nos processos sinalizadores, e, principalmente, durante condições de desafios e estresses oxidativos (Davies, 2000). O acúmulo de proteínas oxidadas tanto devido ao aumento do processo oxidativo quanto ao decréscimo de sua remoção está fortemente associado ao envelhecimento (Stadtman, 2006).

As condições não reguladas de oxidação levam ao dano protéico com possível desestruturação e perda de função. Caso a remoção destas proteínas não ocorra corretamente, seu acúmulo pode acarretar em grande citotoxicidade, levando a morte celular (Costa e col., 2007; Dunlop e col., 2009). Shringarpure e col. (2003) demonstraram que células contendo a enzima E1, ativadora de ubiquitina, termolábil foram capazes de promover uma degradação de proteínas oxidadas de forma ATP-independente, degradação esta bloqueável por inibidores específicos do proteassomo. Consistente com as propostas do 20SPT ser o responsável pela remoção de proteínas danificadas, Inai e Nishikimi, (2002) descreveram uma linhagem de levedura deficiente em 26SPT, mais eficiente que a respectiva linhagem selvagem na remoção de proteínas oxidadas. Mais ainda, o 26SPT apresenta sua atividade peptidásica completamente abolida após o tratamento com 1 mM de H₂O₂, enquanto o 20SPT não sofre nenhuma modificação de atividade ou estrutural mesmo após o tratamento com 5 mM de H₂O₂, sendo capaz de manter sua atividade catalítica durante desafios oxidativos (Reinheckel e col., 1998 e 2000). Esta inativação do 26SPT provavelmente se dá pela oxidação de resíduos específicos do 19SPT, responsável pela proteólise ATP-dependente. A via de ubiquitinação (ativação e conjugação) também é inativada durante desafios oxidativos, por mecanismos que provavelmente envolvem a glutatilação de resíduos específicos de cisteína dessas proteínas (Shang e Taylor, 1995; Jahngen-Hodge e col., 1997). Esses dados reunidos reforçam a hipótese do 20SPT como principal responsável pela degradação de proteínas oxidadas intracelularmente. Teoh e Davies (2004) hipotetizaram ainda, que as proteínas oxidadas durante o metabolismo celular e desafios oxidativos seriam responsáveis por parte dos peptídeos expostos na membrana celular pelas proteínas codificadas a partir do complexo de histocompatibilidade do tipo I (MHC-I); hipótese cunhada como PrOxi – *Protein Oxidation and Immunoproteasome Hypothesis*. Estes dados indicam que apesar do proteassomo estar envolvido na regulação de muitos eventos celulares e possuir diversos complexos regulatórios modulando seus processos proteolíticos, o proteassomo 20S também deve necessitar de processos regulatórios dentro da célula.

Dois interessantes processos de regulação da atividade do 20SPT são a expressão do imunoproteassomo e do timoproteassomo. O imunoproteassomo tem suas subunidades cataliticamente ativas (β 1, β 2 e β 5) substituídas por outras (LMP2, MECL-1 e LMP7; respectivamente), expressas via regulação por interferon- γ (Tanaka, 1994; Rivett e Hearn,

2004; Kloetzel e Ossendorp, 2004; Strehl e col., 2005). A expressão do imunoproteassomo está intimamente relacionada ao sistema imune e a geração de peptídeos específicos para a apresentação antigênica. Recentemente, uma nova isoforma do proteassomo foi identificada em células do timo. Denominado timoproteassomo, esta isoforma apresenta substituição da subunidade hidrofóbica $\beta 5$ por uma subunidade de característica hidrofílica $\beta 5t$, capaz de produzir um conjunto de peptídeos próprios completamente diferente do proteassomo tradicional. Este diferente perfil peptídico parece ser necessário na seleção de linfócitos T CD8(+) (Murata e col., 2007 e 2008; Tomaru e col., 2009). Além da expressão de proteassomos alternativos, outras modulações da atividade do 20SPT se dão no âmbito de modificações pós-traducionais.

Modificações pós-traducionais do proteassomo 20S

Uma série de modificações pós-traducionais (PTMs) já foi descrita para o proteassomo 20S de diversos organismos, porém, a maior parte das modificações identificadas *in vivo* foi descrita em baixas concentrações, necessitando técnicas sensíveis para a detecção (Zong e col., 2008; Kikuchi e col., 2010). Apesar de identificadas, muitas destas modificações ainda não possuem função fisiológica conhecida. Existem interpretações e alguns dados indiretos de que essas modificações estejam correlacionadas com a modulação da atividade proteolítica, manutenção da meia-vida da unidade 20S e no processo de associação das subunidades para a montagem do 20SPT (processo de *assembly*).

Entre as modificações descritas para o proteassomo 20S está a acetilação N-terminal de subunidades. Apesar da incerteza sobre a função desta PTM, a acetilação N-terminal de proteínas tem sido descrita como uma modificação capaz de afetar a estabilidade, função e degradação de proteínas (Polevoda e Sherman, 2000). As subunidades $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 3$, e $\beta 4$ foram descritas como acetiladas em células de mamíferos (Gomes e col., 2006) e em *Saccharomyces cerevisiae*, Kimura e col. (2000 e 2003) descreveram a acetilação do 26SPT além das enzimas responsáveis por essa acetilação. Todas as subunidades alfa e as subunidades $\beta 3$ e $\beta 4$ são acetiladas no N-terminal. A conservação em leveduras e mamíferos da acetilação N-terminal destas duas subunidades β , assim como as das subunidades $\alpha 2$, $\alpha 5$ e $\alpha 7$ indicam um possível papel funcional, no qual estes autores sugerem ser a associação

entre as subunidades do 20SPT. Além disso, a ausência de acetilação em linhagens mutantes para a N- acetiltransferase 1 (Nat1) é capaz de aumentar a atividade tipo-quimiotripsina de maneira significativa (Kimura e col., 2003).

Gomes e col. (2006) também identificaram a fosforilação da subunidade $\alpha 7$ do centro catalítico. A fosforilação da subunidade $\alpha 7$ é mais bem estudada entre as PTM's do 20SPT e apesar de não ser essencial na montagem do 26SPT, a fosforilação desta subunidade parece estar envolvida na estabilização do complexo. A fosforilação da subunidade $\alpha 7$ é regulada negativamente por ação de interferon- γ , diminuindo a quantidade de 26S e aumentando os níveis do imunoproteassomo (Bose e col., 2004). Iwafune e col. (2002, 2004) caracterizaram em levedura a fosforilação das subunidades do 20SPT. As subunidades $\alpha 2$, $\alpha 4$ e $\alpha 7$ apresentaram-se em múltiplos spots em análise por eletroforese bidimensional sendo reduzidas a um único spot após o tratamento com fosfatase-alcalina. Foram identificados no proteassomo de levedura três resíduos de serinas (Ser258, Ser263, and Ser264) fosforilados na subunidade $\alpha 7$ do 20SPT (Iwafune e col., 2004). O tratamento do proteassomo com a fosfatase-alcalina aumentou ainda, o valor da constante cinética K_m para a atividade tipo-quimiotripsina, indicando a fosforilação como detentora de um papel regulatório da atividade proteassomal (Iwafune e col., 2002).

Modificações pós-traducionais como glicação (adição não enzimática de carboidratos) e conjugação de 4-hidroxi-2-nonenal, um importante subproduto de peroxidação lipídica, diminuem a atividade tipo-quimiotripsina do proteassomo. Em humanos, estas informações se tornaram bastante importantes, pois, além de estarem positivamente correlacionadas com o aumento da idade dos indivíduos, estão também vinculadas a quadros patológicos (Carrard e col., 2003; Dahlmann, 2007).

Glutationa e glutatilação de proteínas

Outra modificação pós-traducional sofrida pelo 20SPT é a adição de glutatona nos resíduos de cisteína das subunidades constituintes. A glutatona (GSH) é um tri-peptídeo (γ -Glu-Cys-Gly) encontrado em algumas eubactérias e em todos os organismos eucarióticos, incluindo vegetais e fungos. A alta concentração intracelular se encontra na ordem de 1 a 10 mM dependendo do tecido e da organela (Sies, 1999). A glutatona é responsável pela

manutenção da homeostase redox, sendo um dos principais tampões redox intracelulares. Está envolvida no seqüestro de radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, servindo de equivalente redutor para diversas enzimas como glutathiona peroxidase (Gpx) e glutarredoxinas (Grx), além da ribonucleotídeo redutase envolvida na síntese de DNA (Pocsi e col., 2004; Meyer e Hell, 2005, Avval e Holmgren, 2009). A razão entre a forma reduzida (GSH) e a forma oxidada (GSSG) é um dos fatores determinantes do estado redox intracelular (Jones e col., 2002). O metabolismo de GSSG envolve ainda sua redução pela ação da enzima Glutathiona Redutase (Glr1) que utiliza NADPH como equivalente redutor, recuperando o conteúdo de GSH.

A adição de glutathiona em proteínas, amplamente descrita na literatura mediante desafios oxidativos, era considerada apenas um processo antioxidante no qual as sulfidrilas protéicas seriam protegidas de hiperoxidações irreversíveis através da formação de dissulfetos mistos com a glutathiona. A célula, ao se recuperar do estresse, reduziria os dissulfetos mistos por processos enzimáticos regenerando as sulfidrilas protéicas (Gilbert, 1995). Por sua vez, o conteúdo de glutathiona intracelular também estaria protegido contra oxidações durante o processo, já que o excesso de glutathiona oxidada é exportado das células (LeMoan e col., 2006). No retículo endoplasmático onde a razão GSH/GSSG não é superior a três, mais da metade da glutathiona presente está na forma de dissulfeto misto com proteínas (Bass e col., 2004). Atualmente, a glutatiolação protéica é vista não somente como um processo protetor dos resíduos de cisteína, mas também como uma importante modificação pós-traducional, atuando de maneira regulatória sobre a atividade de diversas enzimas (Giustarini e col., 2004; Ghezzi, 2005).

A formação do dissulfeto misto entre proteínas e glutathiona pode ocorrer de diversas maneiras. Os mecanismos mais frequentemente apontados estão demonstrados na figura 4. A glutatiolação pode ocorrer pela reação direta do dissulfeto GSSG com Cys protéicas reduzidas, mecanismo que supostamente ocorre quando a razão GSH/GSSG intracelular diminui a níveis críticos (Fig.4, reação 1). No entanto, em trabalho recentemente publicado por nosso grupo ficou demonstrada a glutatiolação da proteína Thimet oligopeptidase 24.15, pelo mecanismo acima citado em concentrações fisiológicas de GSSG (Demasi e col., 2008). Alternativamente, os resíduos de Cys protéicos no estado reduzido podem se oxidar através de fontes endógenas ou exógenas de oxidantes como, por exemplo, pela ação de peróxidos, levando a formação do intermediário ácido sulfênico (Fig. 4, reação 2). Apesar de poder ser

estabilizado em algumas proteínas, o ácido sulfênico é altamente reativo, sendo susceptível a tiolações, incluindo a S-glutatiolação. (Claiborne e col., 2001; Netto e col., 2007 – revisão apresentada como anexo VI)

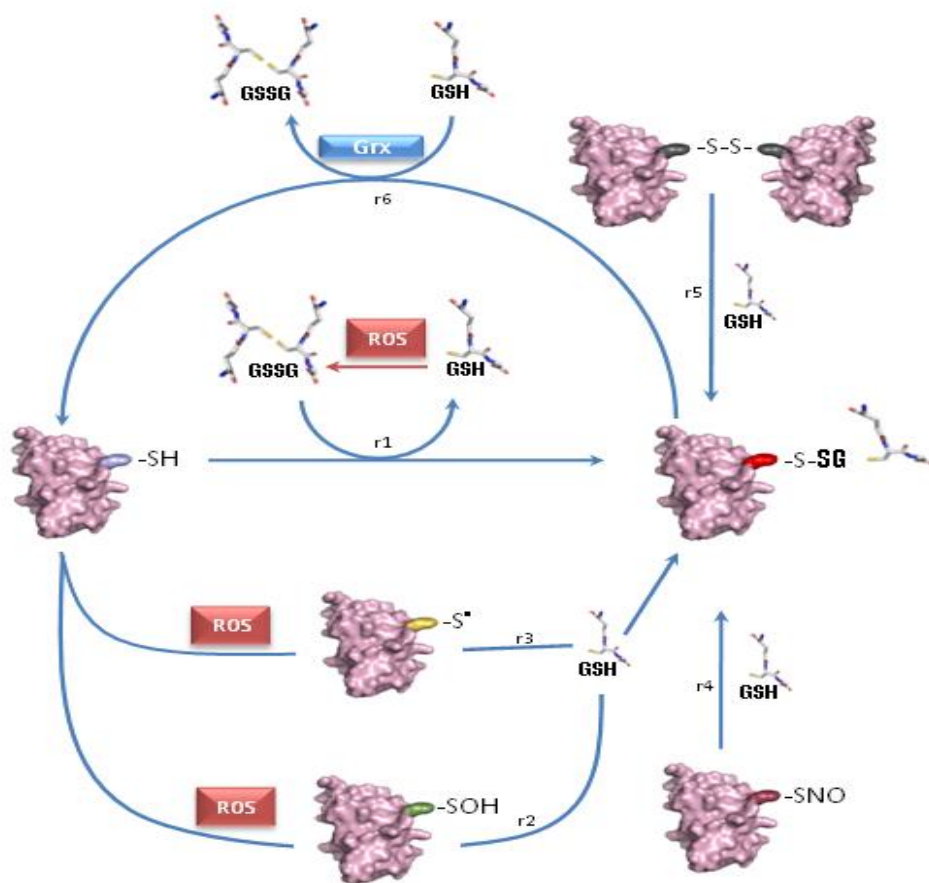


Figura 4. Principais mecanismos de S-glutatiolação e desglutatiolação de proteínas - Resíduos de cisteína protéicos podem se glutatiolar por diferentes vias. A cisteína reduzida (-SH) pode se glutatiolar via reação com glutatona oxidada GSSG (*reação 1*). Já a glutatiolação por glutatona reduzida (GSH) pode ocorrer após a oxidação da sulfidríla por espécies reativas do oxigênio (ROS) formando intermediários não radiculares como o ácido sulfênico (-SOH, *reação 2*) ou intermediários radiculares (-S•, *reação 3*). No último caso, a adição de glutatona gera um intermediário radicalar (PSSG•) que pode decair a dissulfeto. A glutatiolação por GSH também pode ocorrer pela reação com a cisteína na forma de nitrosotiol (-SNO, *reação 4*) ou ainda pela redução de ligações dissulfeto inter ou intraprotéicas (*reação 5*). O dissulfeto misto com glutatona (-S-SG) é posteriormente reduzido por tiol-dissulfeto oxidorreduzases, como glutarredoxinas (Grx), que utiliza GSH como equivalente redutor (*reação 6*), revertendo a sulfidríla a sua forma reduzida.

Baseado nos mecanismos de glutatiolação citados, a literatura tem destacado diversos trabalhos envolvendo a glutatiolação protéica como modulador da atividade e função de proteínas. Proteínas de diversas vias metabólicas e das mais diferentes funções

celulares são moduladas por glutatilação. Exemplificando, a proteína quinase dependente de cAMP em situações de estresse oxidativo tem sua atividade prontamente inibida pela glutatilação da Cys199, localizada próxima ao sítio-ativo (Humphries e col., 2002). A tirosina hidroxilase, enzima passo-limitante da síntese de dopamina é inibida por glutatilação, sendo esta inibição completamente revertida por DTT ou por glutarredoxina. (Borges e col., 2002). A proteína S100A1 da família de proteínas ligantes de cálcio do tipo *EF-Hand*, quando glutatilada, aumenta em 10 vezes a afinidade do loop-C a cálcio e quatro ordens de grandeza as constantes de ligação do loop-N (Goch e col., 2005). Em trabalho recente, Ghezzi e col. (2006) identificaram a glutatilação *in vivo* da ciclofilina A de linfócitos T humano após ativação mitogênica. Mais ainda, demonstraram por estudos de dicroísmo circular um grande impacto na estrutura secundária da proteína glutatilada. Acredita-se que estas modificações estruturais promovidas pela glutatilação estejam correlacionadas com a modulação da atividade das proteínas descritas.

A descrição que o proteassomo sofre o processo de S-glutatilação se deu primeiramente em células de mamífero (epitélio hepático de ratos) incubadas com inibidores irreversíveis e específicos deste complexo protéico como lactacistina, NLVS e β -lactona (Demasi e col., 2001). Nesse trabalho, foi verificado também que preparações de 20SPT purificadas de eritrócito humano e de eritroblasto de coelho possuíam atividade tipo-quimiotripsina (ChT-L), porém não a tipo-tripsina (T-L), modulável pela incubação com GSH, GSSG e cisteína. A modulação da atividade do proteassomo por GSH e GSSG *in vitro*, foi interpretada como fenômeno conseqüente da glutatilação do proteassomo 20S (Demasi e col., 2001).

Descrevemos em Demasi e col. (2003 - Anexo IV) que o proteassomo de levedura também responde a incubações com diversos reagentes tiólicos, inclusive GSH. O mecanismo de glutatilação do 20SPT inclui a formação do intermediário ácido sulfênico em suas sulfidrilas e esta modificação causa diminuição da atividade tipo-quimiotripsina *in vitro*. Células de levedura desafiadas com peróxido de hidrogênio revelaram a presença de glutatona incorporada ao 20SPT, demonstrando a provável ocorrência do fenômeno *in vivo*, dependente do estado redox celular. Em trabalho publicado em 2005 por Dixon e seus colaboradores, foi descrito em escala proteômica a glutatilação de diversas proteínas mediante estresse oxidativo em células vegetais de *Arabidopsis thaliana*. Neste trabalho, as células foram submetidas a estresse oxidativo por incubação na presença de *terc-*

butilhidroperóxido e utilizando glutatona biotinilada como isca, foi possível isolar e identificar inúmeras proteínas glutatioladas, dentre as quais, diversas subunidades do 20SPT.

Niture e col. (2005) desenvolveram técnicas para mimetizar a S-glutatiolação e dessa forma identificaram proteínas contendo cisteínas reativas purificadas por cromatografia de afinidade à glutatona. Utilizando células de meduloblastoma humano, este grupo foi capaz de identificar subunidades do proteassomo e ainda posteriormente utilizar subunidades do 20SPT como controle positivo de proteína nativamente glutatiolada. Trabalhos como o de Zong e col. (2008) identificaram diversas PTM's no proteassomo de camundongo, inclusive modificações oxidativas e nitrosativas. O tratamento do 20SPT com 10 μ M paraquat levou ao aumento da oxidação de sulfidrilas em diversas subunidades, assim como o aumentou também o teor de carbonilas protéicas formadas. No entanto, todos os clássicos protocolos de purificação do proteassomo utilizam redutores tiólicos em seus tampões, excluindo a possibilidade da identificação da glutatiolação como modificação do 20SPT. Devido a este fato, é restrito o número de publicações envolvendo a descrição de subunidades glutatioladas do 20SPT. O estudo da glutatiolação do proteassomo tem se mostrado interessante devido a sua conservação em diversos organismos (se estendendo de levedura a mamíferos, passando por plantas) e também devido ao fato de ser uma modificação que possui um importante papel funcional. Faz-se então crucial, entender a dinâmica de redução, oxidação e glutatiolação dos resíduos de cisteína envolvidos na regulação da atividade do proteassomo 20S.

O proteassomo 20S e a geração de peptídeos intracelulares

O proteassomo é o grande responsável pela geração de peptídeos intracelulares, os quais não são destinados exclusivamente à manutenção do conteúdo intracelular de aminoácidos para a síntese de novas proteínas. Em mamíferos, estes peptídeos podem apresentar as mais diversas funções e uma destas funções envolve a apresentação destes peptídeos como antígenos na superfície celular (Kloetzel, 2004). Outra função reconhecida é a geração de peptídeos livres com papel bioativo no interior das células. Essas moléculas podem atuar na sinalização celular, modulando atividades enzimáticas, regulando a transcrição gênica, entre outras funções (Ferro e col., 2004 e Cunha e col., 2008). Além disso,

estes peptídeos ainda podem ser substratos de peptidases intracelulares, levando ao surgimento de novos peptídeos e possivelmente novas funções celulares (Saric e col., 2004). Tendo em vista a importância dos peptídeos funcionais, a geração de um novo conjunto peptídico intracelular distinto dos perfis existentes em condições basais, representaria uma interessante resposta às modificações metabólicas de diversas origens. Além da expressão de proteassomos alternativos como o timo e o imunoproteassomo, capazes de clivar os substratos de maneira diferenciada, já foram descritos mecanismos alternativos de processamento polipeptídico pelo proteassomo entre os diversos fatores que podem alterar a geração de peptídeos. Entre estes mecanismos, podemos citar a atividade endoproteolítica do proteassomo, na qual a degradação ocorre a partir regiões desestruturadas na porção interna da proteína, liberando fragmentos terminais intactos da proteína (Liu e col., 2003; Qing e col., 2007). Outro mecanismo é a capacidade do proteassomo em realizar o “*splicing* peptídico”, gerando peptídeos que contêm uma seqüência de aminoácidos não contígua a seqüência primária da proteína. Durante a hidrólise, ocorre a remoção da porção intermediária de um determinado peptídeo e por transpeptidação um novo fragmento é formado (Vigneron e col., 2004; Warren e col., 2006; Dalet e col., 2010). Warren e col. (2006) inclusive descreveram o “*splicing reverso*” no qual o peptídeo gerado foi unido na ordem inversa à seqüência original da proteína.

A complexidade dos processos proteolíticos, a relação com o metabolismo redox e a função intracelular do 20SPT ainda não estão completamente caracterizadas e tornam esse sistema proteolítico um interessante alvo de estudos. Dessa forma, compreender o papel fisiológico da glutatilação como moduladora da atividade proteolítica do proteassomo pode elucidar alguns mecanismos do processamento dos polipeptídeos, a especificidade dos substratos hidrolizados e a função do conteúdo peptídico produzido, desencadeando as mais diversas respostas intracelulares.

II. Objetivos

O objetivo geral deste projeto consistiu em caracterizar o processo de S-glutatiolação e desglutatiolação da unidade catalítica do proteassomo 20S da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Dentre os objetivos específicos, investigar a ocorrência *in vivo* desta modificação e identificar as subunidades e os resíduos específicos de cisteína do 20SPT susceptíveis a S-glutatiolação. Mais ainda, estudar sistemas enzimáticos responsáveis pela desglutatiolação do proteassomo, entender a maneira pela qual a glutatiolação modula a atividade catalítica da protease, além de compreender as implicações fisiológicas deste fenômeno.

III. Materiais e Métodos

Reagentes - BSA, β -caseína, DTPA, DTNB, DTT, HED, GSH, Glr, MCA, NBD, NEM, e Ovalbumina foram adquiridos junto a SIGMA-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Substratos fluorogênicos (z-LLE-MCA, z-ARR-MCA e s-LLVY-MCA) foram comprados da Calbiochem (San Diego, CA, EUA). Anticorpo anti-glutationa nos foi vendido pela Arbor Assays (Ann Arbor, Michigan, EUA). Todos os reagentes utilizados para os ensaios de eletroforese bidimensional eram da GE Healthcare (Chalfont St. Giles, Reino Unido) e a Tripsina Gold utilizada para a digestão de proteínas para espectrometria de massas foi obtida da Promega Corporation (Madison, Wisconsin, EUA). Todos os demais reagentes não citados eram de grau analítico.

Crescimento celular, extração e purificação do proteassomo 20S de levedura – Para a extração do proteassomo 20S, utilizamos a linhagem RJD1144 (MATa *his3_200 leu2-3,112, lys2-801 trp1_63 ura3-52 PRE1^{FH}::Ylplac211 URA3*) de *Saccharomyces cerevisiae* derivada da linhagem JD47-13C, que nos foi gentilmente cedida pelo Dr. Raymond Deshaies da Divisão de Biologia, Caltech, Pasadena, CA-EUA. Esta linhagem dispõe de uma cauda de poli-histidina e a seqüência do peptídeo FLAG (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) fusionadas à subunidade Pre1 (β 4) do proteassomo. As leveduras foram crescidas em meio rico padrão YPD, contendo 4 % de glicose (1 % de extrato de levedura, 2 % de peptona e 4 % de glicose) e coletadas após 60 horas de incubação a 30 °C sob agitação. As células foram ressuspendidas em tampão Tris-HCl (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM de MgCl₂ e 20 mM KCl) contendo 500 mM NaCl e 20 mM de imidazol. As células foram rompidas por agitação vigorosa com pérolas de vidro a 4 °C e o extrato celular obtido foi centrifugado a 15000 rpm por 45 minutos a 4 °C. O proteassomo contido no extrato protéico foi purificado em colunas de afinidade a níquel HisTraptm FF (GE Healthcare) de acordo com o manual do fabricante. A eluição do proteassomo foi realizada em gradiente linear de imidazol no sistema ÄKTA *purifier* (GE Healthcare). Após a determinação da atividade proteolítica, as alíquotas ativas foram concentradas em filtros Amicon Ultra YM-100 e dessalinizadas em colunas PD-10 Desalting (GE Healthcare) para Tampão Padrão (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM de MgCl₂ e 20 mM KCl).

Ensaio de atividade do proteassomo 20S - A atividade catalítica do proteassomo foi determinada utilizando-se peptídeos fluorogênicos como substrato. Para cada atividade proteolítica, um substrato diferente foi utilizado: O peptídeo *s*-LLVY-MCA foi o substrato responsável pela quantificação da atividade tipo-quimiotripsina (ChT-L), o substrato *z*-LLE-MCA foi o substrato para a atividade pós-acídica (PA) e os substratos *z*-ARR-MCA para a determinação da atividade tipo-tripsina (T-L). Alíquotas de proteassomo (1-5 µg) foram incubadas com 25-100 µM dos substratos fluorogênicos em tampão padrão por 60 minutos a 30 °C e então, a emissão de fluorescência foi capturada a 440 nm (excitação a 365 nm). A quantidade de MCA (amino metilcumarina) liberada foi calculada a partir de uma curva padrão de MCA livre.

Redução e glutatilação *in vitro* do proteassomo – Para a redução, amostras do 20SPT purificado foram tratadas com 300 mM de DTT por 16 h a 4 °C. A dessalinização para remoção do DTT foi realizada em colunas PD-10 Desalting, com a coleta da proteína em tampão padrão. As alíquotas recolhidas foram monitoradas espectrofotometricamente a 412 nm para excluir a presença de DTT residual mediante reação com 0,75 mM de DTNB. Para a glutatilação *in vitro*, o 20SPT foi tratado com 1-10 mM de glutatona reduzida (GSH) por 30 min à temperatura ambiente. O excesso de glutatona foi removido por ciclos de filtração e rediluição em microfiltros YM-100 (Amicon Ultra - Millipore).

Determinação de glutatona – O ensaio para a dosagem de glutatona foi realizado em tampão 0,1 M fosfato de potássio pH 7,0 contendo 1 mM EDTA, seguido da adição de 0,2 mM NADPH, 80 µM de DTNB e 120 mU de glutatona redutase. Os reagentes foram aclimatados a 37 °C por 2 minutos e a reação foi iniciada com a adição da amostra, acompanhando a absorbância do tionitrobenzonato (TNB) formado a 412 nm por 3 minutos. A quantificação da glutatona foi realizada de acordo com uma curva padrão de glutatona oxidada (GSSG).

Eletroforese bidimensional – Para a padronização da técnica, utilizamos primeiramente a plataforma de focalização e eletroforese horizontal Multiphor II. Um volume de amostra de 50 a 150 µg de proteína foi diluído na solução de reidratação (Uréia 8 M, 2 % CHAPS, 0,5 % Pharmalytes, e 0,007 % azul de bromofenol) e aplicado no cassete de reidratação sob tiras

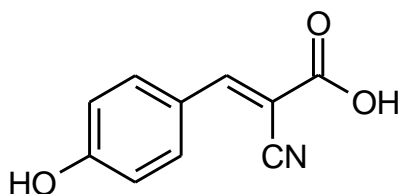
de 11 cm. As tiras foram reidratadas por 16 h à temperatura ambiente. As tiras reidratadas foram retiradas do cassete e transferidas para o sistema de focalização isoeletrica. Após a montagem do aparelho Multiphor II segundo o manual do fabricante, as tiras foram focalizadas e mantidas à -80 °C até o momento da corrida da segunda dimensão. Os géis SDS-PAGE 12,5 % para a segunda dimensão foram corridos imediatamente após duas rodadas de equilíbrio das tiras por 12,5 min em Tampão de Equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 6 M uréia, 30 % glicerol e 1 % SDS). Para as amostras que seriam reduzidas e alquiladas com iodoacetamida (IAA), adicionou-se 50 mM DTT na primeira rodada de equilíbrio e 120 mM de IAA na segunda. A detecção das proteínas foi realizada através de coloração com Coomassie blue G-250 coloidal conforme descrita por Neuhoff e col. (1988). Utilizamos posteriormente a plataforma IPGphor3 que possibilitou a focalização de tiras de até 24 cm e para a segunda dimensão a cuba vertical DaltSix (ambos GE Healthcare), de acordo com o manual do fabricante. Os gradientes de voltagem para a focalização isoeletrica seguiram os protocolos fornecidos pelo software Ettan IPGphor 3 Control Software (GE Healthcare).

Imunomarcacão anti-GSH - Para realizacão dos experimentos de Western Blotting, as amostras protéicas foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12,5 % (SDS-PAGE) e submetidas à eletroforese. As amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose de 0,22 µm (Hybond-ECL da GE Healthcare) por 2 h mantendo a corrente eléctrica constante em 125 mA. A imunomarcacão foi realizada utilizando o aparelho SNAP I.d. (*Protein Detection System – Millipore*) com anticorpo primário anti-GSH (Arbor Assay) diluído de 1:333, conforme manual do fabricante. O ensaio utilizou anticorpo secundário anti-IgG de camundongo ligado à peroxidase HRP (*Horse Radish Peroxidase*), as soluções de detecção e o agente bloqueador, todos fornecidos pelo kit ECL™ Western Blotting Systems (GE Healthcare). O sinal quimioluminescente liberado após incubacão da membrana com as soluções de revelacão foi captado por sensibilizacão de filme radiológico.

Processamento dos spots para espectrometria de massas - Todos os procedimentos, desde a excisão dos spots do gel até a digestão com tripsina, foram realizados em fluxo laminar para se minimizar a contaminação com queratina. Os pedaços de gel contendo as proteínas de interesse foram retirados, cortados em pedaços menores e transferidos para tubos de polipropileno (LoBind – Eppendorf). Os spots excisados foram descorados por duas vezes em

tampão 100 mM bicarbonato de amônio pH 7,8 contendo 50 % acetonitrila (ACN) por 45 minutos a 37 °C. Os fragmentos de gel foram desidratados por cinco minutos à temperatura ambiente com 100 % ACN e os géis foram secos no Speed-Vac por 15 minutos para remover a ACN residual. Os fragmentos secos foram reidratados por uma hora a 4 °C em solução de tripsina (Trypsin Gold – Promega) para espectrometria de massa a 20 µg/ml em 40 mM de bicarbonato de amônio contendo 10 % de ACN. Posteriormente, adicionou-se tampão de digestão não contendo tripsina até cobrir os pedaços de gel e as amostras foram incubadas por 18 h a 37 °C. Para a recuperação dos peptídeos, o gel foi incubado com 150 µl de água Milli-Q por 10 minutos sob agitação. O volume foi recolhido em tubo novo e os peptídeos foram extraídos por duas incubações sucessivas de 60 min com 50 µl de solução 50 % ACN e 5 % TFA, agitando-se ocasionalmente. As duas soluções contendo os peptídeos foram reunidas e secas em Speed-Vac.

Fingerprinting por MALDI-TOF – A análise dos peptídeos foi feita no espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF modelo Ettan (GE Healthcare) em parceria com Clécio Klitzke. Após a digestão *in-gel*, os peptídeos foram resolubilizados em 10 µl de 0,1 % TFA e as amostras foram dessalinizadas em colunas C18 ZipTip (Millipore), de acordo com as instruções do fabricante. Os peptídeos foram eluídos em duas etapas. Na primeira com 5 µl de 50 % ACN, 0,1 % TFA e na segunda com 5 µl de 80 % ACN, 0,1 % TFA. As amostras foram secas mais uma vez e ressuspensa em volume mínimo (1-2 µl) para a aplicação nos slides do espectrômetro. Utilizamos como matriz o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (solução saturada em ACN:água, 1:1 contendo 0,1 % de TFA). Os espectros foram obtidos no modo positivo com uma voltagem de aceleração de 20 kV. Os espectros finais foram resultantes da somatória de 200 espectros acumulados obtidos no modo *reflectron*. O equipamento foi previamente calibrado com um padrão de peptídeos (Angio II $[M+H]^+$ 1046,54 e P14R $[M+H]^+$ 1533,86).



Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico

Detecção de S-glutatioiação por LC-MS/MS – As análises para identificação das subunidades e resíduos glutatiolados foram realizadas em espectrômetro de massa Waters SYNAPT HDMS (geometria Q-TOF) acoplado ao sistema nanoAcquity Waters UPLC. O sistema de UPLC foi equipado com uma coluna de dessalinização Waters Symmetry C18 (20 mm x 180 id μm ; 5 μm de tamanho de partícula), seguido por uma coluna analítica C18 Waters BEH130 (100 mm x 100 id μm ; 1,7 μm de tamanho de partícula). Após o processamento dos spots, as amostras tripsinizadas foram ressuspensas em 8 μl de água deionizada e injetadas no sistema. Os peptídeos foram dessalinizados na coluna *trap* por 3 min com fluxo de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ de 97:3 H₂O:ACN com 0,1% (v/v) de ácido fórmico. Em seguida, a eluição dos peptídeos da coluna *trap* foi realizada direcionando-os para a coluna analítica BEH130 C18 (Waters) utilizando um fluxo de 1,0 $\mu\text{l}/\text{min}$ com gradiente linear de 97:3 para 30:70 H₂O:ACN, com 0,1 % (v/v) de ácido fórmico durante um total de 60 min de análise. Os dados espectrais foram processados por deconvolução utilizando o algoritmo (MaxEnt3) do software MassLynx v.4.1. Após a corrida das amostras, os arquivos RAW foram processados utilizando ProteinLynx Global Server versão 2.2 (Waters) e analisados utilizando o programa de busca MASCOT versão 2.2 (MatrixScience Ltd.). Para cada subunidade previamente identificada, utilizamos também listas preferenciais de inclusão contendo a relação *m/z* dos íons glutatiolados (+305,1). Caso a relação *m/z* do íon precursor fosse detectada, este íon seria preferencialmente selecionado para análise de MS/MS. As massas constituintes da lista de inclusão foram adquiridas a partir da digestão *in silico* de cada subunidade do 20SPT com tripsina, utilizando o software Protein Prospector (prospector.ucsf.edu).

Linhagens Bacterianas:

- DH5 α ; [*endA1*, *hsdR17* ($r_k^- m_k^+$), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA* (*Na 1'*), *relA1*, Δ (*lacZYA-argF*)_{U169} (*m80lacZ* Δ M15)]
- BL21(DE3); [*F'*, *amp T*, *hsdS_b* ($r_B^- m_b^-$), *gal*, *dcm*] (DE3) (Novagen)

Clonagem do gene GRX2 - O grupo do Prof. José Á. Bárcena do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade de Córdoba, Espanha, gentilmente nos cedeu a linhagem bacteriana transformada com plasmídeo contendo o gene codificante da Grx2. O protocolo de clonagem está descrito em Pedrajas e col. (2002). Suscintamente, o gene foi

amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *S. cerevisiae*. Foram utilizados primers específicos contendo sítios de restrição para NdeI e BamHI baseados no banco de dados “*Saccharomyces* Genome Databank”. O produto amplificado por PCR foi clonado no vetor pGEM-T Vector System (Promega), seqüenciado e subclonado no vetor de expressão pET-15b (Novagen). A proteína recombinante foi fusionada no N-terminal a um peptídeo de 20 resíduos de aminoácidos contendo uma cauda de poli-histidina e um sítio de clivagem por trombina. Bactérias *E. coli* da linhagem BL21(DE3) da Novagen foram transformadas para a indução e a expressão do gene.

Indução e expressão do gene *GRX2* – A linhagem bacteriana BL21(DE3) transformada com o plasmídeo pET15b-GRX2 foi inoculada em meio Luria-Bertani (LB – 1 % triptona, 0,5 % extrato de levedura e 1 % NaCl) contendo 100 µg/ml do antibiótico ampicilina utilizado como marca de seleção. As células foram deixadas sob agitação a 37 °C em shaker orbital até atingirem OD₆₀₀= 0,8. A indução do gene foi realizada por 4 horas após a adição de 0,5 mM de isopropil β-D-tiogalactosídeo (IPTG) ao meio de cultura. As células foram então coletadas e congeladas a -20 °C até o momento da purificação.

Purificação e ensaio de atividade enzimática da Grx2 – Para a purificação da Grx2, as células foram ressuspendidas em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,5 contendo 150 mM NaCl e 1 mM do inibidor de protease fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF). O sonicador Unique Ultrasonic foi utilizado para a ruptura celular e o extrato foi tratado com 1 % de sulfato de estreptomicina por 20 minutos a 4 °C sob agitação. A amostra foi então centrifugada a 15000 rpm por 45 minutos a 4 °C com subsequente filtração do sobrenadante em filtros de 45 µm (Amicon - Millipore). A Grx2 foi purificada do extrato celular por cromatografia de afinidade a cobalto em colunas contendo resina TALON® (Clontech) de acordo com o manual do fabricante. A eluição da proteína ocorreu a partir de um gradiente de imidazol. Posteriormente, a proteína foi dessalinizada para o tampão 20 mM Tris-HCl pH 7,5 em colunas PD-10 Desalting (GE Healthcare). A atividade óxido-redutora da Grx2 foi determinada a partir da redução de 0,5 mM de 2-hidroxietil dissulfeto (HED), utilizando 0,5 mM de GSH, na presença de 0,2 U/ml de glutatona redutase de levedura (SIGMA) e 0,4 mM de NADPH como equivalente redutor. O consumo do NADPH foi monitorado

espectrofotometricamente a 340 nm. O ensaio foi realizado no volume final de 1 ml de tampão 0,1 M Tris-HCl pH 7,4 contendo 1 mM EDTA.

Oxidação de proteínas – As amostras de albumina foram oxidadas por 5 mM H₂O₂ durante 30 min à temperatura ambiente. Para prevenir oxidações inespecíficas e a geração de radicais livres via reação de Fenton, as amostras foram previamente incubadas por 5 min com o quelante de metais DTPA (100 µM). Após a oxidação, as amostras foram filtradas e ressuspendidas três vezes para a remoção do excesso de peróxido. A ovalbumina (Ova) foi oxidada na presença de 100 mM H₂O₂ e 1 % SDS por 2 h à temperatura ambiente. Posteriormente, Ova_{ox} foi incubada a 90 °C na presença de 50 mM DTT. Após o tratamento, a Ova foi filtrada e rediluída extensivas vezes para a remoção dos reagentes utilizados. A concentração protéica das amostras foi quantificada por Bradford (Biorad) e as proteínas oxidadas foram submetidas aos demais ensaios.

Análise da degradação de proteínas por SDS-PAGE - Alíquotas das proteínas foram incubadas na presença do 20SPT de levedura em tampão padrão a 30 °C. O tempo de incubação variou dependendo da característica da proteína e do interesse do experimento. Após a incubação, separamos o proteassomo do substrato e seus fragmentos por filtração em microfiltros de 100 kDa (Amicon Ultra). Ao filtrado recuperado, adicionamos tampão de amostra (10 % de glicerol, 1 % SDS, 0,02 % de azul de bromofenol em 100 mM de tampão Tris-HCl pH 6,8). Quando as proteínas utilizadas como substrato não possuíam massa molecular próxima às das subunidades do proteassomo (entre 20 e 32 kDa), o proteassomo também foi aplicado no gel e suas bandas aparecem destacadas acima das demais proteínas. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida (12,5 a 20 %) e submetidas à eletroforese. Os géis foram posteriormente corados com Coomassie Blue ou Nitrato de Prata.

Determinação do perfil de fragmentação de proteínas por HPLC – Para a análise do perfil de fragmentação de proteínas pelo 20SPT, 150 a 300 µg das proteínas substrato (Ovalbumina oxidada e Grx2) foram incubados na presença de 30 µg de 20SPT por 16 h a 30 °C. As amostras hidrolisadas foram separadas das frações protéicas por microfiltração em 10 kDa. O material filtrado foi imediatamente analisado por HPLC (Shimadzu Corporation). As

separações foram realizadas em coluna C18 de fase reversa (ODS Hypersil 150 mm comprimento, ID 4.6 mm, tamanho de partícula 5µm - Thermo) com um volume máximo de injeção de 1 ml em fluxo de 1 ml/min. Os tampões da fase móvel utilizados foram: Solução A (0,1 % de TFA) e solução B (0,1 % de TFA, 90% de acetonitrila). A eluição dos peptídeos foi monitorada a 214 nm (UV-VIS detector Shimadzu SPD-10A). Como padrão de corrida dos produtos de Ovalbumina, 3 pmol do peptídeo sintético SIINFEKL (MW 963,1 Da) foram injetados para identificação do tempo de retenção e o isolamento do pico. Os métodos de corrida contendo os gradientes utilizados para cada substrato estão destacados abaixo.

<i>SIINFEKL e Ovalbumina</i>		<i>Glutarredoxina 2</i>	
Tempo de corrida	Solução B	Tempo de corrida	Solução B
0 min	0 %	0 min	0 %
30 min	30 %	40 min	80 %
40 min	60 %	50 min	100 %
50 min	100 %		

Análise do proteassomo 20S por microscopia eletrônica - Um volume de 12 µl de proteassomo (0,1- 0,5 µg/µl) foi aplicado sobre grades de cobre (300-400 meshes) recobertas com filme de parlódio e carbono. Após 1 minuto, o excesso do líquido foi removido com auxílio de papel de filtro e imediatamente adicionou-se 12 µl de solução aquosa de 2% ácido fosfotúngstico pH 7,2. Novamente com o auxílio de um papel de filtro, removemos por completo a solução contrastante após 10 segundos. As grades foram então examinadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão LEO 906E (Zeiss, Alemanha) do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan com voltagem de aceleração de 100 kV. As imagens foram capturadas por câmera integrada Megaview III utilizando o software iTEM - *Universal TEM Imaging Platform* (Olympus Soft Imaging Solutions GMBh, Alemanha).

IV. Resultados

Glutatiolação da unidade catalítica do proteassomo

O proteassomo e a caracterização do processo de glutatiolação deste complexo têm sido objeto de estudo do nosso grupo há quase uma década. Com a descrição do mecanismo bioquímico de glutatiolação do proteassomo 20S (Demasi e col., 2003 – Anexo IV) passamos a investigar as condições fisiológicas de glutatiolação do 20SPT, bem como o mecanismo pelo qual esta modificação pós-traducional altera a atividade proteolítica do complexo. Para compreender este mecanismo, fez-se essencial a caracterização de condições nas quais a glutatiolação ocorra *in vivo*, assim como identificar os sítios de glutatiolação na unidade catalítica 20S. O 20SPT foi purificado a partir de células de levedura (linhagem RJD1144) mantidas sob nossa condição padrão (YPD, contendo 4 % de glicose por 60 h de incubação a 30 °C), com as células sendo coletadas entre a transição diáuxica e a fase estacionária de crescimento. O 20SPT contendo cauda de poli-histidina foi purificado por cromatografia de afinidade e eluído em gradiente linear de imidazol. A figura 5 apresenta o cromatograma de uma purificação padrão do 20SPT monitorado espectrofotometricamente a 280 nm, evidenciando o pico de eluição da proteína em aproximadamente 60 % de solução B. O excesso de NaCl e imidazol utilizados durante a purificação foi removido por dessalinização em colunas do tipo PD-10 Desalting (GE Healthcare) e a pureza da preparação foi analisada em gel SDS-PAGE, evidenciando o padrão de distribuição de bandas das 14 diferentes subunidades (Fig. 6).

Demasi e col. (2001, 2003) descreveram que a atividade tipo-quimiotripsina (ChT-L) do 20SPT é modulada por glutatona reduzida (GSH) tanto em levedura quanto em células de mamíferos. Diferentemente do proteassomo de mamífero, a atividade do 20SPT de levedura não responde a incubações na presença de glutatona oxidada (GSSG). No 20SPT de leveduras, a via de glutatiolação envolve a formação do intermediário ácido sulfênico nos resíduos de cisteína da proteína, tornando-os susceptíveis a reagir com a forma reduzida da glutatona (Demasi e col., 2003).

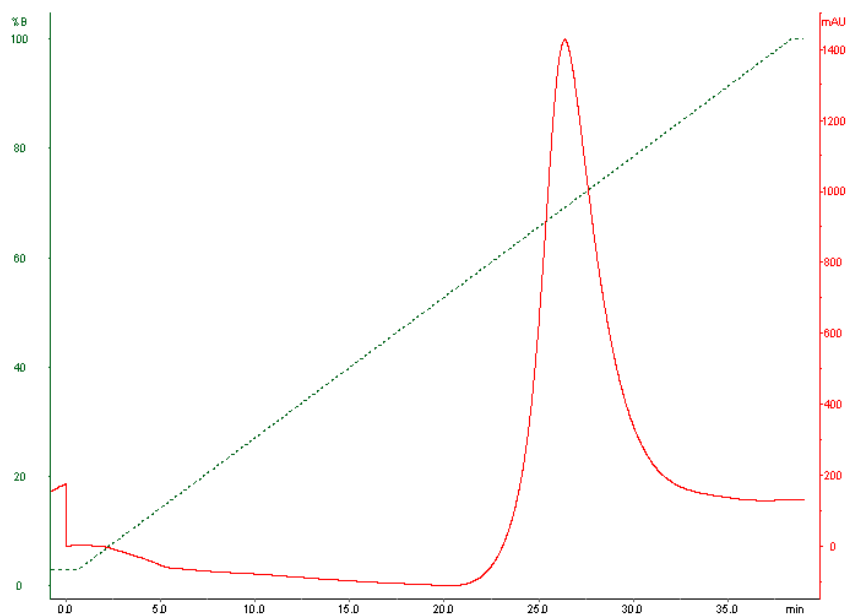


Figura 5. Cromatograma da purificação do proteassomo 20S – A purificação do proteassomo 20S por cromatografia de afinidade a níquel foi realizada em colunas HisTrap FF (GE Healthcare) no sistema de FPLC ÄKTA *purifier* (GE Healthcare). A cromatografia foi monitorada a 280 nm e o pico do proteassomo eluído foi verificado a partir de 60 % do tampão B (tampão padrão contendo 400 mM de imidazol). A presença de proteassomo foi posteriormente confirmada nas alíquotas por determinação da atividade peptidásica.

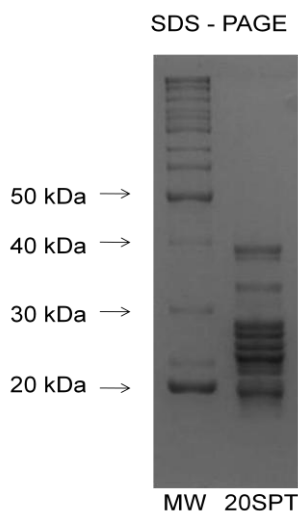


Figura 6. Verificação da pureza do proteassomo 20S por SDS-PAGE - A pureza das preparações do 20SPT foi verificada em gel 12,5 % SDS-PAGE evidenciando o perfil de separação das 14 subunidades. 20SPT, representa 15 µg do proteassomo 20S purificado e MW, o padrão de peso molecular Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen) em gel corado com Coomassie Brilliant Blue.

Para identificarmos a presença de glutatona ligada ao 20SPT, realizamos tratamentos com concentrações crescentes de GSH. Após analisar a modulação da atividade catalítica, liberaríamos a GSH associada ao proteassomo por redução do dissulfeto misto formado. O excesso de GSH não reagido foi eliminado da preparação por ciclos de filtração e re-diluição. Subseqüente a filtração do 20SPT, alíquotas foram retiradas para quantificar a atividade

tipo-quimiotripsina (ChT-L) e conjuntamente determinar os níveis de glutatona incorporados. Para a dosagem de GSH, as alíquotas do 20SPT foram desnaturadas por fervura, reduzidas na presença de 100 mM de borohidreto de sódio (NaBH₄) e após sua eliminação, reagidas com 80 μM de DTNB. As concentrações de GSH utilizadas e a atividade ChT-L correspondente estão apresentadas na tabela 1. A inibição de aproximadamente 70 % da atividade ChT-L foi alcançada em altas concentrações (10 mM) de GSH e foi interessante notar que mesmo a amostra não incubada com GSH (purificada diretamente de YPD) possuía considerável quantia de GSH, evidenciando a glutatilação *in vivo* do proteassomo. Esses dados foram corroborados por ensaios de imunomarcção utilizando anticorpo anti-GSH, no qual o proteassomo purificado de YPD (PT-YPD) e o proteassomo tratado com 10 mM GSH (PT-SG) foram imunomarcados contra GSH. A imunomarcção anti-GSH confirmou a presença de glutatona no 20SPT extraído diretamente de YPD e um intenso aumento após a incubação com GSH (Fig. 7). Para a realização do ensaio, a proteína aplicada foi quantificada pelo ensaio de Bradford e confirmada com a coloração Ponceau-S (Fig. 7), demonstrando que as diferenças apresentadas devem-se exclusivamente a quantidade de glutatona incorporada ao proteassomo.

Tabela 1. Quantificação de GSH liberada do proteassomo e determinação da atividade tipo-quimiotripsina (ChT-L) correspondente.

GSH	GSH liberada (nmol/mg PT20S)	Atividade Cht-L (%)
Sem adição	8,5	100 ± 12
7,5 mM GSH	33 ± 10	89 ± 18
10 mM GSH	30,5	28 ± 11

Proteassomo purificado de células crescidas em meio rico contendo 4% de glicose foi incubado com as concentrações referidas de glutatona e após a lavagem do excesso de GSH, foi feita a determinação da atividade Cht-L do PT20S. As mesmas amostras foram reduzidas com 100 mM de NaBH₄ para liberação da glutatona e o teor de GSH liberado foi dosado conforme descrito em Materiais e Métodos.

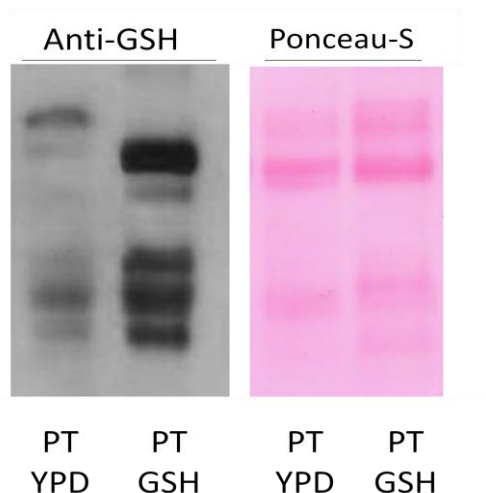


Figura 7. Identificação da glutatilação do 20SPT por imunomarcção - O proteassomo purificado (20 μ g) de YPD (PT-YPD) foi incubado com 10 mM de GSH (PT-GSH) e ambas as amostras foram imunomarcadas com anticorpo anti-GSH conforme descrito em Materiais e Métodos. A membrana corada com Ponceau-S demonstra que não há discrepância na aplicação protéica das duas amostras. O ensaio demonstrou a glutatilação do 20SPT *in vivo* intensificada pelo tratamento *in vitro* com GSH.

A partir dos dados obtidos na figura 7, estabelecemos estes dois modelos para investigar quais seriam as subunidades modificadas do 20SPT e quais os possíveis mecanismos que propiciam a modulação da atividade catalítica: o proteassomo nativamente glutatiliado extraído de YPD (PT-YPD) e o proteassomo extraído de YPD tratado com GSH *in vitro* (PT-SG). Somente a imunomarcção a partir de gel SDS-PAGE não seria capaz de fornecer resolução suficiente para identificarmos cada subunidade glutatiliada, já que as massas moleculares das 14 subunidades do proteassomo variam somente em 10 kDa (Tabela 2). Padronizamos com o auxílio da Dra. Mari Sogayar e do Dr. Marcos Demasi do Instituto de Química da USP, a separação das subunidades do proteassomo por eletroforese bidimensional (2-DE). Esta técnica proporcionou o isolamento de cada proteína componente do 20SPT tanto por sua massa molecular quanto por ponto isoelétrico (pI). De acordo com as informações obtidas no banco de dados “*Saccharomyces* Genome Database” (www.yeastgenome.org), definimos a utilização de tiras de ampla faixa de pH (3 a 10) já que o ponto isoelétrico teórico das subunidades do proteassomo varia entre 4,5 e 7,5 (Tabela 2).

Buscamos inicialmente identificar as subunidades glutatiliadas por análises de migração diferencial dos spots modificados comparando a amostra purificada de YPD (PT-YPD) em gel redutor e não redutor (baseado em Kimura e col., 2000). A adição do tripeptídeo GSH que contém um glutamato conferiria um caráter ácido à proteína, reduzindo seu ponto isoelétrico. No entanto, em nossos ensaios, não foi possível verificarmos nenhuma migração notável de spots entre as condições reduzidas e glutatiliadas (Fig. 8, A e B respectivamente).

Tabela 2. Descrição das subunidades do proteassomo 20S da levedura *S. cerevisiae*.

Subunidade	Gene - Locus	Massa	pI	Número aa	N-term	C-Term
ALFA1	SCL1 - YGL011C	28001	6,17	252	MSGAAAA	VAIAEQD
ALFA2	PRE8 - YML092C	27162	5,50	250	MTDRYSF	NDRLEAL
ALFA3	PRE9 - YGR135W	28714	4,91	258	MGSRRYD	EADEDMK
ALFA4	PRE6 - YOL038W	28439	7,37	254	MSGYDRA	KKKKS NH
ALFA5	PUP2 - YGR253C	28617	4,49	260	MFLTRSE	EADVEMS
ALFA6	PRE5 - YMR314W	25604	7,43	234	MFRNNYD	EAVAKYI
ALFA7	PRE10 - YOR362C	31536	4,90	288	MTSIGTG	EGDIHLE

Subunidade	Gene - Locus	Massa	pI	Número aa	N term	C Term
BETA1	PRE3 - YJL001W	23547	5,73	215	MNGIQVD	PDEYEQL
BETA2	PUP1 - YOR157C	28268	6,60	261	MAGLSFD	EQVDITA
BETA3	PUP3 - YER094C	22605	4,87	205	MSDPSSI	YLKMRQD
BETA4	PRE1 - YER012W	22516	6,15	198	MDIILGI	VDDFQAQ
BETA5	PRE2 - YPR103W	31636	6,17	287	MQAIADS	SFNNVIG
BETA6	PRE7 - YBL041W	26871	5,99	241	MATIASE	FYELKRD
BETA7	PRE4 - YFR050C	29443	5,81	266	MNHDPFS	GYGTQKI

A tabela descreve as 14 subunidades do proteassomo de levedura de acordo com o banco de dados “*Saccharomyces* Genome Database” (www.yeastgenome.org). O nome do gene e o respectivo locus, assim como a massa molecular e o ponto isoelétrico (pI) de cada subunidade estão identificados. As seqüências C e N-terminal de cada proteína também estão destacadas, assim como o número de aminoácidos (aa) que constitui cada cadeia.

Como não obtivemos sucesso na identificação das subunidades glutatioladas por análise migracional dos spots, decidimos empregar a utilização do anticorpo anti-GSH para a imunomarcagem das subunidades isoladas por 2-DE, porém, necessitávamos previamente identificar cada spot para correlacionar com a subunidade correspondente. Padronizamos então, a melhoria das condições de separação das subunidades do 20SPT por 2-DE para a identificação por *fingerprinting* dos peptídeos por espectrometria de massas. A utilização do sistema de focalização isoelétrica IPGphor3 em cuba de eletroforese DaltSix (26 x 20 cm) (ambos GE Healthcare) possibilitou aumentar o tamanho das tiras e o tamanho dos géis utilizados, fato que permitiu não somente um aumento na resolução de separação dos spots, como também aplicação de maior massa protéica.

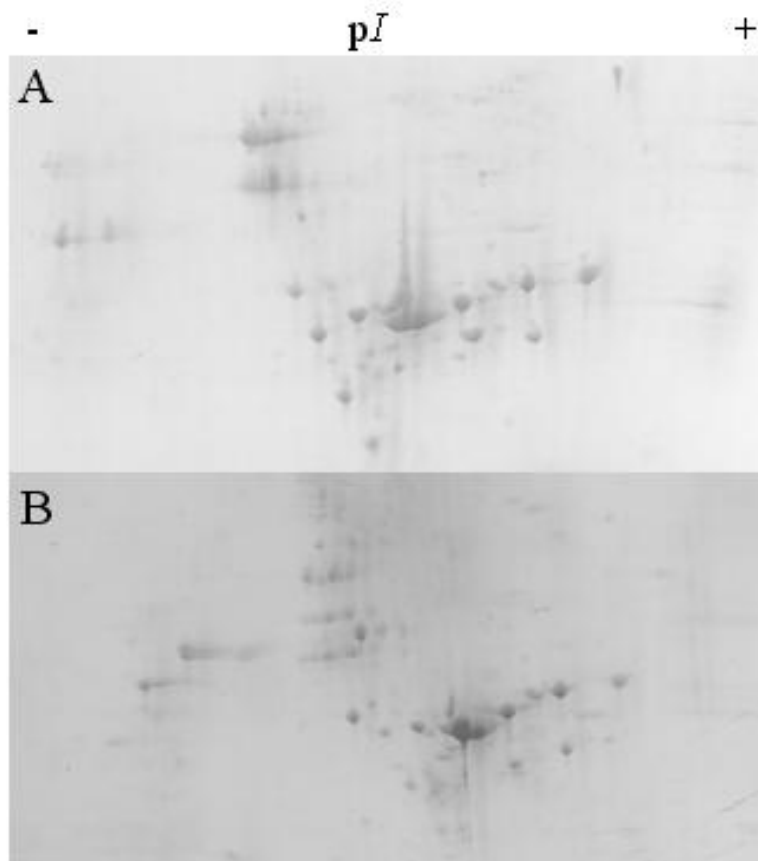


Figura 8. Análise por eletroforese bidimensional (2-DE) do proteassomo 20S de levedura *Saccharomyces cerevisiae* - Alíquotas (50 µg) do 20SPT purificado de YPD (PT-YPD) foram submetidas à eletroforese bidimensional conforme descrito em Materiais e Métodos na presença de DTT **(A)** ou na ausência **(B)**, evidenciando a separação das subunidades do proteassomo.

Devido à maior capacidade de aplicação protéica, conseguimos pela primeira vez visualizar subunidades que apareciam menos intensas em nossos experimentos. Apesar da equimolaridade das subunidades do 20SPT, trabalhos da literatura já apresentaram dificuldades para a visualização de algumas subunidades, como a subunidade $\alpha 7$ e as subunidades $\beta 2$ e $\beta 5$ (Chouduri e col., 2008; Kimura e col., 2000). A padronização e a melhoria da resolução do perfil de separação variando inclusive a faixa de pH utilizada, pode ser verificada na figura 9, onde a região ao redor do pH 6,0 assinalada em azul apresenta uma grande separação dos spots, assim como a região de pH mais ácido assinalada em vermelho. O aumento na quantidade de proteína aplicada a cada tira também foi um fator importante, já que, como essas subunidades apresentaram-se melhor representadas nos géis, elas puderam ser excisadas para a correta identificação por espectrometria de massa.

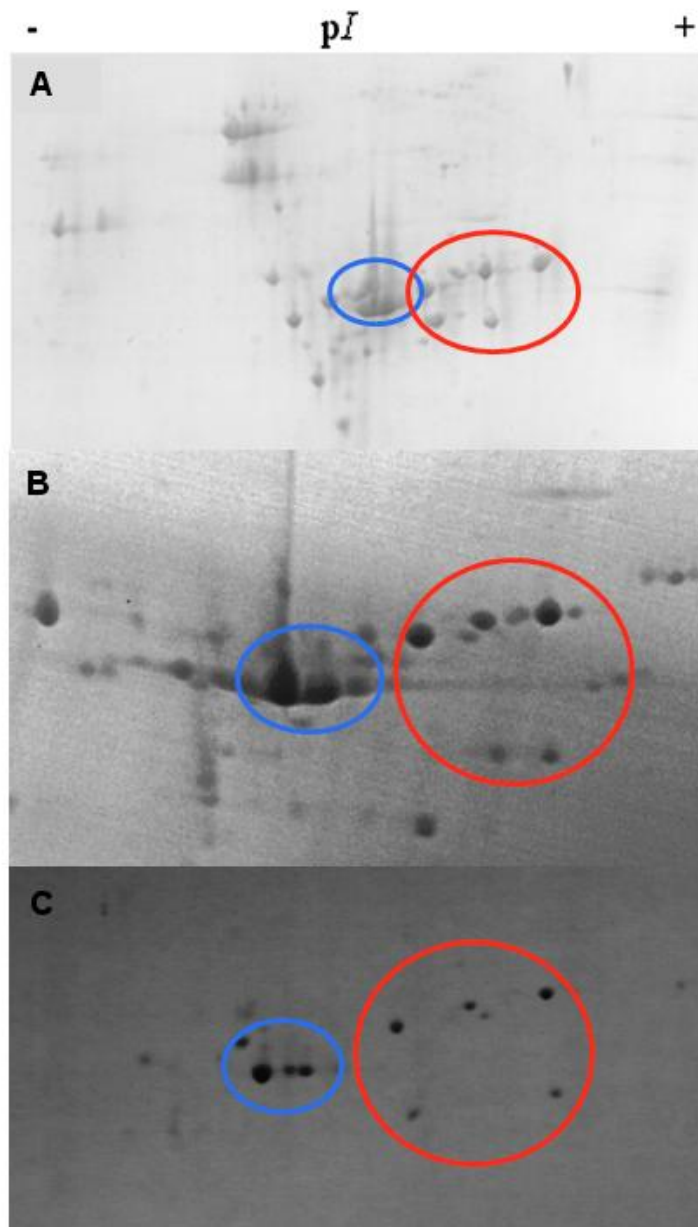


Figura 9. Incremento na resolução da separação das subunidades do 20SPT por 2-DE - Para melhor isolar as subunidades do 20SPT nos ensaios de eletroforese bidimensional, modificamos diversos parâmetros da focalização isolétrica, entre eles: **(A)**, tiras de 11 cm, pH 3 a 10; **(B)** tiras de 18 cm, pH 3 a 10; **(C)** tiras de 18 cm, pH 4 a 7; até atingir uma separação ideal dos spots, na qual não haja sobreposição. A região próxima ao pH 6,0 (assinalada em azul) possui diversos spots com pI e massa molecular próximos, aparecem mais destacados em C, assim como os spots assinalados na região mais ácida em vermelho, evidenciando o ganho em resolução.

Para a identificação das proteínas constituintes de cada spot, contamos com a colaboração de Clécio Klitzke, então pesquisador do Centro de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan. Cada spot excisado foi digerido *in-gel* com solução de tripsina e os produtos peptídicos foram analisados em um espectrômetro de massas tipo MALDI-TOF

(Ettan - GE Healthcare). O aparelho foi calibrado com dois padrões peptídicos e o espectro destes calibrantes está apresentado na figura 10. A partir da calibração do aparelho, cada digestão trípica foi adicionada ao *slide* do aparelho e recoberta com ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico utilizado como matriz. As análises foram realizadas até acumular 200 espectros e a figura 11 apresenta um espectro resultante representativo da digestão de uma das subunidades do 20SPT ($\alpha 6$). A lista de massas obtida a partir de cada espectro foi adicionada ao programa de busca Mascot (Matrix Science) utilizando um algoritmo baseado em MOWSE (*MOlecular Weight Search algorithm*) segundo o banco de dados da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Uma tabela contendo os respectivos *scores* (pontuações), índices de cobertura e peptídeos identificados para cada subunidade encontra-se no Anexo I.

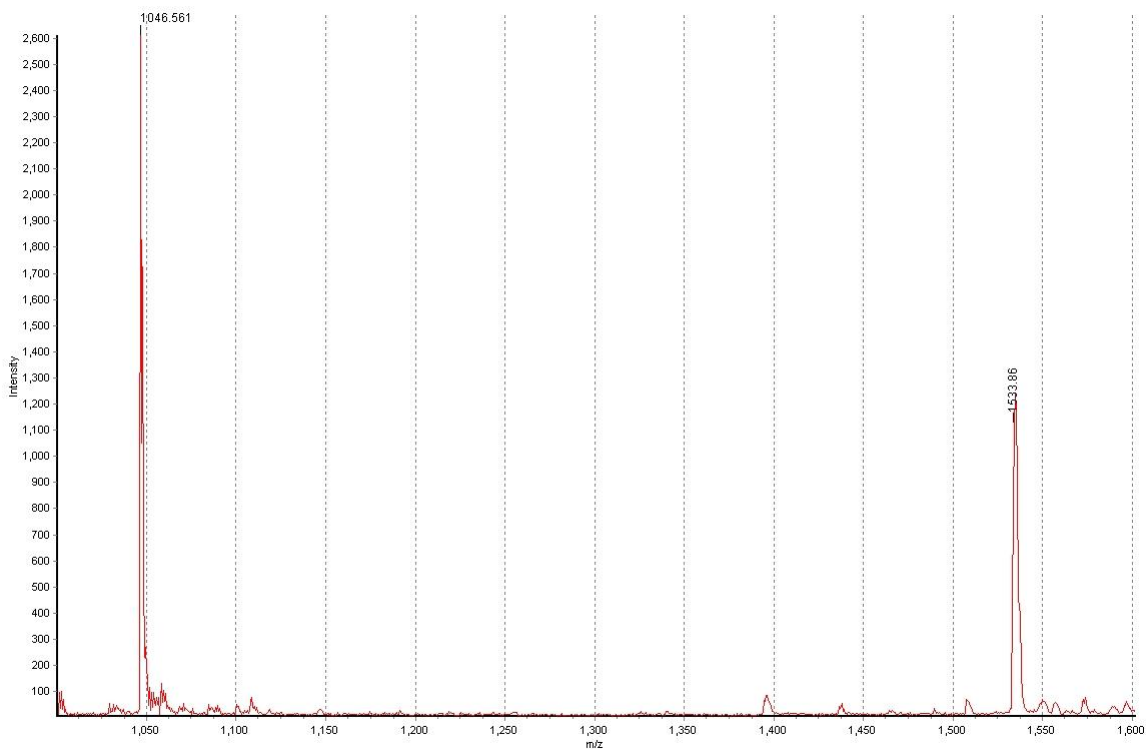


Figura 10. Espectro de MS representativo dos padrões externos de calibração - Previamente as análises por Maldi-TOF-MS, o aparelho foi calibrado utilizando como padrão externo a angiotensina II $[M+H]^+$ 1046,54 e o peptídeo sintético P14R $[M+H]^+$ 1533,86. O espectro demonstra a pureza dos calibrantes utilizados.

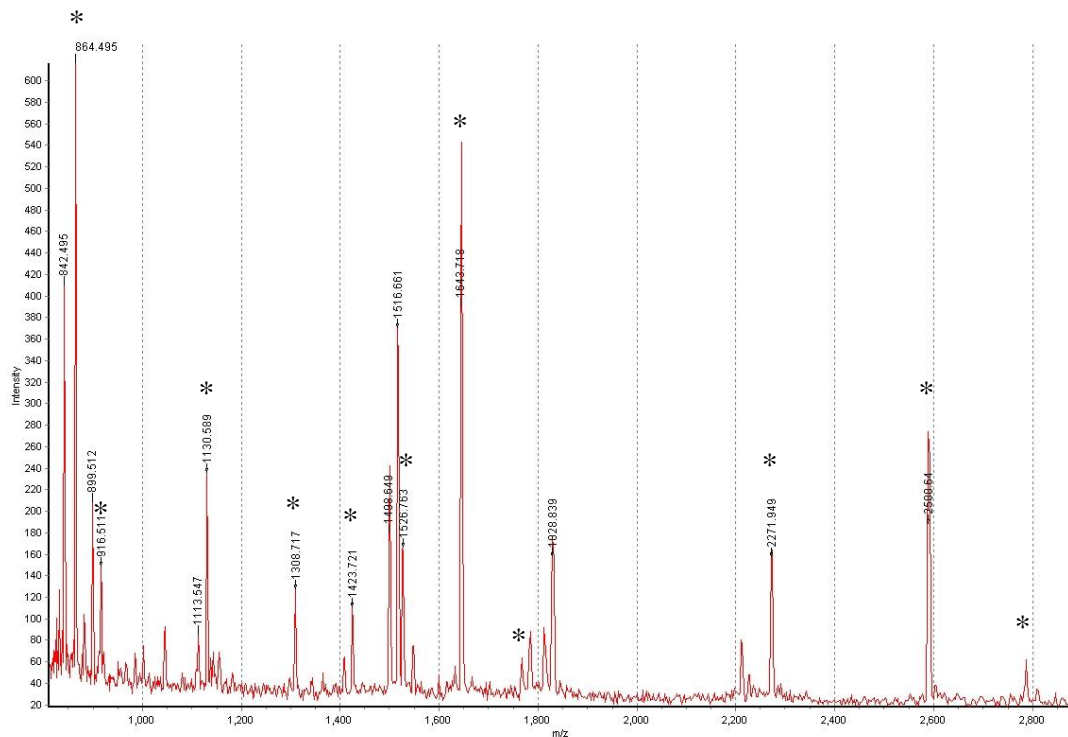


Figura 11. Espectro de massas representativo da digestão da subunidade $\alpha 6$ do proteassomo 20S - Após a separação das subunidades por eletroforese bidimensional, os spots foram excisados do gel e digeridos com tripsina segundo Materiais e Métodos. Após a dessalinização e purificação dos peptídeos em colunas Zip-Tip (Millipore), as amostras foram adicionadas aos slides do espectrômetro e cobertos com matriz até a completa cristalização. As razões massa/carga destacadas (*) correspondem aos peptídeos trípticos posteriormente identificados como componentes da subunidade $\alpha 6$.

Com a identificação das subunidades por espectrometria de massas, na figura 12 apresentamos o perfil de separação do 20SPT por 2-DE. Alguns spots apresentam-se em formas múltiplas principalmente devido a modificações pós-traducionais e a diferentes estados de oxidação (metionina e cisteína) que promovem mudança de mobilidade por alteração do ponto isoelétrico. Juntamente com as 14 subunidades do 20SPT, diversas outras proteínas foram identificadas em nossos estudos. Estas proteínas poderiam estar co-purificando com a fração proteassomal, contaminando nossas amostras, no entanto, a utilização de 500 mM de NaCl durante todo o processo de purificação, filtrações em membranas de poros de 100 kDa e dessalinização em colunas de exclusão molecular deveriam reduzir essa possibilidade. Por outro lado, diversas proteínas denominadas PiPs (*Proteasome interacting Proteins*) já foram identificadas como capazes de interagir com 26SPT (Verma e col., 2000; Scanlon e col., 2009; Bardag-Gorce e col., 2010).

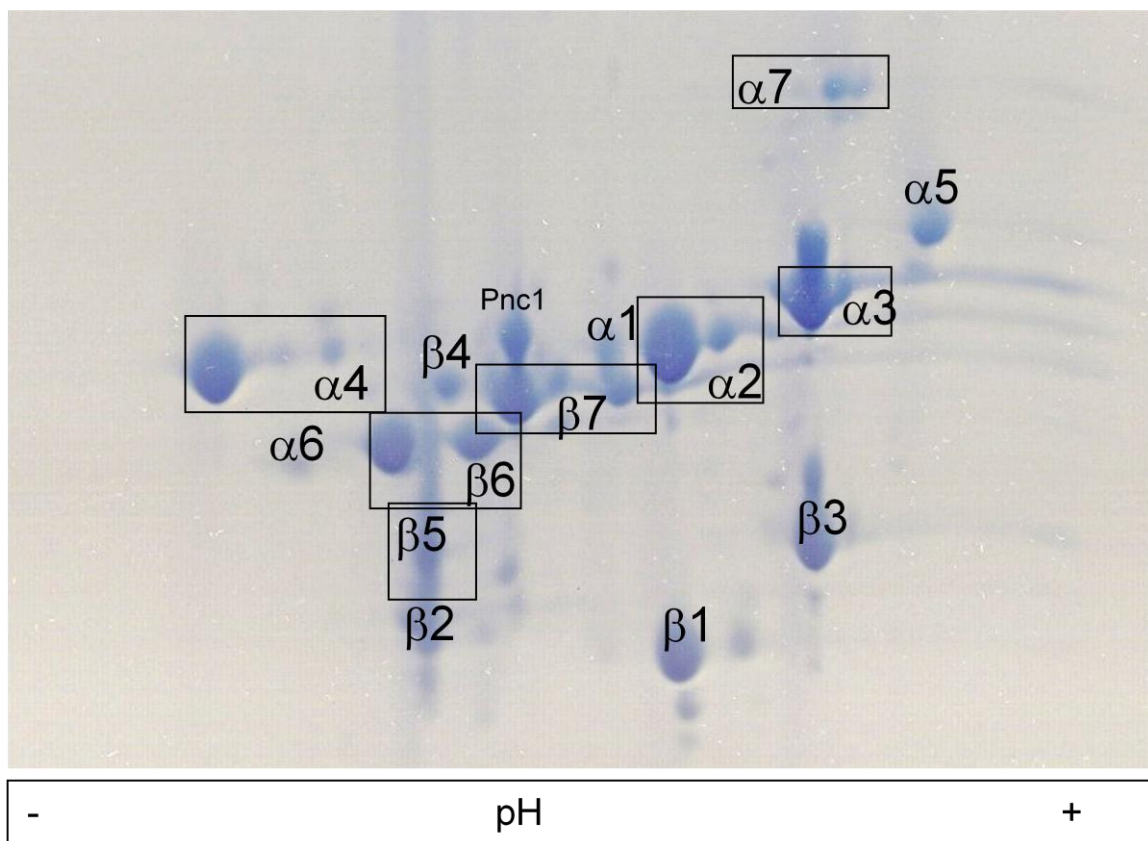


Figura 12. Identificação das subunidades do proteassomo 20S de levedura por 2-DE - Uma alíquota de 150 μg de proteassomo foi submetido à eletroforese bidimensional em tiras de 18 cm com gradiente de pH variando entre 4 e 7. Os spots corados com Coomassie coloidal foram excisados e tratados segundo Matérias e Métodos. Os spots tiveram seu conteúdo protéico digerido com tripsina e os peptídeos analisados por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF para a identificação correta de cada subunidade.

Em análises por ESI-Q-TOF a partir de uma amostra de proteassomo purificado digerido em solução com tripsina, caracterizamos diversas proteínas que poderiam estar associadas, interagindo com a unidade catalítica 20S. Concluímos que parte destas proteínas estaria associada ao proteassomo e não somente co-purificando pela identificação de proteínas envolvidas no metabolismo de ubiquitina como Hbt1 e Bul1 Ubp3. Entre as proteínas identificadas em nossos estudos, uma em especial possui ponto isoelétrico e massa molecular semelhante às subunidades do proteassomo. Esta proteína foi identificada como a nicotinamidase Pnc1 estando também representada na figura 12. Esta enzima converte nicotinamida a ácido nicotínico como parte da via de recuperação de NAD(+) e

ainda é requerida para a extensão da longevidade de leveduras induzida por restrição calórica (Ghislain e col., 2002; Anderson e col., 2003). A expressão de Pnc1 responde a todos os estímulos que expandam o tempo de vida replicativo da levedura e provavelmente esteja expressa em nossa condição devido à fase estacionária de crescimento na qual as células foram submetidas. Outras proteínas identificadas que estão correlacionadas com a condição de crescimento celular são a álcool desidrogenase 3 (Adh3) e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Tdh1). O gene nuclear ADH3 tem sua expressão reprimida na presença de glicose e codifica para a isoforma da matriz mitocondrial da álcool desidrogenase, descrita como envolvida na manutenção do balanço redox mitocondrial durante o crescimento anaeróbico (Bakker e col., 2000 e 2001). Já a Tdh1 é responsável por catalisar a reação de gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato, gerando NADH na glicólise (Delgado e col., 2001). Identificamos também a quinase responsável pela expressão de genes reprimidos por glicose, a Snf1 (*Sucrose Non Fermenting*). Esta proteína tem um papel central durante a desrepressão catabólica, fosforilando ativadores e repressores transcricionais necessários ao crescimento em fontes de carbono alternativas (Celenza e Carlson, 1984; Wilson e col., 1996; Sanz, 2003). Compreender o mecanismo pelo qual essas proteínas metabólicas estão envolvidas com o proteassomo e em especial com a fase estacionária de crescimento poderia facilitar o entendimento da função da protease durante transições metabólicas. Investigar também as propriedades de proteínas de função desconhecida pela ótica do proteassomo poderia fornecer informações sobre a função destas proteínas e sua relação com o metabolismo e a degradação de proteínas. A lista completa das proteínas co-purificadas e/ou que interagem com o 20SPT está apresentada no Anexo II.

Com a definição do perfil de separação das subunidades do 20SPT, passamos a buscar a glutatiolação das subunidades comparando o perfil apresentado na figura 12 aos ensaios de imunomarcção anti-GSH. Analisando o ensaio anti-GSH do PT-SG isolado por 2-DE, uma subunidade nitidamente imunomarcada foi a subunidade $\alpha 7$, que possui ponto isoelétrico e peso molecular muito distinto das demais (Fig. 13). Diversos spots imunomarcados geram dúvidas quanto a sua real equivalência, principalmente devido à presença de subunidades em spots múltiplos e devido ao fato de spots minoritários desconhecidos não terem sido identificados.

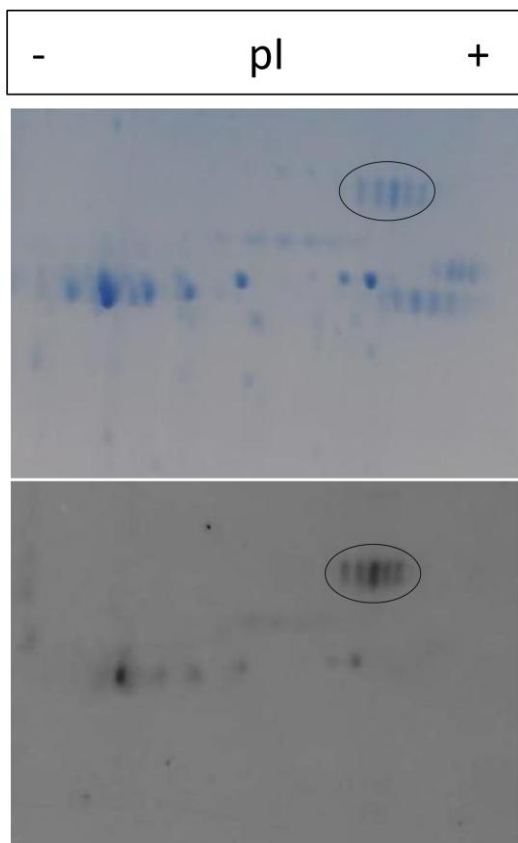


Figura 13. Imunomarcção anti-GSH do 20SPT isolado por eletroforese bidimensional - O 20SPT purificado e tratado com 10 mM de GSH foi separado em tiras de 7 cm, com a faixa de pH variando de 4 a 7. Após a finalização da segunda dimensão, o gel foi transferido para membrana de nitrocelulose e submetido imunomarcção anti-GSH (Arbor Assay) conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os spots circulado correspondem a subunidade $\alpha 7$ identificada como glutatiolada.

Apesar da subunidade $\alpha 7$ estar glutatiolada, é notável que esta abordagem subestimou o número de subunidades modificadas, uma vez que diversos outros spots apresentam-se imunomarcados. Além disso, a subunidade $\alpha 7$ possui três resíduos de cisteína e a correta identificação de qual resíduo estaria modificado seria importante para o entendimento do mecanismo pelo qual a glutatona regula a atividade catalítica do proteassomo. Para isso, uma nova abordagem foi utilizada: A partir do 2-DE, analisamos os fragmentos trípticos por espectrometria de massa em um equipamento de alta sensibilidade e resolução, que possibilita a análise seqüencial (MS/MS) e a atribuição de seqüencia dos peptídeos encontrados. Contamos então com a colaboração do Dr. Fabio Gozzo do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e com o apoio do doutorando Luiz Fernando Santos e do Dr. Eduardo Jorge Pilau de seu laboratório. Com a utilização de um espectrômetro de massas de geometria Q-TOF (Synapt HDMS Ultima, Waters, Milford) acoplado ao sistema nanoAcquity de UPLC foi possível analisarmos não somente a massa dos peptídeos trípticos do proteassomo 20S, mas também, os íons gerados após a fragmentação do íon precursor na câmara de colisão, atribuindo seqüencia cada íon fragmento.

Para determinarmos se com esta técnica seria possível identificar e atribuir a seqüência os peptídeos glutatiolados, utilizamos primeiramente como uma abordagem mais extensiva, o proteossomo glutatiolado *in vitro* na presença de 10 mM de GSH (PT-SG). Outro fator importante foi a alquilação dos resíduos de cisteína livres com iodoacetoamida (IAA) para impedir que estas sulfidrilas reduzam as Cys glutatioladas e evitar a formação de ligações dissulfeto durante a preparação das amostras. Os spots selecionados tiveram suas proteínas digeridas e os produtos peptídicos foram injetados via UPLC na coluna analítica de fase reversa, sendo imediatamente ionizados na fonte electrospray. Os espectros resultantes de cada corrida foram processados e analisados no software Mascot (Matrix Science). Alguns peptídeos esperados pela digestão *in silico* tiveram sua corrente iônica traçada no software MassLynx (Waters) para uma identificação mais acurada. Esta análise permitiu a identificação de três diferentes subunidades glutatioladas ($\alpha 5$, $\alpha 6$ e $\alpha 7$) e um total de seis resíduos de cisteína distribuídos entre elas.

A figura 14 apresenta o espectro de MS gerado contendo diversos peptídeos que possuem o mesmo tempo de retenção, incluindo um dos peptídeos de interesse de 1752,8 Da. Este peptídeo possui uma diferença de massa de +305 Da (relação m/z 585,28 para o íon com três cargas $[M+3H]^{3+}$) quando comparado com a espécie não glutatiolada do mesmo peptídeo (m/z 724,84 duplamente carregado $[M+2H]^{2+}$, 1447,67 Da). O espectro representativo de MS/MS de um dos peptídeos glutatiolados (Cys221 da subunidade $\alpha 5$), exibe a atribuição de seqüência do peptídeo LDENNAQLSCITK e sua respectiva série de fragmentação, demonstrando os íons detectados contendo a adição de glutatona (Fig. 15). A identificação do peptídeo tríptico + 305,1 Da na análise de MS e a identificação dos íons y_{4-13} e do íon b_{12} contendo a modificação por MS/MS mostram inequivocamente a presença da glutatona incorporada à cisteína deste peptídeo. Como controle, apresentamos na figura 16 o mesmo peptídeo LDENNAQLSCITK, extraído de uma amostra reduzida por DTT.

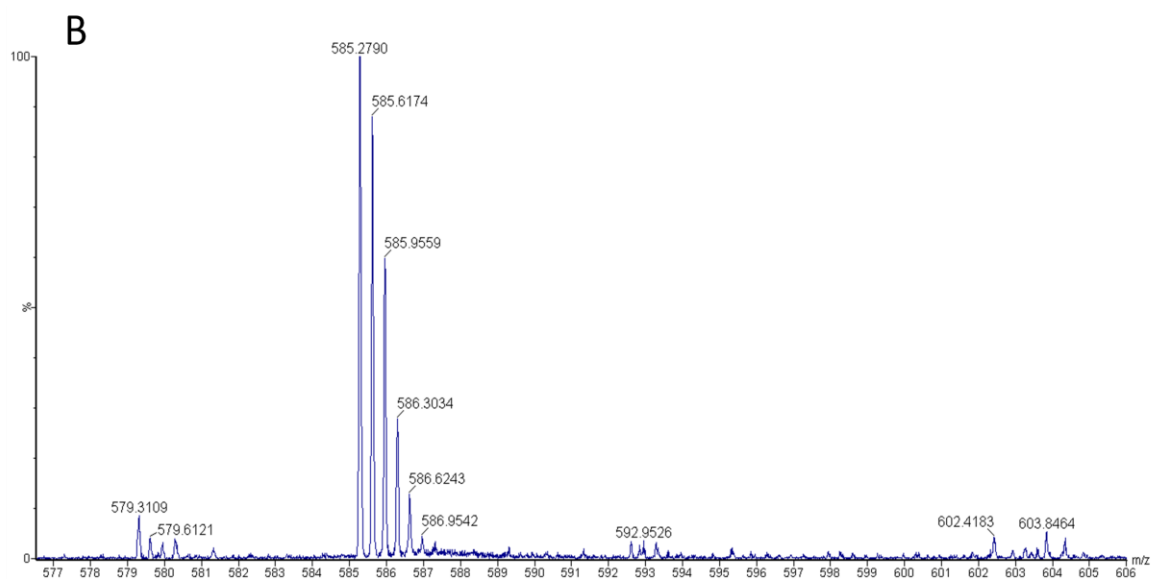
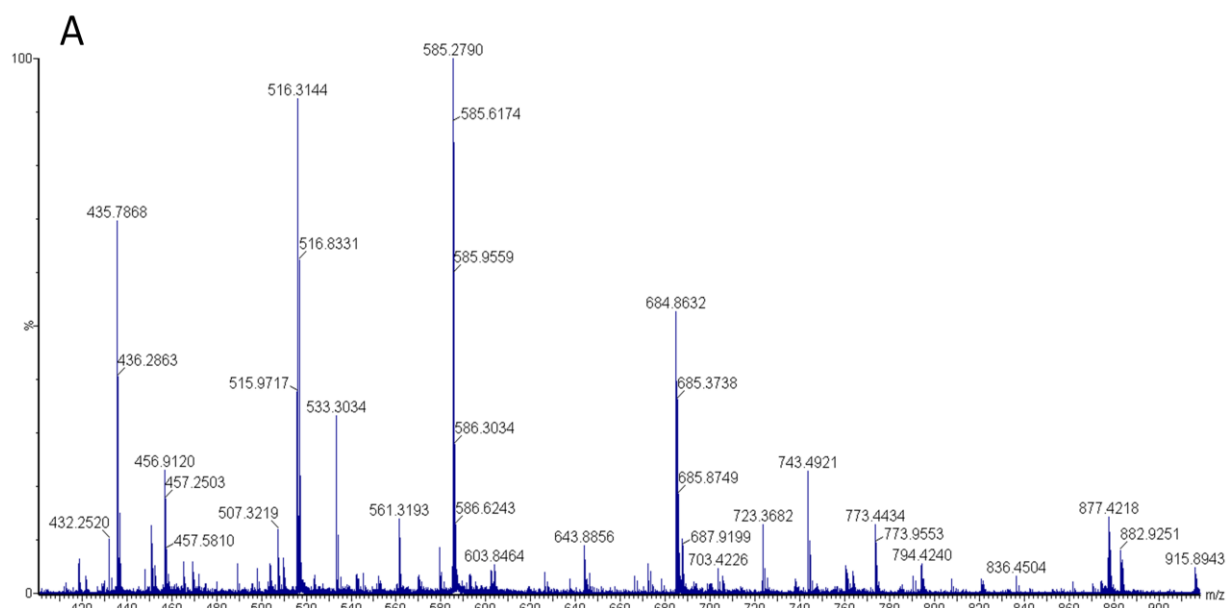


Figura 14. Espectro de MS do peptídeo glutatiolado m/z 585,28 $[M+3H]^{3+}$ da subunidade $\alpha 5$ do proteassomo 20S - Em (A) todos os íons detectados juntamente com o peptídeo de interesse (m/z 585) e em (B), o padrão de distribuição isotópico do íon 585,28 demonstrando estar triplamente carregado.

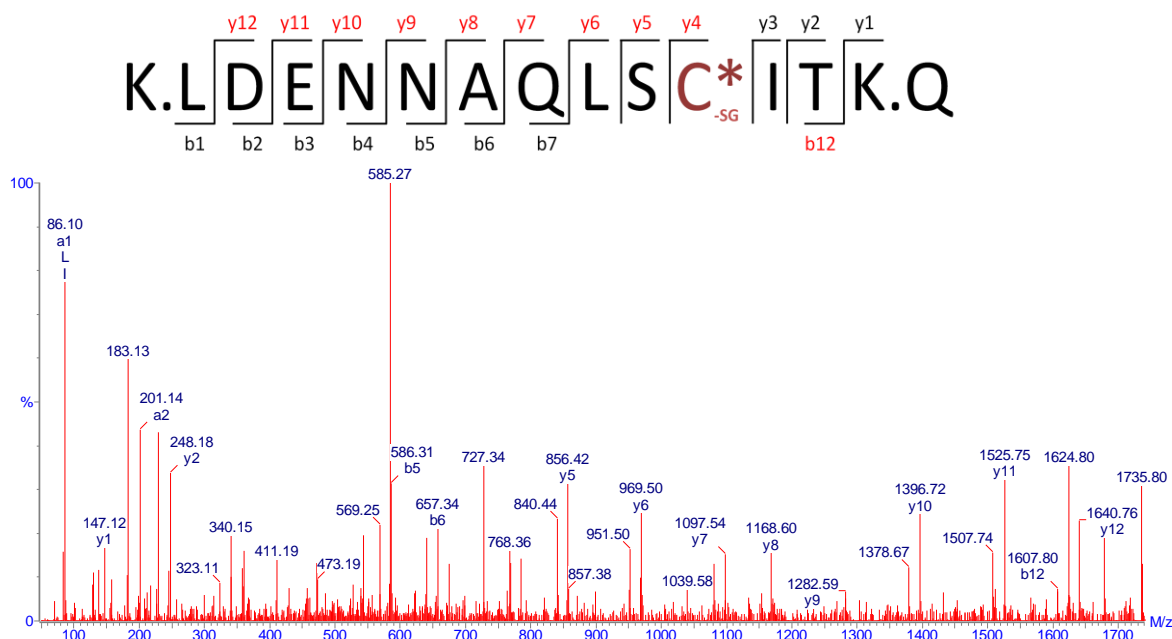


Figura 15. Espectro de MS/MS do peptídeo LDENNAQLS[C*]ITK S-glutiolado - Espectro representativo da atribuição de seqüência do peptídeo tríptico da subunidade $\alpha 5$ do 20SPT contendo a Cys221 glutiolada. A identificação de diversos íons da série y e b (anotados em vermelho na série de fragmentação) comprovam a adição de + 305,1 Da no resíduo de cisteína (+103 Da), corroborando a presença de glutiona no proteassomo. A seqüência do peptídeo e a série de fragmentação com os íons identificados estão assinalados na figura.

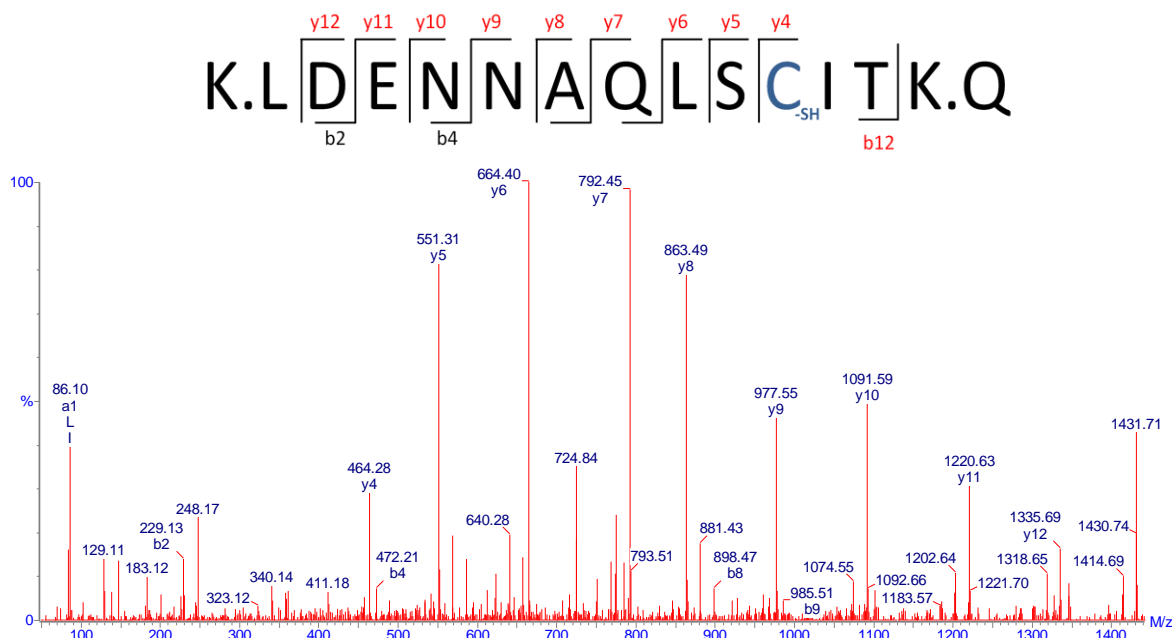


Figura 16. Espectro de MS/MS do peptídeo LDENNAQLS[C-SH]ITK reduzido - Espectro representativo da atribuição de seqüência do peptídeo tríptico da subunidade $\alpha 5$ do 20SPT contendo a Cys221 reduzida. A identificação de diversos íons da série y e b (anotados em vermelho na série de fragmentação) comprovam a presença da cisteína em sua forma reduzida (+ 103 Da). A seqüência do peptídeo e a série de fragmentação com os íons identificados estão assinalados na figura.

A partir destes resultados passamos a investigar a glutatilação *in vivo* do 20SPT, com ênfase nas subunidades glutatioladas já identificadas *in vitro*. Utilizando o proteossomo purificado a partir de nossa condição padrão (PT-YPD), identificamos três resíduos de cisteína glutatiolados sendo um deles diferente dos identificados previamente *in vitro*. Estes resultados apontam que somente uma pequena parcela (3 de 36) dos resíduos de cisteína foram susceptíveis a glutatilação *in vivo* nas nossas condições, sugerindo ser altamente específico, o processo de regulação redox do 20SPT. A tabela 3 apresenta uma compilação de todos os resíduos de cisteína glutatiolados *in vitro* e *in vivo*, assim como as respectivas subunidades, peptídeos e razões massa/carga (m/z) detectadas.

Tabela 3 – Resíduos de cisteína glutatiolados identificados por LC-MS/MS

Subunidade Posição	Resíduo Glutatiolado	Seqüência do Peptídeo	MS íon + GSH	MS/MS íon + GSH	Delta
PT-SG					
Alfa 5					
73-86	Cys76	R.HIGCAMSGLTADAR.S	1707,72	569,91	-0,03
94-122	Cys117	R.TAAVTHNLYYDEDINVESLTQSVCDLALR.F	3558,63	890,41	-0,04
212-224	Cys221	K.LDENNAQLSCITK.Q	1753,77	585,262	-0,02
Alfa 6					
66-82	Cys66	K.CDEHMGLSLAGLAPDAR.V	2060,88	687,63	-0,02
Alfa 7					
42-52	Cys42	K.CNDGVVFAVEK.L	1485,63	743,32	-0,01
73-86	Cys76	R.HIGCVYSGLIPDGR.H	1791,81	597,94	-0,02
PT-YPD					
Alfa 4					
40-48	Cys41	K.NCVVLGCER.R	1353,66	677,83	+0,11
Alfa 5					
73-86	Cys76	R.HIGCAMSGLTADAR.S	1706,81	569,94	-0,09
206-224	Cys221	K.QVMEEKLDENNAQLSCITK.Q	2513,10	1257,62	-0,09

O proteossomo nativamente glutatiolado purificado de YPD (PT-YPD) e o proteossomo glutatiolado *in vitro* (PT-SG) tiveram suas subunidades isoladas por eletroforese bidimensional, digeridas com tripsina e os produtos peptídicos analisados por espectrometria de massa ESI-Q-TOF-MS. A tabela apresenta as subunidades e os resíduos de Cys glutatiolados do 20SPT.

Tomando por base os ensaios de imunomarcação, provavelmente outras subunidades ainda possam ser identificadas como modificadas. Apesar das limitações de ambas as técnicas que utilizamos, é interessante notar que somente as subunidades alfa do proteassomo estão glutatioladas. Como a glutatiolação promove alteração da atividade do proteassomo, nossos dados sugerem que os sítios catalíticos sejam regulados por alteração em porções estruturalmente distantes.

Desglutatiolação do proteassomo 20S

Uma modificação pós-traducional para ser considerada regulatória, necessita uma diversidade de fatores: ocorrência fisiológica, modulação das características da proteína, especificidade de sítios e ser reversível. A ocorrência, a especificidade e modulação da atividade catalítica do 20SPT foram demonstradas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, restando apenas ser demonstrada a reversibilidade do processo. Presume-se que as enzimas responsáveis pela redução de dissulfetos mistos entre proteína e glutatona são as oxidoredutases Glutarredoxinas (Grx) e Tiorredoxinas (Trx). Em levedura já foram descritas oito isoformas de glutarredoxinas divididas em duas classes de acordo com o número de cisteínas envolvidas no mecanismo catalítico (Luikenhuis e col., 1998; Rodriguez-Manzaneque e col., 1999; Mesecke e col., 2008, Eckers e col., 2009). O mecanismo monotiólico é responsável pela redução de dissulfetos mistos entre proteína e glutatona ou tióis de baixo peso molecular enquanto o ditiólico pela redução de ligações dissulfeto em proteínas (Fernandes e Holmgren, 2004). Entre as Grxs ditiólicas que estão relacionadas com a desglutatiolação de proteínas, a Grx1 e a Grx2 possuem alta similaridade de seqüência primária (76 %). A linhagem mutante do gene *GRX1* é sensível a estresse oxidativo induzido pelo radical ânion superóxido enquanto a linhagem Δ *grx2* é sensível a estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (Luikenhuis e col., 1998).

De acordo com os dados de expressão protéica (Ghaemmaghami e col., 2003), localização celular e prováveis vias metabólicas envolvidas, a Grx2 era a proteína mais indicada a se buscar uma atividade desglutatioladora sobre o 20SPT. Além disso, Grx2 é duas ordens de grandeza mais eficiente no mecanismo monotiólico do que Grx1 (Discola e col., 2009). Com a obtenção do clone bacteriano de expressão da Grx2 de levedura, ensaios *in*

vitro foram realizados demonstrando a recuperação das atividades ChT-L e PA que se apresentavam parcialmente inibidas. Além disso, a desglutatioação pela Grx2 estava correlacionada à ativação do 20SPT, o que ficou comprovado pela maior eficiência da Grx2 sobre o 20SPT ativado por cardiolipina. Interessantemente, o mecanismo envolve a posterior degradação da oxidorreductase. Em nossos estudos cristalográficos para a elucidação da estrutura tridimensional da Grx2 (Discola e col., 2005; trabalho apresentado como Anexo V) foi possível determinar que todas as mensurações da proteína (18 x 30 x 40 Å) são maiores ou se aproximam ao diâmetro da abertura da câmara catalítica do 20SPT (4 Å no estado latente e 17 Å no estado ativado por 11S, por exemplo – Förster e Hill, 2003), no entanto, apesar desta aparente incompatibilidade, a Grx2 é capaz de adentrar a câmara e ser degradada. Resultados similares sobre a desglutatioação do 20SPT foram obtidos com as tiorredoxinas citosólicas. Este conjunto de dados sobre a desglutatioação da câmara catalítica do proteassomo 20S resultaram em um trabalho publicado sob o título de “Role of glutaredoxin 2 and cytosolic thioredoxins in cysteinyl-based redox modification of the 20S proteasome” (Silva e col., 2008) e está apresentado na forma de anexo (Anexo VII).

Modulação da proteólise e mecanismo de hidrólise

Após a demonstração da glutatioação (Demasi e col., 2003, Anexo IV) e da desglutatioação do proteassomo (Silva e col., 2008, Anexo VII) passamos a investigar os mecanismos pelo qual esta modificação pós-traducional regula a atividade proteolítica do 20SPT. Estudar a maneira pela qual a glutatioação altera a proteólise realizada pelo 20SPT era um dos objetivos específicos a serem abordados neste projeto. Já era de nosso conhecimento que esta modificação pós-traducional causa modulação das atividades sítio-específicas (utilizando peptídeos ligados a fluoróforos como substrato), mas nada ainda havia sido demonstrado quanto ao efeito proteolítico. Iniciamos esses estudos a partir de proteínas classicamente conhecidas por serem hidrolisadas pelo 20SPT de forma ubiquitina-independente.

Devido ao fato do 20SPT extraído de nossa condição padrão (PT-YPD) estar nativamente glutatiolado, como controle, reduzimos o proteassomo purificado com DTT e este proteassomo será tratado daqui em diante como PT-SH. Para analisar o efeito da

glutatioilação sobre a degradação de proteínas, utilizamos caseína e a albumina bovina oxidada como substratos degradáveis pelo 20SPT. Nestes primeiros ensaios acompanhamos o perfil de degradação destas proteínas e o surgimento de fragmentos peptídicos por SDS-PAGE. Para confirmar a degradação pelo proteassomo, as amostras ainda foram incubadas na presença do ativador SDS (+SDS) demonstrando a integridade da protease e a intensificação da hidrólise após o tratamento (Fig. 17). Estes ensaios demonstraram que o PT-YPD é capaz de degradar os substratos de forma mais eficiente que o PT-SH.

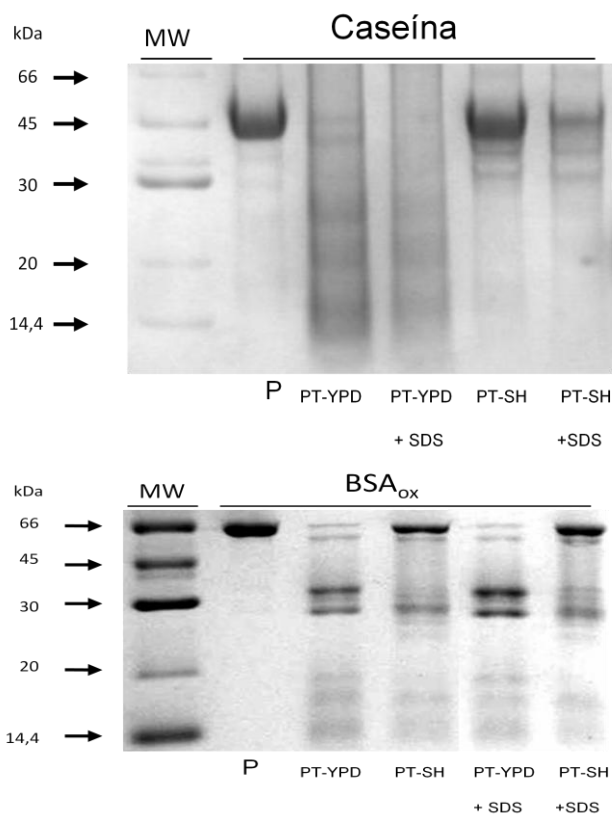


Figura 17. Degradação diferencial de proteínas pelo 20SPT glutatiolado e reduzido - Amostras do proteassomo nativamente glutatiolado (PT-YPD) e reduzido (PT-SH) foram incubadas com Caseína e Albumina Bovina Oxidada (BSA_{ox}) na presença e na ausência de 0,0125 % de SDS (+SDS). As incubações foram realizadas durante 15 e 30 min respectivamente, evidenciando uma maior eficiência de degradação do PT-YPD. P representa a proteína controle na ausência de proteassomo e MW, o padrão de peso molecular.

Estes dados sugerem um aparente paradoxo no qual a presença de glutatona inibe parcialmente as atividades sítio-específicas determinadas com fluoropeptídeos e, ainda assim, é capaz de promover uma degradação mais intensa de substratos protéicos. Entretanto, temos que levar em consideração que diversos fatores podem influenciar a degradação de proteínas, não somente a atividade sítio-específica peptidásica aparente. Um substrato protéico possui diversas características que o difere de um substrato peptídico ao ser degradado por uma protease. Uma proteína substrato necessita interagir com a protease, atingir e se acomodar no sítio ativo para que seus aminoácidos específicos sofram o processo de hidrólise (Someya e Takeda, 2009; Patterson-Ward e col., 2009). Ressaltamos

que o 20SPT é uma protease e não uma peptidase, sendo mais relevantes fisiologicamente os fenômenos destacados para a atividade proteolítica em detrimento à atividade peptidásica. Os dados publicados previamente por nosso grupo (Demasi e col., 2003) sobre o efeito da glutilação na atividade catalítica do 20SPT envolviam basicamente a atividade tipo-quimiotripsina (ChT-L), tida como a mais importante atividade proteassomal. Dados crescentes na literatura têm reforçado a idéia de que as demais atividades (tipo-tripsina e pós-acídica) e a interação entre elas são também de alta relevância quando analisamos a proteólise. Somente com a inibição de múltiplos sítios é possível reduzir drasticamente a degradação de proteínas-alvo (Kisselev e col., 2006). Além disso, as propriedades estruturais da proteína-substrato e a composição de aminoácidos constituintes são fatores cruciais para determinar a importância relativa de cada atividade catalítica sobre degradação de proteínas (Kisselev e col., 2006).

Tendo em mente os fatores apontados por Kisselev e os dados que demonstraram que a Grx2 é degradável pelo 20SPT (Silva e col., 2008) decidimos verificar se o mesmo fenômeno visualizado com Caseína e BSA_{ox} seria reproduzível com Grx2. Primeiramente incubamos a Grx2 com o PT-SH e PT-YPD e verificamos a degradação em gel SDS-PAGE. O PT-YPD também degradou a Grx2 de maneira mais eficiente que PT-SH, confirmando o efeito anteriormente visualizado para as demais proteínas (Fig. 18).

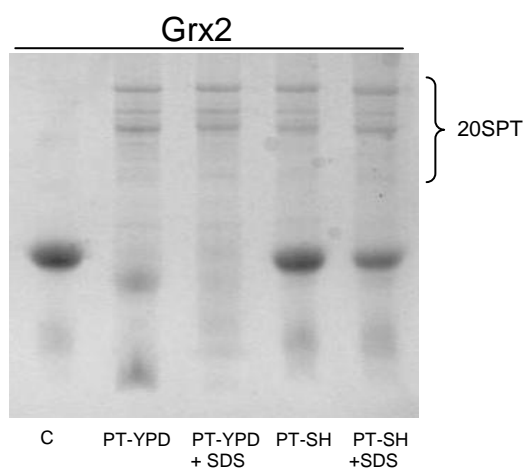
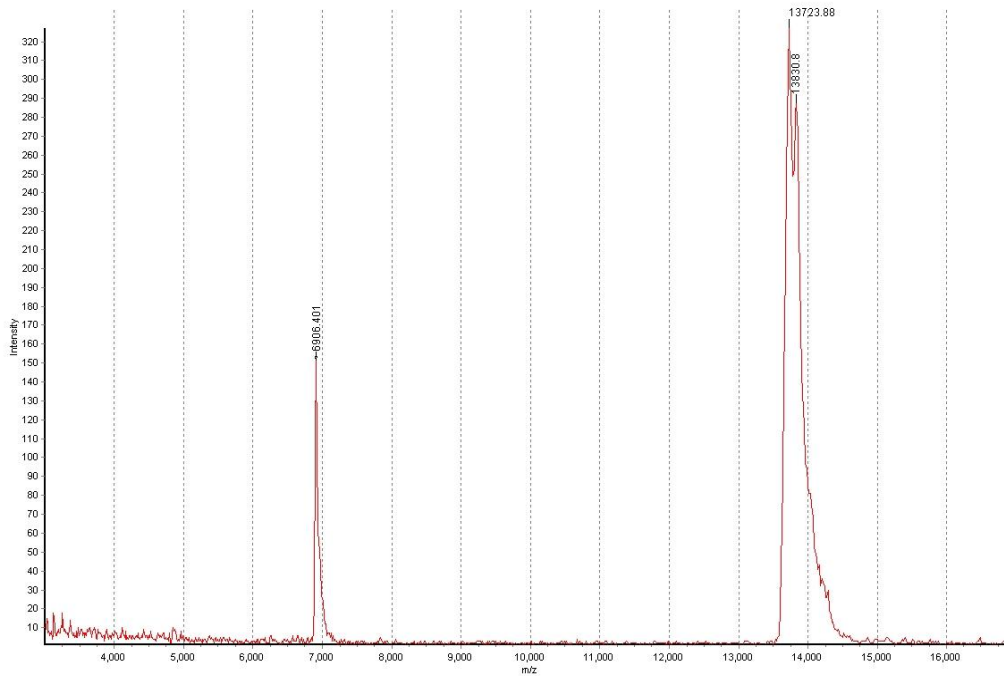


Figura 18. Degradação diferencial da Grx2 pelo 20SPT glutatiolado e reduzido - Amostras do proteassomo nativamente glutatiolado (PT-YPD) e reduzido (PT-SH) foram incubadas com Glutarredoxina 2 (Grx2) na presença e na ausência de 0,0125 % de SDS (+SDS) por 2 horas, demonstrando uma maior taxa de degradação pelo PT-YPD. O proteassomo (20SPT) não foi removido do ensaio previamente à aplicação no gel evidenciando também a equivalência da concentração de 20SPT.

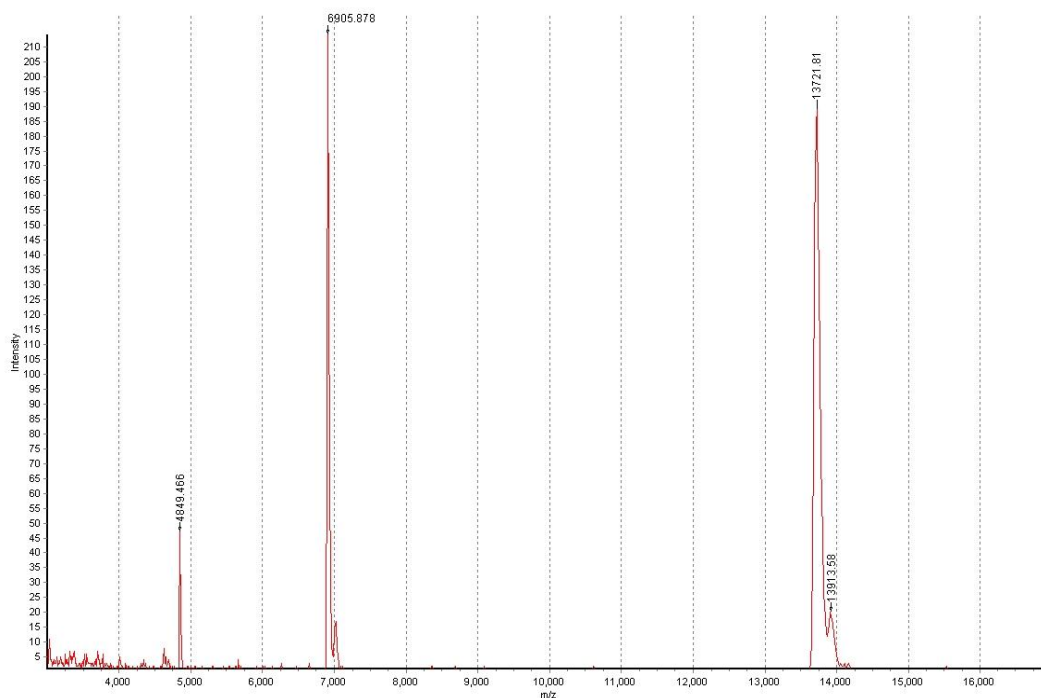
A degradação diferencial de Grx2 pelo 20SPT foi posteriormente verificada também por espectrometria de massas, ensaio no qual variando os tempos de incubação, vimos que

o PT-YPD é capaz de gerar um perfil peptídico muito mais rico que o PT-SH (Fig. 19). O pico de relação massa/carga aproximada em 14 kDa corresponde à Grx2 íntegra monocarregada e o pico de m/z de aproximadamente 7 kDa à proteína íntegra duplamente carregada.

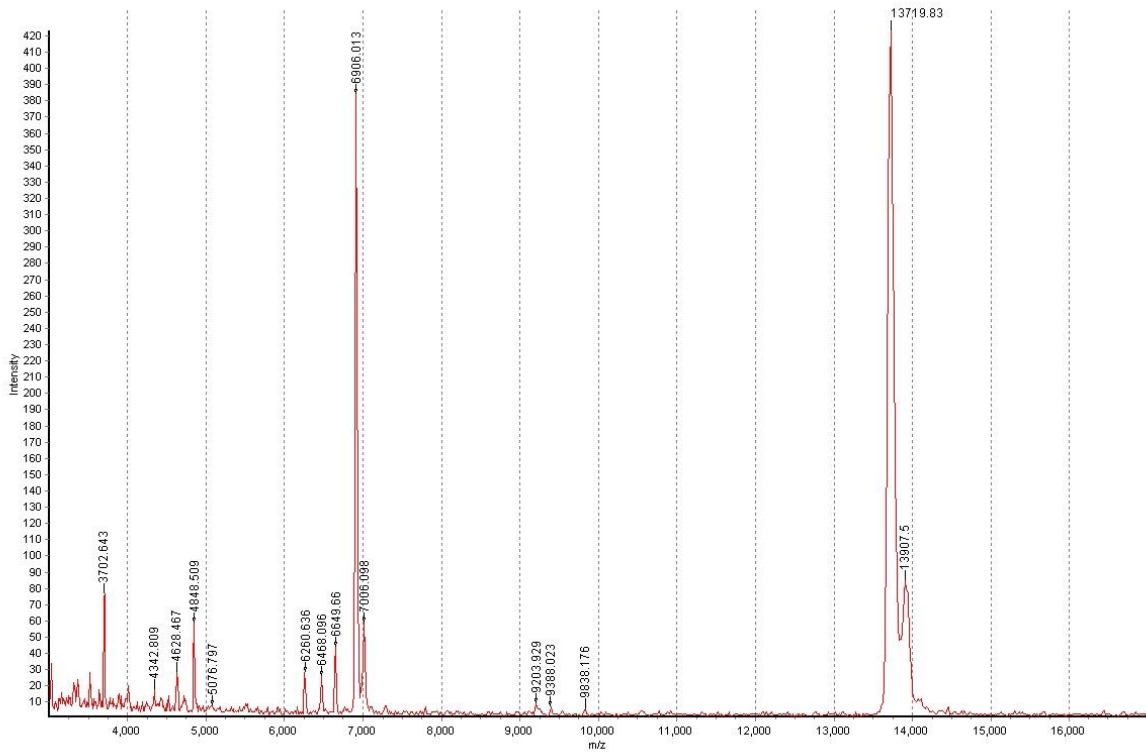
(A) PT-SH 30 min



(B) PT-YPD 30 min



(C) PT-SH 120 min



(D) PT-YPD 120 min

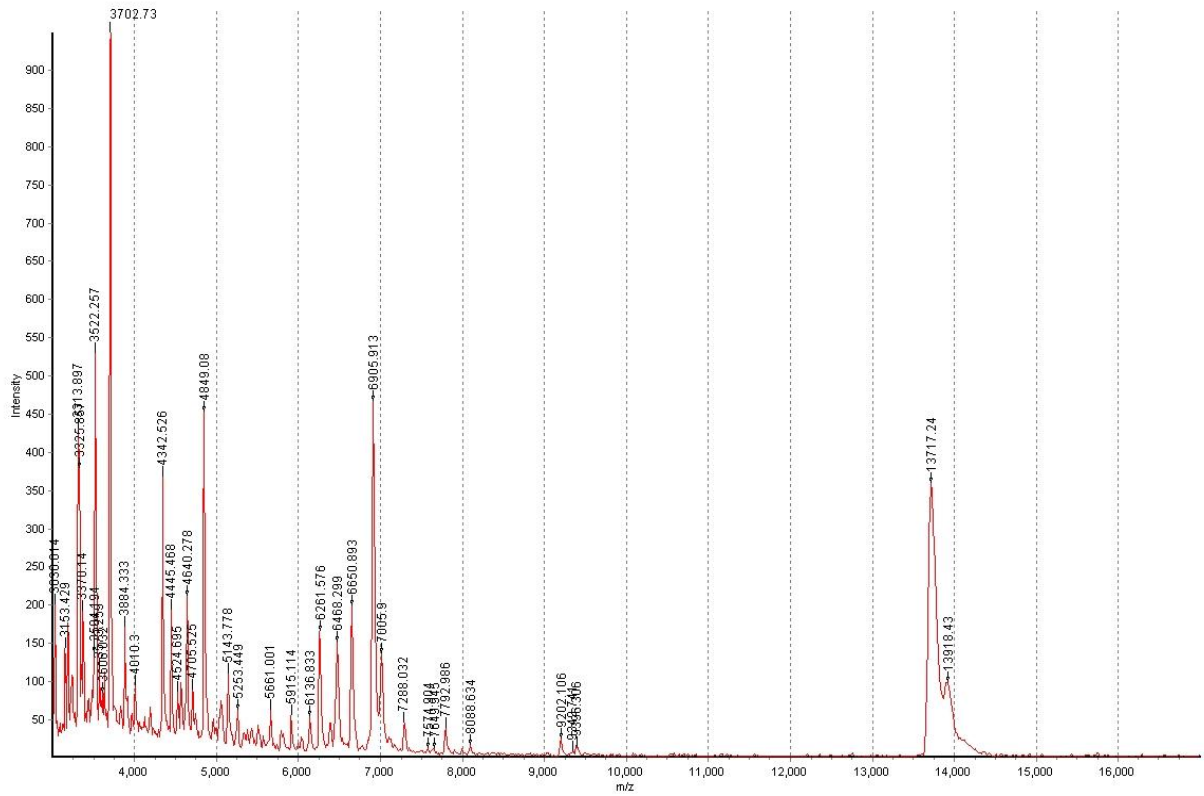


Figura 19. Espectros de massa (Maldi-TOF) analisando o perfil de degradação de Grx2 pelo 20S em diferentes estados redox - Os espectros foram obtidos em modo linear positivo empregando ácido sinapínico como matriz. Amostras de 100 µg de Grx2 foram incubadas na presença do proteassomo nativamente glutatiolado (PT-YPD) ou do proteassomo reduzido com DTT (PT-SH). Os espectros representam a Grx2 incubada com **(A)** PT-SH por 30 min; **(B)** PT-YPD por 30 min; **(C)** PT-SH por 120 min e; **(D)** PT-YPD por 120 min. Posteriormente a incubação, as amostras foram filtradas para remover o 20SPT e aplicadas no espectrômetro de acordo com Materiais e Métodos.

Um dado interessante foi o surgimento de um único peptídeo de grande massa gerado a partir da degradação da Grx2 após 30 minutos de incubação com PT-YPD (Fig. 19b). A perda de exatidão do MALDI-TOF (calibrado com padrões peptídicos) para grandes relações m/z não nos permitiu identificar o grande peptídeo corretamente (aproximadamente 4850 kDa), porém, este peptídeo teve sua seqüência atribuída posteriormente por análises do tipo MS/MS. Estas análises revelaram que este fragmento correspondia à porção C-terminal da proteína de massa 4889,65 kDa, contendo 44 resíduos de aminoácidos, cuja seqüência é **D.ALEEISGQKTVPNVYINGKHIGGNSDLETLKKNGLAEILKPVFQ.**

O proteassomo é conhecido por clivar proteínas em peptídeos que variam entre 4 a 25 resíduos de aminoácidos, com o padrão mais comum de 7 a 9 resíduos (Akopian e col., 1997; Kisselev e col., al., 1998 e 1999a). Sendo assim, a geração de um peptídeo contendo 44 resíduos de aminoácidos não é usual em uma digestão proteassomal. Já foram descritos mecanismos nos quais a proteína não necessariamente adentra linearmente a câmara catalítica através do N ou C-terminal para ocorrer a degradação. Os estudos conduzidos por Liu e col. (2003) descreveram a habilidade do proteassomo em clivar de forma endoproteolítica determinados substratos. Alças desestruturadas flanqueadas por domínios estruturados seriam capazes de adentrar a câmara catalítica na forma de grampo e atingir os sítios-ativos, liberando os domínios estruturados intactos. Devido à grande massa do peptídeo Grx2₆₅₋₁₀₉ e sendo este um dos primeiros a serem gerados pelo 20SPT, sugerimos um mecanismo de degradação da Grx2 pelo 20SPT no qual a porção C-terminal da proteína seria clivada e mantida do lado de fora da câmara. Esta clivagem inicial desestruturaria o restante da proteína, levando a sua degradação por completo.

Apesar de estar contido em uma alfa hélice, o resíduo de aspartato (Asp64) clivado pelo proteassomo para produzir o peptídeo Grx2₆₅₋₁₀₉ se localiza bem externamente na

estrutura 3D da Grx2 (assinalado em amarelo, Fig. 20), o que corroboraria nossa hipótese da Grx2 interagir com o proteassomo e ser clivada, deixando este grande peptídeo externo à câmara catalítica. Estes resultados indicam que este peptídeo não adentrou a câmara catalítica, caso contrário, seria intensamente processado até liberação dos peptídeos característicos de até 25 resíduos de aminoácidos gerados pelo 20SPT (Akopian e col., 1997; Kisselev e col., al., 1998, 1999a). Mutar este resíduo de aspartato e investigar sua correlação com a degradação da Grx2 pelo 20SPT forneceriam informações importantes sobre o mecanismo de hidrólise da Grx2 pelo proteassomo.

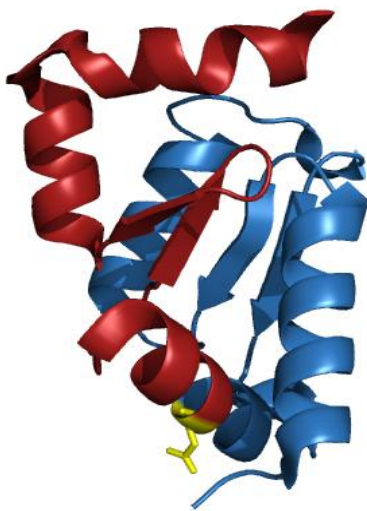
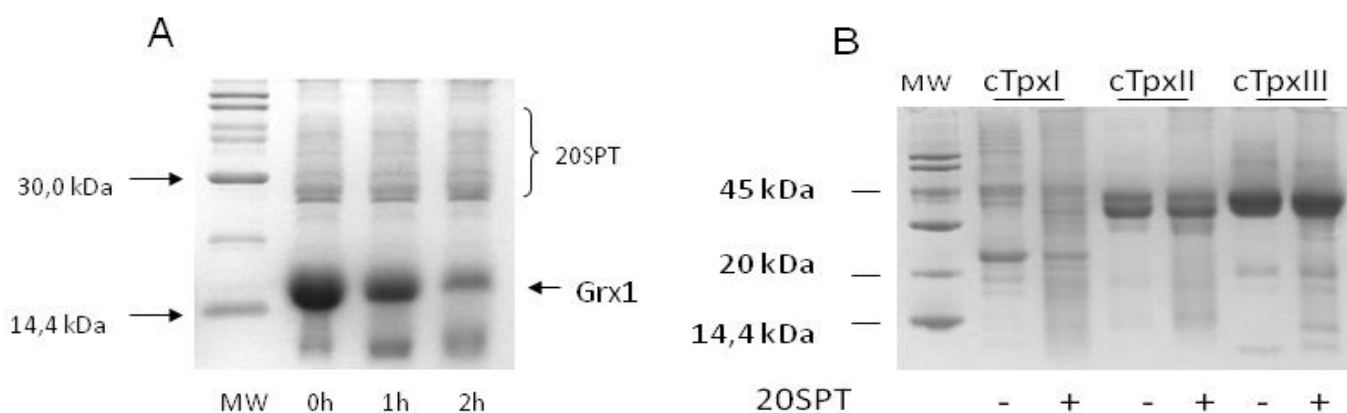


Figura 20. Análise estrutural do sítio de clivagem da Grx2 de *Saccharomyces cerevisiae* - A estrutura tridimensional da Grx2 (PDB Id: 3D4M) foi gerada utilizando o software PyMOL (DeLano Scientific), evidenciando em amarelo a posição superficial à estrutura do sítio de clivagem inicial (Asp64) da Grx2. Em vermelho está demonstrado o grande peptídeo Grx2₆₅₋₁₀₉, identificado por espectrometria de massa.

A Grx2 é uma oxidoredutase integrante da Suprafamília Trx, família de proteínas que, apesar da diferença de seqüência primária e de função, compartilham grande similaridade estrutural (Atkinson e Babbitt, 2009). Entre as proteínas dessa família encontram-se oxidoredutases como as glutarredoxinas e tiorredoxinas, peroxidases dependente de tiol como as peroxirredoxinas, tioltransferases como glutationa S-transferase e até proteínas ligadoras de cálcio como calsequestrinas (Copley e col., 2004). Copley e col. (2004) sugerem ainda que estas proteínas tenham evoluído a partir de um ancestral comum que continha o dobramento tiorredoxina canônico, sofrendo posteriormente extensões e inserções, porém, mantendo o mesmo núcleo estrutural. O enovelamento Tiorredoxina (Trx), consiste em uma folha β central, composta geralmente por quatro fitas, rodeada por α -hélices na conformação $\alpha\beta\alpha\beta\alpha\alpha$ (Pan e Bardwell, 2006).

Considerando a semelhança estrutural e o mecanismo proposto de degradação da Grx2, testamos a degradação de diversas proteínas disponíveis em nosso laboratório

possuidoras do dobramento tiorredoxina (Trx). Apesar de variar a intensidade de degradação, todas as proteínas testadas foram degradadas pelo 20SPT. Incluímos neste ensaio a Grx1 de *Saccharomyces cerevisiae*, que compartilha 64 % de identidade e 85 % de similaridade com Grx2 (Fig. 21a), Tiorredoxina peroxidases citosólicas (cTpxs – Fig. 21b) e as Tiorredoxina citosólicas (Trxs – Fig. 21c), que possuem um motivo Trx. Apesar da falta de identidade de seqüência primária destas proteínas, todas possuem cisteínas ativas em sua estrutura e esta poderia ser a chave da interação destas proteínas com o 20SPT. Entretanto, o ensaio de degradação com a proteína Ohr (*Organic Hydroperoxide Resistance protein*) gentilmente cedida pelo Dr. José Renato Cussiol trouxe uma importante resposta para as nossas questões. Esta proteína clonada de *Xylella fastidiosa*, funcionalmente relacionada com as tiorredoxina peroxidases, decompõe preferencialmente peróxidos orgânicos a custa de redutores tiólicos (Cussiol e col., 2003 e 2010). Apesar de ser uma proteína pequena (17 kDa), o que poderia facilitar sua degradação e mesmo apresentando cisteínas reativas no sítio-ativo, a Ohr possui uma nova estrutura tridimensional não relacionada com o dobramento tiorredoxina (Oliveira e col., 2006). Mesmo após seis horas de incubação com o proteassomo, essa proteína se mostrou resistente a degradação pelo 20SPT (Fig. 21d). Estes dados reforçaram a observação de que a estrutura tiorredoxina (Trx) e/ou alguma particularidade desta estrutura terciária, tornariam as proteínas desta família susceptíveis à degradação pelo 20SPT. A figura 22 destaca as características estruturais de algumas proteínas que possuem o enovelamento Trx e da Ohr.



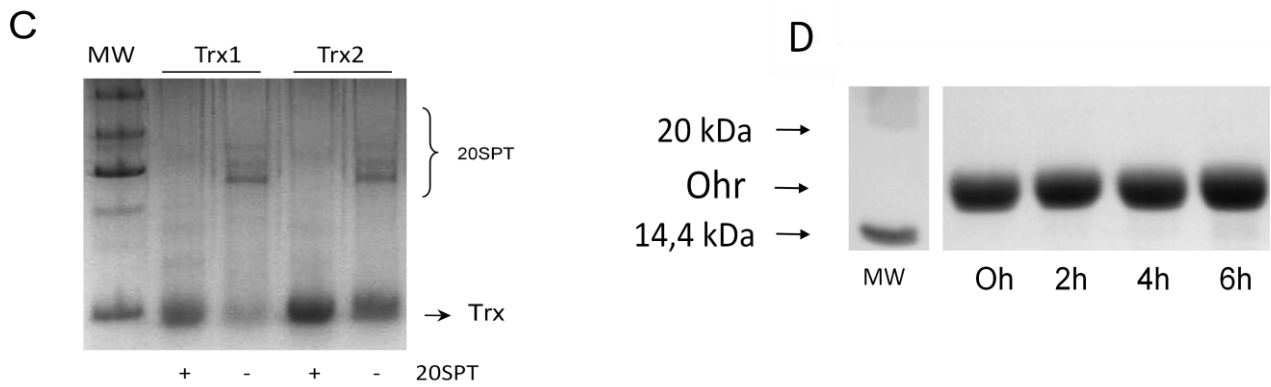


Figura 21. Ensaio de degradação de proteínas - Diversas proteínas contendo o dobramento Trx foram incubadas na presença (+) do proteassomo e a degradação pôde ser visualizada tanto pela diminuição da banda original quanto pelo surgimento de fragmentos. Em (A) temos a incubação com a glutarredoxina 1 (*Grx1*), em (B) a incubação das tiorredoxina peroxidases citosólicas (*cTpxI, II e III*) por 2h; (C) as tiorredoxinas citosólicas (Trx1 e Trx2) também por 2 h; e em (D) a proteína Ohr, não sendo possível visualizar qualquer degradação mesmo após 6h de incubação do 20SPT com esta proteína não relacionada a suprafamília Trx. MW representa o padrão de peso molecular.

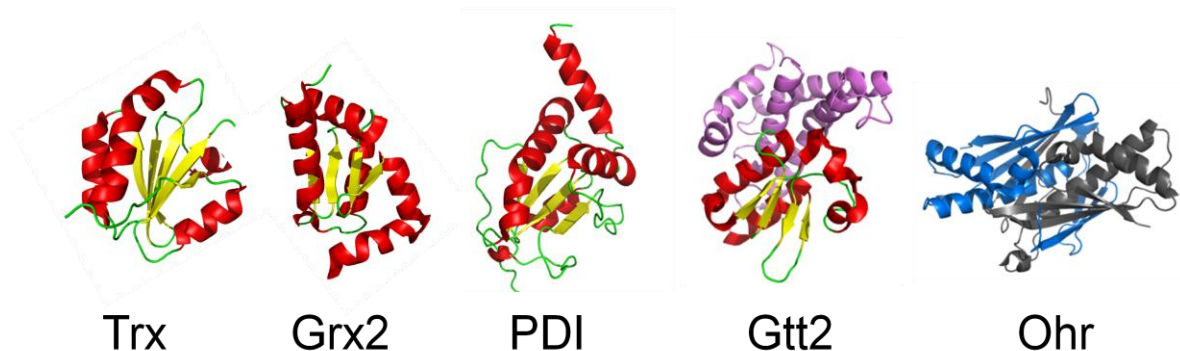


Figura 22. Enovelamento de proteínas da suprafamília Tiorredoxina e Ohr - O enovelamento de proteínas da família Trx consiste em uma folha beta central de 4 ou 5 fitas (amarelo) rodeada por alfa hélices (em vermelho). As extensões de Gtt2 estão mostradas em lilás. O dímero funcional da proteína Ohr em azul e preto não apresenta o enovelamento Trx. Tiorredoxina - Trx (PDB Id: 3F3Q); Glutarredoxina 2 – Grx2 (PDB Id: 3D4M); Proteína Dissulfeto Isomerase – PDI (PDB Id: 3BOA), Glutathione S-transferase - GTT2 (PDB Id: 3ERF), *Organic Hydroperoxide resistance protein* – Ohr (PDB Id: 1ZB8). Imagens gráficas geradas pelo software Pymol (Delano Scientific).

O 20SPT é capaz de degradar diversas proteínas independentemente de ubiquitinação (Benaroudj e col., 2001; Jariel-Encontre e col., 2008; Baugh e col., 2009). Descrevemos nesse trabalho uma nova classe de proteínas que são degradadas pelo 20SPT sem a necessidade de complexos regulatórios ou ativadores. As proteínas da suprafamília Trx possuem

características estruturais que possibilitam o acesso dessas proteínas, mesmo estruturadas, à câmara catalítica para degradação. As glutarredoxinas possuem por volta de 14 kDa e volume maior que da abertura da câmara, porém, provavelmente interajam com as subunidades alfa do proteassomo possibilitando o acesso aos sítios-ativos, como mostraram os resultados acima. Apesar do grande peso molecular, a oligopeptidase Thimet EP24.15 que possui aproximadamente 80 kDa, também é capaz de ser degradada pelo 20SPT de maneira ubiquitina-independente (dados não mostrados). Estes dados reforçam que não somente proteínas desnaturadas e danificadas, mas também famílias estruturais e inclusive proteínas de alto peso molecular, são substratos do 20SPT. A correta identificação das estruturas e das características específicas que possibilitam que estas proteínas sejam degradadas pode contribuir para a compreensão (ou aumentar a lista) dos substratos *in vivo* do 20SPT.

Nossos resultados até então apontam para uma possível via de interação e degradação da Grx2 e das proteínas da suprafamília Trx, porém ainda restava compreender o mecanismo pelo qual a glutatiolação da unidade 20S do proteassomo alterava a atividade proteolítica. Utilizando substratos peptídicos, a glutatiolação afeta tanto a atividade tipo-quimiotripsina (ChT-L) quanto a pós-acídica (PA), porém sem grandes efeitos sobre a atividade tipo-tripsina (T-L). Kisselev e col. (1999b) propuseram um interessante modelo de degradação proteica denominado “*Bite and Chew*”, no qual sucintamente a atividade ChT-L seria a responsável por primeiramente “morder” as proteínas-alvo, gerando peptídeos capazes de ativar a PA e de inibir temporariamente a ChT-L. Esta etapa possibilita que as atividades T-L e PA possam “mastigar” esses peptídeos previamente gerados, liberando os produtos finais de digestão. Quando a clivagem pela atividade PA não é mais possível, a atividade ChT-L é reativada, iniciando uma nova rodada de “mordidas e mastigadas”.

Na condição de glutatiolação do 20SPT, estando a atividade ChT-L parcialmente inibida, os demais sítios poderiam estar mais acessíveis ao substrato, segundo o modelo, clivando a proteína de maneira diferenciada. Esta seria uma das possibilidades de entender o paradoxo da modulação da atividade proteassomal mediante glutatiolação. Para solucionar esta questão, primeiramente analisamos por HPLC, o perfil dos peptídeos de Grx2 gerado por PT-SH e PT-YPD. Como existe uma diferença significativa entre as velocidades de degradação do PT-YPD e do PT-SH (Figs. 17-19), decidimos identificar os peptídeos finais gerados após incubação da Grx2 por 16 h com o 20SPT. Ao término deste período, as proteínas íntegras foram separadas dos peptídeos utilizando microfiltros e o material filtrado

foi submetido à cromatografia de fase reversa em coluna C18 ODS Hypersil (Thermo). A corrida foi acompanhada a 214 nm e o cromatograma obtido está apresentado na figura 23. Este cromatograma evidenciou a presença de picos distintos entre as duas condições e, mesmo os picos comuns, apresentaram-se em diferentes proporções, indicando que o proteassomo glutatiolado é capaz de degradar as proteínas de maneira diferenciada.

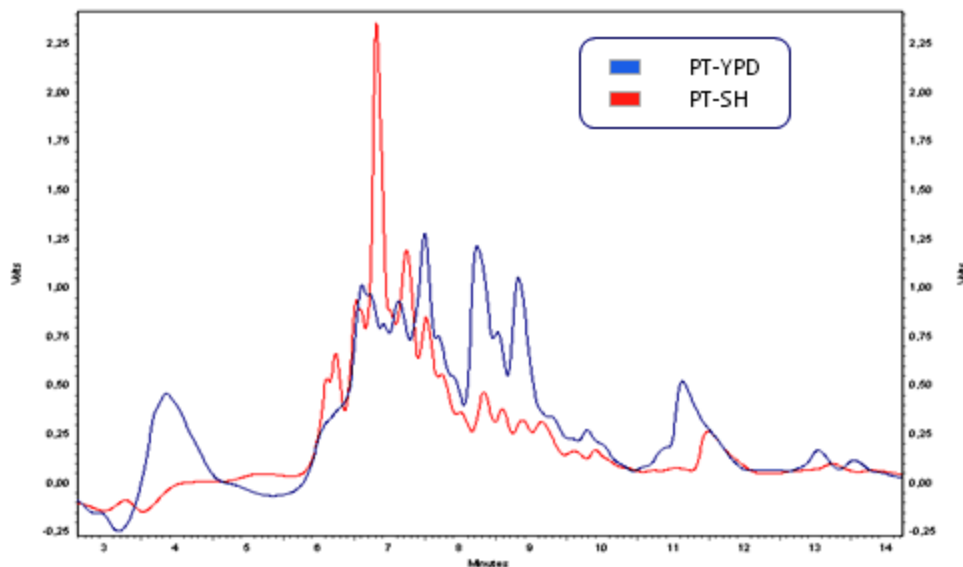


Figura 23. Degradação diferencial da Grx2 pelo 20SPT - 300µg de Grx2 foram incubados na presença de 30 µg do proteassomo nativamente glutatiolado (PT-YPD, azul) ou reduzido com DTT (PT-SH, vermelho) por 16 h a 30 °C. Após a incubação, as amostras foram filtradas para remover as proteínas íntegras e os peptídeos recuperados foram analisados por HPLC. A cromatografia em coluna de fase reversa C18 foi monitorada a 214 nm, realizada segundo Materiais e Métodos.

As diferenças de degradação apresentadas nos motivaram a investigar quais seriam as atividades que estariam envolvidas no fenômeno da geração de peptídeos diferenciados dependente da glutatilação do 20SPT. Para isso, atribuímos a seqüência por espectrometria de massas dos peptídeos gerados nas duas condições estudadas para inferirmos quais atividades catalíticas do proteassomo estariam envolvidas no processo. Neste ensaio, após a degradação da Grx2, os peptídeos foram concentrados e injetados diretamente no espectrômetro. Os cromatogramas com a contagem total de íons para PT-YPD e PT-SH está apresentado na figura 24 (azul e vermelho, respectivamente) demonstrando a quantidade de peptídeos detectados em nossos ensaios.

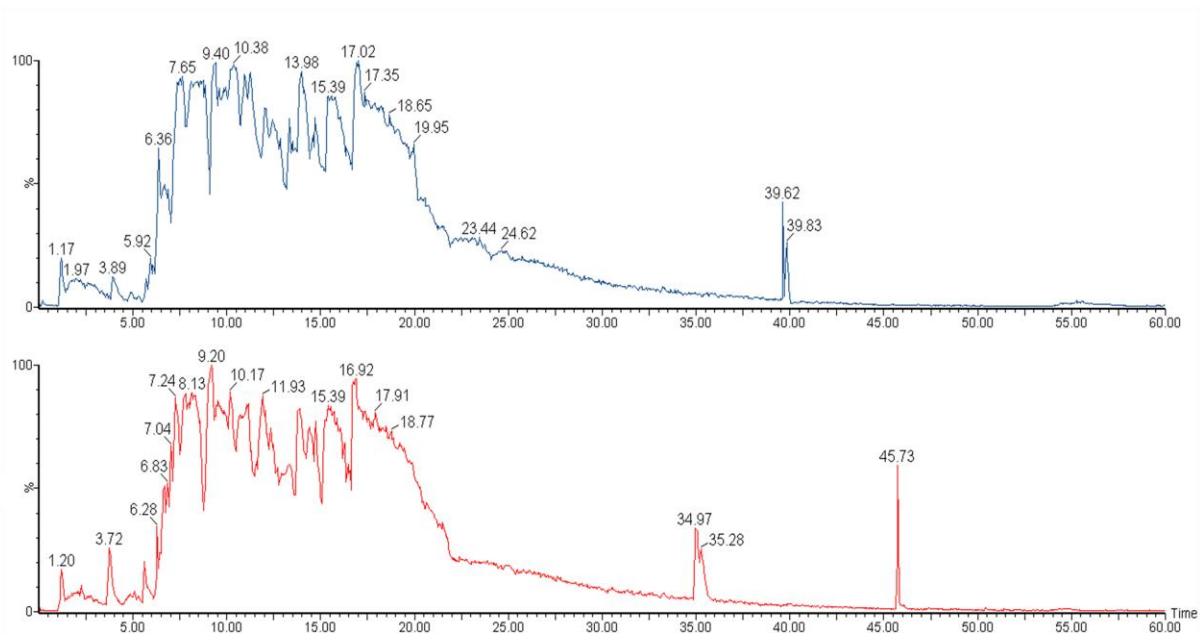


Figura 24. Cromatogramas expressando a contagem total de íons gerados pela degradação de Grx2 - Após a incubação de Grx2 com o proteassomo nativamente glutatiolado (PT-YPD; azul) e o proteassomo reduzido com DTT (PT-SH; vermelho), os peptídeos gerados foram analisados por espectrometria de massas do tipo ESI-Q-TOF-MS. O cromatograma apresenta a contagem total de íons para cada condição demonstrando a grande geração de peptídeos a serem analisados.

Analisando todos os peptídeos gerados utilizando o software Mascot (Matrix Science), verificamos que existe uma produção de aproximadamente 30 % de peptídeos próprios a cada condição (PT-YPD e PT-SH). Outro dado interessante é que, apesar de grande parte dos peptídeos serem comuns às duas condições, existe variação na proporção destes íons, refletindo a diferença das intensidades dos picos vista por HPLC. Com a identificação dos peptídeos, analisar os sítios de clivagem de cada peptídeo gerado corresponderia a verificar a participação de cada atividade específica na degradação do substrato. A tabela 4 apresenta o número total de peptídeos que contém cada resíduo específico de aminoácido imediatamente anterior ao sítio de clivagem (posição P1), para as duas condições. As maiores diferenças entre os sítios de clivagem estão evidenciadas em azul na tabela 4. Estes dados mostram que a clivagem das proteínas não é simplesmente mais eficiente pelo PT-YPD, mas também ocorre de uma maneira diferenciada, gerando peptídeos distintos. Importante ainda verificar que na clivagem pelo PT-YPD, o sítio T-L pareceu mais ativo, uma vez que foi encontrada uma grande prevalência de peptídeos clivados em lisina (K). A Grx2 é uma proteína rica em lisinas e isto é um fator importante devido ao fato da atividade T-L do PT-YPD não estar comprometida pela glutatiolação, sendo um substrato facilmente

degradável. Uma tabela representativa das análises de MS/MS contendo os peptídeos gerados a partir da Grx2 e as proporções relativas de cada fragmento produzido pelo proteassomo nativamente glutatiolado e o reduzido está apresentada como o Anexo III.

Tabela 4. Sítios de clivagem de Grx2 reconhecidos pelo proteassomo 20S.

	Clivagem C-term														Total	
	K	L	A	V	N	Q	T	M	S	F	H	D	E	I		G
PT-SH	13	16	5	17	4	3	1	1	1	1	2	5	2	6	0	77
PT-YPD	24	18	4	4	8	3	1	4	4	3	0	3	1	2	2	81

A Grx2 foi incubada por 16 h com o proteassomo reduzido por DTT (PT-SH) e o proteassomo nativamente glutatiolado (PT-YPD). Os peptídeos gerados pelas duas condições tiveram suas seqüências atribuídas por análises de MS/MS e os sítios de clivagem foram separados de acordo com o resíduo de aminoácido reconhecido na posição P1. As maiores diferenças estão destacadas em azul e a quantidade total de íons detectados está marcada em vermelho.

A geração diferencial de peptídeos já foi demonstrada ser importante em processos celulares. Tal qual o timo e o imunoproteassomo são capazes de gerar um perfil peptídico diferente do 20SPT padrão, a glutatiolação da unidade catalítica parece exercer uma função semelhante ao modificar a degradação de proteínas pelo 20SPT. Decidimos então investigar a geração diferenciada de peptídeos visando verificar a influência que esta modificação pós-traducional poderia ter no sistema imune. Apesar da levedura não apresentar sistema imunológico, Niedermann e col. (1997) estudaram o processamento de um fragmento de ovalbumina (Ova₂₃₉₋₂₈₁) pelo 20SPT de diversos organismos, importante por gerar um epítipo imunodominante (SIINFEKL - Ova₂₅₇₋₂₆₄). Este grupo descreveu que o processamento de polipeptídeos pelo proteassomo parece ser altamente conservado ao longo da escala evolutiva e possivelmente influenciou a evolução das moléculas do MHC de classe I. Nesse trabalho foi caracterizado que a geração de peptídeos pelo 20SPT purificado a partir de diferentes organismos (inclusive o proteassomo de leveduras e de drosófilas) seria compatível com os sistemas de apresentação antigênica, de forma altamente comparável aos peptídeos gerados pelo 20SPT de mamíferos. A geração de Ova₂₅₇₋₂₆₄ pelo 20SPT somente se torna mais otimizada para a apresentação antigênica na presença do ativador PA28. Utilizamos o proteassomo de levedura como modelo passível de extrapolação para o sistema imune de vertebrados devido a três principais fatores: (1) o 20SPT de *Saccharomyces*

cerevisiae tem a capacidade de gerar peptídeos de forma comparável ao 20SPT de mamíferos; (2) a glutatilação do proteassomo não é uma modificação pós-traducional exclusiva de levedura, ocorrendo também em plantas e mamíferos (Dixon e col., 2005; Niture e col., 2005; Demasi e col., 2001); (3) A glutatilação modifica o perfil peptídico gerado pelo 20SPT, o que poderia acarretar uma resposta imunológica diferencial.

Estes fatores nos levaram a investigar se a glutatilação do 20SPT influenciaria na degradação da ovalbumina (Ova), proteína importante por gerar peptídeos apresentáveis na superfície celular pelas proteínas expressas pelo complexo MHC de classe I (Niedermann e col., 1997; Bem-Shahar e col., 1997; Craiu e col., 1997). Entretanto, a ovalbumina não é hidrolisada em sua forma nativa pelo 20SPT. Para a degradação de Ova padronizamos um tratamento com o qual tornamos possível seu acesso à câmara catalítica do 20SPT. Protocolos na literatura descrevem a degradação de Ova após oxidação na presença de ácido fórmico (Michalek e col., 1996), porém, somente foi possível conseguir resultados satisfatórios após oxidar Ova na presença de H₂O₂ e SDS. A degradação de ovalbumina oxidada pôde ser visualizada em SDS-PAGE, como verificada na figura 25.

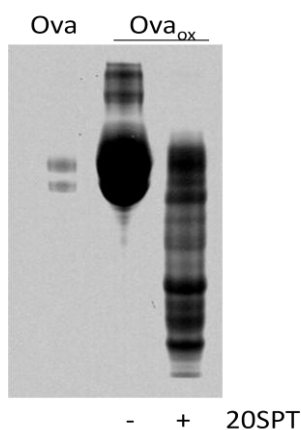


Figura 25. Degradação de Ovalbumina pelo 20SPT - Na amostra sem tratamento verificamos as duas bandas constituintes da Ovalbumina comercial, na qual, após a oxidação por H₂O₂ (Ova_{ox} – ver Materiais e Métodos) foi possível visualizar o surgimento dos produtos de hidrólise decorrente da incubação com o 20SPT (+). Após a incubação com 25 µg de Ova_{ox}, o 20SPT foi removido das amostras por filtração.

Com a padronização do tratamento que proporcionou a degradação de Ova, verificamos o perfil dos peptídeos gerados por PT-YPD e PT-SH por HPLC, assim como feito anteriormente para Grx2. A degradação de Ova gerou um perfil diferenciado de peptídeos comparando as duas condições analisadas (Fig. 26). Esta diferença indica uma habilidade do proteassomo glutatilado em gerar conjuntos peptídicos distintos do PT-SH, não somente para Grx2.

Além de verificar a diferença entre os perfis peptídicos obtidos, buscamos em seguida, mensurar a geração do peptídeo imunocompetente SIINFEKL localizado entre a posição 257 e 264 da seqüência da Ova. Apesar de o epítopo SIINFEKL ser no final do processo exposto na superfície celular, segundo relatos na literatura, este peptídeo não é gerado diretamente em grandes proporções durante a degradação de Ova, sendo que vários pré-peptídeos com extensões N-terminal já foram descritos (Cascio e col., 2001; Goldberg e col., 2002). Estes peptídeos provavelmente seriam clivados por peptidases antes de serem expostos na superfície celular. Embora já esperássemos uma baixa quantidade deste peptídeo em nossas amostras, pudemos rastreá-lo por HPLC após a aquisição do peptídeo SIINFEKL sintético. Para tanto, padronizamos um método de corrida no qual fosse possível isolar o peptídeo SIINFEKL dos demais peptídeos de Ova e posteriormente comparar os tempos de retenção do pico com os produtos de digestão de Ova incubada com 20SPT glutatiolado e reduzido.

Apesar da pequena intensidade do pico de SIINFEKL, somente foi possível visualizar o pico correspondente nas amostras incubadas com PT-SH (Fig. 26b). Este resultado foi confirmado em três experimentos independentes, corroborando a hipótese da degradação diferencial de proteínas pelo proteassomo glutatiolado. Como a glutatilação do 20SPT poderia ainda promover uma degradação diferencial do próprio SIINFEKL o que seria responsável pelas diferenças visualizadas na figura 26, como controle incubamos o peptídeo sintético com o proteassomo nas mesmas condições. A figura 27 demonstra que ambos os proteassomos modificam o peptídeo na mesma intensidade, produzindo um novo pico com um ligeiro aumento no tempo de retenção, que supomos seja o mesmo pico identificado com uma seta na figura 26. Dessa forma ainda podemos concluir que existe uma geração diferencial de peptídeos entre as duas condições. Ensaios de espectrometria de massas ainda serão conduzidos para confirmar e quantificar a geração de SIINFEKL (e deste subproduto) nestas condições. Nossos dados sugerem que esta modificação possui uma importante função celular, gerando conjuntos diferentes de peptídeos dependente do estado redox da célula.

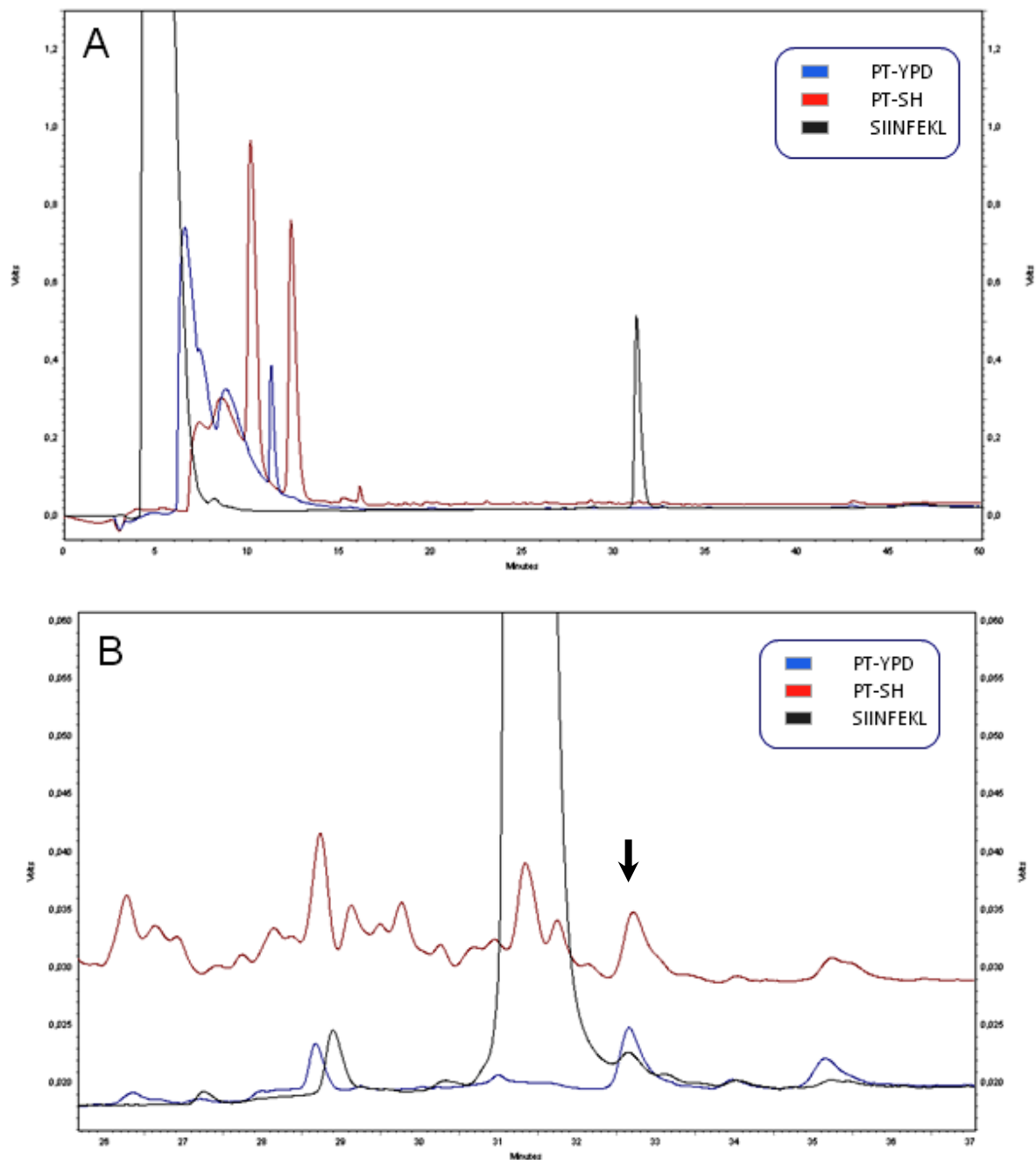


Figura 26. Degradação diferencial de ovalbumina pelo 20SPT - 300 μ g de Ova oxidada foram incubados na presença do proteassomo nativamente glutatiolado (PT-YPD; azul) e do reduzido (PT-SH; vermelho). Os produtos de digestão foram aplicados em HPLC utilizando coluna C18 de fase reversa, eluídos por um gradiente de ACN. Em (A) temos o cromatograma completo contendo os produtos de Ova gerados pelo PT-YPD e pelo PT-SH. Em cinza está representado o peptídeo sintético SIINFEKL eluído aos 30 min de corrida. Em (B) o cromatograma destaca o tempo de retenção do peptídeo SIINFEKL (cinza) demonstrando a presença do peptídeo SIINFEKL somente na amostra hidrolisada pelo PT-SH (vermelho). Cromatograma representativo de três experimentos independentes. A seta indica um possível peptídeo fruto da hidrólise do SIINFEKL pelo proteassomo.

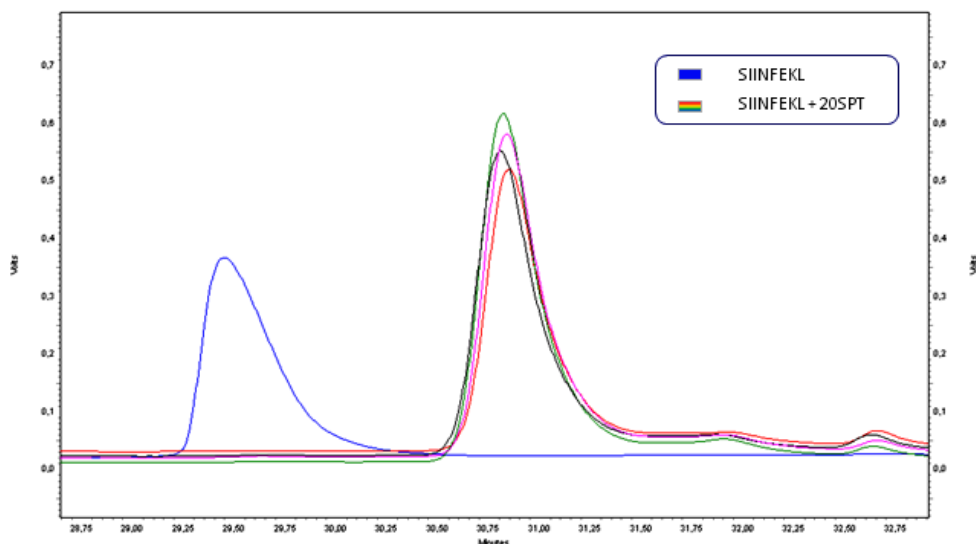


Figura 27. Controle da hidrólise de SIINFEKL pelo proteassomo – O peptídeo sintético SIINFEKL (azul) foi incubado em duplicata na presença do proteassomo nativamente glutatíolado (preto e verde) e do reduzido (vermelho e rosa), e os produtos gerados foram aplicados em HPLC utilizando coluna C18 de fase reversa, eluídos por um gradiente de ACN. Neste ensaio controle evidenciamos que ambos os proteassomos modificam o peptídeo na mesma intensidade.

Dinâmica de abertura da câmara catalítica

Apesar de sua complexa arquitetura protéica, o 20SPT não apresenta uma estrutura rígida. Trabalhos como o de Osmulski e Gaczynska, (2000) demonstraram o dinamismo da estrutura 3D do proteassomo dependente da presença de substratos quando analisado por microscopia de força atômica. Neste trabalho foi descrito que o 20SPT pode oscilar entre duas conformações diferentes verificadas pela abertura e fechamento da câmara catalítica. Decidimos investigar se a glutatilação do proteassomo poderia acarretar em modificações estruturais na abertura da câmara catalítica do 20SPT, fato este que estaria relacionado com a maior eficiência e a diferença do perfil peptídico gerado na degradação de proteínas. Além disso, os dados obtidos nos experimentos de espectrometria de massas apontaram somente resíduos de cisteína glutatíolado nas subunidades alfa do 20SPT.

As subunidades alfa estão intimamente relacionadas com a abertura e fechamento da câmara catalítica (Groll e col., 2000; Bajorek e col., 2003). Com a colaboração da Dra. Sylvia Carneiro do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, passamos a analisar o 20SPT por microscopia eletrônica de transmissão. Diversos trabalhos (Cascio e col., 2001;

Nickell e col., 2009; Effantin e col., 2009) adotaram a microscopia eletrônica como técnica de visualização do proteassomo 20S e de seus complexos regulatórios. Padronizamos o ensaio para que pudéssemos verificar o 20SPT em sua vista frontal para análise da abertura da câmara catalítica. Para confirmar a integridade do 20SPT, visualizamos a proteína também em sua vista lateral apresentando o formato de barril esperado (Fig. 28).

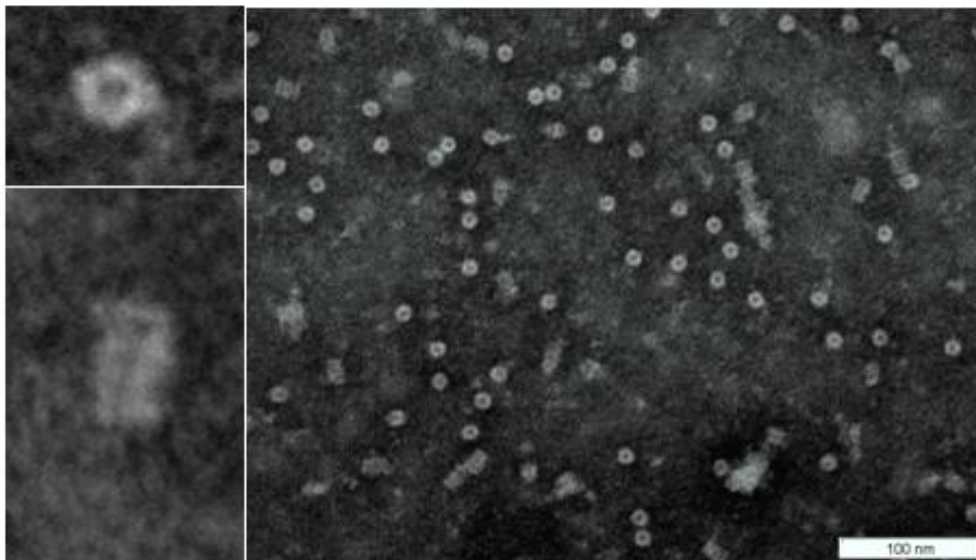


Figura 28. Microscopia eletrônica do proteassomo 20S - Amostras do 20SPT foram analisadas em microtelas recobertas com carbono contrastadas negativamente com 2 % de fosfotungstato de potássio segundo Materiais e Métodos. No quadro superior à esquerda temos uma visão frontal do proteassomo, evidenciando a abertura da câmara catalítica e no quadro inferior, uma vista longitudinal da câmara catalítica.

A partir da padronização, foi possível visualizar as modificações de abertura da câmara catalítica dependente do estado redox dos resíduos de cisteína. O ensaio mais interessante está demonstrado na figura 29, no qual o PT-YPD foi purificado e analisado no microscópio, apresentando uma alta porcentagem da câmara catalítica na sua conformação aberta (Fig. 29a). Uma alíquota do mesmo PT-YPD foi tratada com 20 mM de DTT por 30 min à temperatura ambiente e levada imediatamente ao microscópio. A redução do proteassomo com DTT levou ao fechamento de diversas unidades, demonstrando o interessante dinamismo desta estrutura (Fig. 29b). A porcentagem de estruturas abertas após tratamento com DTT caiu de 85 % para 20 %, para um total de 500 moléculas analisadas por condição. A plasticidade da estrutura do proteassomo, dependente do estado redox de suas sulfidrilas, pode fornecer respostas esclarecedoras sobre o mecanismo de

modulação da atividade catalítica, que, juntamente com os ensaios proteolíticos, descrevem mais um interessante modelo de regulação deste importante complexo protéico envolvido nas mais diversas vias metabólicas celulares.

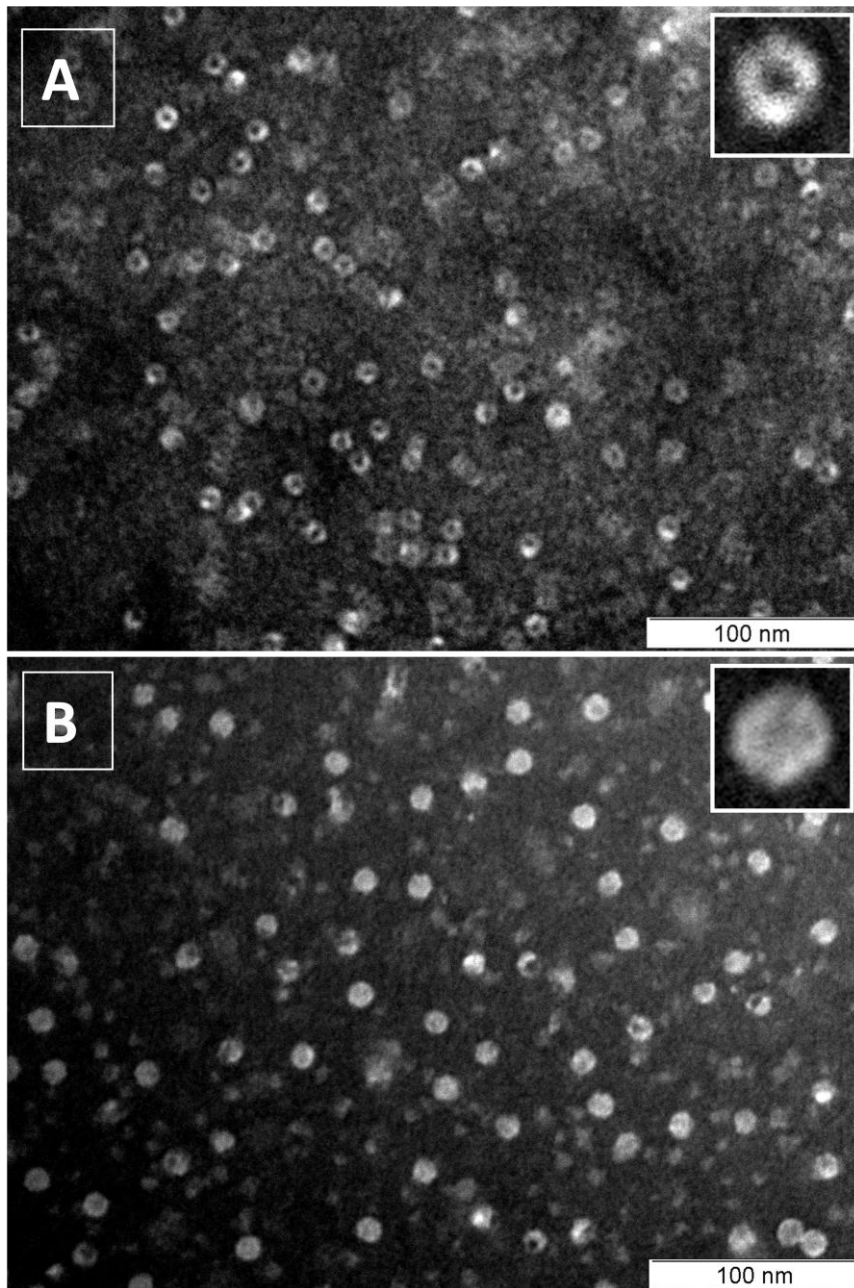


Figura 29. Microscopia eletrônica do proteassomo 20S - Amostras do 20SPT foram analisadas em microtelas recobertas com carbono contrastadas negativamente com 2 % de fosfotungstato de potássio segundo Materiais e Métodos. Em **(A)** está apresentado o PT-YPD evidenciando a maioria (aproximadamente 85 %) das moléculas na conformação aberta. A mesma amostra foi tratada com 20 mM DTT por 30 min à temperatura ambiente e visualizada em **(B)**, demonstrando o fechamento das unidades catalíticas, restando ao redor de 20 % de unidades abertas. Em destaque uma imagem ampliada de cada condição.

V. Discussão

O proteassomo é responsável pela degradação de mais de 80 % das proteínas intracelulares. Por estar envolvido nas mais diversas vias metabólicas, um fino sistema de regulação se faz necessário. Descrita nos mais diversos organismos, a S-glutatiolação surge como mais uma modificação pós-traducional capaz de regular a atividade proteassomal (Dixon e col., 2005; Niture e col., 2005; Demasi e col., 2001 e 2003; Silva e col., 2008). Neste trabalho caracterizamos duas condições experimentais nas quais detectamos a glutatiolação do proteassomo por imunomarcção anti-GSH e por análises de MS/MS. Uma condição *in vivo*, na qual o proteassomo foi purificado a partir de células crescidas até fase estacionária em meio rico (PT-YPD) e outra condição na qual o proteassomo foi incubado *in vitro* com GSH (PT-SG). Entre os objetivos deste projeto estava a identificação das subunidades glutatioladas do proteassomo para a compreensão do mecanismo de modulação de sua atividade catalítica.

Com as técnicas de imunomarcção anti-GSH e análises por LC-MS/MS, identificamos diversas subunidades e resíduos de cisteína glutatiolados *in vitro* e *in vivo*. Entre as 14 subunidades do 20SPT, três delas não possuem resíduos de cisteína em sua seqüência primária (α_2 , α_3 e β_7). As demais subunidades contêm entre um e cinco resíduos de cisteína por subunidade num total de 36 Cys diferentes, representando 72 resíduos por molécula de proteassomo. Apesar do alto número de resíduos de cisteína, apenas sete foram identificadas contendo a adição de glutatona, somando nossas duas condições experimentais. O mais interessante é que a modificação ocorreu somente nas subunidades α do 20SPT.

A subunidade α_3 é tida como a subunidade mais importante nos processos de abertura e fechamento da câmara catalítica. E ainda, diversas interações de van der Waals e ligações de hidrogênio se fazem necessárias entre as subunidades α_2 , α_3 e α_4 para a manutenção da conformação fechada do 20SPT (Whitby e col., 2000). A deleção de nove resíduos de aminoácidos da cauda N-terminal da subunidade α_3 promove a desestruturação das caudas das demais subunidades levando à abertura da câmara catalítica, o que acarreta uma velocidade de hidrólise de peptídeos comparável com a do 20SPT ativado por SDS (Fig. 29; extraída de Groll e col., 2000). A subunidade α_3 não possui resíduos de cisteínas que

pudessem ser modificados diretamente por glutatona, porém, nada exclui a possibilidade da desestruturação das caudas N-terminal das subunidades alfa ser desencadeada por modificações em outras subunidades que não $\alpha 3$. Ou ainda, que a glutatilação possa promover um mecanismo diferenciado de abertura devido a modificações em outras subunidades.

Segundo Förster e col. (2005) somente a desestruturação desta cauda não é suficiente para a ativação do 20SPT. Um mecanismo ordenado da estabilização da forma aberta também se faz necessário. Os mesmos autores em estudos com ativadores que promovem a abertura sugerem que a manutenção da forma aberta se dá pela interação com diversos resíduos das subunidades alfa distantes da entrada da câmara. Um segundo trabalho do mesmo grupo (Bajorek e col., 2003) mostrou que a deleção da cauda N-terminal da subunidade $\alpha 7$ não era suficiente para promover a abertura e a ativação do 20SPT, porém, associada à deleção da cauda da $\alpha 3$, observou-se um efeito sinérgico na abertura provavelmente pelo fato dessas duas subunidades estarem diametralmente opostas na estrutura 3D (Fig. 30). Uma das hipóteses seria que a glutatilação da subunidade $\alpha 7$ poderia ter um importante papel na regulação da atividade do 20SPT, principalmente por interagir com $\alpha 3$, desencadeando um processo no qual participariam posteriormente as demais subunidades ou ainda mantendo a estabilidade da câmara na conformação aberta.

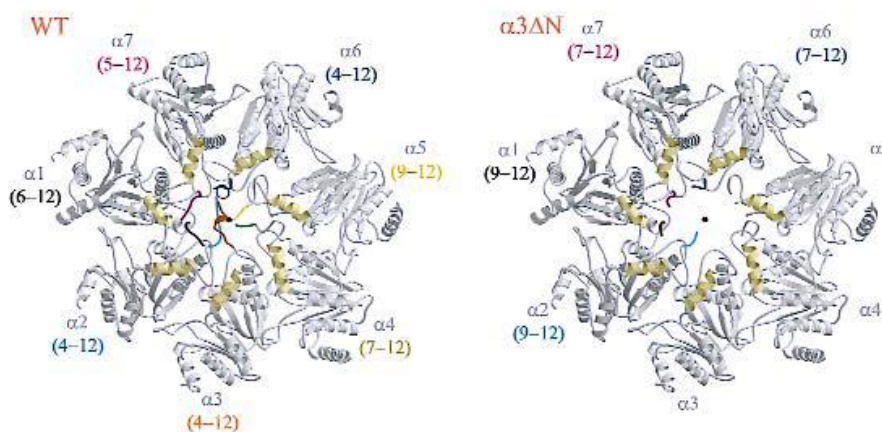


Figura 30. Abertura da câmara catalítica do 20SPT por deleção da cauda N-terminal da subunidade $\alpha 3$. A deleção de nove resíduos N-term (GSRRYDSRT) da subunidade $\alpha 3$ foi suficiente para promover a abertura da câmara catalítica do 20SPT da linhagem $\alpha 3\Delta N$ em comparação com a estrutura da linhagem selvagem (WT). Extraído de Groll e col. (2000).

A localização das cisteínas glutatioladas na estrutura 3D do proteassomo não condiz com nenhum mecanismo de regulação direta, não estando presente na entrada da câmara catalítica nem próximo aos sítios-ativos (Fig. 31). Diversos trabalhos demonstram regulações alostéricas da atividade catalítica do proteassomo, nos quais os mais diversos ligantes interagem em sítios distantes das treoninas catalíticas modulando a atividade proteolítica do 20S (Jankowska e col., 2009; Gaczynska e col., 2003; Kisselev e col., 2002 e 2003). Apesar da identificação de sete resíduos glutatioláveis, não podemos descartar que outros resíduos ainda possam estar glutatiolados no 20SPT, já que cada técnica utilizada apresenta limitações.

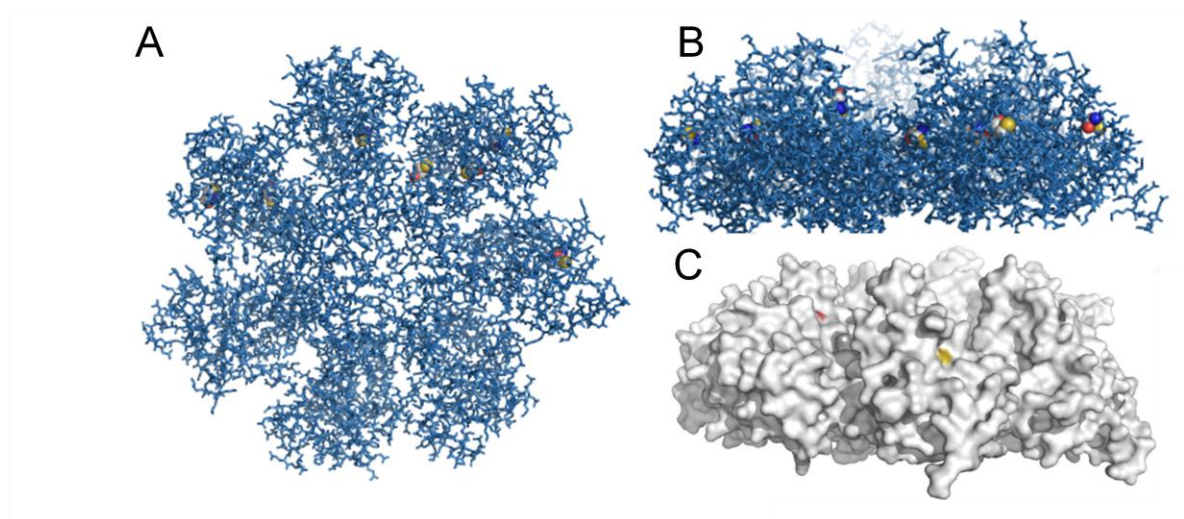


Figura 31. Localização das cisteína glutatioladas no 20SPT. Todos os resíduos de cisteína identificados como glutatiolados nas subunidades alfa do 20SPT estão destacados nas imagens. Em amarelo é possível verificar a posição das sulfidrilas. Para facilitar a visualização, apenas um anel alfa está sendo demonstrado na figura. Em **(A)** temos a vista frontal do 20SPT e em **(B)** e **(C)** uma vista lateral. Em **(C)** temos ainda a representação da estrutura de superfície do anel alfa do proteassomo, evidenciando em amarelo o tiol exposto ao solvente da cisteína 221 da subunidade $\alpha 5$. PDB Id: 1RYP. Imagens gráficas geradas pelo software Pymol (Delano Scientific).

Os ensaios por imunomarcção dependem da correta correlação entre o spot imunomarcado e o perfil de separação das subunidades do 20SPT. A única subunidade indubitavelmente glutatiolada, identificada por imunomarcção, foi a subunidade $\alpha 7$, devido principalmente a seu ponto isoelétrico e massa molecular altamente distinta das demais. Os demais spots imunomarcados na figura 13 foram de difícil correspondência com o perfil previamente obtido, principalmente devido à presença de múltiplos spots e a

heterogeneidade da população do 20SPT. Assinalar uma destas subunidades como modificada poderia acarretar em uma série de erros. Como exemplo, podemos citar a subunidade $\alpha 6$ que foi encontrada glutatiolada somente como um spot minoritário de pI mais ácido, co-migrante com o spot da subunidade $\beta 6$. Isso nos levaria erroneamente a considerar o spot de $\beta 6$ glutatiolado por imunomarcação, quando na realidade o spot imunomarcado provavelmente era uma forma minoritária de $\alpha 6$. Espectrometria de massas foi uma importante ferramenta para a confirmação da presença da glutatiolona modificando as subunidades imunoidentificadas.

Os ensaios de espectrometria de massas confirmaram a glutatiolação da subunidade $\alpha 7$ assim como das subunidades $\alpha 4$, $\alpha 5$ e $\alpha 6$. Embora a análise por espectrometria de massas tenha sido capaz de identificar diversos resíduos glutatiolados, esta técnica também conta com suas limitações. Não são muito bem descritas as características de ionização de peptídeos glutatiolados e nem a manutenção da integridade desta modificação peptídica no processo de fragmentação dos peptídeos na câmara de colisão. Diversos trabalhos que caracterizaram a glutatiolação de proteínas na literatura apenas identificaram a modificação por MS ou utilizando glutatiolona biotinilada, identificaram por *fingerprinting* as proteínas imunoprecipitadas, porém sem a necessidade da ionização de peptídeos contendo glutatiolona. Embora a análise de S-glutatiolação por MS/MS não seja das mais simples por envolver inúmeras variáveis, alguns trabalhos atuais já demonstram a glutatiolação de proteínas por MS/MS (Regazzoni e col., 2009; Palmieri e col., 2010; Kambe e col., 2010). Anteriormente aos ensaios com o 20SPT, testamos a manutenção da integridade da modificação e a capacidade de ionização de peptídeos modificados, analisando a glutatiolação da oligopeptidase Thimet EP. 24.15. Esta enzima possui 15 resíduos de cisteína em sua seqüência primária e foi caracterizada como glutatiolável na presença de GSSG (Demasi e col., 2008). A superexpressão desta proteína em bactérias e a obtenção de grande massa protéica facilitaram as condições experimentais. Embora nem todos os resíduos de cisteína tenham sido identificados em nossas análises (provavelmente devido a formações de dissulfetos intra e intermoleculares), foi possível confirmar que a glutatiolona poderia se manter intacta durante a fragmentação na câmara de colisão, possibilitando a atribuição de seqüência do peptídeo contendo o resíduo de cisteína modificado por MS/MS (dados não mostrados). Entre as dificuldades metodológicas encontradas, vale a pena destacar a necessidade de índices de cobertura próximos a 100 % para identificar todos os peptídeos

possíveis, a intensidade e capacidade de ionização de cada peptídeo, a separação dos peptídeos por UPLC para a seleção dos íons para MS/MS e o tamanho dos fragmentos gerados pela digestão com tripsina. Apesar da alta capacidade das análises por espectrometria de massas de identificar a glutatilação, cabe ainda destacar que o número de spots imunomarcados com o anticorpo anti-GSH é muito maior que o de subunidades identificadas no total, indicando que nossos estudos ainda podem estar subestimando as subunidades e Cys glutatiladas.

Durante nossas análises, diversos peptídeos foram encontrados não somente glutatilados, mas também reduzidos na mesma amostra (dados não mostrados). Este dado indica que a glutatilação não ocorre na totalidade das moléculas do 20SPT intracelular. A heterogeneidade da população do 20SPT pode ser explicada devido à sublocalização celular e à ausência de sincronia de ciclo celular das células de levedura, fator que pode alterar a capacidade redutora da célula (Aon e col., 2007; Lloyd e col., 2003).

Analisando a localização dos resíduos de cisteína glutatilados, apenas a Cys221 contida na subunidade $\alpha 5$ apresenta a sulfidril totalmente exposta ao solvente (Fig. 31 e 32). Dados estruturais reforçam que esta Cys possui volume teórico suficiente para abrigar uma molécula de glutatona. Este resíduo é o mais acessível à glutatona, o que está de acordo com a maior quantidade detectada deste íon tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

É intrigante que mesmo os demais resíduos, apesar de não tão expostos ao solvente, também se apresentem glutatilados em nossas análises. Uma possível hipótese é de que a glutatilação possa ocorrer de forma seqüencial no 20SPT. A cisteína 221 da subunidade $\alpha 5$, devido a sua alta exposição ao solvente, seria a primeira a se modificar e a glutatilação deste resíduo acarretaria em mudanças estruturais que exporiam os demais resíduos de cisteína tornando-os também susceptíveis a glutatilação. Dois mecanismos surgiriam para a regulação da atividade catalítica do 20SPT. A glutatilação da $\alpha 5$ Cys221 poderia atuar como um gatilho, no qual ao ser ativado causaria mudanças estruturais que alterariam a atividade catalítica do proteassomo com as demais glutatilações sendo conseqüências deste disparo. Outra hipótese é que a glutatilação da $\alpha 5$ Cys221 atuaria como um sensor redox do proteassomo iniciando as modificações estruturais até a glutatona alcançar os resíduos responsáveis pela modulação da atividade catalítica.

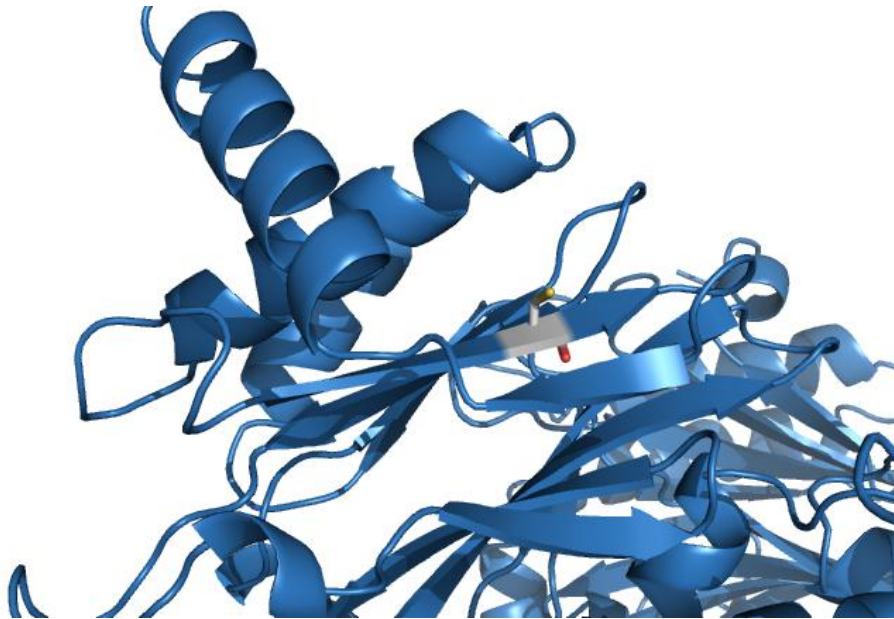


Figura 32. Imagem tridimensional destacando a localização da Cisteína 221 da subunidade $\alpha 5$ do proteassomo - A figura representa a localização da Cys221 da subunidade $\alpha 5$ passível de glutatilação. A acessibilidade do tiol (amarelo) ao solvente indica a facilidade deste resíduo em reagir com GSH, além disso, a análise estrutural demonstra volume suficiente para abrigar uma molécula de glutatona. PDB Id: 1RYP. Imagens gráficas geradas pelo software Pymol (Delano Scientific).

O proteassomo da arqueobactéria *M. thermophila* possui somente 14 resíduos de cisteína e não responde a incubação com GSH mesmo na concentração de 10 mM (Demasi e col., 2003). A pressão evolutiva sobre as subunidades do 20SPT pode ter selecionado resíduos de cisteína específicos que atuem como gatilhos ou sensores, respondendo a diferentes condições redox em eucariotos. Mutações sítio-dirigidas para os resíduos de cisteína glutatilados são as novas propostas para a continuidade deste projeto, possivelmente gerando um proteassomo insensível a glutatona.

Por outro lado, a inserção de cisteínas especificamente posicionadas no 20SPT de levedura (analisando a localização das Cys glutatiladas por GSSG no proteassomo de mamíferos), poderia levar aos efeitos ativadores e a resposta a GSSG vistas para o proteassomo de mamíferos (Demasi e col., 2001). Entender este fino mecanismo de regulação e a importância de cada Cys no processo de modulação da atividade catalítica daria uma importante contribuição para a caracterização do processo. Estas Cys poderiam se tornar alvos de inibidores ou ativadores especificamente desenhados para o proteassomo, importante alvo para tratamentos de tumores e doenças neurodegenerativas (Montagut e col., 2006; Matsuda e Tanaka; 2009; Petrucelli e Dawson, 2004).

Outro fato interessante é que dois dos peptídeos identificados como glutatiolados em duas diferentes subunidades ($\alpha 5$ e $\alpha 7$) compartilham identidade de seqüência primária (DRHIGC). Uma busca nos bancos de dados de proteínas glutatioladas e análises estruturais dos resíduos de aminoácidos envolvidos na estabilização da molécula de glutathione nas cisteínas de proteínas poderão gerar informações importantes, estabelecendo novos motivos protéicos correlacionados a modificações pós-traducionais específicas, dependente do estado redox intracelular.

A glutatiolação de proteínas não é somente uma modificação pós-traducional que ocorre em resposta a desafios oxidativos. Para ser caracterizada como uma modificação regulatória, além de ocorrer em condições fisiológicas, o processo modulatório necessita ser reversível. Caracterizamos neste trabalho dois sistemas enzimáticos capazes de desglutatiolar o proteassomo (Anexo VII; Silva e col., 2008). Os sistemas glutarredoxina e tiorredoxina são conhecidos por serem extremamente redundantes dentro das células e, interessantemente, o sistema glutarredoxina foi caracterizado por reduzir a ribonucleotídeo redutase em linhagem deficientes do sistema tiorredoxina (Holmgren, 1976). Verificamos *in vitro* que a desglutatiolação da unidade catalítica do proteassomo recupera as atividades sitio-específicas parcialmente inibidas (ChT-L e PA) e o mecanismo de desglutatiolação é dependente da ativação do 20SPT, o que acarreta em grande proteólise das oxidoredutases. Cabe agora, investigar o papel destas oxidoredutases *in vivo* na desglutatiolação do proteassomo, analisando o nível de glutatiolação e a atividade do 20SPT em linhagens mutantes para glutarredoxinas e tiorredoxinas ou ainda de glutathione redutases e tiorredoxina redutases. Estudos sendo conduzidos em nosso laboratório investigam os mecanismos de desglutatiolação do 20SPT pela Grx1 e Grx2 de levedura. A utilização de Grx mutante para a cisteína de resolução poderá proporcionar a formação de uma ligação dissulfeto estável entre a Grx e as cisteínas do proteassomo, indicando por imunomarcção em 2-DE ou espectrometria de massas as cisteínas glutatioláveis passíveis de desglutatiolação pelas Grxs. Embora ambas Grx possuam alta similaridade de seqüência primária, a Grx2 possui atividade específica 15 vezes maior que Grx1. As características estruturais de cada Grx refletem na diferença da atividade catalítica relatada (Discola e col., 2009). Estas diferenças estruturais podem determinar a especificidade dos substratos das Grx e analisar o efeito sobre o proteassomo como possível substrato endógeno pode comprovar esta hipótese.

Outro dado importante obtido neste trabalho foi que a glutatilação do 20SPT é capaz de alterar a atividade proteolítica promovendo uma hidrólise diferenciada dos substratos. Foi possível verificar que o PT-YPD é capaz de degradar diversas proteínas de forma mais eficiente que o PT-SH e ainda, analisando o perfil peptídico gerado pelo PT-YPD e pelo PT-SH, foi possível concluir que essas diferenças não se dão somente na velocidade de catálise, mas também na participação diferencial de cada sítio catalítico. Os dados de HPLC e espectrometria de massas de degradação proteica (Figs. 23 e 26; tabela 4; Anexo III) demonstraram que cada 20SPT gerou uma parcela de aproximadamente 30 % de peptídeos únicos, e que, mesmo entre os peptídeos comuns às duas condições, as proporções variaram enormemente. É importante frisar que após o longo período de incubação dessas proteínas com o 20SPT (16 h) podemos afirmar com certa confiabilidade que as diferenças apresentadas são devido a diferenças de clivagem e não por estarmos analisando diferenças intermediárias do mesmo processamento proteolítico. Dados não mostrados revelaram que nas condições trabalhadas, após 6 horas de incubação com Grx2, não foi possível verificar diferença significativa de proteólise. Mais ainda, identificando os íons produzidos após esta longa incubação (Anexo III), não foi possível identificar uma geração significativa de grandes peptídeos como o Grx2₆₅₋₁₀₉, estando de acordo com o padrão de peptídeos gerados pelo proteassomo. Ressaltamos que os resultados poderiam ser ainda mais contrastantes se estivéssemos analisando uma população homogênea de proteassomo glutatiliado.

A importância das análises qualitativas realizadas é que mesmo uma proporção de 20SPT glutatiliado contida na amostra PT-YPD foi capaz de gerar peptídeos de forma distinta e estes peptídeos puderam ser detectados, evidenciando sítios preferenciais de clivagem. Análises quantitativas ainda não puderam ser realizadas já que a fração não glutatiliada do PT-YPD pode estar suprimindo a real atividade do 20SPT modificado. Estudos preliminares ainda não foram conclusivos sobre a diferença dos parâmetros cinéticos para cada sítio-ativo entre as duas condições. Utilizando substratos fluoropeptídicos específicos para cada atividade, buscaremos a obtenção de parâmetros que envolvam velocidade máxima de catálise, constantes de afinidade pelo substrato e de eficiência catalítica. Apesar disso, a glutatilação pode não afetar nenhum destes parâmetros para a atividade peptidásica e somente estar relacionada com a degradação de proteínas, contudo, acreditamos que estas diferenças serão evidenciadas quando padronizarmos condições nas quais a glutatilação esteja presente em todas as moléculas do proteassomo. Esta homogeneidade do 20SPT

evidenciará todas as diferenças (proteolíticas e peptidásicas) entre a forma reduzida e glutatiolada.

Pretendemos estudar condições de estresse oxidativo, assim como realizado por Dixon e col., (2005), na tentativa de homogeneizar a população do proteassomo. Ensaios neste sentido também poderão ser realizados *in vitro*, glutatiolando moderadamente o proteassomo para a determinação dos parâmetros cinéticos, já que um intenso tratamento com GSH aboliria por completo a atividade proteassomal. A presença intracelular de uma população heterogênea do proteassomo 20S muito provavelmente está associada às diferenças redox entre citoplasma e núcleo onde o proteassomo é abundante e, acreditamos que essas diferenças também determinam a eficiência proteolítica e especificidade de substratos.

Embora os estudos que visaram demonstrar a modulação dos sítios-ativos específicos por glutatona ainda não serem conclusivos, investigamos se a diferença de degradação poderia estar correlacionada com modificações estruturais na câmara catalítica. Diversos trabalhos publicados pela dupla Osmulski e Gaczynska (2000, 2002 e 2008) haviam demonstrado o dinamismo da estrutura tridimensional do proteassomo 20S por microscopia de força atômica. Visualizando nossas amostras por microscopia eletrônica de transmissão, foi possível correlacionar um interessante efeito de fechamento da câmara catalítica na presença de DTT (Fig. 29). Este fenômeno pode ser juntamente com os mecanismos alostéricos de regulação, um dos responsáveis pela degradação diferencial de proteínas obtida em nossos experimentos. A glutatiolação, por promover a abertura da câmara, poderia retirar o 20SPT do seu estado de latência, acarretando numa maior degradação de proteínas oxidadas. Esta abertura permitiria um maior aporte de substrato aos sítios catalíticos intensificando a degradação destas proteínas. Mais ainda, uma série de experimentos que envolvem a estrutura do 20SPT está sendo realizada em nosso laboratório, na qual além de verificar o dinamismo da estrutura 3D do proteassomo, envolve a participação do proteassomo 19S. A hipótese é que o efeito da glutatiolação e conseqüente abertura da câmara catalítica (modificações dependentes do estado redox intracelular) poderiam promover diferenças de cinética de acoplamento e desacoplamento entre a unidade catalítica e a regulatória. Especulamos ainda, baseando-nos em ensaios preliminares, que a forma glutatiolada do 20SPT encontra-se desacoplada de unidades regulatórias, o que permitiria uma degradação mais eficiente das proteínas oxidadas.

O conjunto de dados obtidos até o momento reforça uma importante atividade do 20SPT sobre a degradação de proteínas por uma via independente de poli-ubiquitinação, estando em desacordo com as descrições sobre sua latência (Coux e col., 1996; Groll e col., 2000). A glutatilação promove sensíveis modificações de atividade e estrutura do proteassomo, sendo um processo regulado por resíduos específicos de cisteína. Demasi e col. (2003) descreveram o efeito do tratamento das células de levedura com H₂O₂ na atividade proteassomal, indicando que esta modificação tende a ocorrer dependente do balanço redox celular. Coincidentemente, o 20SPT glutatiolado é capaz de degradar de forma mais eficiente as proteínas-substrato, incluindo proteínas oxidadas cuja ocorrência em condições de estresse oxidativo está aumentada. Esta via de regulação é condizente com o fato do 26SPT e a enzima ativadora de ubiquitina (E1) serem mais sensíveis, e estarem inativadas, em condições de estresse oxidativo em comparação ao 20SPT (Reinheckel e col., 1998 e 2000). Portanto, não seria possível creditar ao 26SPT inativo, a degradação das proteínas oxidadas. O 20SPT destituído de subunidades regulatórias representa uma importante porcentagem do proteassomo total intracelular. Sendo mais resistente aos desafios oxidativos, o 20SPT desponta como principal candidato a degradação de proteínas oxidadas intracelularmente, e ainda, a glutatilação de resíduos específicos de cisteína possuiria importante papel nesta transição funcional.

Embora muito ainda se tenha a explorar neste vasto campo que se abre em relação à modificação da atividade catalítica do proteassomo, a glutatilação do 20SPT surge como uma modificação pós-traducional capaz de combater o excesso de proteínas danificadas oxidativamente, sugerindo uma função antioxidante para o 20SPT. Cessando o desafio oxidativo, as oxidoredutases da família Grx e Trx seriam capazes de desglutatiolar o 20SPT, recobrando sua atividade catalítica basal, na qual acoplado ao 19SPT atuaria de forma regulada na seleção de substratos para degradação via sistema ubiquitina-proteassomo.

VI. Conclusões

A caracterização do processo de glutatilação e desglutatilação da unidade catalítica 20S do proteassomo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram os principais objetivos durante a execução deste projeto. Dentre as principais conclusões extraídas podemos citar que:

- Foi demonstrado que o proteassomo 20S purificado de leveduras crescidas até atingir fase estacionária apresenta-se nativamente glutatiolado.
- Após o isolamento das 14 subunidades componentes do 20SPT por eletroforese bidimensional, identificamos *in vitro* e *in vivo*, as subunidades e os resíduos de cisteína glutatiolados por análises de imunomarcação anti-GSH e por estudos de espectrometria de massa.
- Considerando as duas condições estudadas, apenas sete dos 36 resíduos de cisteína da câmara catalítica apresentaram-se modificados por glutatona, sugerindo um mecanismo específico da regulação da atividade proteassomal.
- Os resíduos de cisteína identificados como glutatiolados concentram-se exclusivamente nas subunidades alfa do 20SPT. Analisando a disposição das Cys glutatioladas na estrutura 3D da protease, verificamos que estes resíduos não se localizam próximos a entrada da câmara catalítica, nem próximos aos sítios-ativos, indicando um mecanismo alostérico de regulação.
- A glutatilação da câmara catalítica do 20SPT promove uma hidrólise mais eficiente das proteínas degradáveis independentemente de ubiquitinação. Mais ainda, a presença de glutatona altera o perfil peptídico gerado pela forma reduzida do proteassomo, por utilizar as atividades sítio-específicas de maneira diferenciada.
- A geração diferencial de peptídeos pode ter uma grande relevância em diversos eventos celulares, inclusive no sistema imune. Somente a forma reduzida do proteassomo foi capaz de gerar o epítipo imunodominante SIINFEKL a partir da degradação de ovalbumina. Este dado é interessante visto que, apesar da levedura não possuir sistema imune, as vias de processamento polipeptídico são altamente conservadas na escala evolutiva e o proteassomo de mamíferos também possui sua atividade modulada por glutatona.
- Um dos possíveis mecanismos pelo qual a glutatilação altera a atividade do proteassomo pode estar correlacionado com a dinâmica de abertura e fechamento da câmara catalítica. Análises da vista frontal da unidade catalítica demonstraram que o proteassomo nativamente glutatiolado encontra-se em sua conformação aberta, sendo imediatamente fechado na presença do redutor DTT.

- Caracterizamos ainda uma via de desglutatiolação do 20SPT capaz de recuperar as atividades comprometidas pela presença de glutatona demonstrando a reversibilidade desta modificação. A desglutatiolação ocorre enzimaticamente pela ação da glutarredoxina 2, com resultados similares para as tioredoxinas citosólicas. O mecanismo ainda envolve a degradação das oxidoredutases provavelmente devido a propriedades estruturais desta família de proteínas.
- Os dados obtidos até então sugerem um interessante papel antioxidante do 20SPT durante desafios oxidativos. Nestas condições ocorreria a glutatiolação da unidade catalítica, modulando a atividade proteassomal, removendo mais eficientemente as proteínas oxidadas geradas durante o desafio.
- Este trabalho abre uma série de perspectivas para o entendimento da modulação da atividade proteassomal por glutatiolação e para o envolvimento desta modificação pós-traducional com o metabolismo redox intracelular. Devido à conservação desta protease e do mecanismo de glutatiolação nos mais diversos organismos eucarióticos, estes estudos tornam-se cada vez mais importantes para a compreensão da função intracelular do proteassomo 20S. Compreender o papel de cada resíduo glutatiolável e investigar o mecanismo alostérico de modulação da atividade são os mais novos objetivos deste grupo.

VII. Referências Bibliográficas

- Akopian, T.N.; Kisselev, A.F. e Goldberg, A.L. (1997) "Processive degradation of proteins and other catalytic properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*." *J Biol Chem.*, **272**: 1791-8.
- Anderson, R.M.; Bitterman, K.J.; Wood, J.G.; Medvedik, O. e Sinclair, D.A. (2003) "Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*." *Nature*, **423**: 181-5.
- Aon, M.A.; Cortassa, S.; Lemar, K.M.; Hayes, A.J. e Lloyd, D. (2007) "Single and cell population respiratory oscillations in yeast: a 2-photon scanning laser microscopy study." *FEBS Lett.*, **581**: 8-14.
- Arendt, C.S. e Hochstrasser, M. (1997). "Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation." *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**: 7156-7161.
- Arrigo, A.P.; Tanaka, K.; Goldberg, A.L. e Welch, W.J. (1988) "Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome)." *Nature*, **331**: 192-4.
- Asher, G.; Bercovich, Z.; Tsvetkov, P.; Shaul, Y. e Kahana, C. "20S proteasomal degradation of ornithine decarboxylase is regulated by NQO1." *Mol Cell.*, **17**: 645-55.
- Asher, G.; Lotem, J.; Sachs, L.; Kahana, C. e Shaul, Y. (2002) "Mdm-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1." *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**: 13125-30.
- Atkinson, H.J. e Babbitt, P.C. (2009) "An atlas of the thioredoxin fold class reveals the complexity of function-enabling adaptations." *PLoS Comput Biol.*, **5**: e1000541.
- Avval, F.Z. e Holmgren, A. (2009) "Molecular mechanisms of thioredoxin and glutaredoxin as hydrogen donors for Mammalian S phase ribonucleotide reductase." *J Biol Chem.*, **284**: 8233-40.
- Babbitt, S.E.; Kiss, A.; Deffenbaugh, A.E.; Chang, Y.H.; Bailly, E.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Buranda, T.; Sklar, L.A.; Baumler, J.; Gogol, E.; Skowyra, D. (2005) "ATP hydrolysis-dependent disassembly of the 26S proteasome is part of the catalytic cycle." *Cell*, **121**: 553-65.
- Bajorek, M.; Finley, D. e Glickman, M.H. (2003) "Proteasome disassembly and downregulation is correlated with viability during stationary phase." *Curr Biol.*, **13**: 1140-4.
- Bakker, B.M.; Bro, C.; Kötter, P.; Luttkik, M.A.; van Dijken, J.P. e Pronk, J.T. (2000) "The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bacteriol.*, **182**: 4730-7.
- Bakker, B.M.; Overkamp, K.M.; van Maris, A.J.; Kötter, P.; Luttkik, M.A.; van Dijken, J.P. e Pronk, J.T. (2001) "Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*." *FEMS Microbiol Rev.*, **25**: 15-37.
- Bardag-Gorce F. (2010) "Effects of ethanol on the proteasome interacting proteins." *World J Gastroenterol.*, **16**: 1349-57.
- Bass, R.; Ruddock, L.W.; Klappa, P. e Freedman, R.B. (2004) "A Major Fraction of Endoplasmic Reticulum-located Glutathione Is Present as Mixed Disulfides with Protein" *J. Biol. Chem.*, **279**: 5257-62.
- Baugh, J.M.; Viktorova, E.G. e Pilipenko, E.V. (2009) "Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination." *J Mol Biol.*, **386**: 814-27.

- Benaroudj, N.; Tarcsa, E.; Cascio, P. e Goldberg, A.L. (2001) "The unfolding of substrates and ubiquitin-independent protein degradation by proteasomes." *Biochimie*, **83**: 311-8.
- Ben-Shahar, S.; Cassouto, B.; Novak, L.; Porgador, A. e Reiss, Y. (1997) "Production of a specific major histocompatibility complex class I-restricted epitope by ubiquitin-dependent degradation of modified ovalbumin in lymphocyte lysate." *J Biol Chem.*, **272**: 21060-6.
- Bernassola, F.; Karin, M.; Ciechanover, A. e Melino, G. (2008) "The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development." *Cancer Cell*, **14**: 10-21.
- Blickwedehl, J.; Agarwal, M.; Seong, C.; Pandita, R.K.; Melendy, T.; Sung, P.; Pandita, T.K. e Bangia, N. (2008) "Role for proteasome activator PA200 and postglutamyl proteasome activity in genomic stability." *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**: 16165-70.
- Borges, C.R.; Geddes, T.; Watson, J.T. e Kuhn, D.M. (2002) "Dopamine biosynthesis is regulated by S-glutathionylation. Potential mechanism of tyrosine hydroxylase inhibition during oxidative stress." *J. Biol. Chem.*, **277**: 48295-302.
- Bose, S.; Stratford, F.L.; Broadfoot, K.I.; Mason, G.G. e Rivett, A.J. (2004) "Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon." *Biochem J.*, **378**: 177-84.
- Carrard, G.; Dieu, M.; Raes, M.; Toussaint, O. e Friguet, B. (2003) "Impact of ageing on proteasome structure and function in human lymphocytes." *Int J Biochem Cell Biol.*, **35**: 728-39.
- Cascio, P.; Hilton, C.; Kisselev, A.F.; Rock, K.L. e Goldberg, A.L. (2001) "26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide." *EMBO J.*, **20**: 2357-66.
- Celenza, J.L. e Carlson, M. (1984) "Cloning and genetic mapping of SNF1, a gene required for expression of glucose-repressible genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol.*, **4**: 49-53.
- Chasapis, C.T. e Spyroulias, G.A. (2009) "RING finger E(3) ubiquitin ligases: structure and drug discovery." *Curr Pharm Des.*, **15**: 3716-31.
- Chen E, Hrdlickova, R.; Nehyba, J.; Longo, D.L.; Bose, H.R. Jr e Li, C.C. (1998) "Degradation of proto-oncoprotein c-Rel by the ubiquitin-proteasome pathway." *J Biol Chem.*, **273**: 35201-7.
- Choudhuri, A.U.; Tokumoto, T.; Dohra, H.; Ushimaru, T. e Yamada, S. (2008) "Functional and biochemical characterization of the 20S proteasome in a yeast temperature-sensitive mutant, rpt6-1." *BMC Biochem.*, **9**: 20.
- Ciechanover, A e col., (1982) "Covalent affinity' purification of ubiquitin-activating enzyme." *J Biol Chem.*, **257**: 2537-42.
- Ciechanover, A.; Hod, Y. e Hershko, A. (1978) "A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes" *Biochem Biophys Res Commun.*, **81**: 1100-05.
- Claiborne, A., Mallett, T.C.; Yeh, J.I.; Luba, J. e Parsonage, D. (2001) "Structural, redox, and mechanistic parameters for cysteine-sulfenic acid function in catalysis and regulation." *Adv Protein Chem.*, **58**: 215-76.
- Costa, V.; Quintanilha, A. e Moradas-Ferreira, P. (2007) "Protein oxidation, repair mechanisms and proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*." *IUBMB Life*. **59**: 293-8.
- Coux, O.; Tanaka, K. e Goldberg, A.L. (1996) "Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes." *Annu. Rev. Biochem.*, **65**: 801-47.

- Craiu, A., Akopian, T.; Goldberg, A. e Rock, K.L. (1997) "Two distinct proteolytic processes in the generation of a major histocompatibility complex class I-presented peptide." *Proc Natl Acad Sci USA.*, **94**: 10850-5.
- Cunha, F.M.; Berti, D.A.; Ferreira, Z.S.; Klitzke, C.F.; Markus, R.P. e Ferro, E.S. (2008) "Intracellular peptides as natural regulators of cell signaling." *J Biol Chem.*, **283**: 24448-59.
- Cussiol, J.R., Alegria, T.G.; Szweda, L.I. e Netto, L.E. (2010) "Ohr (organic hydroperoxide resistance protein) possesses a previously undescribed activity: Lipoyl-dependent peroxidase." *J Biol Chem.*, **285**: 21943-50.
- Cussiol, J.R., Alves, S.V.; de Oliveira, M.A. e Netto, L.E. (2003) "Organic hydroperoxide resistance gene encodes a thiol-dependent peroxidase." *J Biol Chem.*, **278**: 11570-8
- Dahlmann, B. (2007) "Role of proteasomes in disease." *BMC Biochem.*, **8**: Suppl 1:S3.
- Dalet, A.; Vigneron, N.; Stroobant, V.; Hanada, K. e Van den Eynde, B.J. (2010) "Splicing of distant peptide fragments occurs in the proteasome by transpeptidation and produces the spliced antigenic peptide derived from fibroblast growth factor-5." *J Immunol.*, **184**: 3016-24.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R.; Colombo, G.; Giustarini, D. e Milzani, A. (2009) "Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans." *Trends Biochem Sci.*, **34**: 85-96.
- Davies, K.J. (2001) "Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome." *Biochimie*, **83**: 301-10.
- de Duve, C. (1983) "Lysosomes revisited." *Eur J Biochem.*, **137**: 391-7
- de Duve, C.; Pressman, B.C.; Gianetto, R.; Wattiaux, R. e Appelmans, F. (1955) "Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue." *Biochem J.*, **60**: 604-17
- Delano, W. L. (2002) "The Pymol Molecular Graphics System" Delano Scientific, San Carlos, CA., USA (<http://www.pymol.org>)
- Delgado, M.L.; O'Connor, J.E.; Azorín, I.; Renau-Piqueras, J.; Gil, M.L. e Gozalbo, D. (2001) "The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* TDH1, TDH2 and TDH3 genes are also cell wall proteins." *Microbiology*, **147**: 411-7.
- DeMarini, D.J.; Papa, F.R.; Swaminathan, S.; Ursic, D.; Rasmussen, T.P.; Culbertson, M.R. e Hochstrasser, M. (1995) "The yeast SEN3 gene encodes a regulatory subunit of the 26S proteasome complex required for ubiquitin-dependent protein degradation in vivo." *Mol Cell Biol.*, **15**: 6311-21.
- Demasi, M.; Shringarpure, R. e Davies, K.J. (2001) "Glutathiolation of the proteasome is enhanced by proteolytic inhibitors." *Arch Biochem Biophys.*, **389**: 254-63.
- Demasi, M.; Silva, G.M. e Netto, L.E. (2003) "20 S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is S-glutathionylated." *J Biol Chem.*, **278**: 679-85.
- Demasi, M.; Piassa Filho, G.M.; Castro, L.M.; Ferreira, J.C.; Rioli, V. e Ferro, E.S. (2008) "Oligomerization of the cysteinyl-rich oligopeptidase EP24.15 is triggered by S-glutathionylation." *Free Radic Biol Med.*, **44**: 1180-90.
- Deshaies, R.J. e Joazeiro, C.A. (2009) "RING domain E3 ubiquitin ligases." *Annu Rev Biochem.*, **78**: 399-434.
- Dick, T.P.; Nussbaum, A.K.; Deeg, M.; Heinemeyer, W.; Groll, M.; Schirle, M.; Keilholz, W.; Stevanović, S.; Wolf, D.H.; Huber, R.; Rammensee, H.G. e Schild, H. (1998) "Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants." *J Biol Chem.*, **273**: 25637-46.

- Discola, K.F.; Oliveira, M.A.; Silva, G.M.; Barcena, J.A.; Porras, P.; Padilla, A.; Netto, L.E. e Guimarães, B.G. (2005) "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of glutaredoxin 2 from *Saccharomyces cerevisiae* in different oxidation states." *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.*, **61**: 445-7.
- Discola, K.F.; de Oliveira, M.A.; Cussiol, J.R.R.; Monteiro, G.; Bárcena, J.A.; Porras, P.; Padilla, C.A.; Guimarães, B.G. e Netto, L.E. (2009) "Structural aspects of the distinct biochemical properties of glutaredoxin 1 and glutaredoxin 2 from *Saccharomyces cerevisiae*." *J Mol Biol.*, **385**: 889-901.
- Dixon, D.P.; Skipsey, M.; Grundy, N.M. e Edwards, R. (2005) "Stress-Induced Protein S-Glutathionylation in *Arabidopsis*" *Plant Physiol.*, **138**: 2233-44.
- Dunlop, R.A.; Brunk, U.T. e Rodgers, K.J. (2009) "Oxidized proteins: mechanisms of removal and consequences of accumulation." *IUBMB Life*, **61**: 522-7.
- Eckers, E.; Bien, M.; Stroobant, V.; Herrmann, J.M. e Deponte, M. (2009) "Biochemical characterization of dithiol glutaredoxin 8 from *Saccharomyces cerevisiae*: the catalytic redox mechanism redux." *Biochemistry*, **48**: 1410-23.
- Effantin, G.; Rosenzweig, R.; Glickman, M.H. e Steven, A.C. (2009) "Electron microscopic evidence in support of alpha-solenoid models of proteasomal subunits Rpn1 and Rpn2." *J Mol Biol.*, **386**: 1204-11.
- Elsasser, S.; Gali, R.R.; Schwickart, M.; Larsen, C.N.; Leggett, D.S.; Müller, B.; Feng, M.T.; Tübing, F.; Dittmar, G.A. e Finley, D. (2002) "Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains." *Nat Cell Biol.*, **4**: 725-30.
- Etlinger, J.D. e Goldberg, A.L. (1977) "A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes." *Proc Natl Acad Sci USA*. **74**: 54-8.
- Fasanaro, P; Capogrossi, M.C. e Martelli, F. (2010) "Regulation of the endothelial cell cycle by the ubiquitin-proteasome system." *Cardiovasc Res.*, **85**: 272-80.
- Fernandes, A.P. & Holmgren, A. (2004) "Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system." *Antiox Redox Signal.*, **6**: 63-74.
- Ferrington, D.A.; Sun, H.; Murray, K.K.; Costa, J.; Williams, T.D.; Bigelow, D.J. e Squier, T.C. (2001) "Selective degradation of oxidized calmodulin by the 20 S proteasome." *J Biol Chem.*, **276**: 937-43.
- Ferro, E.S.; Hyslop, S. e Camargo, A.C. (2004) "Intracellular peptides as putative natural regulators of protein interactions." *J Neurochem.*, **91**: 769-77
- Förster, A.; Masters, E.I.; Whitby, F.G.; Robinson, H. e Hill, C.P. (2005) "The 1.9 Å structure of a proteasome-11S activator complex and implications for proteasome-PAN/PA700 interactions." *Mol Cell*, **18**: 589-99.
- Förster, A.; Whitby, F.G. e Hill, C.P. (2003) "The pore of activated 20S proteasomes has an ordered 7-fold symmetric conformation." *EMBO J.*, **22**: 4356-64.
- Gaczynska, M. e Osmulski, P.A. (2008) "Atomic force microscopy as a tool to study the proteasome assemblies." *Methods Cell Biol.*, **90**: 39-60.
- Gaczynska, M.; Osmulski, P.A.; Gao, Y.; Post, M.J. e Simons, M. (2003) "Proline- and arginine-rich peptides constitute a novel class of allosteric inhibitors of proteasome activity." *Biochemistry*, **42**: 8663-70.
- Gasparian, A.V.; Guryanova, O.A.; Chebotaev, D.V.; Shishkin, A.A.; Yemelyanov, A.Y. e Budunova, I.V. (2009) "Targeting transcription factor NFκB: comparative analysis of proteasome and IKK inhibitors." *Cell Cycle*, **8**: 1559-66

- Ghaemmaghami, S.; Huh, W.K.; Bower, K.; Howson, R.W.; Belle, A.; Dephoure, N.; O'Shea, E.K. e Weissman, J.S. (2003) "Global analysis of protein expression in yeast." *Nature*, **425**: 737-41.
- Ghezzi, P.; Casagrande, S.; Massignan, T.; Basso, M.; Bellacchio, E.; Mollica, L.; Biasini, E.; Tonelli, R.; Eberini, I.; Gianazza, E.; Dai, W.W.; Fratelli, M.; Salmona, M.; Sherry, B. e Bonetto, V. (2006) "Redox regulation of cyclophilin A by glutathionylation." *Proteomics*, **6**: 817-25.
- Ghislain, M.; Talla, E. e François, J.M. (2002) "Identification and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* nicotinamidase gene, PNC1." *Yeast*, **19**: 215-24.
- Gilbert, H.F. (1995) "Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability" *Methods Enzymol.*, **251**: 8-28.
- Giustarini, D.; Rossi, R.; Milzani, A.; Colombo, R. e Dalle-Donne, I. (2004) "S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases." *J. Cell. Mol. Med.*, **8**: 201-12.
- Glickman, M.H.; Rubin, D.M.; Fried, V.A. e Finley, D. (1998) "The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome." *Mol Cell Biol.*, **18**: 3149-62.
- Glickman, M.H.; Rubin, D.M.; Fu, H.; Larsen, C.N.; Coux, O.; Wefes, I.; Pfeifer, G.; Cjeka, Z.; Vierstra, R.; Baumeister, W.; Fried, V. e Finley, D. (1999) "Functional analysis of the proteasome regulatory particle." *Mol Biol Rep.*, **26**: 21-8.
- Goch, G.; Vdovenko, S.; Kozłowska, H. e Bierzyński, A. (2005) "Affinity of S100A1 protein for calcium increases dramatically upon glutathionylation." *FEBS J.*, **272**: 2557-65.
- Goldberg, A.L.; Cascio, P., Saric, T. e Rock, K.L. (2002) "The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides." *Mol Immunol.*, **39**: 147-64.
- Gomes, A.V.; Zong, C.; Edmondson, R.D.; Li, X.; Stefani, E.; Zhang, J.; Jones, R.C.; Thyparambil, S.; Wang, G.W.; Qiao, X., Bardag-Gorce, F. e Ping P. (2006) "Mapping the murine cardiac 26S proteasome complexes" *Circ Res.*, **99**: 362-71.
- Groll, M.; Ditzel, L.; Lowe, J.; Stock, D.; Bochtler, M.; Bartunik, H. e Huber, R. (1997) "Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution." *Nature*, **386**: 463-71.
- Groll, M.; Heinemeyer, W.; Jäger, S.; Ullrich, T.; Bochtler, M.; Wolf, D.H. e Huber, R. (1999) "The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**: 10976-83.
- Groll, M.; Bajorek, M.; Köhler, A.; Moroder, L.; Rubin, D.M.; Huber, R.; Glickman, M.H. e Finley, D. (2000) "A gated channel into the proteasome core particle." *Nat Struct Biol.*, **7**: 1062-7.
- Groll, M. e Clausen, T. (2003) "Molecular shredders: how proteasomes fulfill their role." *Curr Opin Struct Biol.*, **13**: 665-73.
- Guerrero, C.; Milenkovic, T.; Przulj, N.; Kaiser, P. e Huang, L. (2008) "Characterization of the proteasome interaction network using a QTAX-based tag-team strategy and protein interaction network analysis." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**: 13333-8.
- Heinemeyer, W.; Fischer, M.; Krimmer, T.; Stachon, U. e Wolf, D.H. (1997) "The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing." *J Biol Chem.*, **272**: 25200-9.
- Hershko, A e col.,(1983) "Components of ubiquitin-protein ligase system: resolution, affinity purification and role in protein breakdown." *J Biol Chem.*, **258**: 8206–8214.

- Hershko, A. e Ciechanover, A. (1998) "The ubiquitin system." *Annu Rev Biochem.*, **67**: 425-79.
- Hershko, A.; Ciechanover, A. e Rose, I.A. (1979) "Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP." *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**: 3107-10
- Hill, C.P.; Masters, E.I.; Whitby, F.G. (2002) "The 11S regulators of 20S proteasome activity." *Curr Top Microbiol Immunol.*, **268**: 73-89.
- Holmgren, A. (1976) "Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione." *Proc Natl Acad Sci U S A.* **73**: 2275-9.
- Hough, R.; Pratt, G. e Rechsteiner, M. (1987) "Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate." *J Biol Chem.*, **262**: 8303-13.
- Humphries, K.M.; Juliano, C. e Taylor, S.S. (2002) "Regulation of cAMP-dependent protein kinase activity by glutathionylation." *J Biol Chem.*, **277**: 43505-11.
- Husnjak, K.; Elsasser, S.; Zhang, N.; Chen, X.; Randles, L.; Shi, Y.; Hofmann, K.; Walters, K.J., Finley, D. e Dikic, I. (2008) "Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor." *Nature*, **453**: 481-8.
- Inai, Y. e Nishikimi, M. (2002) "Increased degradation of oxidized proteins in yeast defective in 26 S proteasome assembly." *Arch Biochem Biophys.*, **404**: 279-84.
- Iwafune, Y.; Kawasaki, H. e Hirano, H. (2002) "Electrophoretic analysis of phosphorylation of the yeast 20S proteasome." *Electrophoresis*, **23**: 329-38.
- Iwafune, Y.; Kawasaki, H. e Hirano, H. (2004) "Identification of three phosphorylation sites in the alpha7 subunit of the yeast 20S proteasome in vivo using mass spectrometry." *Arch Biochem Biophys.*, **431**: 9-15.
- Jahngen-Hodge, J.; Obin, M.S.; Gong, X.; Shang, F.; Nowell, T.R. Jr.; Gong, J.; Abasi, H.; Blumberg, J. e Taylor, A. (1997) "Regulation of ubiquitin-conjugating enzymes by glutathione following oxidative stress." *J. Biol. Chem.*, **272**: 28218-26.
- Jankowska, E.; Gaczynska, M.; Osmulski, P.; Sikorska, E.; Rostankowski, R.; Madabhushi, S.; Tokmina-Lukaszewska, M. e Kasprzykowski, F. (2010) "Potential allosteric modulators of the proteasome activity." *Biopolymers*, **93**: 481-95.
- Jap, B.; Pühler, G.; Lücke, H.; Typke, D.; Löwe, J.; Stock, D.; Huber, R. e Baumeister, W. (1993) "Preliminary X-ray crystallographic study of the proteasome from Thermoplasma acidophilum." *J Mol Biol.*, **234**: 881-4.
- Jariel-Encontre, I.; Bossis, G.; Piechaczyk, M. (2008) "Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome." *Biochim Biophys Acta.*, **1786**: 153-77.
- Jariel-Encontre, I.; Pariat, M.; Martin, F.; Carillo, S.; Salvat, C. e Piechaczyk, M. (1995) "Ubiquitinylation is not an absolute requirement for degradation of c-Jun protein by the 26 S proteasome." *J Biol Chem.*, **270**: 11623-7.
- Jones, D.P. (2002) "Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance." *Methods Enzymol.*, **348**: 93-112.
- Jung, T.; Catalgol, B. e Grune, T. " (2009) "The proteasomal system." *Mol Aspects Med.*, **30**: 191-296.
- Kambe, T.; Song, T.; Takata, T.; Hatano, N.; Miyamoto, Y.; Nozaki, N.; Naito, Y.; Tokumitsu, H. e Watanabe, Y. (2010) "Inactivation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I by S-glutathionylation of the active-site cysteine residue." *FEBS Lett.*, **584**: 2478-84.
- Kee, Y. e Huijbregtse, J.M. (2007) "Regulation of catalytic activities of HECT ubiquitin ligases." *Biochem Biophys Res Commun.*, **354**: 329-33.

- Kikuchi, J.; Iwafune, Y.; Akiyama, T.; Okayama, A.; Nakamura, H.; Arakawa, N.; Kimura, Y. e Hirano, H. (2010) "Co- and post-translational modifications of the 26S proteasome in yeast." *Proteomics*, 2010. No prelo.
- Kimura, Y.; Saeki, Y.; Yokosawa, H.; Polevoda, B.; Sherman, F. e Hirano, H. (2003) "N-Terminal modifications of the 19S regulatory particle subunits of the yeast proteasome." *Arch Biochem Biophys.*, **409**: 341-8.
- Kimura, Y.; Takaoka, M.; Tanaka, S.; Sassa, H.; Tanaka, K.; Polevoda, B.; Sherman, F. e Hirano, H. (2000) "N(alpha)-acetylation and proteolytic activity of the yeast 20 S proteasome." *J Biol Chem.*, **275**: 4635-9.
- Kisselev, A.F.; Akopian, T.N. e Goldberg, A.L. (1998) "Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes." *J Biol Chem.*, **273**: 1982-9.
- Kisselev, A.F.; Akopian, T.N.; Woo, K.M. e Goldberg, A.L. (1999a) "The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation." *J Biol Chem.*, **274**: 3363-71.
- Kisselev, A.F.; Akopian, T.N.; Castillo, V. e Goldberg, A.L. (1999b) "Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown." *Mol Cell*, **4**: 395-402.
- Kisselev, A.F.; Callard, A. e Goldberg, A.L. (2006) "Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate." *J Biol Chem.*, **281**: 8582-90.
- Kisselev, A.F.; Kaganovich, D. e Goldberg, A.L. (2002) "Binding of hydrophobic peptides to several non-catalytic sites promotes peptide hydrolysis by all active sites of 20 S proteasomes. Evidence for peptide-induced channel opening in the alpha-rings." *J Biol Chem.*, **277**: 22260-70.
- Kisselev, A.F.; Garcia-Calvo, M.; Overkleeft, H.S.; Peterson, E.; Pennington, M.W.; Ploegh, H.L.; Thornberry, N.A. e Goldberg, A.L. (2003) "The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites." *J Biol Chem.*, **278**: 35869-77.
- Kloetzel, P.M. (2004) "The proteasome and MHC class I antigen processing." *Biochim Biophys Acta*, **1695**: 225-33.
- Kloetzel, P.M. e Ossendorp, F. (2004) "Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation." *Curr Opin Immunol.*, **16**: 76-81.
- Le Moan, N.; Clement, G.; Le Maout, S.; Tacnet, F. e Toledano M.B. (2006) "The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols: contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways" *J.Biol.Chem.*, **81**: 10420-30.
- Li, J. e Rechsteiner, M. (2001) "Molecular dissection of the 11S REG (PA28) proteasome activators." *Biochimie*, **83**: 373-83.
- Li, W. e Ye, Y. (2008) "Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms." *Cell Mol Life Sci.*, **65**: 2397-406.
- Liu, C.W.; Corboy, M.J.; DeMartino, G.N. e Thomas, P.J. (2003) "Endoproteolytic activity of the proteasome." *Science*, **299**: 408-11.
- Lloyd, D.; Lemar, K.M.; Salgado, L.E.; Gould, T.M. e Murray, D.B. (2003) "Respiratory oscillations in yeast: mitochondrial reactive oxygen species, apoptosis and time; a hypothesis." *FEMS Yeast Res.*, **3**: 333-9.
- Löwe, J.; Stock, D.; Jap, B.; Zwickl, P.; Baumeister, W. e Huber, R. (1995) "Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution." *Science*, **268**: 533-9.

- Luikenhuis, S.; Perrone, G.; Dawes, I.W. e Grant, C.M. (1998) "The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species." *Mol. Biol. Cell.*, **9**: 1081-91.
- Matsuda, N. e Tanaka, K. (2010) "Does impairment of the ubiquitin-proteasome system or the autophagy-lysosome pathway predispose individuals to neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease?" *J Alzheimers Dis.*, **19**: 1-9.
- Mesecke, N.; Mittler, S.; Eckers, E.; Herrmann, J.M. e Deponte, M. (2008) "Two novel monothiol glutaredoxins from *Saccharomyces cerevisiae* provide further insight into iron-sulfur cluster binding, oligomerization, and enzymatic activity of glutaredoxins." *Biochemistry.*, **47**: 1452-63.
- Meyer, A.J. e Hell, R. (2005) "Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups" *Photosynth Res.*, **86**: 435-57.
- Michalek, M.T.; Grant, E.P. e Rock, K.L. (1996) "Chemical denaturation and modification of ovalbumin alters its dependence on ubiquitin conjugation for class I antigen presentation." *J Immunol.*, **157**: 617-24.
- Montagut, C.; Rovira, A. e Albanell, J. (2006) "The proteasome: a novel target for anticancer therapy." *Clin Transl Oncol.*, **8**: 313-7.
- Morimoto, Y.; Mizushima, T.; Yagi, A.; Tanahashi, N.; Tanaka, K.; Ichihara, A. e Tsukihara, T. (1995) "Ordered structure of the crystallized bovine 20S proteasome." *J Biochem.*, **117**: 471-4.
- Murata, S.; Sasaki, K.; Kishimoto, T.; Niwa, S.; Hayashi, H.; Takahama, Y. e Tanaka, K. (2007) "Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes." *Science*, **316**: 1349-53.
- Murata, S.; Takahama, Y. e Tanaka, K. (2008) "Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides." *Curr Opin Immunol.*, **20**: 192-6.
- Nandi, D.; Tahiliani, P.; Kumar, A. e Chandu, D. (2006) "The Ubiquitin-proteasome system." *J Biosci.*, **31**: 137-55.
- Navon, A. e Goldberg, A.L. (2001) "Proteins are unfolded on the surface of the ATPase ring before transport into the proteasome." *Mol Cell*, **8**: 1339-49.
- Neuhoff, V.; Arold, N.; Taube, D. e Ehrhardt, W. (1988) "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250." *Electrophoresis*, **9**: 255-62.
- Nickell, S.; Beck, F.; Scheres, S.H.; Korinek, A.; Förster, F.; Lasker, K.; Mihalache, O.; Sun, N.; Nagy, I.; Sali, A.; Plitzko, J.M.; Carazo, J.M.; Mann, M. e Baumeister, W. (2009) "Insights into the molecular architecture of the 26S proteasome." *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **106**: 11943-7.
- Niedermann, G.; Grimm, R.; Geier, E.; Maurer, M.; Realini, C.; Gartmann, C.; Soll, J.; Omura, S.; Rechsteiner, M.C.; Baumeister, W. e Eichmann, K. (1997) "Potential immunocompetence of proteolytic fragments produced by proteasomes before evolution of the vertebrate immune system." *J Exp Med.*, **186**: 209-20.
- Niture, S.K.; Velu, C.S.; Bailey, N.I. e Srivenugopal, K.S. (2005) "S-thiolation mimicry: quantitative and kinetic analysis of redox status of protein cysteines by glutathione-affinity chromatography." *Arch Biochem Biophys.*, **444**: 174-84.
- Nussbaum, A.K.; Dick, T.P.; Keilholz, W.; Schirle, M.; Stevanović, S.; Dietz, K.; Heinemeyer, W.; Groll, M.; Wolf, D.H.; Huber, R.; Rammensee, H.G. e Schild, H. (1998) "Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 12504-9.

- Oliveira, M.A.; Guimarães, B.G.; Cussiol, J.R.; Medrano, F.J.; Gozzo, F.C. e Netto, L.E. (2006) "Structural insights into enzyme-substrate interaction and characterization of enzymatic intermediates of organic hydroperoxide resistance protein from *Xylella fastidiosa*." *J Mol Biol.*, **359**: 433-45.
- Osmulski, P.A. e Gaczynska, M. (2000) "Atomic force microscopy reveals two conformations of the 20 S proteasome from fission yeast." *J Biol Chem.*, **275**: 13171-4.
- Osmulski, P.A. e Gaczynska, M. (2002) "Nanoenzymology of the 20S proteasome: proteasomal actions are controlled by the allosteric transition." *Biochemistry.*, **41**: 7047-53.
- Pacifici, R.E. e Davies, K.J. (1990) "Protein degradation as an index of oxidative stress." *Methods Enzymol.*, **186**: 485-502.
- Palmer, A.; Rivett, A.J.; Thomson, S.; Hendil, K.B.; Butcher, G.W.; Fuertes, G. e Knecht, E. (1996) "Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol." *Biochem J.*, **316**: 401-7.
- Palmieri, M.C.; Lindermayr, C.; Bauwe, H.; Steinhauser, C. e Durner, J. (2010) "Regulation of plant glycine decarboxylase by s-nitrosylation and glutathionylation." *Plant Physiol.*, **152**: 1514-28.
- Pan, J.L. e Bardwell, J.C. (2006) "The origami of thioredoxin-like folds." *Protein Sci.*, **15**: 2217-27.
- Patterson-Ward, J.; Tedesco, J.; Hudak, J.; Fishovitz, J.; Becker, J.; Frase, H.; McNamara, K. e Lee, I. (2009) "Utilization of synthetic peptides to evaluate the importance of substrate interaction at the proteolytic site of *Escherichia coli* Lon protease." *Biochim Biophys Acta*, **1794**: 1355-63.
- Pedrajas, J.R.; Porras, P.; Martinez-Galisteo, E.; Padilla, C.A.; Miranda-Vizuete, A. e Barcena, J.A. (2002) "Two isoforms of *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 2 are expressed in vivo and localize to different subcellular compartments." *Biochem. J.*, **364**: 617-23.
- Petrucci, L. e Dawson, T.M. (2004) "Mechanism of neurodegenerative disease: role of the ubiquitin proteasome system." *Ann Med.*, **36**: 315-20.
- Pineda-Molina, E.; Klatt, P.; Vázquez, J.; Marina, A.; García de Lacoba, M.; Pérez-Sala, D. e Lamas, S. (2001) "Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappaB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding." *Biochemistry*, **40**: 14134-42.
- Pocsi, I.; Prade, R.A. e Penninckx, M.J. (2004) "Glutathione, altruistic metabolite in fungi." *Adv. Microb. Physiol.*, **49**: 1-76.
- Polevoda, B. e Sherman, F. (2000) "Nalpha -terminal acetylation of eukaryotic proteins." *J. Biol. Chem.*, **275**: 36479-82.
- Qing, G.; Qu, Z. e Xiao, G. (2007) "Endoproteolytic processing of C-terminally truncated NF-kappaB2 precursors at kappaB-containing promoters." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**: 5324-9.
- Regazzoni, L; Panusa, A.; Yeum, K.J.; Carini, M. e Aldini, G. (2009) "Hemoglobin glutathionylation can occur through cysteine sulfenic acid intermediate: electrospray ionization LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometry studies." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, **877**: 3456-61.
- Reinheckel, T.; Sitte, N.; Ullrich, O.; Kuckelkorn, U.; Davies, K.J. e Grune, T. (1998) "Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress." *Biochem J.*, **335**: 637-42.
- Reinheckel, T.; Ullrich, O.; Sitte, N. e Grune, T. (2000) "Differential impairment of 20S and 26S proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress." *Arch Biochem Biophys.*, **377**: 65-8.

- Rivett, A.J.; Palmer, A. e Knecht, E. (1992) "Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells." *J Histochem Cytochem.*, **40**: 1165-72.
- Rivett, A.J. e Hearn, A.R. (2004) "Proteasome function in antigen presentation: immunoproteasome complexes, Peptide production, and interactions with viral proteins." *Curr Protein Pept Sci.*, **5**: 153-61.
- Rodriguez-Manzanares, M.T.; Ros, J.; Cabisco, E.; Sorribas, A. e Herrero, E. (1999) "Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Cell. Biol.*, **19**: 8180-90.
- Ruiz de Mena, I.; Mahillo, E.; Arribas, J. e Castano, J.G. (1993) "Kinetic mechanism of activation by cardiolipin (diphosphatidylglycerol) of the rat liver multicatalytic proteinase." *Biochem J.*, **296**: 93-7.
- Sadre-Bazzaz, K.; Whitby, F.G.; Robinson, H.; Formosa, T. e Hill, C.P. (2010) "Structure of a Bln10 complex reveals common mechanisms for proteasome binding and gate opening." *Mol Cell*, **37**: 728-35.
- Sanz, P. (2003) "Snf1 protein kinase: a key player in the response to cellular stress in yeast." *Biochem Soc Trans.*, **31**: 178-81.
- Saric, T.; Graef, C.I. e Goldberg, A.L. (2004) "Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metalloproteinases." *J Biol Chem.*, **279**: 46723-32.
- Scanlon, T.C.; Gottlieb, B.; Durcan, T.M.; Fon, E.A.; Beitel, L.K. e Trifiro, M.A. (2009) "Isolation of human proteasomes and putative proteasome-interacting proteins using a novel affinity chromatography method." *Exp Cell Res.*, **315**: 176-189.
- Schlesinger, D.H.; Goldstein, G. e Niall, H.D. (1975) "The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells." *Biochemistry*, **14**: 2214-8.
- Shang, F. e Taylor, A. (1995) "Oxidative stress and recovery from oxidative stress are associated with altered ubiquitin conjugating and proteolytic activities in bovine lens epithelial cells." *Biochem. J.*, **307**: 297-303.
- Sharon, M.; Taverner, T.; Ambroggio, X.I.; Deshaies, R.J. e Robinson, C.V. (2006) "Structural organization of the 19S proteasome lid: insights from MS of intact complexes." *PLoS Biol.*, **4**: e287.
- Shibatani, T. e Ward, W.F. (1995) "Sodium dodecyl sulfate (SDS) activation of the 20S proteasome in rat liver." *Arch Biochem Biophys.*, **321**: 160-6.
- Shringarpure, R.; Grune, T.; Mehlhase, J. e Davies, K.J. (2003) "Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome." *J Biol Chem.*, **278**: 311-8.
- Sies, H., (1999). "Glutathione and its role in cellular functions." *Free Radic Biol Med.*, **27**: 916-921.
- Sigismund, S.; Polo, S. e Di Fiore, P.P. (2004) "Signaling through monoubiquitination." *Curr Top Microbiol Immunol.*, **286**: 149-85.
- Silva, G.M.; Netto, L.E.; Discola, K.F.; Piassa-Filho, G.M.; Pimenta, D.C.; Bárcena, J.A. e Demasi, M. (2008) "Role of glutaredoxin 2 and cytosolic thioredoxins in cysteinyl-based redox modification of the 20S proteasome." *FEBS J.*, **275**: 2942-55.
- Smith, D.M.; Benaroudj, N. e Goldberg, A. (2006) "Proteasomes and their associated ATPases: a destructive combination." *J Struct Biol.*, **156**: 72-83.
- Someya, Y. e Takeda, N. (2009) "Insights into the enzyme-substrate interaction in the norovirus 3C-like protease." *J Biochem.*, **146**: 509-21.

Soza, A.; Knuehl, C.; Groettrup, M.; Henklein, P.; Tanaka, K. e Kloetzel, P.M. (1997) "Expression and subcellular localization of mouse 20S proteasome activator complex PA28." *FEBS Lett.*, **413**: 27-34.

Stadtman, E.R. (2006) "Protein oxidation and aging." *Free Radic Res.*, **40**: 1250-8.

Strehl, B.; Seifert, U.; Krüger, E.; Heink, S.; Kuckelkorn, U. e Kloetzel, P.M. (2005) "Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing." *Immunol Rev.*, **207**: 19-30.

Takeuchi, J.; Chen, H.; Hoyt, M.A. e Coffino, P. (2008) "Structural elements of the ubiquitin-independent proteasome degron of ornithine decarboxylase." *Biochem J.*, **410**: 401-7.

Tanaka, K. (1994) "Role of proteasomes modified by interferon-gamma in antigen processing." *J Leukoc Biol.*, **56**: 571-5.

Tarcsa, E.; Szymanska, G.; Lecker, S.; O'Connor, C.M. e Goldberg, A.L. (2000) "Ca²⁺-free calmodulin and calmodulin damaged by in vitro aging are selectively degraded by 26 S proteasomes without ubiquitination." *J Biol Chem.*, **275**: 20295-301.

Tenno, T.; Fujiwara, K.; Tochio, H.; Iwai, K.; Morita, E.H.; Hayashi, H.; Murata, S.; Hiroaki, H.; Sato, M.; Tanaka, K. e Shirakawa, M. (2004) "Structural basis for distinct roles of Lys63- and Lys48-linked polyubiquitin chains." *Genes Cells*, **9**: 865-75.

Teoh, C.Y. e Davies, K.J. (2004) "Potential roles of protein oxidation and the immunoproteasome in MHC class I antigen presentation: the 'ProXl' hypothesis." *Arch Biochem Biophys.*, **423**: 88-96.

Tofaris, G.K.; Layfield, R. e Spillantini, M.G. (2001) "alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome." *FEBS Lett.*, **509**: 22-6.

Tomaru, U.; Ishizu, A.; Murata, S.; Miyatake, Y.; Suzuki, S.; Takahashi, S.; Kazamaki, T.; Ohara, J.; Baba, T.; Iwasaki, S.; Fugo, K.; Otsuka, N.; Tanaka, K. e Kasahara, M. (2009) "Exclusive expression of proteasome subunit {beta}5t in the human thymic cortex." *Blood*, **113**: 5186-91.

Ustrell, V.; Hoffman, L.; Pratt, G. e Rechsteiner, M. (2002) "PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair." *EMBO J.*, **21**: 3516-25.

Varshavsky, A. (2005) "Regulated protein degradation." *Trends Biochem. Sci.*, **30**: 283-6.

Verma, R.; Chen, S.; Feldman, R.; Schieltz, D.; Yates, J.; Dohmen, J. e Deshaies, R.J. (2000) "Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes." *Mol Biol Cell*, **11**: 3425-39.

Verma, R.; Aravind, L.; Oania, R.; McDonald, W.H.; Yates, J.R.3rd; Koonin, E.V. e Deshaies, R.J. (2002) "Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome." *Science*, **298**: 611-5.

Vigneron, N.; Stroobant, V.; Chapiro, J.; Ooms, A.; Degiovanni, G.; Morel, S.; van der Bruggen, P.; Boon, T. e Van den Eynde, B.J. (2004) "An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome." *Science*, **304**: 587-90.

Warren, E.H.; Vigneron, N.J.; Gavin, M.A.; Coulie, P.G.; Stroobant, V.; Dalet, A.; Tykodi, S.S.; Xuereb, S.M.; Mito, J.K.; Riddell, S.R. e Van den Eynde, B.J. (2006) "An antigen produced by splicing of noncontiguous peptides in the reverse order." *Science*, **313**: 1444-7.

Whitby, F.G.; Masters, E.I.; Kramer, L.; Knowlton, J. R.; Yao, Y.; Wang, C.C. e Hill, C.P. (2000) "Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators" *Nature*, **408**: 115-20.

Wigley, W.C.; Fabunmi, R.P.; Lee, M.G.; Marino, C.R.; Muallem, S.; DeMartino, G.N. e Thomas, P.J. (1999) "Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome." *J Cell Biol.*, **145**: 481–490.

Wilkinson, K.D.; Urban, M.K. e Haas, A.L. (1980) "Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes." *J Biol Chem.*, **255**: 7529-32.

Wilkinson, C.R.; Wallace, M.; Morphew, M.; Perry, P.; Allshire, R.; Javerzat, J.P.; McIntosh, J.R. e Gordon, C. (1998) "Localization of the 26S proteasome during mitosis and meiosis in fission yeast." *EMBO J.*, **17**: 6465-76.

Wilson, W.A.; Hawley, S.A. e Hardie, D.G. (1996) "Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio." *Curr Biol.*, **6**: 1426-34.

Yamada, S.; Sato, K.; Yamada, J.; Yasutomi, M.; Tokumoto, T. e Ishikawa, K. (1998) "Activation of the 20S Proteasome of *Xenopus* Oocytes by SDS: Evidence for the Substrate-Induced Conformational Change Characteristic of Trypsin-Like Peptidase." *Zoolog Sci.*, **15**: 353-7.

Zong, C.; Young, G.W.; Wang, Y.; Lu, H.; Deng, N.; Drews, O. e Ping, P. (2008) "Two-dimensional electrophoresis-based characterization of post-translational modifications of mammalian 20S proteasome complexes." *Proteomics*, **8**: 5025-37.

Anexo I.

Identificação das subunidades do proteassomo 20S por MALDI-TOF.

Subunidade $\alpha 1$ Score 68 Cobertura 42 %						
Posição	<i>m/z</i>	M. Teórica	M. Calculada	Delta	Miss	Seqüência
15-24	1156,61	1155,61	1155,60	0,00	0	R.HITIFSPEGR.L
34-46	1401,63	1400,62	1400,74	-0,11	0	K.ATNQTNINSLAVR.G
49-57	992,36	991,35	991,50	-0,15	0	K.DCTVVVISQK.K
63-77	1727,95	1726,94	1726,90	0,05	0	K.LLDPTTVSYIFCISR.T
78-91	1439,80	1438,79	1438,76	0,03	0	R.TIGMVVNGPIPDAR.N
99-105	793,26	792,25	792,38	-0,12	0	K.AEAAEFR.Y
121-131	1324,75	1323,74	1323,66	0,08	0	R.MANLSQIYTQR.A
175-187	1601,78	1600,78	1600,78	-0,01	0	K.QQEITTNLENHFK.K
231-244	1698,90	1697,89	1697,83	0,06	1	K.DKFFTLAENIEER.L
233-244	1455,63	1454,62	1454,70	-0,08	0	K.FFTLSAENIEER.L

Subunidade $\alpha 2$ Score 62 Cobertura 22 %						
Posição	<i>m/z</i>	M. Teórica	M. Calculada	Delta	Miss	Seqüência
5-17	1421,78	1420,77	1420,69	0,09	0	R.YSFLTTFSPSGK.L
18-29	1291,80	1290,79	1290,72	0,08	0	K.LGQIDYALTAVK.Q
64-83	2111,24	2110,23	2110,04	0,19	0	K.VSLLTPDIGAVYSGMGPDIR.V
99-108	1223,78	1222,77	1222,63	0,13	1	K.RIYGEYPPTK.L
100-108	1067,63	1066,63	1066,53	0,08	0	R.IYGEYPPTK.L

Subunidade $\alpha 3$ Score 106 Cobertura 69 %						
Posição	<i>m/z</i>	M. Teórica	M. Calculada	Delta	Miss	Seqüência
6-18	1528,76	1527,75	1527,73	0,02	1	R.YDSRTTIFSPEGR.L
10-18	1007,54	1006,53	1006,51	0,02	0	R.TTIFSPEGR.L
51-65	1679,81	1678,81	1678,86	-0,06	1	R.KVTSTLLEQDTSTEK.L
73-92	1982,16	1981,15	1981,12	0,03	0	K.IAVAVAGLTADAEILINTAR.I
93-100	986,51	985,50	985,53	-0,03	0	R.IHAQNYLK.T
101-113	1560,87	1559,87	1559,82	0,05	0	K.TYNEDIPVEILVR.R
114-119	731,46	730,46	730,43	0,02	1	R.RLSDIK.Q
144-161	2099,01	2098,00	2097,94	0,06	0	R.YGYQLYTSNPSGNYTGWK.A
162-181	2082,01	2081,01	2081,05	-0,04	0	K.AISVGANTSAAQTLQMDYK.D
182-195	1575,77	1574,76	1574,79	-0,02	1	K.DDMKVDDAIELALK.T
200-210	1229,63	1228,62	1228,56	0,06	0	K.TDSSALTYDR.L
200-217	2060,12	2059,12	2059,02	0,09	1	K.TDSSALTYDRLEFATIR.K
211-217	849,50	848,49	848,48	0,02	0	R.LEFATIR.K
218-228	1208,65	1207,64	1207,58	0,06	1	R.KGANDGEVYQK.I
229-241	1570,98	1569,97	1569,95	0,02	1	K.IFKPQEKDILVK.T
248-258	1341,68	1340,67	1340,46	0,22	0	K.DEDEEADEDMK*

Subunidade $\alpha 4$ Score 74 Cobertura 46 %						
Posição	<i>m/z</i>	M. Teórica	M. Calculada	Delta	Miss	Seqüência
5-27	2590,48	2589,47	2589,36	0,11	1	R.ALSIFSPDGHIFQVEYALEAVKR.G
65-81	1816,93	1815,92	1815,91	0,01	0	K.IDSHVVLSFSGLNADSR.I
87-95	1053,59	1052,58	1052,55	0,04	1	K.ARVEAQSHR.L
96-109	1648,88	1647,87	1647,87	0,00	0	R.LTLEDPVTVYELTR.Y
110-117	920,50	919,49	919,49	0,01	0	R.YVAGVQQR.Y
118-139	2325,30	2324,29	2324,19	0,10	0	R.YTQSGGVRPFGVSTLIAGFDPD.R

145-164 2244,16 2243,16 2243,09 0,07 0 K.LYQTEPSGIYSSWSAQITGR.N

Subunidade $\alpha 5$ Score 91 Cobertura 52 %

Posição	m/z	M. Teórica	M. Calculada	Delta	Miss	Seqüencia
1-12	1461,73	1460,72	1460,67	0,05	1	-.GSMFLTRSEYDR.G
13-22	1036,52	1035,51	1035,50	0,01	0	R.GVSTFSPEGR.L
23-34	1439,75	1438,74	1438,77	-0,03	0	R.LFQVEYSLEAIK.L
46-55	1085,58	1084,57	1084,62	-0,05	1	K.EGVVLGVEKR.A
55-68	1545,77	1544,76	1544,80	-0,05	1	K.RATSPLLESDSIEK.I
69-74	744,34	743,33	743,42	-0,08	0	K.IVEIDR.H
75-88	1402,63	1401,62	1401,65	-0,03	0	R.HIGCAMSGLTADAR.S
89-95	859,28	858,28	858,40	-0,12	0	R.SMIEHAR.T *
125-134	1038,48	1037,48	1037,44	0,04	0	R.FGEGASGEER.L
173-196	2498,40	2497,39	2497,24	0,14	0	K.AIGSGSEGAQAELLNEWHSSLTK.E
232-237	781,20	780,19	780,37	-0,18	0	K.IYDNEK.T
249-262	1493,54	1492,53	1492,59	-0,06	0	K.EAAESPEEADVEMS.-

Subunidade $\alpha 6$ Score 114 Cobertura 73 %

Posição	m/z	M. Teórica	M. Calculada	Delta	Miss	Seqüencia
3-17	1643,71	1642,70	1642,72	-0,02	0	R.NNYDGDVTTFSPTR.L
18-29	1423,71	1422,70	1422,78	-0,07	0	R.LFQVEYALEAIK.Q
30-38	916,43	915,43	915,51	-0,09	0	K.QGSVTVGLR.S
39-50	1308,72	1307,71	1307,77	-0,05	1	R.SNTHAVLVALKR.N
65-81	1755,82	1754,82	1754,81	0,01	0	K.CDEHMGLSLAGLAPDAR.V
82-88	864,43	863,43	863,49	-0,06	0	R.VLSNYLR.Q
89-100	1458,64	1457,63	1457,67	-0,04	0	R.QQCNYSSLVFNR.K
118-138	2271,16	2270,15	2270,17	-0,01	0	K.NTQSYGGRPYGVGLLIIGYDK.S
139-163	2588,33	2587,32	2587,30	0,02	0	K.SGAHLLFQPSGNVTELYGTAIGAR.S
191-201	1130,73	1129,72	1129,61	0,11	0	K.AGVEAISQSLR.D
191-207	2785,62	2784,62	2784,49	0,13	1	K.AGVEAISQSLRDESILTVDNLSIAIVGK.
218-231	1526,68	1525,67	1525,67	-0,06	0	K.DTPFTIYDGEAVAK.Y

Subunidade $\alpha 7$ Score 60 Cobertura 22 %

Posição	m/z	M. Teórica	M. Calculada	Delta	Miss	Seqüencia
63-68	729,40	728,40	728,42	-0,02	0	K.IQVVDR.H
69-82	1486,79	1485,78	1485,74	0,04	0	R.HIGCVYSLIPDGR.H
101-111	1197,68	1189,67	1196,66	0,01	0	K.TPIPIAFADR.L
175-186	1330,71	1329,71	1329,68	0,03	0	K.LVDHHPEGLSAR.E
229-241	1447,77	1446,76	1446,74	0,03	0	K.GDLLQEAIIDFAQK.E

Subunidade $\beta 1$ Score 66 Cobertura 44 %

Posição	m/z	M. Teórica	M. Calculada	Delta	Miss	Seqüencia
7-16	1002,45	1001,44	1001,51	-0,07	0	K.DGVILGADSR.T
17-26	1067,51	1066,50	1066,54	-0,04	0	R.TTTGAYIANR.V
27-33	832,33	831,32	831,48	-0,16	1	R.VTDKLR.V
81-102	244,19	2443,18	2443,16	0,03	1	K.ELCYENKDNLTAGIIVAGYDDK.N
103-118	1698,82	1697,81	1697,91	-0,10	1	K.NKGEVYTIPLGGSVHK.L
105-118	1456,69	1455,68	1455,77	-0,00	0	K.GEVYTIPLGGSVHK.L
162-171	1033,48	1032,48	1032,50	-0,02	0	K.WDGSSGGVIR.M
172-182	1161,55	1160,54	1160,62	-0,08	0	R.MVVTLTAAGVER.L *

Subunidade β2 Score 74 Cobertura 14 %						
Posição	m/z	M. Teórica	M. Calculada	Delta	Miss	Seqüencia
8-19	1276,73	1275,72	1275,66	0,06	0	K.FNNGVVIAADTR.S
183-188	766,36	765,36	765,37	-0,01	0	K.DAEYLR.N
189-196	976,56	975,55	975,51	0,04	0	R.NYLTPNVR.E
202-207	797,42	796,41	796,42	-0,01	1	K.SYKFPR.G

Subunidade β3 Score 59 Cobertura 24 %						
Posição	m/z	M. Teórica	M. Calculada	Delta	Miss	Seqüencia
28-41	1493,83	1492,82	1492,79	0,04	1	R.LGSQSLGVSNKFEK.I
80-97	2070,17	2069,16	2069,03	0,13	0	R.AIEPETFTQLVSSSLYER.R
98-114	1808,08	1807,07	1806,98	0,09	1	R.RFGPYFVGPVAVAGINSK.S
99-114	1651,91	1650,91	1650,88	0,03	0	R.FGPYFVGPVAVAGINSK.S

Subunidade β4 Score 87 Cobertura 29 %						
Posição	m/z	M. Teórica	M. Calculada	Delta	Miss	Seqüencia
71-85	1726,61	1725,60	1725,82	-0,22	0	R.EDYELSPQAVSSFVR.Q
96-109	1621,63	1620,63	1620,86	-0,24	0	R.RPYQVNVLIGGYDK.K
96-110	1749,74	1748,73	1748,96	-0,23	1	R.RPYQVNVLIGGYDKK.K
112-125	1681,64	1680,63	1680,87	-0,24	0	K.NKPELYQIDYLGTK.V
171-177	924,33	923,33	923,44	-0,11	1	K.RMPMDFK.G
183-190	915,42	914,42	914,52	-0,10	1	K.IVDKDGIR.Q

Subunidade β5 Score 89 Cobertura 32 %						
Posição	m/z	M. Teórica	M. Calculada	Delta	Miss	Seqüencia
1-7	809,43	808,42	808,44	-0,02	0	-.TTTLAFR.F
8-19	1261,70	1260,69	1260,68	0,01	0	R.FQGGIIVAVDSR.A
82-91	1240,68	1239,68	1239,69	-0,02	0	K.ILSNLVYQYK.G
92-106	1517,68	1516,67	1516,68	-0,01	0	K.GAGLSMGTMICGYTR.K
107-121	1700,87	1699,87	1699,81	0,06	1	R.KEGPTIYYVDSGTR.L
108-121	1572,78	1571,77	1571,71	0,06	0	K.EGPTIYYVDSGTR.L
159-167	994,63	993,62	993,58	0,03	1	K.RSILAAHR.D
160-167	838,47	837,46	837,48	-0,02	0	R.SILAAHR.D

Subunidade β6 Score 63 Cobertura 50 %						
Posição	m/z	M. Teórica	M. Calculada	Delta	Miss	Seqüencia
29-38	1182,66	1181,65	1181,57	0,09	0	R.NITDYSINSR.Y
39-66	2962,13	2961,12	2961,35	-0,23	1	R.YEPKVFDCGNIVMSANGFAADGDALVK.R
74-83	1389,47	1388,47	1388,63	-0,16	1	K.WYHFDHNDKK.L
84-91	831,48	830,47	830,46	0,01	0	K.LSINSAAR.N
92-100	1085,66	1084,65	1084,60	0,05	0	R.NIQHLLYGK.R
101-119	2241,34	2240,34	2240,13	0,21	1	K.RFFPYVHTIAGLDEDEGK.G
102-119	2084,87	2083,86	2084,03	-0,17	0	R.FFPYVHTIAGLDEDEGK.G
120-133	1546,84	1545,83	1545,71	0,12	0	K.GAVYSFDPVGSYER.E
138-157	2063,89	2062,88	2063,05	-0,17	0	R.AGGAAASLIMPFLDNQVNFK.N
186-194	1013,54	1012,53	1012,45	0,09	0	R.DSFTSATER.H
195-209	1634,80	1633,79	1633,94	-0,15	0	R.HIQVGDGLELIVTK.D

Subunidade $\beta 7$ Score 86 Cobertura 47 %						
Posição	m/z	M. Teórica	M. Calculada	Delta	Miss	Seqüência
1-15	1589,68	1588,67	1588,85	-0,18	0	-.TQQPIVTGTSVISMK.Y
16-35	2110,92	2109,91	2110,07	-0,16	0	K.YDNGVIIAADNLGSYGSLLR.F
42-65	2581,13	2580,12	2580,29	-0,16	0	R.LIPVGDNTVVGISGDISDMQHIER.L *
107-128	2443,02	2442,01	2442,25	-0,24	0	K.MNPLWNAIIVAGVQSNQDQFLR.Y
168-182	1631,73	1630,72	1630,83	-0,12	0	K.TTVQVAEEAIVNAMR.V
168-182	1647,71	1646,71	1646,83	-0,12	0	K.TTVQVAEEAIVNAMR.V *
183-187	713,36	712,35	712,39	-0,04	0	R.VLYYR.D
194-202	1020,47	1019,46	1019,57	-0,10	0	R.NFSLAIIDK.N

Score de proteína maior que 56 foi significativa ($p < 0,05$) para o algoritmo MOWSE Score do software Mascot (Matrix Science), (*) representa o resíduo de metionina oxidado a forma de metionina sulfóxido, m/z é a relação massa/carga obtida, Miss significa a quantidade sítios de digestão ignorados pela tripsina, M. Teórico é a massa teórica esperada e M. Calculada corresponde a massa calculada a partir de nossas análises.

Anexo II.

Proteínas identificadas por espectrometria de massas ESI-Q-ToF que interagem com o proteassomo (PiPs).

O proteassomo 20S íntegro foi digerido em solução e aplicado diretamente no espectrômetro. Destacadas estão todas as subunidades do proteassomo 20S de levedura.

	Gene	Score	Massa	Matches	Seq.	emPAI	Descrição
1	<i>YGL037C</i>	2937	24978	107 (80)	10 (9)	4.12	PNC1 SGDID:S000003005, Chr VII from 427953-427303, reverse complement, Verified ORF, "Nicotinamidase that converts nicotinamide to nicotinic acid as part of the NAD(+) salvage pathway, required for life span extension by calorie restriction".
2	<i>YDL223C</i>	1227	113548	46 (32)	22 (14)	0.49	BT1 SGDID:S000002382, Chr IV from 60406-57266, reverse complement, Verified ORF, "Substrate of the Hub1p ubiquitin-like protein that localizes to the shmoo tip (mating projection)".
3	<i>YMR314W</i>	874	25588	39 (31)	10 (10)	2.40	PRE5 SGDID:S000004931, Chr XIII from 901708-902412, Verified ORF, "Alpha 6 subunit of the 20S proteasome".
4	<i>YGL011C</i>	786	27983	55 (34)	15 (11)	3.83	SCL1 SGDID:S000002979, Chr VII from 475252-474494, reverse complement, Verified ORF, "Alpha 1 subunit of the 20S proteasome involved in the degradation of ubiquitinated substrates".
5	<i>YOR362C</i>	643	31517	23 (17)	3 (3)	0.35	PRE10 SGDID:S000005889, Chr XV from 1018744-1017878, reverse complement, Verified ORF, "Alpha 7 subunit of the 20S proteasome".
6	<i>YGR135W</i>	469	28697	30 (20)	7 (6)	0.93	PRE9 SGDID:S000003367, Chr VII from 761397-762173, Verified ORF, "Alpha 3 subunit of the 20S proteasome, the only nonessential 20S subunit; may be replaced by the alpha 4 subunit (Pre6p) under stress conditions to create a more active proteasomal".
7	<i>YOL038W</i>	454	28422	17 (11)	7 (4)	0.56	PRE6 SGDID:S000005398, Chr XV from 255336-256100, Verified ORF, "Alpha 4 subunit of the 20S proteasome; may replace alpha 3 subunit (Pre9p) under stress conditions to create a more active proteasomal isoform".
8	<i>YPR103W</i>	446	31617	47 (27)	5 (5)	0.65	PRE2 SGDID:S000006307, Chr XVI from 732347-733210, Verified ORF, "Beta 5 subunit of the 20S proteasome, responsible for the chymotryptic activity of the proteasome".
9	<i>YFR050C</i>	333	29425	14 (12)	5 (5)	0.71	PRE4 SGDID:S000001946, Chr VI from 249853-249053, reverse complement, Verified ORF, "Beta 7 subunit of the 20S proteasome".
10	<i>YMR083W</i>	314	40344	33 (16)	8 (7)	0.88	ADH3 SGDID:S000004688, Chr XIII from 434787-435914, Verified ORF, "Mitochondrial alcohol dehydrogenase isozyme III; involved in the shuttling of mitochondrial NADH to the cytosol under anaerobic conditions and ethanol production".
11	<i>YOL139C</i>	310	24239	18 (14)	4 (4)	1.17	CDC33 SGDID:S000005499, Chr XV from 61024-60383, reverse complement, Verified ORF, "Cytoplasmic mRNA cap binding protein and translation initiation factor eIF4E".
12	<i>YJL001W</i>	236	23533	27 (14)	10 (8)	1.90	PRE3 SGDID:S000003538, Chr X from 435156-435220,435337-435919, Verified ORF, "Beta 1 subunit of the 20S proteasome, responsible for cleavage after acidic residues in peptides".
13	<i>YNL154C</i>	213	62041	10 (5)	5 (2)	0.11	YCK2 SGDID:S000005098, Chr XIV from 345278-343638, reverse complement, Verified ORF, "Palmitoylated plasma membrane-bound casein kinase I isoform".
14	<i>YER094C</i>	161	22590	14 (8)	7 (4)	0.74	PUP3 SGDID:S000000896, Chr V from 349342-348725, reverse complement, Verified ORF, "Beta 3 subunit of the 20S proteasome involved in ubiquitin-dependent catabolism; human homolog is subunit C10".

	Gene	Score	Massa	Matches	Seq.	emPAI	Descrição
15	<i>YGR253C</i>	129	28599	11 (7)	3 (3)	0.39	PUP2 SGDID:S000003485, Chr VII from 999145-998363, reverse complement, Verified ORF, "Alpha 5 subunit of the 20S proteasome involved in ubiquitin-dependent catabolism; human homolog is subunit zeta".
16	<i>YGR267C</i>	114	27751	9 (5)	4 (2)	0.25	FOL2 SGDID:S000003499, Chr VII from 1025741-1025010, reverse complement, Verified ORF, "GTP-cyclohydrolase I, catalyzes the first step in the folic acid biosynthetic pathway".
17	<i>YBL041W</i>	111	26854	12 (6)	5 (4)	0.60	PRE7 SGDID:S000000137, Chr II from 141250-141975, Verified ORF, "Beta 6 subunit of the 20S proteasome".
18	<i>YML050W</i>	109	35954	4 (4)	1 (1)	0.19	AIM32 SGDID:S000004514, Chr XIII from 173139-174074, Verified ORF, "Putative protein of unknown function; null mutant is viable and displays elevated frequency of mitochondrial genome loss".
19	<i>YER012W</i>	102	22503	13 (5)	5 (2)	0.32	PRE1 SGDID:S000000814, Chr V from 177834-178430, Verified ORF, "Beta 4 subunit of the 20S proteasome; localizes to the nucleus throughout the cell cycle".
20	<i>YJL052W</i>	98	35728	15 (5)	7 (3)	0.30	TDH1 SGDID:S000003588, Chr X from 338265-339263, Verified ORF, "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isozyme 1, involved in glycolysis and gluconeogenesis; tetramer that catalyzes the reaction of glyceraldehyde-3-phosphate to 1,3 bis-phosphoglycerate".
21	<i>YMR242C</i>	92	20424	11 (6)	5 (2)	0.36	RPL20A SGDID:S000004855, Chr XIII from 754219-754219,753741-753224, reverse complement, Verified ORF, "Protein component of the large (60S) ribosomal subunit, nearly identical to Rpl20Bp and has similarity to rat L18a ribosomal protein".
22	<i>YML092C</i>	89	27145	16 (7)	5 (2)	0.26	PRE8 SGDID:S000004557, Chr XIII from 86739-85987, reverse complement, Verified ORF, "Alpha 2 subunit of the 20S proteasome".
23	<i>YOL087C</i>	84	125304	11 (5)	10 (5)	0.14	YOL087C SGDID:S000005447, Chr XV from 158637-155287, reverse complement, Uncharacterized ORF, "Putative protein of unknown function".
24	<i>YGR010W</i>	66	44881	12 (3)	7 (2)	0.24	NMA2 SGDID:S000003242, Chr VII from 511549-512736, Verified ORF, "Nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase, involved in de novo and salvage synthesis of NAD(+)".
25	<i>YLR328W</i>	64	45830	12 (2)	6 (1)	0.15	NMA1 SGDID:S000004320, Chr XII from 784913-786118, Verified ORF, "Nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase, involved in pathways of NAD biosynthesis, including the de novo, NAD(+) salvage, and nicotinamide riboside salvage pathways".
26	<i>YOR276W</i>	55	18212	4 (1)	2 (1)	0.19	CAF20 SGDID:S000005802, Chr XV from 841332-841817, Verified ORF, ""Phosphoprotein of the mRNA cap-binding complex involved in translational control, repressor of cap-dependent translation initiation, competes with eIF4G for binding to eIF4E".
27	<i>YDL237W</i>	54	44355	9 (2)	4 (1)	0.07	AIM6 SGDID:S000002396, Chr IV from 30657-31829, Verified ORF, "Putative protein of unknown function, required for respiratory growth".
28	<i>YPL216W</i>	52	128052	5 (2)	3 (1)	0.03	YPL216W SGDID:S000006137, Chr XVI from 143820-147128, Uncharacterized ORF, "Putative protein of unknown function; YPL216W is not an essential gene".
29	<i>YDR481C</i>	52	62965	5 (2)	5 (2)	0.11	PHO8 SGDID:S000002889, Chr IV from 1420243-1418543, reverse complement, Verified ORF, "Repressible alkaline phosphatase, a glycoprotein localized to the vacuole regulated by levels of inorganic phosphate".
30	<i>YOR157C</i>	47	28250	6 (3)	2 (2)	0.25	PUP1 SGDID:S000005683, Chr XV from 631752-630967, reverse complement, Verified ORF, "Beta 2 subunit of the 20S proteasome; endopeptidase with trypsin-like activity that cleaves after basic residues".
31	<i>YMR275C</i>	45	109107	11 (1)	6 (1)	0.03	BUL1 SGDID:S000004888, Chr XIII from 818580-815650, reverse complement, Verified ORF, "Ubiquitin-binding component of the Rsp5p E3-ubiquitin ligase complex, functional homolog of Bul2p".

	Gene	Score	Massa	Matches	Seq.	emPAI	Descrição
32	<i>YJL020C</i>	38	128218	5 (1)	3 (1)	0.03	BBC1 SGDID:S000003557, Chr X from 402404-398931, reverse complement, Verified ORF, "Protein possibly involved in assembly of actin patches; interacts with an actin assembly factor Las17p and with the SH3 domains of Type I myosins Myo3p and Myo5p".
33	<i>YML035C</i>	36	93244	2 (1)	2 (1)	0.04	AMD1 SGDID:S000004498, Chr XIII from 208860-206428, reverse complement, Verified ORF, "AMP deaminase, tetrameric enzyme that catalyzes the deamination of AMP to form IMP and ammonia".
34	<i>YKL129C</i>	36	142419	7 (2)	5 (2)	0.05	MYO3 SGDID:S000001612, Chr XI from 200163-196348, reverse complement, Verified ORF, "One of two type I myosins; localizes to actin cortical patches".
35	<i>YHR097C</i>	31	40639	3 (1)	2 (1)	0.08	YHR097C SGDID:S000001139, Chr VIII from 298612-298488,298363-297388, reverse complement, Uncharacterized ORF, "Putative protein of unknown function".
36	<i>YDR213W</i>	31	100277	2 (1)	2 (1)	0.03	UPC2 SGDID:S000002621, Chr IV from 889749-892490, Verified ORF, ""Sterol regulatory element binding protein, induces transcription of sterol biosynthetic genes and of DAN/TIR gene products; Ecm22p homolog".
37	<i>YKL035W</i>	30	55953	2 (1)	2 (1)	0.06	UGP1 SGDID:S000001518, Chr XI from 369534-371033, Verified ORF, "UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase), catalyses the reversible formation of UDP-Glc from glucose 1-phosphate and UTP".
38	<i>YMR301C</i>	30	77473	4 (1)	2 (1)	0.04	ATM1 SGDID:S000004916, Chr XIII from 869626-867554, reverse complement, Verified ORF, "Mitochondrial inner membrane ATP-binding cassette (ABC) transporter, exports mitochondrially synthesized precursors of iron-sulfur (Fe/S) clusters to the cytosol".
39	<i>YLR371W</i>	29	152501	2 (1)	2 (1)	0.02	ROM2 SGDID:S000004363, Chr XII from 862713-866783, Verified ORF, "GDP/GTP exchange protein (GEP) for Rho1p and Rho2p".
40	<i>YDR430C</i>	28	112110	10 (1)	4 (1)	0.03	CYM1 SGDID:S000002838, Chr IV from 1328463-1325494, reverse complement, Verified ORF, "Lysine-specific metalloprotease of the mitochondrial intermembrane space, member of the pitriysin family".
41	<i>YEL036C</i>	26	58146	3 (1)	3 (1)	0.06	ANP1 SGDID:S000000762, Chr V from 84552-83050, reverse complement, Verified ORF, "Subunit of the alpha-1,6 mannosyltransferase complex; type II membrane protein; has a role in retention of glycosyltransferases in the Golgi".
42	<i>YOR233W</i>	26	90033	7 (1)	2 (1)	0.04	KIN4 SGDID:S000005759, Chr XV from 775847-778249, Verified ORF, "Serine/threonine protein kinase that inhibits the mitotic exit network (MEN) when the spindle position checkpoint is activated".
43	<i>YGR173W</i>	26	40980	28 (1)	2 (1)	0.08	RBG2 SGDID:S000003405, Chr VII from 843859-844965, Uncharacterized ORF, "Protein with similarity to mammalian developmentally regulated GTP-binding protein".
44	<i>YKL091C</i>	26	36050	1 (1)	1 (1)	0.09	YKL091C SGDID:S000001574, Chr XI from 270294-269362, reverse complement, Verified ORF, "Putative homolog of Sec14p, which is a phosphatidylinositol/ phosphatidylcholine transfer protein involved in lipid metabolism; localizes to the nucleus".
45	<i>YER151C</i>	25	101854	1 (1)	1 (1)	0.03	UBP3 SGDID:S000000953, Chr V from 472419-469681, reverse complement, Verified ORF, ""Ubiquitin-specific protease that interacts with Bre5p to co-regulate anterograde and retrograde transport between endoplasmic reticulum and Golgi compartments".
46	<i>YLR397C</i>	25	84695	1 (1)	1 (1)	0.04	AFG2 SGDID:S000004389, Chr XII from 914892-912550, reverse complement, Verified ORF, "ATPase of the CDC48/PAS1/SEC18 (AAA) family, forms a hexameric complex; may be involved in degradation of aberrant mRNAs".
47	<i>YMR306W</i>	21	207349	7 (1)	3 (1)	0.02	FKS3 SGDID:S000004923, Chr XIII from 881158-886515, Verified ORF, "Protein involved in spore wall assembly, has similarity to 1,3-beta-D-glucan synthase catalytic subunits Fks1p and Gsc2p".

	Gene	Score	Massa	Matches	Seq.	emPAI	Descrição
48	<i>YDL055C</i>	21	0	2 (1)	2 (1)	0.08	PSA1 SGDID:S000002213, Chr IV from 356759-355674, reverse complement, Verified ORF, "GDP-mannose pyrophosphorylase (mannose-1-phosphate guanyltransferase), synthesizes GDP-mannose from GTP and mannose-1-phosphate in cell wall biosynthesis".
49	<i>YLR442C</i>	20	0	7 (1)	5 (1)	0.03	SIR3 SGDID:S000004434, Chr XII from 1022248-1019312, reverse complement, Verified ORF, "Silencing protein that interacts with Sir2p and Sir4p, and histone H3 and H4 tails, to establish a transcriptionally silent chromatin state".
50	<i>YDR205W</i>	20	80526	1 (1)	1 (1)	0.04	MSC2 SGDID:S000002613, Chr IV from 859344-861518, Verified ORF, "Member of the cation diffusion facilitator family, localizes to the endoplasmic reticulum and nucleus".
51	<i>YML109W</i>	19	105432	27 (1)	3 (1)	0.03	ZDS2 SGDID:S000004577, Chr XIII from 51640-54468, Verified ORF, "Protein that interacts with silencing proteins at the telomere, involved in transcriptional silencing".
52	<i>YJR121W</i>	18	54760	4 (1)	2 (1)	0.06	ATP2 SGDID:S000003882, Chr X from 647597-649132, Verified ORF, "Beta subunit of the F1 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase, which is a large, evolutionarily conserved enzyme complex required for ATP synthesis".
53	<i>YNL101W</i>	18	0	3 (1)	1 (1)	0.04	AVT4 SGDID:S000005045, Chr XIV from 435001-437142, Verified ORF, "Vacuolar transporter, exports large neutral amino acids from the vacuole; member of a family of seven <i>S. cerevisiae</i> genes (AVT1-7) related to vesicular GABA-glycine transporters".
54	<i>YDL160C</i>	16	57508	3 (1)	3 (1)	0.06	DHH1 SGDID:S000002319, Chr IV from 171931-170411, reverse complement, Verified ORF, "Cytoplasmic DExD/H-box helicase, stimulates mRNA decapping, coordinates distinct steps in mRNA function and decay".

Anexo III.

Peptídeos de Grx2 gerados pelo 20SPT identificados por espectrometria de massas ESI-Q-ToF.

A Grx2 foi incubada com o proteassomo nativamente glutatiolado PT-YPD e com o proteassomo reduzido PT-SH por 16 h. A porcentagem relativa de cada peptídeo identificado está identificada na tabela. Destacado em azul estão os peptídeos gerados preferencialmente pelo PT-YPD e em laranja os peptídeos gerados majoritariamente pelo PT-SH. Em vermelho estão assinalados os peptídeos identificados somente em uma das condições.

Posição	Peptídeo	% íons	
		PT-YPD	PT-SH
36-45	VSQETVAHVK	0,16	0,24
37-45	SQETVAHVK	0,96	1,91
37-51	SQETVAHVKDLIGQK	0,16	0,48
37-56	SQETVAHVKDLIGQKEVFVA	0,16	0,24
37-57	SQETVAHVKDLIGQKEVFVAA	0,00	0,48
38-45	QETVAHVK	0,16	0,48
39-45	ETVAHVK	0,32	0,24
40-45	TVAHVK	0,48	0,48
40-56	TVAHVKDLIGQKEVFVA	0,16	0,00
42-54	AHVKDLIGQKEVF	0,00	0,24
42-55	AHVKDLIGQKEFV	0,00	0,24
42-56	AHVKDLIGQKEVFVA	0,32	0,48
43-51	HVKDLIGQK	0,00	0,24
43-54	HVKDLIGQKEVF	0,16	0,24
43-56	HVKDLIGQKEVFVA	0,48	0,24
44-55	VKDLIGQKEFV	0,00	0,24
44-56	VKDLIGQKEVFVA	0,16	0,24
44-57	VKDLIGQKEVFVAA	0,00	0,24
45-51	KDLIGQK	0,00	0,24
45-54	KDLIGQKEVF	0,16	0,24
45-55	KDLIGQKEFV	0,16	0,24
45-56	KDLIGQKEVFVA	0,32	0,48
45-57	KDLIGQKEVFVAA	0,16	0,24
46-54	DLIGQKEVF	0,00	0,48
46-55	DLIGQKEFV	0,16	0,48
46-56	DLIGQKEVFVA	9,49	3,58
46-57	DLIGQKEVFVAA	1,61	0,48
46-58	DLIGQKEVFVAAK	0,32	0,00
47-54	LIGQKEVF	0,16	0,24
47-55	LIGQKEFV	0,00	0,24
47-56	LIGQKEVFVA	0,16	0,48
48-56	IGQKEVFVA	0,16	0,00
48-58	IGQKEVFVAAK	0,16	0,00
49-58	GQKEVFVAAK	0,16	0,00

Posição	Peptídeo	PT-YPD	PT-SH
52-56	EVFVA	3,86	3,58
53-57	VFVAA	0,32	0,24
57-68	AKTYCPYCKATL	0,16	0,24
57-69	AKTYCPYCKATLS	0,16	0,00
58-68	KTYCPYCKATL	0,16	0,24
66-71	ATLSTL	0,16	0,00
66-75	ATLSTLFQEL	0,16	0,00
66-81	ATLSTLFQELNVPKSK	0,64	0,00
66-83	ATLSTLFQELNVPKSKAL	0,16	0,00
68-75	LSTLFQEL	0,80	0,24
69-75	STLFQEL	2,73	3,10
69-81	STLFQELNVPKSK	0,48	0,48
69-82	STLFQELNVPKSKA	0,00	0,48
69-83	STLFQELNVPKSKAL	0,00	0,24
69-85	STLFQELNVPKSKALVL	0,32	0,48
69-98	STLFQELNVPKSKALVLEDEMNSNGSEIQD	0,00	0,24
70-81	TLFQELNVPKSK	0,16	0,00
70-83	TLFQELNVPKSKAL	0,16	0,00
70-85	TLFQELNVPKSKALVL	0,16	0,00
72-81	FQELNVPKSK	0,64	0,24
72-82	FQELNVPKSKA	0,16	0,48
72-83	FQELNVPKSKAL	0,16	0,48
72-85	FQELNVPKSKALVL	0,16	0,00
72-88	FQELNVPKSKALVLELD	0,16	0,00
72-90	FQELNVPKSKALVLELDEM	0,16	0,24
72-98	FQELNVPKSKALVLEDEMNSNGSEIQD	0,16	0,24
73-85	QELNVPKSKALVL	0,32	0,48
73-90	QELNVPKSKALVLELDEM	0,16	0,00
76-81	NVPKSK	0,00	0,24
76-83	NVPKSKAL	0,00	0,24
76-90	NVPKSKALVLELDEM	0,16	0,24
76-98	NVPKSKALVLEDEMNSNGSEIQD	0,16	0,24
76-107	NVPKSKALVLEDEMNSNGSEIQDALEEISGQK	0,16	0,00
82-86	ALVLE	0,96	0,24
82-88	ALVLELD	0,32	0,24
82-89	ALVLELDE	0,00	0,24
82-98	ALVLELDEMNSNGSEIQD	8,84	4,77
82-107	ALVLELDEMNSNGSEIQDALEEISGQK	0,96	0,00
82-115	ALVLELDEMNSNGSEIQDALEEISGQKTPNVYIN	0,32	0,00
82-117	ALVLELDEMNSNGSEIQDALEEISGQKTPNVYINGK	0,16	0,00
83-88	LVLELD	0,16	0,00
84-88	VLELD	0,16	0,00
84-98	VLELDEMNSNGSEIQD	0,16	0,24
84-106	VLELDEMNSNGSEIQDALEEISGQ	0,32	0,00
84-107	VLELDEMNSNGSEIQDALEEISGQK	1,13	0,00
84-109	VLELDEMNSNGSEIQDALEEISGQKTV	0,32	0,00

Posição	Peptídeo	PT-YPD	PT-SH
84-115	VLELDMSGSEIQDALEEISGQKTPNVYIN	0,16	0,00
84-117	VLELDMSGSEIQDALEEISGQKTPNVYINGK	0,16	0,00
86-106	ELDEMSGSEIQDALEEISGQ	0,48	0,00
86-107	ELDEMSGSEIQDALEEISGQK	2,89	0,72
86-109	ELDEMSGSEIQDALEEISGQKTV	0,48	1,19
86-111	ELDEMSGSEIQDALEEISGQKTPN	0,16	0,00
86-115	ELDEMSGSEIQDALEEISGQKTPNVYIN	0,16	0,00
87-107	LDEMSGSEIQDALEEISGQK	0,16	0,24
87-109	DEMSGSEIQDALEEISGQK	0,16	0,24
87-115	LDEMSGSEIQDALEEISGQKTPNVYIN	0,16	0,00
88-107	DEMSGSEIQDALEEISGQKTV	0,00	0,24
89-107	EMSGSEIQDALEEISGQK	0,16	0,24
89-109	EMSGSEIQDALEEISGQKTV	0,16	0,24
90-107	MSGSEIQDALEEISGQK	0,16	0,24
90-109	MSGSEIQDALEEISGQKTV	0,16	0,24
91-106	SNGSEIQDALEEISGQ	0,16	0,00
91-107	SNGSEIQDALEEISGQK	4,66	2,39
91-109	SNGSEIQDALEEISGQKTV	2,41	2,63
91-111	SNGSEIQDALEEISGQKTPN	0,16	0,24
91-113	SNGSEIQDALEEISGQKTPNVY	0,16	0,24
91-114	SNGSEIQDALEEISGQKTPNVYI	0,16	0,00
91-115	SNGSEIQDALEEISGQKTPNVYIN	1,45	0,95
91-117	SNGSEIQDALEEISGQKTPNVYINGK	0,16	0,24
93-107	SEIQDALEEISGQK	0,16	0,24
93-109	GSEIQDALEEISGQKTV	0,00	0,24
94-107	SEIQDALEEISGQK	0,16	0,00
95-107	EIQDALEEISGQK	0,16	0,00
95-109	EIQDALEEISGQKTV	0,16	0,24
95-115	EIQDALEEISGQKTPNVYIN	0,16	0,00
97-109	QDALEEISGQKTV	0,00	0,24
98-109	DALEEISGQKTV	0,00	0,72
99-103	ALEEI	0,00	0,72
99-106	ALEEISGQ	0,00	0,24
99-109	ALEEISGQKTV	1,29	6,21
99-111	ALEEISGQKTPN	0,16	0,24
99-113	ALEEISGQKTPNVY	0,32	0,72
99-114	ALEEISGQKTPNVYI	0,16	0,24
99-115	ALEEISGQKTPNVYIN	5,47	3,58
99-117	ALEEISGQKTPNVYINGK	0,16	0,00
99-128	ALEEISGQKTPNVYINGKHIGNSDLETL	0,00	0,24
100-109	LEEISGQKTV	0,16	0,00
101-109	EEISGQKTV	0,16	0,24
101-115	EEISGQKTPNVYIN	0,16	0,24
102-109	EISGQKTV	0,00	0,24
102-115	EISGQKTPNVYIN	0,16	0,24

Posição	Peptídeo	PT-YPD	PT-SH
104-113	SGQKTVPNVY	0,00	0,24
104-115	SGQKTVPNVYIN	0,16	0,48
107-115	KTVPNVYIN	0,16	0,48
108-113	TVPNVY	0,00	0,24
108-115	TVPNVYIN	0,00	0,24
110-114	PNVYI	0,00	0,24
110-115	PNVYIN	0,32	0,24
110-117	PNVYINGK	0,16	0,00
110-124	PNVYINGKHIGGNSD	0,00	0,24
114-128	INGKHIGGNSDLETL	0,00	0,24
115-128	NGKHIGGNSDLETL	0,00	0,24
115-143	NGKHIGGNSDLETLKKNGLAEILKPVFQ	0,00	0,24
116-128	GKHIGGNSDLETL	1,45	3,82
116-131	GKHIGGNSDLETLKKN	0,00	0,24
116-137	GKHIGGNSDLETLKKNGLAEI	0,16	0,24
116-138	GKHIGGNSDLETLKKNGLAEIL	0,16	0,00
116-139	GKHIGGNSDLETLKKNGLAEILK	0,32	0,24
116-143	GKHIGGNSDLETLKKNGLAEILKPVFQ	8,68	1,67
117-128	KHIGGNSDLETL	0,16	0,48
118-128	HIGGNSDLETL	0,16	0,24
118-131	HIGGNSDLETLKKN	0,00	0,24
118-134	HIGGNSDLETLKKNGL	0,00	0,24
118-135	HIGGNSDLETLKKNGLA	0,00	0,24
118-136	HIGGNSDLETLKKNGLAE	0,16	0,24
118-139	HIGGNSDLETLKKNGLAEILK	0,16	0,00
118-143	HIGGNSDLETLKKNGLAEILKPVFQ	1,77	1,19
120-143	GGNSDLETLKKNGLAEILKPVFQ	0,16	0,24
121-143	GNSDLETLKKNGLAEILKPVFQ	0,16	0,00
125-137	LETLKKNGLAEI	0,32	0,24
125-143	LETLKKNGLAEILKPVFQ	0,32	0,48
126-143	ETLKKNGLAEILKPVFQ	0,32	0,72
129-137	KKNGLAEI	0,00	0,48
129-142	KKNGLAEILKPVF	0,16	0,00
129-143	KKNGLAEILKPVFQ	4,18	4,77
130-143	KKNGLAEILKPVFQ	0,00	0,48
131-143	KNGLAEILKPVFQ	0,48	1,43
132-139	GKLAEILK	0,16	0,00
132-143	GKLAEILKPVFQ	7,23	8,83
133-143	KLAEILKPVFQ	0,48	0,72
134-143	LAEILKPVFQ	3,54	5,25
135-143	AELKPVFQ	0,16	3,34
136-143	EILKPVFQ	0,16	0,95
137-143	ILKPVFQ	0,16	0,48
138-143	LKPVFQ	0,16	1,67
	Total	100 %	100 %

Anexo IV.

J Biol Chem. 2003 Jan 3;278(1):679-85. Epub 2002 Oct 29.

20 S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is S-glutathionylated.

Demasi M, Silva GM, Netto LE.

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, 277 São Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil. mari_mais@hotmail.com

Abstract

The 20 S proteasome core purified from *Saccharomyces cerevisiae* is inhibited by reduced glutathione (GSH), cysteine (Cys), or the GSH precursor gamma-glutamylcysteine. Chymotrypsin-like activity was more affected by GSH than trypsin-like activity, whereas the peptidylglutamyl-hydrolyzing activity (caspase-like) was not inhibited by GSH. Cys-sulfenic acid formation in the 20 S core was demonstrated by spectral characterization of the Cys-S(O)-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole adduct, indicating that 20 S proteasome Cys residues might react with reduced sulfhydryls (GSH, Cys, and gamma-glutamylcysteine) through the oxidized Cys-sulfenic acid form. S-Glutathionylation of the 20 S core was demonstrated in vitro by GSH-biotin incorporation and by decreased alkylation with monobromobimane. Compounds such as N-ethylmaleimide (-S-sulfhydryl H alkylating), dimedone (-SO sulfenic acid H reactant), or 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (either -SH or -SOH reactant) highly inhibited proteasomal chymotrypsin-like activity. In vivo experiments revealed that 20 S proteasome extracted from H₂O₂-treated cells showed decreased chymotrypsin-like activity accompanied by S-glutathionylation as demonstrated by GSH release from the 20 S core after reduction with NaBH₄. Moreover, cells pretreated with H₂O₂ showed decreased reductive capacity assessed by determination of the GSH/oxidized glutathione ratio and increased protein carbonyl levels. The present results indicate that at the physiological level the yeast 20 S proteasome is regulated by its sulfhydryl content, thereby coupling intracellular redox signaling to proteasome-mediated proteolysis.

PMID: 12409293 [PubMed - indexed for MEDLINE]Free Article

20 S Proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* Is Responsive to Redox Modifications and Is S-Glutathionylated*

Received for publication, September 10, 2002, and in revised form, October 24, 2002
Published, JBC Papers in Press, October 29, 2002, DOI 10.1074/jbc.M209282200

Marilene Demasi‡, Gustavo Monteiro Silva, and Luis Eduardo Soares Netto

From the Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, 277 São Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil

The 20 S proteasome core purified from *Saccharomyces cerevisiae* is inhibited by reduced glutathione (GSH), cysteine (Cys), or the GSH precursor γ -glutamylcysteine. Chymotrypsin-like activity was more affected by GSH than trypsin-like activity, whereas the peptidylglutamyl-hydrolyzing activity (caspase-like) was not inhibited by GSH. Cys-sulfenic acid formation in the 20 S core was demonstrated by spectral characterization of the Cys-S(O)-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole adduct, indicating that 20 S proteasome Cys residues might react with reduced sulfhydryls (GSH, Cys, and γ -glutamylcysteine) through the oxidized Cys-sulfenic acid form. S-Glutathionylation of the 20 S core was demonstrated *in vitro* by GSH-biotin incorporation and by decreased alkylation with monobromobimane. Compounds such as N-ethylmaleimide (-S-sulfhydryl H alkylating), dimedone (-SO sulfenic acid H reactant), or 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (either -SH or -SOH reactant) highly inhibited proteasomal chymotrypsin-like activity. *In vivo* experiments revealed that 20 S proteasome extracted from H₂O₂-treated cells showed decreased chymotrypsin-like activity accompanied by S-glutathionylation as demonstrated by GSH release from the 20 S core after reduction with NaBH₄. Moreover, cells pretreated with H₂O₂ showed decreased reductive capacity assessed by determination of the GSH/oxidized glutathione ratio and increased protein carbonyl levels. The present results indicate that at the physiological level the yeast 20 S proteasome is regulated by its sulfhydryl content, thereby coupling intracellular redox signaling to proteasome-mediated proteolysis.

The proteasome is an essential proteolytic complex in eukaryotic cells where it is responsible for the degradation of many cellular proteins. It plays an important role in cell-cycle regulation, cell signaling, including apoptosis, and elimination of abnormal proteins generated by mutation (1, 2) and oxidative damage (3–5).

In recent years, many publications have reported the reversible S-glutathionylation of a discrete number of proteins (6). Protein S-glutathionylation seems to play an essential role in redox regulation. This form of regulation has direct effects on both enzyme activity and the ability of transcription and replication factors to bind DNA targets. The mechanism of protein glutathionylation has evolved in recent years from the strict

belief that this event would take place solely when intracellular GSSG¹ levels increased upon oxidative stress, with the formation of mixed disulfides between protein Cys-SH residues and GSSG (7, 8), to the present and more complete understanding of protein sulfhydryl chemistry and evidence showing formation of protein-Cys-SOH derivatives (9) that are prone to S-glutathionylation by reduced GSH (10).

Either individual enzyme activity or global cellular responses can be rapidly controlled by the oxidation of protein-Cys-SH residues (reviewed in Ref. 6) generating Cys-SOH, Cys-SO₂H, and Cys-SO₃H acid forms (11), where Cys-SOH is susceptible to S-thionylation and reversibly reduced to Cys-SH (11–14). Cys-SOH formation and S-glutathionylation during enzyme catalysis and redox signaling are novel cofactors in the context of redox regulation (14).

In a recent publication (15) it was demonstrated that the reduced and oxidized forms of GSH modulate the chymotrypsin-like activity of purified 20 S proteasome extracted from mammalian cells. In the present report we show that the activity of the 20 S proteasome purified from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is also sensitive to GSH, though in a different way from that observed in the mammalian proteasome. The 20 S proteasome extracted from yeast is inhibited by reduced GSH and S-glutathionylated *in vitro*, as well as *in vivo*, when cells are submitted to oxidative challenge. Considering that the proteasome plays important role in cell signaling regulation by hydrolysis of many proteins involved in cascade events of the cellular regulatory pathways, it is not surprising that its activity may be regulated by its Cys-SH residues redox status.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Reagents—Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), dimedone (5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione), dinitrophenylhydrazine, dithionitrobenzoic acid (DTNB), N-ethylmaleimide (NEM), fluorogenic substrates succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (s-LLVY-MCA) and *t*-butoxycarbonyl-Gly-Lys-Arg-MCA, γ -glutamylcysteine (GC), and streptavidin immobilized on 4% beaded agarose were purchased from Sigma. The fluorogenic substrate carbobenzoxy-Leu-Leu-Glu-MCA, the proteasome inhibitors lactacystin and tri-leucine vinyl sulfone, and monobromobimane (mBrB) were purchased from Calbiochem. 7-Chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD) was purchased from Aldrich. All other reagents used were of analytical grade, and the water was purified with the Milli-Q system.

Yeast Strains and Growth—*S. cerevisiae* BY4741 strain (MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0) was obtained from Euroscarf, Frankfurt,

* This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 55-11-3091-7589; Fax: 55-11-3091-7553; E-mail: mari_mais@hotmail.com.

¹ The abbreviations used are: GSSG, oxidized glutathione; Cys-SH, reduced cysteine; Cys-SOH, Cys-sulfenic acid; Cys-SO₂H, Cys-sulfonic acid; Cys-SO₃H, Cys-sulfonic acid; DTNB, dithionitrobenzoic acid; DTPA, diethylenetriaminepentaacetic acid; DTT, dithiothreitol; GC, γ -glutamylcysteine; GSH, reduced glutathione; mBrB, monobromobimane; MCA, 4-methylcoumarin-7-amide; NBD, 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole; NEM, N-ethylmaleimide; s-LLVY-MCA, succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA; HPLC, high pressure liquid chromatography; ANOVA, analysis of variance.

Germany, and RJD1144 (MATA *his3Δ200 leu2-3,112, lys2-801 trp1Δ63 ura3-52 PRE1^{FH}::Ylplac211 URA3*) derived from strain JD47-13C was kindly donated by Dr. Raymond Deshaies, Division of Biology, Caltech, Pasadena, CA. This strain has the 20 S proteasome PRE1 subunit tagged with the FLAG peptide sequence and a polyhistidine tail (16). Cells were cultured in YPD medium (2% glucose, 2% peptone, and 1% yeast extract) or as otherwise specified at 30 °C with reciprocal shaking. Log phase cells were harvested at the optical density of the culture at 600 nm (A_{600}) of 0.6–0.8. Stationary phase cells were harvested at A_{600} higher than 1.5.

Extraction and Purification of the 20 S Proteasome—Yeast cells were disrupted according to the protocol described in Ref. 16. The 20 S proteasome from untagged strain was purified by sequential chromatographs on DEAE-Sepharose, Sephacryl™ S-400 column (Amersham Biosciences), and a monoQ column in an HPLC system. The purification was performed according to a method described previously (17), except that gel filtration was used instead of a sucrose gradient, and the monoQ column was used in the HPLC instead of the fast protein liquid chromatography system. The 20 S proteasome core from the RJD1144 strain with a FLAGHis₆-tagged PRE1 subunit was purified by affinity chromatography or, when specified, by immunoprecipitation. Affinity chromatography was performed using a HiTrap™ chelating HP column (Amersham Biosciences) attached to a P1 peristaltic pump (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's protocol. The proteasome was eluted from the column with 300 mM imidazole. Active fractions from all steps of all preparations were assayed by the degradation of the fluorogenic peptide s-LLVY-MCA and confirmed by inhibition with tri-leucine vinyl sulfone. Final enriched fractions were pooled, concentrated, and rediluted twice in a Centricon CM-30 apparatus (Amicon). Purification by immunoprecipitation was performed according to the protocol described in Ref. 16 with the anti-FLAG® M2 affinity gel freezer-safe antibody (Sigma) immobilized on agarose beads. The 20 S proteasome was eluted from the agarose beads, when specified, by incubation with the FLAG® peptide (Sigma) according to the manufacturer's protocol. The final preparations were analyzed by SDS-PAGE and by electrophoresis on a 5% non-denaturing polyacrylamide gel according to the protocol described in Ref. 17. The three different 20 S proteasome preparations described here were used for the assays. The results shown below (*in vivo* and *in vitro*) refer to the preparations obtained from strains containing FLAGHis₆-tagged PRE1; however, we did not observe any difference compared with preparations from strains containing untagged PRE1 (data not shown).

Hydrolysis Assay of Fluorogenic Peptides—20 S proteasome (0.5–3 μg) or cell extracts (400–500 μg protein/ml) were incubated at 37 °C in 10 mM Tris/HCl buffer, pH 7.8, containing 20 mM KCl and 5 mM MgCl₂, here referred to as standard buffer. Incubation was started by the addition of 25–50 μM of the peptides (other additions are specified in the legends to the figures). The reaction was stopped by adding 4 volumes of 0.1 M sodium borate, pH 9, containing 7.5% ethanol. Fluorescence emission was recorded at 430 nm (excitation at 365 nm). MCA liberated from the substrates was calculated from a standard curve of free MCA.

Oxidation of 20 S Proteasome with H₂O₂—When specified, purified 20 S proteasome preparations were treated with H₂O₂. Proteasome concentration in these experiments was typically 50 μg or as otherwise specified, and the preparation was incubated for 30 min at room temperature in the presence of 5 mM H₂O₂ with or without 100 μM DTPA in standard buffer. After incubation, excess H₂O₂ was removed by three cycles of centrifugation and redilution with standard buffer through Microcon CM-10 filters (Amicon). Aliquots of the 20 S proteasome were taken for further incubation or for hydrolysis assay after determination of protein concentration.

Reduction of 20 S Proteasome with NaBH₄—After isolation of the 20 S core with the anti-FLAG antibody, as described above, the agarose beads were washed three times according to the manufacturer's protocol. NaBH₄ reduction was performed with the 20 S proteasome bound to the anti-FLAG-agarose bead complex incubated in the presence of 20 mM NaBH₄ buffered in 50 mM Tris/HCl, pH 8.6, for 40 min at 37 °C. After incubation, the suspension was centrifuged, the supernatant was utilized for GSH determination (described below), and the beads were washed twice with standard buffer. The proteolysis assay, when specified, was performed with the 20 S proteasome still bound to the beads.

GSH Determination—Intracellular GSH was extracted by lysing the cell pellets in 1 volume of glass beads and 2 volumes of 3.5% sulfosalicylic acid. The suspension was vortexed for 20 min at 4 °C in a multi-fold vortex and centrifuged at maximum speed in a microcentrifuge. This procedure was repeated twice, and the supernatants were combined. Total GSH, as well as GSSG, was assayed according to a protocol described previously (15). The determination was performed by reaction

with DTNB in the presence of glutathione reductase and NADPH. Samples for GSSG measurement were incubated previously for 1 h with NEM after adjusting the pH to 7. GSH released from 20 S proteasome was detected as follows: 20 S proteasome isolated by immunoprecipitation was reacted with NaBH₄ as described above. The supernatant recovered was filtered through a Microcon CM-10 filter. The filtrate was acidified to remove remaining NaBH₄ (reaction with NaBH₄ was performed at pH 8.6), and the pH was adjusted to 7 prior to the addition of DTNB, glutathione reductase, and NADPH. GSH detection was increased in the presence of glutathione reductase and NADPH comparing to detection in the presence of DTNB only. GSH concentration was calculated from standard curves of GSSG. Intracellular reduced GSH was determined by the difference between total GSH and GSSG.

GSH-Biotin Preparation—GSH-biotin derivative was achieved as described in Ref. 18. GSH was reacted with sulfo-NHS-biotin (EZ-Link™ NHS-LC-Biotin; Pierce) at 1/1 molar ratio in 50 mM NaHCO₃, pH 8.5, for 1 h at room temperature. The reaction was stopped by the addition of 5× excess NH₄CO₃ compared with initial biotin concentration.

Proteasome S-Modification by the GSH-Biotin Derivative—H₂O₂-treated or untreated 20 S proteasome (450 μg) was incubated with 5 mM GSH-biotin for 20 min at room temperature. Excess GSH-biotin was removed by filtration through a Microcon CM-10 filter followed by redilution three times in standard buffer. After washing, protein was diluted in standard buffer, mixed with streptavidin-agarose beads (100 μl/mg protein), and incubated for 60 min at 4 °C. The beads were washed by four cycles of centrifugation/redilution in standard buffer containing 150 mM NaCl, and the remaining protein was eluted from the beads by incubation for 30 min in standard buffer containing 0.1% SDS and 10 mM DTT, followed by centrifugation at maximum speed for 15 min. The supernatants were submitted to 12.5% SDS-PAGE after determination of protein concentration.

Cell Viability—Aliquots of the cell suspension were diluted to an A_{600} of 0.2 immediately after the treatments, followed by a further 5,000× redilution. Aliquots of 100 μl of the final suspension were spread on YPD-agar plates (five per sample) and incubated at 30 °C for 48 h. After incubation, colonies were counted manually. Cell viability assays were repeated at least five times.

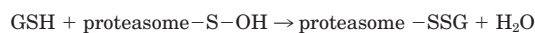
Assay for the Protein Carbonyl Group—Carbonyl group formation in the proteins was determined by derivatization with dinitrophenylhydrazine and quantified by spectrophotometry as described in Ref. 19.

Protein Determination—Protein concentration was determined with Bradford® reagent (Bio-Rad).

RESULTS

Yeast 20 S Proteasomal Activity Is Inhibited by Sulfhydryl Compounds—Purified 20 S proteasome core isolated from *S. cerevisiae* was assayed for hydrolysis with the s-LLVY-MCA substrate in the presence of GSH, GSSG, and Cys (Fig. 1). GSSG had a slight effect on 20 S proteasomal activity at any concentration tested. However, GSH or Cys strongly inhibited the proteasomal activity at 5 mM concentration. The GSH precursor GC also inhibited chymotrypsin-like activity in a pattern similar to that obtained by Cys treatment (results not shown). The trypsin-like activity determined by the hydrolysis of the fluorogenic substrate *t*-butoxycarbonyl-Leu-Lys-Arg-MCA was 50% decreased in the presence of 10 mM GSH (results not shown). The trypsin-like specific activity (μmol MCA/min/mg) represented less than 5% of the chymotrypsin-like activity measured under the experimental conditions described here (the same protocols were used for both determinations). The peptidylglutamyl-hydrolyzing activity assayed by the hydrolysis of the fluorogenic peptide carbobenzoxy-Leu-Leu-Glu-MCA was not affected by any of the sulfhydryl compounds tested (GSH, GC, or Cys) at any concentration or by GSSG (result not shown).

One question raised by these results was how the reduced form of GSH and other thiols tested (Cys and GC), but not GSSG, inhibited 20 S proteasomal activity. Our working hypothesis was that Cys-SH residues in the 20 S proteasome structure are probably oxidized to the Cys-SOH form, susceptible to S-glutathionylation by GSH, as described elsewhere (6, 20), but not by GSSG, according to the reaction,



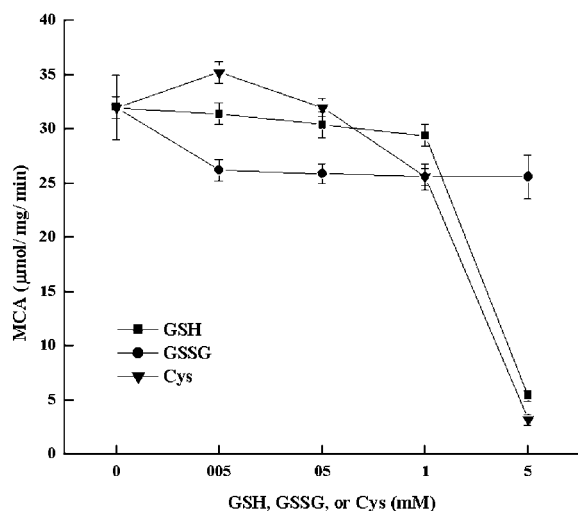


FIG. 1. Chymotrypsin-like activity of the 20 S proteasome extracted from yeast determined in the presence of GSH, GSSG, and Cys. The 20 S proteasome (1–3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) isolated from *S. cerevisiae*, as described under “Materials and Methods,” was preincubated in standard buffer for 10 min at room temperature in the presence of 0–5 mM Cys, GSH, or GSSG, followed by a further 1-h incubation at 37 °C with 10 μM s-LLVY-MCA. Results are expressed as means \pm S.D. of four independent experiments.

To test this hypothesis, purified 20 S proteasome preparations were incubated in the presence of 5 mM H_2O_2 and 100 μM DTPA. The iron chelator DTPA was used to prevent the Fenton reaction and consequently the generation of the very reactive hydroxyl radical, which may produce nonspecific protein oxidation, in addition to iron-catalyzed thiol oxidation and generation of several protein-sulfur derivatives (21). Thus, in the absence of iron or another transition metal, sulfhydryl oxidation to Cys-SOH may prevail, though further oxidation of Cys-SOH to Cys-SO₂H and Cys-SO₃H is expected (11). According to our results, 20 S proteasome treatment with H_2O_2 in the presence of DTPA decreased chymotrypsin-like activity to 80% of the original level (Fig. 2A), whereas when H_2O_2 treatment was performed in the absence of DTPA the activity was reduced to 60% (data not shown). When 20 S proteasome was pretreated with H_2O_2 plus DTPA the chymotrypsin-like activity was much more affected by GSH (Fig. 2A). In fact, after H_2O_2 /DTPA pretreatment, inhibition by GSH occurred at concentrations as low as 0.01 mM (35% inhibition), and GSH at 1 mM promoted stronger inhibition (60%; see Fig. 2A) than that verified without pretreatment (Fig. 1). In contrast, GSSG did not affect 20 S proteasome activity (Fig. 2A). These results are in agreement with our hypothesis in the reaction shown above.

In contrast to H_2O_2 , DTT treatment enhanced proteasomal activity by about 15–20% (Fig. 2B). Moreover, it sensitized the proteasome to GSH incorporation after H_2O_2 treatment. When 20 S proteasome samples were treated with 10 mM DTT, followed by incubation with H_2O_2 /DTPA, the chymotrypsin-like activity was even more sensitive to GSH when compared with samples not preincubated with DTT (Fig. 2A). In this condition, proteasomal activity was decreased to 50 and 5% in the presence of 0.5 or 1 mM GSH, respectively (Fig. 2B), whereas when the same GSH concentrations were employed without DTT pretreatment, chymotrypsin-like activity was decreased only to 60 and 40%, respectively (Fig. 2A). Cys-SOH already present in 20 S proteasome was probably reduced to Cys-SH by DTT, with the consequent prevention of hyperoxidation of Cys-SOH to Cys-SO₂H or Cys-SO₃H by H_2O_2 treatment.

As expected according to our hypothesis described in the reaction shown above, when the 20 S core was pretreated only

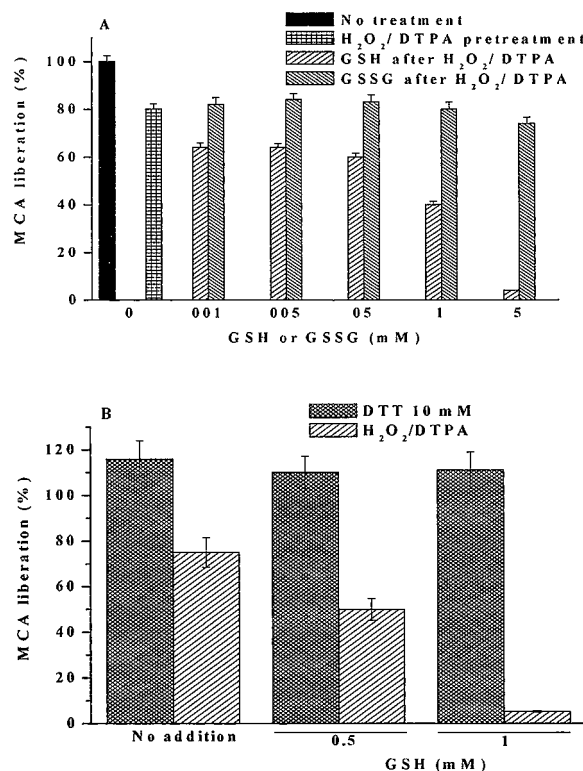


FIG. 2. A, H_2O_2 /DTPA pretreatment of 20 S proteasome sensitizes chymotrypsin-like activity to GSH inhibition. 20 S proteasome was pretreated with H_2O_2 in the presence of DTPA, as described under “Materials and Methods.” Aliquots of H_2O_2 -treated samples (1–3 μg) were taken and incubated with GSH or GSSG, as described in the legend for Fig. 1, followed by a hydrolysis assay with s-LLVY-MCA. B, DTT preincubation followed by oxidation with H_2O_2 /DTPA increases 20 S core sensitization to GSH inhibition. 20 S proteasome (100 μg) was preincubated for 30 min at room temperature in standard buffer in the presence of 10 mM DTT. After incubation, DTT was washed out by filtration through Microcon CM-10 filters. Protein recovered from the filter was treated with H_2O_2 /DTPA, as described under “Materials and Methods.” Aliquots of H_2O_2 -treated samples (1–3 μg) were taken and incubated with GSH or GSSG, as per the legend for Fig. 1, followed by a hydrolysis assay with s-LLVY-MCA. Results are represented as percentage of control samples (no treatment) set as 100 and are expressed as means \pm S.D. of four independent experiments.

with DTT, no alteration by GSH was observed in its activity (Fig. 2B). Also, proteasome reduced by DTT was not inhibited by GSSG (result not shown) as could be expected, because GSSG is able to react with sulfhydryl groups to form mixed disulfides (7, 8). Reduced Cys-20 S might be prevented from reacting with GSSG by structural constraints imposed by nearby groups.

Proteasomal Activity Is Inhibited by Cys-SH and Cys-SOH Reactants—To demonstrate that modification of Cys-20 S core residues is responsible for the inhibition of chymotrypsin-like activity, we next tested this activity in the presence of Cys-SH and Cys-SOH reactants, such as NBD, dimedone, and NEM (Table I). We observed that chymotrypsin-like activity was inhibited 40 and 30% by 50 μM NBD and 1 mM NEM, respectively. NEM alkylates Cys-SH whereas NBD is incorporated into both Cys-SH and Cys-SOH. This might be, at least in part, the reason why NBD is more potent than NEM in terms of chymotrypsin-like activity inhibition. After inhibition by NBD, 20 S proteasomal activity was recovered by incubation with 5 mM DTT (result not shown). Because DTT treatment leads to NBD release (9), this result indicates that inhibition was promoted by Cys conjugation.

The specific Cys-SOH reagent dimedone (9) produced low inhibition when compared with the former reagents. Dimedone

TABLE I
Effect of Cys-SH and Cys-SOH reactants on proteasomal activity

The 20 S proteasome (1–3 $\mu\text{g/ml}$) was preincubated, as per Fig. 1, for 30 min at room temperature in the presence of NBD, NEM, or dimedone, at the indicated concentrations, followed by a further 1-h incubation at 37 °C with 10 μM s-LLVY-MCA. H_2O_2 /DTPA-treated samples, prior to the hydrolysis assay or dimedone incubation, samples were treated with 5 mM H_2O_2 and 100 μM DTPA, as described under "Materials and Methods," followed by incubation with dimedone and the assay with the fluorogenic substrate. The s-LLVY-MCA hydrolysis assay is described under "Materials and Methods." Results are means \pm S.D. of three independent experiments.

Proteasome incubation		MCA release
		$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$
Control (no addition)		25.4 \pm 1.4
H_2O_2 /DTPA-treated samples		20.3 \pm 1.5 ^a
NBD	50 μM	15.7 \pm 0.8 ^a
Dimedone	1 mM	24.1 \pm 1.1
	5 mM	22.6 \pm 1.8
	10 mM	19.6 \pm 1.8 ^a
H_2O_2 /DTPA-treated samples plus 10 mM dimedone		11.6 \pm 1.0 ^a
NEM	1 mM	17.6 \pm 1.0 ^a
	5 mM	10.4 \pm 0.8 ^a
	10 mM	7.6 \pm 0.6 ^a

^a $p \leq 0.0001$ (ANOVA).

promoted 23% inhibition only at 10 mM concentration. On the other hand, when purified 20 S proteasome preparations were pretreated with H_2O_2 /DTPA prior to incubation with dimedone, we observed increased proteolytic inhibition compared with the inhibition observed in the absence of H_2O_2 /DTPA pretreatment followed by dimedone incubation (results shown in *italics* in Table I). Upon H_2O_2 pretreatment, 10 mM dimedone decreased chymotrypsin-like activity to 50% of that observed in H_2O_2 control samples.

Taken together, the results reported thus far indicate that any group located in Cys residues of the 20 S core decreases its hydrolytic activity, at least the chymotrypsin-like activity, which is considered the strongest of its activities (1). It seems that Cys residues in the 20 S proteasome must be reduced as much as possible to allow maximum activity. Nevertheless, these residues appear to oxidize easily to Cys-SOH.

Cys-SOH Formation and S-Glutathionylation—To demonstrate that Cys residues in the 20 S proteasome structure are oxidized to Cys-SOH, 20 S proteasome preparations were incubated with NBD. This compound reacts with Cys-SH, as well as with Cys-SOH. NBD adducts of Cys-SOH and Cys-SH can be distinguished by their spectra (9). The proteasome-Cys-S(O)-NBD adduct was generated by 20 S proteasome pretreatment with H_2O_2 /DTPA followed by NBD incubation (Fig. 3, *dashed line spectrum*). This adduct showed maximum absorbance at 345 nm whereas the purified 20 S core not oxidized by H_2O_2 yielded the NBD adduct with a maximum absorbance at 420 nm (Fig. 3, *solid line spectrum*).

We also reacted denatured 20 S proteasome preparations with the -SH reactant mBrB (22). Denatured 20 S proteasome samples were preincubated with DTT or GSH. After incubation, DTT and GSH were removed, and the samples were treated overnight with 150 μM mBrB. Proteasome-Cys-bimane conjugates were detected by fluorescence emission recorded after removal of mBrB. DTT-reduced samples showed fluorescence emission at least twice as high as control samples, whereas GSH-treated samples showed reduced fluorescence, probably because 20 S proteasome mixed disulfides could not conjugate with mBrB (Fig. 4). This result indicates that GSH does not play the role of a reducing compound as DTT, but probably GSH was incorporated into the protein structure by S-conjugation.

To demonstrate effectively that the effect of GSH on proteasomal activity is because of S-glutathionylation, 20 S proteasome preparations were incubated with the GSH-biotin derivative according to the protocol described in the literature (18). This method allows the direct determination of protein S-glutathionylation, because biotinylated GSH-proteasome com-

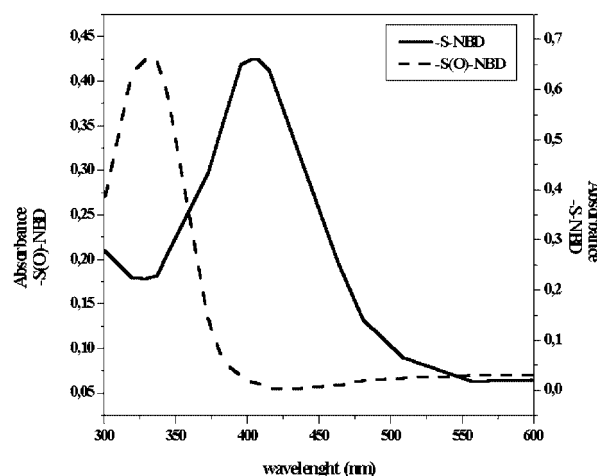


FIG. 3. **NBD-modified 20 S proteasome UV-visible spectra.** The Cys-S(O)-NBD conjugate (*dashed line*) was generated by incubating denatured 20 S proteasome (40 μg) in standard buffer with H_2O_2 /DTPA, as described under "Materials and Methods," followed by incubation with 100 μM NBD for 30 min. All reagents were washed out by filtration through Microcon CM-10 filters prior to absorbance measurements. The Cys-S-NBD conjugate (*solid line*) was generated by incubating denatured 20 S proteasome (40 μg) in standard buffer with 100 μM NBD. Proteasome was denatured by preincubation in 5 M guanidine solution buffered in 50 mM Tris/HCl, pH 7.5. Spectra were recorded with a Hitachi spectrophotometer.

plexes can be isolated by the streptavidin affinity procedure. 20 S proteasome pretreatment with H_2O_2 increased GSH incorporation (Fig. 5). The protein concentration determined after protein elution from the streptavidin-agarose beads was 4-fold higher in samples pretreated with H_2O_2 . Protein recovered from control and H_2O_2 -treated samples after elution from the streptavidin beads was 10 and 40.5 μg , respectively (the amount of protein reacted with GSH-biotin was the same in both samples, *i.e.* 300 μg). This result is direct proof that 20 S proteasome is susceptible to S-glutathionylation by means of GSH addition to Cys-SOH. Because a significant amount of S-glutathionylated 20 S proteasome was detected in the control sample, part of its Cys residues were probably already oxidized to Cys-SOH (Fig. 5). It should be emphasized that the reaction with GSH-biotin was performed under non-denaturing conditions. The preparation was brought to denaturing conditions only after incubation with and removal of GSH-biotin to displace the 20 S core from the streptavidin-agarose beads. Thus the results described in Fig. 5 do not allow us to predict how many or which subunits of the 20 S core were S-glutathionyl-

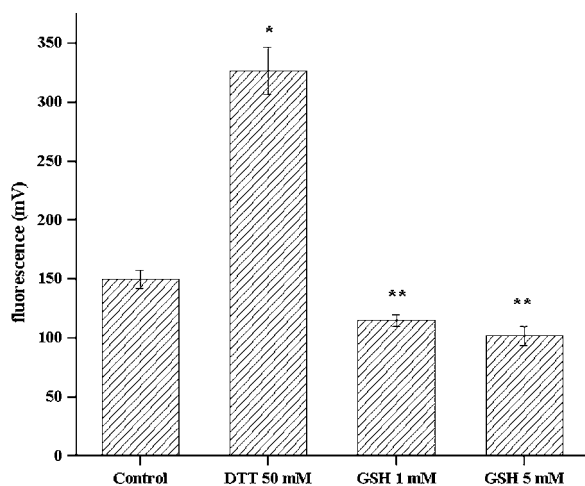


FIG. 4. **mBrB incorporation into the 20 S core after DTT and GSH preincubation.** 20 S proteasome (10 μ g) was incubated in standard buffer for 30 min with DTT or for 10 min with GSH at room temperature at the indicated concentrations. GSH or DTT was removed, and protein samples were washed in standard buffer by filtration. The Cys-mBrB conjugate was generated by overnight incubation with 150 μ M mBrB at 4 $^{\circ}$ C in the dark. After incubation, 20 S proteasome was precipitated with 20% trichloroacetic acid followed by washing three times with 10% trichloroacetic acid. The protein was dissolved in 5 M guanidine buffered in 0.1 M Tris/HCl, pH 7.5. Fluorescence emission was recorded at 476 nm (excitation at 400 nm). Results are expressed as means \pm S.D. of three independent experiments. *, $p < 0.00025$. **, p at least 0.001 (ANOVA).

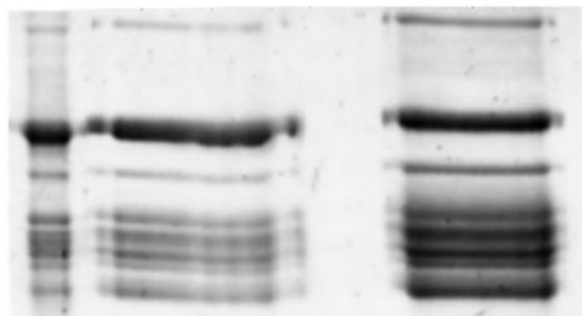


FIG. 5. **20 S proteasome S-glutathionylation by GSH-biotin.** Glutathionylated 20 S proteasome was purified from control (300 μ g) and H_2O_2 -treated (300 μ g) samples after incubation with GSH-biotin followed by SDS-PAGE. The complete experimental procedure is described under "Materials and Methods." The gel shown is representative of three independent experiments. The left lane refers to 5 μ g of a standard preparation of 20 S proteasome, and the middle and right lanes refer to the GSH-biotin-incubated control (10 μ g) and to H_2O_2 -treated samples (40.5 μ g), respectively.

lated. We tried to denature the proteasome just after incubation with GSH-biotin and prior to the streptavidin incubation to determine approximately how many and which subunits would be S-glutathionylated. However, under these conditions, the proteasome concentration of control and H_2O_2 -treated samples recovered from the agarose beads was not sufficient to be detected on the gel by Coomassie Blue staining. This is an indication that perhaps very few or even only one subunit might be S-glutathionylated.

Comparative Catalytic Regulation by GSH among 20 S Proteasome Structures—Chymotrypsin-like activity of 20 S proteasome from *Methanosarcina thermophila*, an Archaeon bacterium, was assayed in the presence of GSH and NEM for comparison to its counterpart, the yeast 20 S proteasome. The Archaeon proteasome was not affected by GSH and was inhibited slightly by NEM (Table II). In the case of mammalian 20 S

TABLE II

Effect of Cys modification on Archaeon proteasome activity

Archaeon proteasome was purchased from ICN Biomedical Research Products. 25–50 μ g/ml was preincubated for 10 or 30 min at room temperature in the presence of GSH or NEM, respectively, at the indicated concentrations, followed by a further 1-h incubation at 37 $^{\circ}$ C with 10 μ M s-LLVY-MCA. Hydrolysis determination was described under "Materials and Methods." Results are means \pm S.D. of three independent experiments.

	s-LLVY-MCA hydrolysis	
	mM	MCA μ mol \times min $^{-1}$ \times mg $^{-1}$
No addition		8.8 \pm 0.5
GSH	5	9.0 \pm 0.5
	10	10.2 \pm 0.9
NEM	1	8.7 \pm 0.6
	5	7.5 \pm 0.7
	10	6.2 \pm 0.4 ^a

^a $p \leq 0.001$ (ANOVA).

proteasome, both GSH and GSSG at micromolar concentrations activated the chymotrypsin-like activity, whereas it was inhibited by millimolar concentrations (15). Moreover, 20 S mammalian proteasomal activity was inhibited strongly by NEM. On the other hand, the yeast 20 S core is inhibited only by reduced GSH (Fig. 1) and is inhibited strongly by NEM (Table I) whereas the Archaeon proteasome is not affected by any GSH form and is only affected slightly by NEM (Table II).

These results indicate a possible role of Cys residues inside the 20 S core controlling its catalytic activity. Comparing Cys residue content among archaeon, yeast, and mammalian (human) 20 S proteasomes, 28, 74, and 100 (108 total Cys) reduced Cys residues are found, respectively. Most likely the differential effect of GSH addition on proteasome activity is related to non-conserved Cys residues. Our belief is that the 20 S proteasome core has evolved as an important sensor of cellular redox status by modification in its catalytic activity brought about by changes in its Cys residues, promoting the cellular response to redox alterations.

In Vivo 20 S Proteasome Glutathionylation—Our next approach was to search for *in vivo* 20 S proteasome S-glutathionylation. Our hypothesis was that proteasome would be sensitive to intracellular reductive capacity, being more active as the cell reductive environment is maximized. This might be an additional way for cells to trigger the signaling response to oxidative alterations. To test this hypothesis, we treated cells with increasing H_2O_2 concentrations. After treatment, the hydrolysis of the fluorogenic substrate s-LLVY-MCA was determined in preparations of 20 S proteasome isolated from the cell extract with the anti-FLAG system and in the proteasome-free cell extract obtained after 20 S proteasome extraction. The 20 S core-anti-FLAG antibody complex bound to agarose beads was assayed for the hydrolysis of the fluorogenic peptide s-LLVY-MCA before and after incubation in the presence of 20 mM $NaBH_4$ to reduce the S-S bridges formed by mixed disulfides or to reduce Cys-SOH to Cys-SH. $NaBH_4$ can also reduce carbonyl groups or Schiff bases formed by the oxidation of some specific amino acid residues to alcohol derivatives (23). Our purpose in using $NaBH_4$ was to reduce oxidized Cys residues inside the 20 S core, thereby recovering proteasome sulfhydryls and promoting GSH release from the core. GSH was assayed in the supernatant recovered after reduction with $NaBH_4$, as described under "Materials and Methods."

The reductive cellular capacity was evaluated by the determination of the GSH/GSSG ratio. We also determined cell viability and the formation of carbonyl protein as a marker of oxidative stress (Table III).

H_2O_2 treatment leads to a significant increase in the formation of protein carbonyl when added to the culture medium at

TABLE III
Proteasomal activity and redox parameters upon H_2O_2 cell treatment

Cells were grown in YPD medium to A_{600} of 0.6–0.8 followed by a further 1-h incubation with H_2O_2 added to the medium at the final concentrations shown. After incubation, aliquots were taken for cell viability assay. The remaining cells were harvested by centrifugation and washed twice with water. Cell extract preparation, 20 S proteasome purification by immunoprecipitation, reduction with $NaBH_4$, and measurements of proteolysis, total and oxidized glutathione, GSH released from 20 S proteasome, and carbonyl proteins are described under “Materials and Methods.” ND, not determined.

	No addition	H_2O_2		
		0.1	0.5	1
		<i>mM</i>		
Cell viability, no. of colonies	62 ± 2	62 ± 2	28 ± 2 ^a	19 ± 1 ^a
s-LLVY-MCA hydrolysis, %				
20 S proteasome fraction ^{b,c}				
Before $NaBH_4$ reduction	100 ± 6	102 ± 3	50 ± 3 ^a	36 ± 2 ^a
After $NaBH_4$ reduction	110 ± 7	ND	70 ± 4 ^a	ND
Proteasome-free cell extract ^{b,d}	100 ± 4	128 ± 9 ^a	160 ± 7 ^a	165 ± 8 ^a
GSH, nmol/mg ^e	Not detected	ND	1.40 ± 0.05	ND
GSH/GSSG	54 ± 3	66 ± 2 ^a	37 ± 9 ^a	29 ± 1 ^a
Protein carbonyl formation, nmol/mg ^f	20 ± 2	24 ± 2	27 ± 1 ^g	ND

^a $p \leq 0.00027$ (ANOVA).

^b Results are expressed as percentage of control samples (No addition), set as 100.

^c 20 S proteasome was purified from the cell extract by immunoprecipitation and assayed for proteolysis before and after reduction with $NaBH_4$.

^d Proteolysis was determined in the cell extract, free of the 20 S proteasome particle, recovered after incubation two times with anti-FLAG antibody.

^e GSH was released from samples of 20 S proteasome after reduction with $NaBH_4$, as described in footnote c.

^f The protein fraction from cell extracts was precipitated with 20% trichloroacetic acid. All results are means ± S.D. of four to five independent experiments.

^g $p = 0.027$ (ANOVA).

a concentration of at least 0.5 mM (Table III). At this concentration, H_2O_2 -promoted oxidative stress was accompanied by decreased reductive capacity of the cell, as evaluated by the GSH/GSSG ratio, which dropped to 68.5% compared with that found in control cells. Under the same conditions, proteasomal activity decreased 50% before incubation with $NaBH_4$ and was partially recovered after reduction with $NaBH_4$ to 70% of control samples (Table III). Hydrolysis of the fluorogenic peptide s-LLVY-MCA, determined in the proteasome-free extract, increased by 60%. Reports in the literature (24–26) show that mammalian cells under oxidative stress show increased proteolysis. The cited authors assume that increased proteolysis is because of increased proteasomal activity such as that seen *in vitro* when oxidized substrates show increased hydrolysis levels by purified 20 S proteasome preparations from mammalian cells (3). However, our results show that yeast 20 S proteasome is highly affected by oxidative stress whereas hydrolysis not dependent on proteasome is increased (Table III).

The reason for the partial recovery of proteasome activity after $NaBH_4$ treatment (Table III) is probably the reduction of Cys-SOH or Cys-SSG to Cys-SH. However, other oxidative processes are responsive to reduction by $NaBH_4$, e.g. formation of carbonyl and Schiff bases (19), but in this case the original amino acid structures are not regenerated as expected for Cys-SOH and Cys-SSG. GSH release from the 20 S core after reduction with $NaBH_4$ (Table III) is strong evidence that proteasomal activity might be regulated by S-glutathionylation under intracellular oxidative conditions, and consequently decreased reductive capacity, here attested by a reduced GSH/GSSG ratio upon H_2O_2 cell treatment.

Taken together, results obtained *in vivo* after cell treatment with H_2O_2 indicate that loss of reductive cellular capacity, according to GSH/GSSG ratios and protein carbonyl levels, is associated with loss of 20 S proteasomal activity and with its S-glutathionylation. These data are an indication of redox modulation of 20 S proteasome activity.

DISCUSSION

It is becoming increasingly apparent that many oxidant-sensitive proteins are S-glutathionylated in response to intracellular redox status (6, 18, 27) (reviewed in Ref. 28). Cys-SOH

is an intermediate form involved in redox regulation and catalysis by protein sulfhydryl groups (reviewed in 6). Distinct fates for protein Cys-SOH have been considered (11, 14) whereby S-glutathionylation would be one of the mechanisms modulating protein activity. Protein S-glutathionylation is a reversible process, and there is considerable evidence that GSH release is controlled enzymatically, probably by glutaredoxin (29).

In this manuscript we describe the mechanism by which 20 S proteasome is glutathionylated *in vitro*. Taken together, those results indicate that during moderate oxidative stress Cys residues inside the 20 S proteasome core might be oxidized to Cys-SOH, reversibly protected by S-glutathionylation, and most likely deglutathionylated after cellular recovery from oxidative stress.

From the data in Table III we calculated that one to two molar GSH was released per mol of 20 S proteasome, considering that the molecular mass of the yeast protease is ~700 kDa. GSH was not detected in 20 S proteasome samples obtained from control cells, probably because of the sensitivity of the assay utilized for GSH detection. The low GSH concentration released from the 20 S core is a suggestion that S-glutathionylation of 20 S proteasome at the physiological level is highly specific; probably very few Cys residues in the core are prone to S-glutathionylation during metabolic processes. Our hypothesis is that S-glutathionylation of the 20 S proteasome is coupled to the oxidation of sulfhydryls, according to the reaction shown above.

Comparing the results described here about the effect of GSH and GSSG on proteasomal activity from yeast (see Figs. 1 and 2) and *M. thermophila* (Table II) to earlier results (15) obtained for mammalian 20 S proteasome, it is clear that the 20 S proteasome homologues respond differentially to changes in redox conditions. In this regard, it is important to observe that the mammalian counterpart has either long- or short-lived proteins as substrates, and its localization inside cells is widespread; it is found in the cytoplasm and nucleus (30). On the other hand, the yeast proteasome is associated with the degradation of short-lived proteins and localized mainly inside the cell nucleus, and perhaps not more than 20% occurs in the

cytoplasm associated with the nuclear endoplasmic reticulum network (31).

It is interesting to point out that GSH distribution inside yeast cells is still not clear. Although it has been demonstrated already that GSH is distributed inside the mammalian nucleus at concentrations as high as in the cytoplasm (32), its presence inside the yeast nucleus is not clear, neither is the distribution of glutaredoxin isoforms inside yeast cells clear thus far. A mammalian nuclear isoform was described already (33, 34) whereas information on yeast nuclear isoforms is still lacking. Because glutaredoxin activity is coupled to direct GSH consumption, its presence inside the nucleus would be strong evidence of GSH distribution in the nucleus. Considering proteasome distribution and its role in the yeast cell, as discussed above, elucidation of GSH distribution inside yeast cells is an important matter to corroborate the findings discussed here.

Another important difference suggested in the literature (30, 31) is that yeast proteasome is always capped by the 19 S regulatory unit in contrast to the finding that its counterpart, the mammalian 20 S proteasome, is found in 3–4-fold excess over the 19 S regulatory unit. In our opinion, even if it is true that the yeast proteasome is always capped with the 19 S regulator, this does not rule out the possibility that the catalytic unit represented by 20 S proteasome is regulated independently of either protein ubiquitinylation or substrate recognition by the 26 S proteasome. Our results indicated that redox regulation by glutathionylation is important *in vivo* (Table III). Other examples of redox regulation and S-glutathionylation have been described for other metabolic processes (27, 35, 36). Our results lead us to speculate that 20 S proteasomal activity can be modulated by S-glutathionylation through the increased presence of oxidants, which would be used in signaling processes. Besides, transient 20 S proteasome inhibition would decrease the hydrolysis of proteins responsible for redox signaling, *e.g.* AP-1-like factors. AP-1-like proteins are sensors of the redox state of the cell (37) and, as already demonstrated in mammalian cells, are degraded by the proteasome (38). The metabolic advantage of protein S-glutathionylation in redox signaling is the prevention of irreversible oxidation of the Cys thiol group to Cys-SO₂H or Cys-SO₃H, permitting protein reactivation by reduction. Such mechanism might work in parallel to the main mechanism controlling proteasome-mediated proteolysis, *i.e.* ubiquitinylation. The relationship between proteasome glutathionylation and ubiquitinylation of substrates remains to be established.

REFERENCES

- Coux, O., Tanaka, K., and Goldberg, A. F. (1996) *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 801–847
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hatmann, C., and Huber, R. (1999) *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**, 295–317
- Giulivi, C., Pacifici, R. E., and Davies, K. J. A. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **311**, 329–341
- Berlett, B. S., and Stadtman E. R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 20313–20316
- Ullrich, O., Reinheckel, T., Sitte, N., Hass, R., Grune, T., and Davies, K. J. A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6223–6228
- Claiborne, A., Mallett, T. C., Yeh, J. I., Luba, J., and Parsonage, D. (2001) *Adv. Prot. Chem.* **58**, 215–276
- Gilbert, H. F. (1995) *Methods Enzymol.* **251**, 8–28
- Thomas, J. A., Poland, B., and Honzatko, R. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* **319**, 1–9
- Ellis, H. R., and Poole, L. B. (1997) *Biochemistry* **36**, 15013–15018
- Barrett, W. C., DeGnore, J. P., Keng, Y. F., Zhang, Z. Y., Yim, M. B., and Chock, P. B. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 34543–34546
- Yang, K. S., Kang, S. W., Woo, H. A., Hwang, S. C., Chae, H. Z., Kim, K., and Rhee, S. G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 38029–38036
- Benitez, L. V., and Allison, W. S. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* **159**, 89–96
- Allison, W. S. (1976) *Acc. Chem. Res.* **9**, 293–299
- Claiborne, A., Yeh, J. I., Mallett, T. C., Luba, J., Crane, E. J., Charrier, V., and Parsonage, D. (1999) *Biochemistry* **38**, 15407–15416
- Demasi, M., Shringarpure, R., and Davies, K. J. A. (2001) *Arch. Biochem. Biophys.* **389**, 254–263
- Verma, R., Chen, S., Feldman, R., Schieltz, D., Yates, J., Dohmen, J., and Deshaies, R. J. (2000) *Mol. Biol. Cell* **11**, 3425–3439
- Hough, R., Pratt, G., and Rechsteiner, M. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 8303–8313
- Sullivan, D. M., Wehr, N. B., Fergusson, M. M., Levine, R. L., and Finkel, T. (2000) *Biochemistry* **39**, 11121–11128
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R., and Shacter, E. (1994) *Methods Enzymol.* **233**, 346–357
- Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 4244–4250
- Netto, L. E. S., and Stadtman, E. R. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **333**, 233–242
- Kosower, E. M., and Kosower, N. S. (1995) *Methods Enzymol.* **251**, 133–148
- Stadtman, E. R. (1993) *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 797–821
- Grune, T., Reinheckel, T., and Davies, K. J. A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 2344–2351
- Grune, T., Reinheckel, T., and Davies, K. J. A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 15504–15509
- Reinheckel, T., Sitte, N., Ullrich, O., Kuckelkorn, U., Davies, K. J. A., and Grune, T. (1998) *Biochem. J.* **335**, 637–642
- Fratelli, M., Demol, H., Puype, M., Casagrande, S., Eberin, I., Salmons, M., Bonetto, V., Mengozzi, M., Duffieux, F., Miclet, E., Bachi, A., Vandekerckhove, J., Gianazza, E., and Ghezzi, P. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 3505–3510
- Cotgreave, I. A., and Gerdes, R. G. (1998) *Bioch. Biophys. Res. Comm.* **242**, 1–9
- Cotgreave, I. A., and Gerdes, R. G., Schuppe-Koistinen, I., and Lind, C. (2002) *Methods Enzymol.* **348**, 175–182
- Brooks, P., Fuentes, G., Murray, R. Z., Bose, S., Knecht, E., Rechsteiner, M. C., Hendil, K. B., Tanaka, K., Dyson, J., and Rivett, J. (2000) *Biochem. J.* **346**, 155–161
- Russell, S. J., Steger, K. A., and Johnston, A. S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 21943–21952
- Bellomo, G., Palladini, G., and Vairetti, M. (1997) *Microsc. Res. Tech.* **36**, 243–252
- Bandyopadhyay, S., Starke, D. W., Mieyal, J. J., and Gronostaiski, R. M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 392–397
- Lundberg, M., Johansson, C., Chandra, J., Enoksson, M., Jacobsson, C., Ljung, J., Johansson, M., and Holmgren, A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 26269–26275
- Nulton-Persson, A. C., and Szweda, L. I. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 23357–23361
- Nulton-Persson, A. C., and Szweda, L. I. (2002) *Free Radic. Biol. Med.* **33**, S90
- Toone, W. M., Morgan, B. A., and Jones, N. (2001) *Oncogene* **20**, 2336–2346
- Acquaviva, C., Brockly, F., Ferrara, P., Bossis, G., Salvat, C., Jariel-Encontre, I., and Piechaczyk, M. (2001) *Oncogene* **20**, 7563–7572

Anexo V.

Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2005 Apr 1;61(Pt 4):445-7. Epub 2005 Apr 1.

Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of glutaredoxin 2 from *Saccharomyces cerevisiae* in different oxidation states.

Discola KE, Oliveira MA, Silva GM, Barcena JA, Porras P, Padilla A, Netto LE, Guimarães BG.

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão 277, São Paulo, SP, Brazil.

Abstract

Glutaredoxins are small (9-12 kDa) heat-stable proteins that are highly conserved throughout evolution; the glutaredoxin active site (Cys-Pro-Tyr-Cys) is conserved in most species. Five glutaredoxin genes have been identified in *Saccharomyces cerevisiae*; however, Grx2 is responsible for the majority of oxidoreductase activity in the cell, suggesting that its primary function may be the detoxification of mixed disulfides generated by reactive oxygen species (ROS). Recombinant Grx2 was expressed in *Escherichia coli* as a 6xHis-tagged fusion protein and purified by nickel-affinity chromatography. Prior to crystallization trials, the enzyme was submitted to various treatments with reducing agents and peroxides. Crystals suitable for X-ray diffraction experiments were obtained from untreated protein and protein oxidized with *t*-butyl hydroperoxide (10 mM). Complete data sets were collected to resolutions 2.15 and 2.05 Å for untreated and oxidized Grx2, respectively, using a synchrotron-radiation source. The crystals belong to space group P4(1)2(1)2, with similar unit-cell parameters.

PMID: 16511065 [PubMed - indexed for MEDLINE]PMCID: PMC1952414

Karen Fulan Discola,^a
 Marcos Antonio de Oliveira,^a
 Gustavo Monteiro Silva,^a
 José Antonio Barcena,^b
 Pablo Porras,^b Alicia Padilla,^b
 Luis Eduardo Soares Netto^a and
 Beatriz Gomes Guimarães^{c*}

^aDepartamento de Biologia, Instituto de
 Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do
 Matão 277, São Paulo, SP, Brazil,

^bDepartamento de Bioquímica y Biología
 Molecular, Campus de Rabanales, Edificio
 'Severo Ochoa', Universidad de Córdoba,
 14071 Córdoba, Spain, and ^cLaboratório
 Nacional de Luz Síncrotron, CP 6192,
 CEP 13084-971, Campinas, SP, Brazil

Correspondence e-mail: beatriz@lnls.br

Received 25 February 2005

Accepted 17 March 2005

Online 1 April 2005

Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of glutaredoxin 2 from *Saccharomyces cerevisiae* in different oxidation states

Glutaredoxins are small (9–12 kDa) heat-stable proteins that are highly conserved throughout evolution; the glutaredoxin active site (Cys-Pro-Tyr-Cys) is conserved in most species. Five glutaredoxin genes have been identified in *Saccharomyces cerevisiae*; however, Grx2 is responsible for the majority of oxidoreductase activity in the cell, suggesting that its primary function may be the detoxification of mixed disulfides generated by reactive oxygen species (ROS). Recombinant Grx2 was expressed in *Escherichia coli* as a 6×His-tagged fusion protein and purified by nickel-affinity chromatography. Prior to crystallization trials, the enzyme was submitted to various treatments with reducing agents and peroxides. Crystals suitable for X-ray diffraction experiments were obtained from untreated protein and protein oxidized with *t*-butyl hydroperoxide (10 mM). Complete data sets were collected to resolutions 2.15 and 2.05 Å for untreated and oxidized Grx2, respectively, using a synchrotron-radiation source. The crystals belong to space group $P4_12_12$, with similar unit-cell parameters.

1. Introduction

Glutaredoxins (Grx) are small (9–12 kDa) heat-stable proteins with at least one cysteine in their active site that are highly conserved throughout evolution (reviewed by Holmgren, 1989). The ubiquitous distribution of glutaredoxins is probably related to the fact that these proteins are involved in many cellular processes, including protein folding, regulation of protein activity, reduction of dehydroascorbate, repair of oxidatively damaged proteins and sulfur metabolism (Holmgren, 1989; Rietsch & Beckwith, 1998).

There are five glutaredoxin genes (*GRX1–5*) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The Grx1 and Grx2 isoforms are dithiol proteins with a Cys-Pro-Tyr-Cys motif in their active site, whereas Grx3, Grx4 and Grx5 are monothiol proteins that contain Cys-Gly-Phe-Ser in their active site (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 1999; Bellí *et al.*, 2002). The importance of glutaredoxin is related to the fact that these proteins possess the ability to reduce disulfide bonds (Holmgren, 1989). Changes in the thiol–disulfide redox status of proteins are important not only for the reactivation of enzymes and for protein folding and stability, but also for the control of protein function (Ritz & Beckwith, 2001). *In vitro* studies have shown that both Grx1 and Grx2 can reduce mixed disulfides. However, despite the homology between Grx2 and Grx1 (64% identity and 85% similarity), Grx2 is responsible for the majority of oxidoreductase activity in the cell (Luikenhuis *et al.*, 1998; Grant, 2001). Grx2 performs the reversible disulfide-bond exchange reaction between its active site and the active site of the substrate protein *via* a monothiol mechanism, initiated by the nucleophilic N-terminal cysteine residue (Luikenhuis *et al.*, 1998; Collinson & Grant, 2003; Ritz & Beckwith, 2001).

It was recently proposed that Grx2 also possesses peroxidase and glutathione *S*-transferase activities (Collinson *et al.*, 2002; Collinson & Grant, 2003). Accordingly, the resistance of yeast to oxidative stress induced by hydroperoxides is affected by changes in the levels of glutaredoxins among other factors (Collinson *et al.*, 2002). Yeast strains with deletions in either the *GRX1* or *GRX2* genes are sensitive to hydroperoxides; however, the *GRX2* null mutant has higher hydrogen peroxide sensitivity, showing that Grx2 is probably the



main glutaredoxin involved in the detoxification of this oxidant in the cell (Collinson *et al.*, 2002; Wheeler & Grant, 2004). Both dithiolic glutaredoxins are capable of reducing hydroperoxides directly in a catalytic manner: their active sites act as an electron-transfer site and undergo a reversible oxidation of two vicinal protein thiol groups to a disulfide bridge (Collinson *et al.*, 2002). The resulting oxidized glutaredoxin is reduced by two GSH molecules and the resulting GSSG is reduced back by NADPH in a reaction catalyzed by glutathione reductase (Jordan *et al.*, 1997). Preliminary results from our group have indicated that Grx2 is also involved in another process: the deglutathionylation of the 20S proteasome. The converse process of deglutathionylation, glutathionylation, occurs avoiding the irreversible oxidation of the proteasome (Demasi *et al.*, 2003).

Recently, two different isoforms of Grx2 have been identified, one with a molecular weight of 15.9 kDa and the other of 11.9 kDa. Both isoforms are localized in the mitochondria, but the shorter isoform is also detected in the cytosolic fraction (Pedrajas *et al.*, 2002). The multitude of Grx2 functions can probably be related to the fact that this protein possesses these two isoforms.

At present, three-dimensional structures of glutaredoxins from only four sources have been determined: *Escherichia coli* Grx1 (Sodano *et al.*, 1991), Grx2 (Xia *et al.*, 2001) and Grx3 (Nordstrand *et al.*, 1999), bacteriophage T4 Grx (Eklund *et al.*, 1992), *Sus scrofa* Grx (Katti *et al.*, 1995) and *Homo sapiens* Grx (Sun *et al.*, 1998). These proteins share the same thioredoxin overall fold, despite variations in amino-acid sequences (Stefankova *et al.*, 2005). The glutaredoxin 2

from *E. coli*, the only Grx2 of known three-dimensional structure, is an atypical glutaredoxin with a molecular weight of 24 kDa, compared with the typical molecular weight of 9–12 kDa for other known glutaredoxins (Xia *et al.*, 2001). In this work, we present preliminary X-ray crystal analysis aiming towards the three-dimensional structure determination of the shorter *S. cerevisiae* Grx2 isoform, which may be helpful in comprehension of the molecular mechanisms by which Grx2 operates.

2. Methods

2.1. Cloning

The 432 bp *GRX2* gene was PCR amplified from *S. cerevisiae* genomic DNA of strain W303 using primers which, in addition to the open reading frame, contained cloning adaptors (*Nde*I and *Bam*HI restriction sites) to favour the gene transfer to expression plasmids. The PCR product and the expression vector pET15b were first digested with *Nde*I and then with *Bam*HI. The fragments generated by *Nde*I/*Bam*HI digestion containing the *GRX2* gene and pET15b were extracted from agarose gel by the Rapid Gel Extraction Concert kit (Invitrogen). After purification, the *GRX2* gene was ligated to the digested pET15b expression vector. The cloned gene sequence was confirmed by automated DNA sequencing and the resulting pET15b/*GRX2* was used to transform *E. coli* BL21 (DE3).

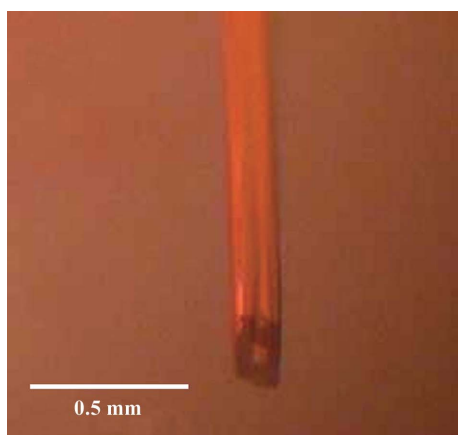
2.2. Expression and purification

E. coli BL21 (DE3) strain harbouring the pET15b/*GRX2* plasmid was grown (50 ml) overnight in LB medium containing 100 µg ml⁻¹ ampicillin at 310 K and transferred to 1 l fresh LB/amp medium and cultured further at 310 K until the OD₆₀₀ reached 0.6–0.8. Expression was induced with 0.5 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside and the cells were harvested after 4 h incubation at 310 K.

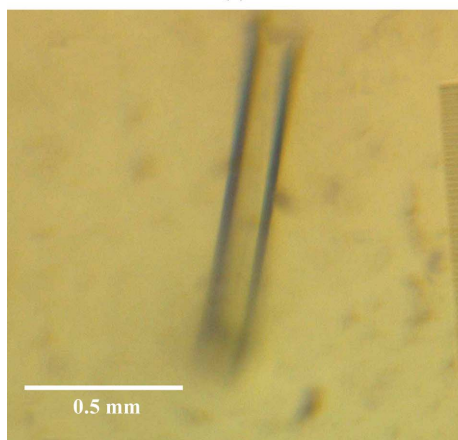
After cell lysis, the protein was purified by cobalt-affinity chromatography with an imidazole gradient (Talon metal-affinity resin from Clontech). We have obtained approximately 50 mg pure protein from 1 l cell culture. Protein purity was confirmed by SDS-PAGE and the purified protein was concentrated to 10 mg ml⁻¹ in 5 mM Tris-HCl pH 7.5.

2.3. Crystallization

Crystallization trials were executed using the hanging-drop vapour-diffusion method. Prior to crystallization, enzyme samples were submitted to treatment for 1 h at 310 K with hydrogen peroxide, *t*-butyl hydroperoxide, diamide and DTT. Initial screening was performed at 293 K using the commercially available Crystal Screen and Crystal Screen II kits from Hampton Research. The drops were prepared by mixing equal volumes (2 µl) of protein solution and reservoir solution. Promising crystals were identified in four conditions of the Crystal Screen kit: condition Nos. 10, 28, 32 and 47. The conditions were optimized by variation of precipitant or salt concentrations and pH. Crystals suitable for X-ray diffraction experiments were obtained from the untreated protein and from protein after oxidation with 10 mM *t*-butyl hydroperoxide. In both cases, the optimal condition was obtained with a reservoir solution consisting of 30% PEG 4000, 0.1 M sodium acetate pH 4.6 and 0.2 M ammonium acetate. The crystals grown from the untreated sample reached dimensions of ~0.10 × 0.15 × 0.9 mm after one week (Fig. 1a), while crystals grown from the oxidized protein reached ~0.10 × 0.15 × 0.8 mm in about the same time (Fig. 1b).



(a)



(b)

Figure 1
Crystals of Grx2 from *S. cerevisiae*. (a) Untreated protein, (b) oxidized protein. Both Grx2 crystals were grown using 30% PEG 4000, 0.1 M sodium acetate pH 4.6 and 0.2 M ammonium acetate.

Table 1

Data-collection parameters and crystallographic data statistics.

Values in parentheses refer to the highest resolution shell.

	Untreated protein	Oxidized protein
Wavelength (Å)	1.431	1.431
Temperature (K)	110	110
Space group	<i>P4₁2₁2</i>	<i>P4₁2₁2</i>
Unit-cell parameters (Å)	<i>a</i> = <i>b</i> = 47.66, <i>c</i> = 95.00	<i>a</i> = <i>b</i> = 47.63, <i>c</i> = 94.59
Resolution range (Å)	42.60–2.15 (2.27–2.15)	42.56–2.05 (2.16–2.05)
Total reflections	68434	90136
Unique reflections	6439	7295
Completeness (%)	100.0 (100.0)	99.8 (99.3)
Multiplicity	10.6 (10.7)	12.3 (11.2)
<i>R</i> _{sym} † (%)	10.3 (31.2)	8.0 (29.4)
Average <i>I</i> /σ(<i>I</i>)	23.5 (7.3)	28.9 (7.8)

$$\dagger R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl,i} - \langle I \rangle_{hkl}|}{\sum_i \langle I \rangle_{hkl}}$$

2.4. Data collection and processing

The crystals, cryoprotected by a solution consisting of 30% PEG 4000, 0.1 *M* sodium acetate pH 4.6, 0.2 *M* ammonium acetate and 20% glycerol, were cooled to 110 K in a nitrogen-gas stream and X-ray diffraction data were collected using synchrotron radiation at the protein crystallography beamline D03B of the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, Brazil. LNLS D03B is a monochromatic beamline with maximum photon flux between 1.3 and 1.6 Å. The wavelength of the incident X-ray was set to 1.431 Å. A MAR CCD detector was used to record the oscillation data with $\Delta\phi = 1^\circ$. Data sets were processed using the programs *MOSFLM* (Leslie, 1992) and *SCALA* (Evans, 1993) from the *CCP4* package (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994).

3. Results and discussion

Glutaredoxin 2 from *S. cerevisiae* was submitted to crystallization trials after treatment with hydrogen peroxide, *t*-butyl hydroperoxide, diamide and DTT. Microcrystals were obtained from all samples, but to date crystals suitable for X-ray diffraction experiments only grew from the untreated protein and the sample after oxidation with 10 mM *t*-butyl hydroperoxide.

A crystal of untreated Grx2 diffracted to 2.15 Å resolution and belonged to space group *P4₁2₁2*, with unit-cell parameters *a* = *b* = 47.66, *c* = 95.00 Å. The oxidized Grx2 crystal diffracted to 2.05 Å resolution and also belongs to space group *P4₁2₁2*, with similar unit-cell parameters. Table 1 summarizes the data-collection statistics. In order to estimate the number of molecules in the asymmetric unit, the Matthews coefficient *V*_M was calculated (Matthews, 1968). Both crystals presented one molecule per asymmetric unit with *V*_M = 2.3 Å³ Da⁻¹ and solvent contents of 45.8 and 45.0% for the native and oxidized protein, respectively.

Application of the molecular-replacement method using the program *AMoRe* (Navaza, 2001) indicated a probable solution when a polyalanine theoretical model constructed with the program *MODELLER* (Claude *et al.*, 2004) was used as the search model. The theoretical model was built based on the coordinates of a thiol-

transferase from *S. scrofa* (Katti *et al.*, 1995; PDB code 1kte; 36% sequence identity). Previous attempts to solve the structure using the 1kte coordinates as the search model for molecular replacement had failed. Currently, structure refinement is in progress.

We expect that knowledge of the three-dimensional structure of Grx2 in different redox states will contribute to the understanding of the catalytic mechanism of the enzyme, which is involved in several biological processes.

This work was supported by grant 01/07539-5, the Structural Molecular Biology Network (SMOLBnet), from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), by the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) under proposal D03B-1795 and by Spanish MCyT, grant BFI2002-00755.

References

- Bellí, G., Polaina, J., Tamarit, J., Torre, M. A., Rodríguez-Manzaneque, M. T., Ros, J. & Herrero, E. (2002). *J. Biol. Chem.* **277**, 37590–37596.
- Claude, J. B., Suhre, K., Notredame, C., Claverie, J. M. & Abergel, C. (2004). *Nucleic Acid Res.* **32**, W606–W609.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 760–763.
- Collinson, E. J. & Grant, C. M. (2003). *J. Biol. Chem.* **278**, 22492–22497.
- Collinson, E. J., Wheeler, G. L., Garrido, E. O., Avery, A. M., Avery, S. V. & Grant, C. M. (2002). *J. Biol. Chem.* **277**, 16712–16717.
- Demasi, M., Silva, G. M. & Netto, L. E. S. (2003). *J. Biol. Chem.* **278**, 679–685.
- Eklund, H., Ingelman, M., Söderberg, B. O., Uhlin, T., Nordlund, P., Nikkola, M., Sonnerstam, U., Joelson, T. & Petratos, K. (1992). *J. Mol. Biol.* **228**, 596–618.
- Evans, P. R. (1993). *Proceedings of the CCP4 Study Weekend. Data Collection and Processing*, edited by N. Isaacs, L. Sawyer & S. Bailey, pp. 114–122. Warrington: Daresbury Laboratory.
- Grant, C. M. (2001). *Mol. Microbiol.* **39**, 533–541.
- Holmgren, A. (1989). *J. Biol. Chem.* **264**, 13963–13966.
- Jordan, A., Aslund, F., Pontis, E., Reichard, P. & Holmgren, A. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**, 18044–18050.
- Katti, S. K., Robbins, A. H., Yang, Y. & Wells, W. W. (1995). *Protein Sci.* **4**, 1998–2005.
- Leslie, A. G. W. (1992). *Jnt CCP4/ESF–EACBM Newsl. Protein Crystallogr.* **26**.
- Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I. W. & Grant, C. M. (1998). *Mol. Biol. Cell.* **9**, 1081–1091.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Navaza, J. (2001). *Acta Cryst.* **D57**, 1367–1372.
- Nordstrand, K., Aslund, F., Holmgren, A., Otting, G. & Berndt, K. D. (1999). *J. Mol. Biol.* **286**, 541–552.
- Pedrajas, J. R., Porras, P., Martinez-Galisteo, E., Padilla, C. A., Miranda-Vizuete, A. & Bárcena, J. A. (2002). *Biochem. J.* **364**, 617–623.
- Rietsch, A. & Beckwith, J. (1998). *Annu. Rev. Genet.* **32**, 163–184.
- Ritz, D. & Beckwith, J. (2001). *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 21–48.
- Rodríguez-Manzaneque, M. T., Ros, J., Babiscol, E., Sorribas, A. & Herrero, E. (1999). *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8180–8190.
- Sodano, P., Xia, T. H., Bushweller, J. H., Bjornberg, O., Holmgren, A., Billeter, M. & Wulthrich, K. (1991). *J. Mol. Biol.* **221**, 1311–1324.
- Stefankova, P., Maderova, J., Barak, I., Kollarova, M. & Otwinowski, Z. (2005). *Acta Cryst.* **F61**, 164–168.
- Sun, C., Berardi, M. J. & Bushweller, J. H. (1998). *J. Mol. Biol.* **280**, 687–701.
- Wheeler, G. L. & Grant, C. M. (2004). *Physiol. Plant.* **120**, 12–20.
- Xia, B., Vlamis-Gardikas, A., Holmgren, A., Wright, P. E. & Dyson, H. J. (2001). *J. Mol. Biol.* **310**, 907–918.

Anexo VI.

Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2007 Jul-Aug;146(1-2):180-93. Epub 2006 Sep 6.

Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more.

Netto LE, de Oliveira MA, Monteiro G, Demasi AP, Cussioli JR, Discola KF, Demasi M, Silva GM, Alves SV, Faria VG, Horta BB.

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brazil. nettoles@ib.usp.br

Abstract

Cysteine plays structural roles in proteins and can also participate in electron transfer reactions, when some structural folds provide appropriated environments for stabilization of its sulfhydryl group in the anionic form, called thiolate (RS^-). In contrast, sulfhydryl group of free cysteine has a relatively high $pK(a)$ (8,5) and as a consequence is relatively inert for redox reaction in physiological conditions. Thiolate is considerable more powerful as nucleophilic agent than its protonated form, therefore, reactive cysteine are present mainly in its anionic form in proteins. In this review, we describe several processes in which reactive cysteine in proteins take part, showing a high degree of redox chemistry versatility.

PMID: 17045551 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Review

Reactive cysteine in proteins: Protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more[☆]

Luis Eduardo Soares Netto^{a,*}, Marcos Antonio de Oliveira^a, Gisele Monteiro^a, Ana Paula Dias Demasi^a, José Renato Rosa Cussioli^a, Karen Fulan Discola^a, Marilene Demasi^b, Gustavo Monteiro Silva^a, Simone Vidigal Alves^a, Victor Genu Faria^a, Bruno Brasil Horta^a

^a Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo—SP, Brazil

^b Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan, São Paulo-SP, Brazil

Received 1 May 2006; received in revised form 13 July 2006; accepted 31 July 2006

Available online 6 September 2006

Abstract

Cysteine plays structural roles in proteins and can also participate in electron transfer reactions, when some structural folds provide appropriated environments for stabilization of its sulfhydryl group in the anionic form, called thiolate (RS⁻). In contrast, sulfhydryl group of free cysteine has a relatively high pK_a (8,5) and as a consequence is relatively inert for redox reaction in physiological conditions. Thiolate is considerable more powerful as nucleophilic agent than its protonated form, therefore, reactive cysteine are present mainly in its anionic form in proteins. In this review, we describe several processes in which reactive cysteine in proteins take part, showing a high degree of redox chemistry versatility.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Antioxidant; Cysteine; Disulfide; Peroxide; Electron transfer; Signaling; Thiols; Thiolate

Contents

1. Introduction	180
2. Roles of reactive cysteine in biology	181
2.1. Reduction of disulfide bonds	181
2.2. Formation of disulfide bonds	183
2.3. Protein S-glutathionylation	183
2.4. Antioxidant defense	184
2.5. Redox signalling	186
3. Conclusions	190
Acknowledgements	190
References	190

[☆] This paper is part of the 4th special issue of CBP dedicated to The Face of Latin American Comparative Biochemistry and Physiology organized by Marcelo Hermes-Lima (Brazil) and co-edited by Carlos Navas (Brazil), Rene Belebani (Brazil), Rodrigo Stabeli (Brazil), Tania Zenteno-Savín (Mexico) and the editors of CBP. This issue is dedicated to the memory of two exceptional men, Peter L. Lutz, one of the pioneers of comparative and integrative physiology, and Cicero Lima, journalist, science lover and Hermes-Lima's dad.

* Corresponding author. Tel.: +55 11 30917589; fax: +55 11 30917553.

E-mail address: nettoles@ib.usp.br (L.E.S. Netto).

1. Introduction

Proteins are the final products of gene expression and are responsible to execute the biological information contained in the nucleotide sequences of their respective genes. A classical dogma in biology is that the genetic information presented in the nucleotide sequence of DNA is expressed in a two-stage

process: transcription and translation. Proteins need to adopt proper tertiary and quaternary structures to perform their biological functions. Because most proteins spontaneously fold into their native conformation under physiological conditions, the central dogma also implies that protein's primary structure dictates its tertiary structure.

Our interest is on proteins that have the ability to participate in electron transfer reactions. Most proteins rely on organic and on inorganic redox cofactors (NAD⁺, FAD, heme, Cu, Fe and other transition metals) for redox activity. In contrast, for other proteins, amino acids, mainly cysteines, are responsible for this property. Free cysteine possesses low reactivity to undergo redox transitions (Wood et al., 2003b). However, protein folding can generate environments in which cysteine residues are reactive. The reactivity of a sulfhydryl group is related to its pK_a, since its deprotonated form (thiolate = RS⁻) is more nucleophilic and reacts faster with oxidants than the protonated form (R-SH). The sulfhydryl groups of most cysteines (linked to a polypeptide backbone or free cysteine) possess low reactivity, which is related to the fact that their pK_a is around 8,5 (Benesch and Benesch, 1955). In contrast, some redox proteins possess a reactive cysteine that is stabilized in the thiolate form by a basic residue, in most cases a lysine or an arginine residue (Copley et al., 2004). In conclusion, reactive cysteines in proteins are kept in a reactive form (thiolate = RS⁻) by structural interactions with other amino acids. These reactive cysteines residues are compounds with very versatile redox chemistry because its sulfur atom can undergo redox transitions into any oxidation state between +6 and -2 (Jacob et al., 2003). Several proteins took advantage of this versatility to perform various biological functions as will be discussed below.

2. Roles of reactive cysteine in biology

2.1. Reduction of disulfide bonds

Many proteins with reactive cysteines are involved in controlling thiol/disulfide exchange reactions (Fig. 1A), a central theme in biology. Thiol/disulfide-exchange reactions are nucleophilic substitutions. A thiol or thiolate (RSH or RS⁻) acts as a nucleophilic agent on a disulfide bond (RS-SR). These reactions are, for example, used to form and reversibly destroy structural disulfides in proteins and peptides, to regulate enzyme activity and to maintain cellular redox balance. The rate of this reaction is dependent on the pK_a of the sulfhydryl compound that is the nucleophilic agent. The lower the pK_a, higher is the amount of deprotonated form of sulfhydryl group (thiolate) and faster are the reactions at physiological pH. The tri-peptide glutathione (γ-Glu-Cys-Gly, GSH) is the most abundant thiol in cells and is vital for the maintenance of the intracellular redox balance, among other functions (reviewed by Jacob et al., 2003). Glutathione is almost completely protonated at physiological pH because its pK_a is 9,2 (Jung et al., 1972) which disfavor its reaction with disulfides. However, it should be also considered that glutathione levels in cells are very high, which should favor disulfide reduction, since rate of a reaction depend also on the concentration of substrates.

Besides glutathione, thiol proteins such as thioredoxin, glutaredoxin (also known as thioltransferase) and protein disulfide isomerase are also involved in the regulation of the intracellular redox balance and, therefore, they are also known as thiol/disulfide oxido-reductases. Thioredoxin appears to be a very ancient protein since it is widespread among all the living organisms. These small proteins (12–13 kDa) possess disulfide reductase activity endowed by two vicinal cysteines present in a CXXC motif (typically CGPC), which are used to reduce target proteins that are recognized by other domains of thioredoxin polypeptide. The reduction of target proteins results in a disulfide bridge between the two cysteines from the thioredoxin CXXC motif, which is then reduced by thioredoxin reductase that utilizes reducing equivalents from NADPH. Some of the target proteins of thioredoxin include ribonucleotide reductase (important for DNA synthesis), methionine sulfoxide reductase, peroxiredoxins and transcription factors such as p53 and NF-κB (reviewed by Powis and Montfort, 2001).

Since thioredoxin plays multiple roles, it was surprising to observe that deletion of their genes in *Escherichia coli* resulted in a viable bacteria, capable to synthesize desoxyribonucleotides, among other processes. Holmgren (1976) showed that glutaredoxin was the backup for thioredoxin in the reduction of ribonucleotides. Like thioredoxin, glutaredoxin possess a CXXC motif in their active site (typically CPYC) and most of them are low molecular weight proteins (12–13 kDa). Glutaredoxin can also catalyze the reduction of disulfide bond in target proteins like thioredoxin through thiol/disulfide exchange reactions (Fig. 1A).

Furthermore, glutaredoxin also catalyzes the reduction of mixed disulfides with glutathione in a process that only the N-terminal cysteine thiolate participates (reviewed by Fernandes and Holmgren, 2004). Interestingly, some glutaredoxin isoforms possess only the N-terminal cysteine and are only capable to reduce mixed disulfides with glutathione. Thioredoxins reduce a wider range of disulfides in proteins than glutaredoxins, but cannot reduce mixed disulfides with glutathione. The disulfide form of glutaredoxin is reduced by glutathione, which is then reduced by NADPH in a reaction catalyzed by glutathione reductase.

The thioredoxin system (NAPDH+thioredoxin reductase+thioredoxin) and the glutathione system (NADPH+glutathione reductase+glutathione) are the major thiol dependent redox pathways present in the cells. Glutathione systems may or may not contain glutaredoxin, depending on the process considered. Several enzymes and other effectors can be reduced by both systems but many processes are reduced by either thioredoxin or by glutathione system. Interestingly, in platyhelminths, the thioredoxin and glutathione systems are linked in only one pathway. This worm possesses a seleno-cysteine containing enzyme named thioredoxin-glutathione reductase, which possess thioredoxin reductase, glutathione reductase and glutaredoxin activities (Sun et al., 2001).

The two electron redox potential of the cysteine/cystine couple in thiol/disulfide oxido-reductases is influenced by several factors. Thioredoxin and glutaredoxin are strong reducing agents and therefore possess a very negative redox

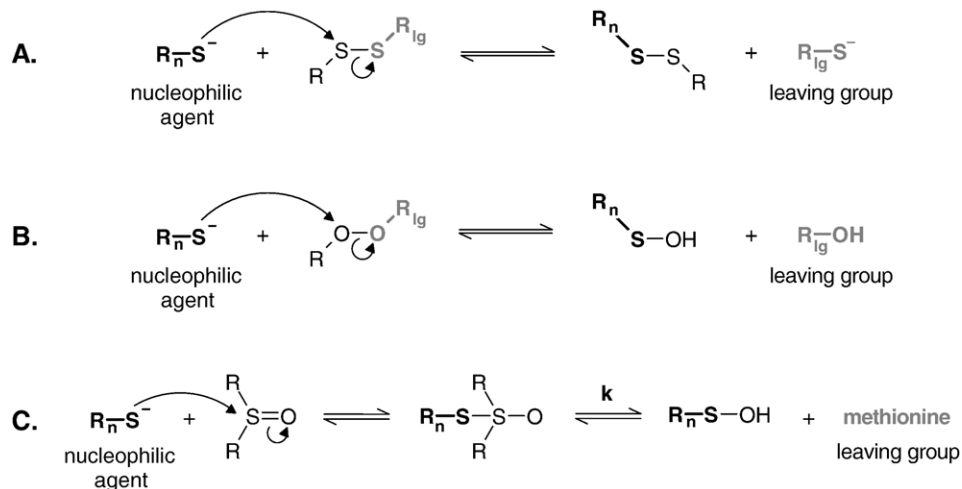


Fig. 1. Nucleophilic substitutions and reactive cysteines. (A) Thiol-disulfide exchange reaction. This reaction is faster when the sulfhydryl group is deprotonated (thiolate). Therefore, rate of this reaction is given by $V = k[R_n-S^-][RSSR_{lg}]$. The same rationale applies for the other reactions depicted here. (B) Peroxide reduction, resulting in a sulfenic acid derivative (Cys-SOH) and an alcohol corresponding to the peroxide. The sulfenic acid derivative can have different outcomes depending on the kind of peroxidoreductase considered (see Fig. 4) and on the environment where it is located. (C) Sulfoxide reduction, resulting in methionine regeneration and sulfenic acid formation in methionine sulfoxide reductase, which is reduced back to its sulfhydryl from by thioredoxin (reviewed by Weissbach et al., 2002). Abbreviations: lg = leaving group; n = nucleophilic agent.

potential. In contrast, protein disulfide isomerases (PDI) and DbsAs (bacterial PDI counterparts) possess much lower negative potentials (Table 1). Therefore reduction potential of the best oxidant (DsbA) is 146 mV higher than the best reductant (thioredoxin), corresponding to a ratio of 105 in thermodynamic stability of the dithiol/disulfide equilibrium (Xiao et al., 2005). This diversity in potentials reflects the biological roles of these thiol proteins. Thioredoxins and glutaredoxins preferentially reduce disulfide bridges, whereas protein disulfide isomerase and DbsAs preferentially generate disulfide bonds in proteins (Jacob et al., 2003).

It is interestingly to observe that in spite of these great differences in redox properties all these oxido-reductases share several similarities: (1) S γ atom is mostly deprotonated in N-terminal cysteine residue of the CXXC motif at physiological conditions. Therefore, the most N-terminal cysteine is more

nucleophilic and more exposed than the second cysteine. The most C-terminal cysteine is usually protonated and more buried in the polypeptide chain; (2) global fold of five stranded β -sheet flanked by four helices, the so-called thioredoxin fold (Fig. 2A); (3) the active site that contains the CXXC motif is located on a surface loop at the end of strand β 2 and followed by a long α -helix (Fig. 2A).

Several reasons have been raised to explain this variation of the reducing capabilities, such as the composition of the amino acids in the CXXC motif (Table 1), network of charged amino acids and structural factors, such as the dipole property of the α -helix where the buried cysteine is located (reviewed by Carvalho et al., 2006). These different redox properties among thiol/disulfide oxido-reductases appear not to be related with the stability of the disulfide bonds, since their lengths are very similar among these proteins (reviewed by Carvalho et al., 2006). In any case, for all of these enzymes, the pK_a of the reactive cysteine is considerably lower than the pK_a of free cysteine (Table 1), but the mechanism by which the thiolate is stabilized varies.

The stabilization of the thiolate anion in thioredoxin is relatively well characterized and was taken as an example for thiol/disulfide oxido-reductases. It depends on: (i) a network of charged residues, especially on specific aspartate and lysine residues (Fig. 2B); (ii) dipole character of the α -helix where the C-terminal cysteine is located and (iii) hydrogen bonding between the reactive and the C-terminal cysteine residues (reviewed by Carvalho et al., 2006).

Interestingly, mutations of Asp26 and Lys57 of thioredoxin affect only the pK_a of the active site thiol, but not the structure of the protein (Dyson et al., 1997). For the other oxido-reductases the network of charged residues is different and involves Glu 30 for PDI (PDB ID=1MEK), Glu 24 for DsbA (PDB ID=1A23) and Glu30, Asg26 and Lys27 for glutaredoxin (PDB ID=1KTE).

Table 1
Properties of Thiol/disulfide oxido-reductases

Oxido-reductase	Motif in active site	Redox Potential (E ^o , mV)	pK _a
Thioredoxin	Cys-Gly-Pro-Cys	-270 ^a	6.3–7.5 ^f
Glutaredoxin	Cys-Pro-Tyr-Cys	-198 to -233 ^b	3.5–3.8 ^g
Tryparedoxin	Cys-Pro-Pro-Cys	-249 ^c	7.2 ^h
Protein Disulfide Isomerase (PDI)	Cys-Gly-His-Cys	-127 ^d	3.5–6.7 ⁱ
DbsA	Cys-Pro-His-Cys	-125 ^e	3.5 ^j

^a — Miranda-Vizuete et al. (1997), Nishinaka et al. (2001). ^b — Aslund et al. (1997). ^c — Reckenfelderbaumer et al. (2002). ^d — Lundstrom and Holmgren (1993). ^e — Collet and Bardwell (2002). ^f — Holmgren (1972), Kallis and Holmgren (1980), Reutimann et al. (1981), Dyson et al. (1997), Li et al. (1993), Chivers et al. (1997), Dillet et al. (1998), Vohnik et al. (1998). ^g — Gan et al. (1990), Yang and Wells (1991), Mielal et al. (1991), Jao et al. (2006). ^h — Reckenfelderbaumer and Krauth-Siegel (2002); ⁱ — Darby and Creighton (1995), Hawkins and Freedman (1991); ^j — Nelson and Creighton (1994), Gauschopf et al. (1995).

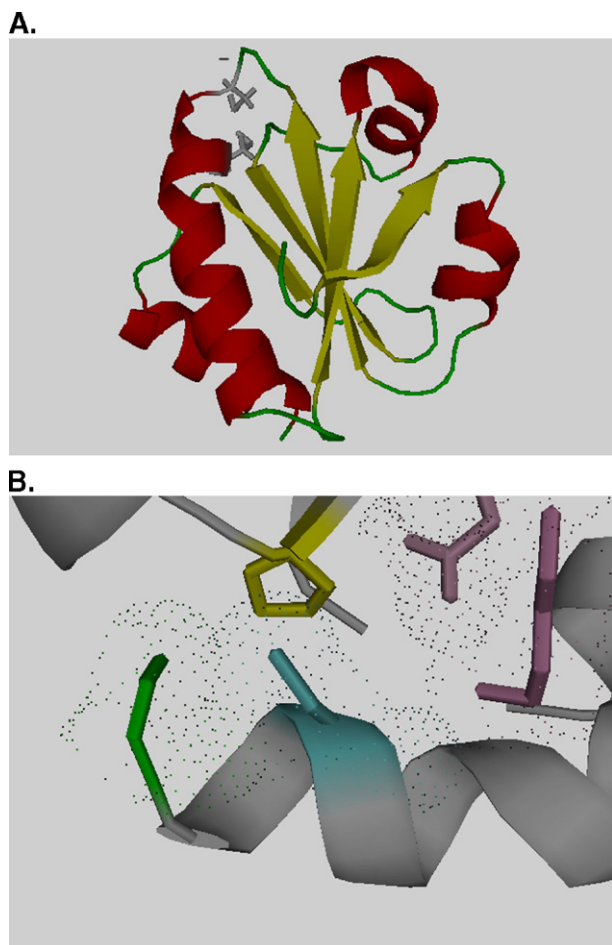


Fig. 2. Structural characteristics of thiol/disulfide oxidoreductases. Thioredoxin from *Escherichia coli* (PDB ID = 1XOB) was chosen as a model to describe several features common to thiol/disulfide oxidoreductases. (A) General view of thioredoxin fold: β -sheet composed of five strands (yellow) flanked by four α -helices (red). Both main and side chains of the two cysteine residues belonging to the CXXC motif are showed (gray). The reactive cysteine (Cys 32) is the most exposed one. (B) View of the active site, showing the network of amino acids involved in the stabilization of reactive cysteine in the thiolate form. Residues involved in the network of charged amino acids are represented with colors and with dots representing their electronic densities (Asp 26 — magenta, Cys 32 — green, Cys 35 — cyan, Lys 57 — magenta). Pro76 (yellow) is not involved in the network of charged residues that stabilize the thiolate form of reactive cysteine, but its main and side chains are shown here because this residue plays a central role in the recognition of thioredoxin substrates. Figures were generated by the Pymol software (www.pymol.org). (For interpretation of the reference to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

We are interested in the functional and structural characterization of proteins belonging to thioredoxin and glutathione systems from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In this regard, we solved the structure of thioredoxin reductase I (Oliveira et al., 2005) and preliminary data indicated that the two thioredoxin systems are not completely redundant.

2.2. Formation of disulfide bonds

The formation of disulfide bonds stabilizes the most active conformation of proteins that will be secreted. One would

expect that PDI and DsbA would be more suitable to catalyze the formation of disulfide bond given their reduction potential (Table 1). In fact, the search for the enzymatic catalyst of oxidative folding led to isolation of PDI (Goldberger et al., 1963). PDI can catalyze the formation, reduction or isomerization of disulfide bonds depending on the redox conditions of the assay and on the nature of the substrate protein. However, the environment in which PDI is found (endoplasmic reticulum), favors only the formation and isomerization of disulfide bonds. Both, the formation of disulfide bond and isomerase activities occur by thiol/disulfide exchange reactions (Fig. 1A). Like thioredoxins and glutaredoxins, the ability of PDI to catalyze thiol/disulfide exchange reactions is given by a CXXC motif (typically CGHC) among other factors (Aslund et al., 1997). When the cysteines in the active site are present in the disulfide form, PDI can directly oxidize thiol groups of target proteins into disulfide bridges (dithiol oxidase activity). In contrast, the isomerase activity of PDI relies on the dithiol (reduced) configuration state of the active site cysteines, suitable for disulfide reshuffling (reviewed by Frand et al., 2000).

In spite of the different redox properties among all these oxido-reductases, they can catalyze both reduction and formation of disulfide bonds *in vitro*, depending on the experimental conditions. In fact, Grx1 from *E. coli* is even more efficient than PDI to catalyze disulfide bond formation (Xiao et al., 2005), indicating that kinetic parameters should also to be taken into account. Therefore, it is important to consider the environment in which the thiol oxido-reductase is located to analyze its function. In eukaryotic cells, protein disulfide bond formation takes place within the lumen of the endoplasmic reticulum. Proteins that will be secreted to the extracellular space are processed inside this organelle. The redox state of the endoplasmic reticulum is more oxidizing than that of cytosol, a difference that favors the formation of disulfide bonds, which is important to maintain the structure of the exported protein in the harsh extracellular environment. The major redox buffer in the cytosol as well as in the lumen of ER is the couple GSH/GSSG. However, GSH/GSSG ratios are quite different: 1:1 to 3:1 for the lumen of endoplasmic reticulum and 30:1 to 100:1 for the cytosol and mitochondrial matrix. Therefore, the ability of thioredoxin and glutaredoxin to catalyze reduction of disulfide bond in protein and of PDI to catalyze the reverse process is consequence of several factors such as redox potentials of vicinal sulfhydryl groups in these proteins and redox balance of the environment.

2.3. Protein *S*-glutathionylation

Another thiol/disulfide exchange process that deserves special consideration here is *S*-glutathionylation of cysteine residues in proteins. In resting state, levels of *S*-glutathionylated proteins in cells are around 1%, but upon oxidative stress a significant increase is observed. Therefore, initially, the meaning of the *S*-glutathionylation was thought to be the protection of cysteine residues against overoxidation to sulfinic (RSO₂H) or sulfonic (RSO₃H) acids, which can lead to protein inactivation

(Thomas et al., 1995). Later, it was shown that for some enzymes, protein *S*-glutathionylation affects enzyme activities, suggesting a regulatory role for this process (Chrestensen et al., 2000; Davis et al., 1997; Demasi et al., 2003). If *S*-glutathionylation is in fact a regulatory event, it is expected the occurrence of proteins capable to catalyze the addition and removal of glutathione from target proteins. Glutaredoxins, especially those containing only one cysteine in their active site, have been most frequently implied as dethiolases (Molina et al., 2004). The yeast *S. cerevisiae* has five glutaredoxins, three monothiolic and two dithiolic, distributed in different compartments and performing similar, but not completely redundant roles (Wheeler and Grant, 2004). We have recently solved the crystal structure of glutaredoxin 2 (Discola et al., 2005) and unpublished results have demonstrated its role on the removal of GSH from *S*-glutathionylated 20S proteasome extracted from yeast cells. We hope that with the elucidation of glutaredoxin 2 structure it will be possible to obtain insights into the mechanisms by which this thiol/disulfide oxidoreductase act as a dethiolase in the yeast *S. cerevisiae*.

2.4. Antioxidant defense

Proteins with reactive cysteine considered so far, catalyze thiol/disulfide exchange reactions. In contrast, thiol-dependent peroxidases have evolved the ability to cleave a peroxide bond that is a more difficult process than the reduction of a disulfide bond (Fig. 1B). Copley et al. (2004) elegantly hypothesized that peroxidoredoxins, a class of thiol-dependent peroxidases, present

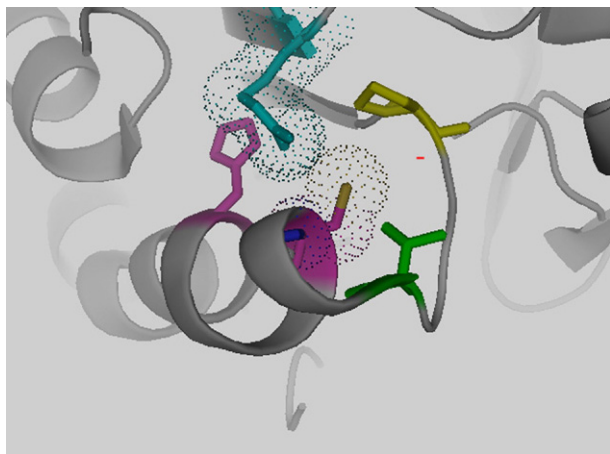


Fig. 3. Structure of peroxidoredoxin active site. Reactive cysteine in peroxidoredoxins corresponds to the C-terminal cysteine of CXXC motifs in thioredoxins (Copley et al., 2004). Therefore, they are located in an α -helix as the C-terminal cysteine of thioredoxin is. Structure of human peroxidoredoxin 5 (PDB ID = 1HD2) is shown as an example. Electronic density of arginine residue (Arg127) involved in the stabilization of the thiolate is represented with dots, as well as reactive cysteine (Cys47). Thiolate function (RS^-) of Cys 47 is brown. Main and side chains of a threonine residue (Thr44 that corresponds to the N-terminal cysteine in thioredoxin) that plays a role in stabilization of thiolate is shown in green, as well as the chains of Pro 40 (yellow) that is involved in protection of peroxidoredoxin from overoxidation. Finally, main and side chains of histidine 51 (purple), forming a salt bridge with Arg 127 (cyan) is also shown here. Figure was generated by the Pymol software (www.pymol.org). (For interpretation of the reference to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

several amino acids substitutions from the more ancient thiol/disulfide oxidoreductases, which make them capable to reduce OO bonds through a reactive cysteine.

Both hydrogen and organic hydroperoxides can be decomposed by peroxidoredoxins and in most of cases they utilize reductive equivalents from thioredoxins (Netto et al., 1996). Therefore, the majority of peroxidoredoxins are also called thioredoxin peroxidases. Recently, it was shown that some peroxidoredoxins can also decompose peroxynitrite (Bryk et al., 2000; Dubuisson et al., 2004; Trujillo et al., 2004; Wong et al., 2002). These reactions catalyzed by peroxidoredoxins have been implied in both peroxide detoxification and cellular signaling as will be discussed below. Like other thiol/disulfide oxidoreductases, peroxidoredoxins are widespread in nature and are found in several cell compartments such as cytosol, mitochondria, nucleus and chloroplast (Rhee et al., 2005a).

As described for the thiol/disulfide oxidoreductases, the high reactivity of the active site cysteine in peroxidoredoxins is related to the fact that the thiol group of this residue possesses very low pK_a . In the case of peroxidoredoxins, the presence of a guanidine group from a fully conserved arginine residue (Wood et al., 2003b) is a key factor for the stabilization of the thiolate. Interestingly, the reactive cysteine from peroxidoredoxins is homologous to the C-terminal cysteine of the CXXC motif in oxidoreductases, which is not the most nucleophilic. The reactive cysteine (the most N-terminal and most solvent exposed seen in Fig. 2) in oxidoreductases was replaced by a threonine residue in peroxidoredoxins and the other cysteine acquired high nucleophilicity due to several structural features and amino acids interactions, such as the hydrogen bonding with an arginine residue mentioned above (Fig. 3).

Other peroxide-removing enzymes evolved other strategies to decompose peroxides. Catalase and mammalian glutathione peroxidase utilize heme or seleno-cysteine to decompose peroxides, whereas peroxidoredoxins have a very reactive cysteine in their active site. Initially, these differences in the active sites was thought to reflect the fact that peroxidoredoxins would have moderate catalytic efficiency ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), (Hofmann et al., 2002) when compared with catalases ($\sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Hillar et al., 2000) and glutathione peroxidases ($\sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Hofmann et al., 2002). Recently, however, some reports have described higher rate constants (10^6 – $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) for the reaction of reduced peroxidoredoxins with different kinds of peroxides (Akerman and Muller, 2005; Baker and Poole, 2003; Dubuisson et al., 2004; Parsonage et al., 2005). In any case, it is important to emphasize that peroxidoredoxins are abundant in aerobic cells. For example: (i) peroxidoredoxins are among the ten most abundant proteins in *E. coli* (Link et al., 1997); (ii) peroxidoredoxins are the second or third most abundant protein in erythrocytes (Moore et al., 1991) and (iii) compose 0.1–0.8% of the soluble proteins in other mammalian cells (Chae et al., 1999). Furthermore, it was demonstrated that peroxidoredoxin, but not catalase, was responsible for protection of bacteria against endogenously generated hydrogen peroxide (Costa Seaver and Imlay, 2001).

There are several kinds of peroxidoredoxins and several classifications were proposed based on different criteria.

Generally, every aerobic cell possesses several different kinds of peroxidoredoxins. The most frequently used criteria for classification is the presence or absence of additional conserved cysteines (Wood et al., 2003b). Peroxidoredoxins that contain two conserved cysteines are called 2-Cys Prx, whereas those that possess only one conserved cysteine are referred as 1-Cys Prx. In both cases, the reactive cysteine attacks the hydroperoxide and is oxidized to sulfenic acid (Cys-SOH), while the corresponding alcohol is released (Fig. 4). Because the reactive cysteine is the one that directly interact with peroxides it is called peroxidatic cysteine and is located at the N-terminal part of the protein. Three peroxidoredoxin classes can be recognized based on the next step of the catalytic cycle (1-Cys Prx; typical 2-Cys Prx and atypical 2-Cys Prx). The 1-Cys Prx presents the simplest mechanism: they are oxidized to a stable sulfenic acid and then reduced back by a reductant. The biological electron donors of most 1-Cys Prx are still unknown. One exception is the 1-Cys Prx from yeast, whose electron donor is mitochondrial thioredoxin (Pedrajas et al., 2000). Furthermore, mammalian 1-Cys Prx can form heterodimer complexes with

Glutathione *S*-transferase π , being capable to accept electrons from glutathione (Ralat et al., 2006).

The enzymatic mechanism of 2-Cys Prx differs from the 1-Cys Prx's mechanism because these proteins have a second conserved cysteine, also called resolving cysteine, which is also involved in the catalytic cycle. The sulfenic acid formed in the peroxidatic cysteine reacts with the resolving cysteine of other protein, generating an intermolecular disulfide bridge. In the case of atypical 2-Cys Prx, the resolving cysteine belongs to the same polypeptide backbone of the peroxidatic cysteine, therefore an intramolecular disulfide bond is generated. For the majority of the typical and atypical 2-Cys Prx proteins, disulfide bonds are reduced by thioredoxins (Fig. 4).

Alternatively, peroxidoredoxins can be classified according to their amino acid sequence, which is very variable among five different groups (Trivelli et al., 2003). In spite of the fact that peroxidoredoxins groups share very low amino acid sequence similarity, they have residues that are very conserved among all members (Wood et al., 2003b): (1) A proline that limits solvent and peroxide access in the active site and therefore probably

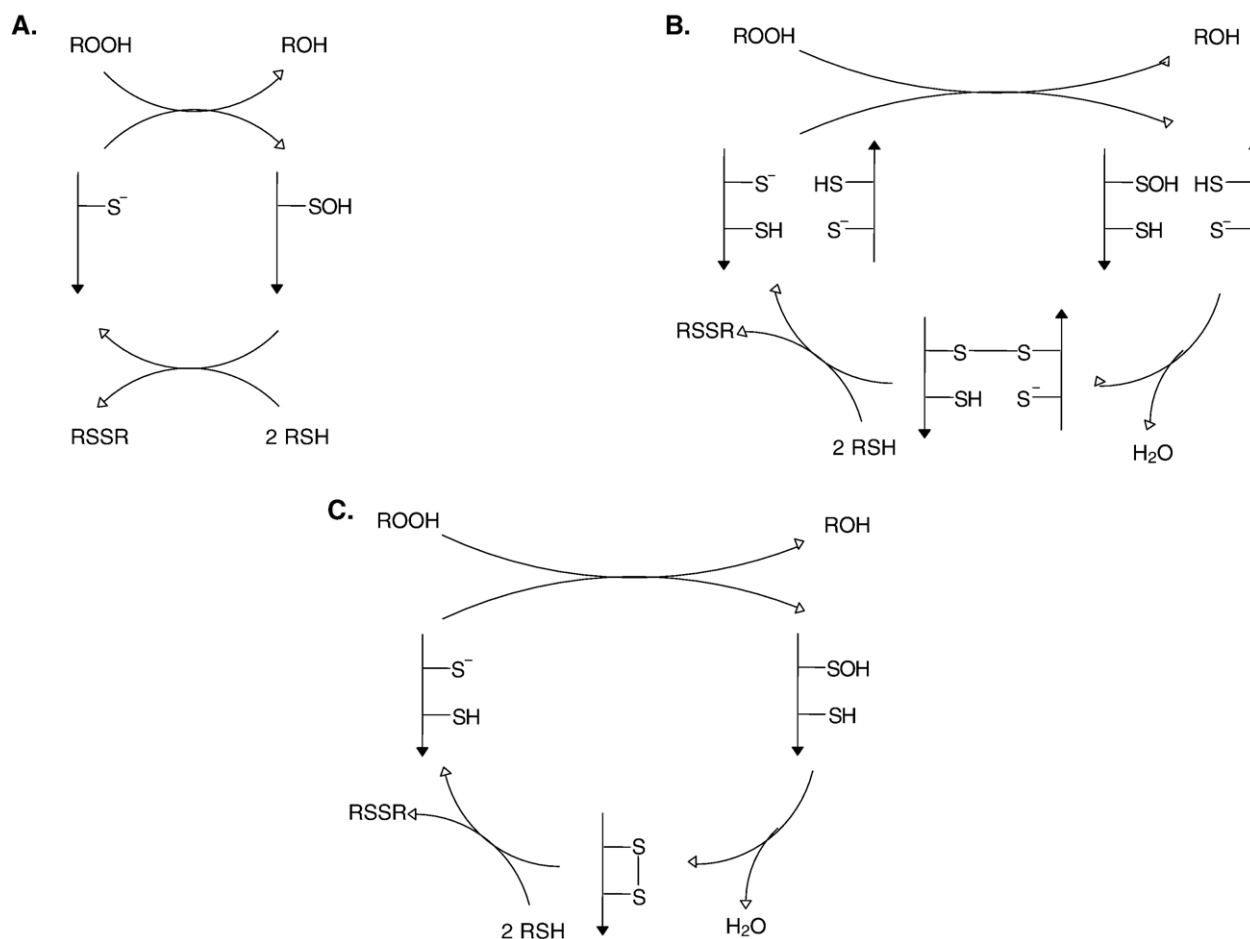


Fig. 4. Catalytic mechanism of Prxs. As described in Fig. 1B reduction of peroxides by reactive cysteines generated a sulfenic acid derivative in all kinds of peroxidoredoxins. (A) In 1-Cys peroxidoredoxins the sulfenic acid derivative is stabilized by the polypeptide backbone and is directly reduced by a thiol reductant. (B) In typical 2-Cys peroxidoredoxins, the sulfenic acid interacts with another thiol group from other subunit, generating an intermolecular disulfide bond, which is then reduced by a biological substrate, in most cases thioredoxin. (C) In atypical 2-Cys peroxidoredoxins, the catalytic mechanism is very similar to 2-Cys typical, with the exception that an intramolecular disulfide bond is formed.

shields the cysteine sulfenic acid from overoxidation; (2) an arginine residue that is involved in the stabilization of peroxidatic cysteine in the thiolate form and (3) an threonine residue that also interacts with the sulfur atom of peroxidatic cysteine (Fig. 3). Besides these similarities, all peroxiredoxins possess a common structural feature: the thioredoxin fold, which was described before. Interestingly, all other thiol/disulfide oxido-reductases presented here (thioredoxin, glutaredoxin and protein disulfide isomerase) also possess the thioredoxin fold (Fig. 2A). Differently than the thiol/disulfide oxido-reductases, peroxiredoxins contain central insertions, N-terminal and C-terminal expansions to the thioredoxin fold that are different for different groups of these thiol dependent peroxidases. Due to these structural similarities and through a motif analysis, it was proposed that all these thiol proteins might have a common ancestor (Copley et al., 2004).

The yeast *S. cerevisiae*, which has been used as model for higher eukaryotes, possesses five peroxiredoxins belonging to four different sub-groups (Park et al., 2000). Our studies have demonstrated that although all five yeast peroxiredoxins have the same biochemical activity (thioredoxin dependent peroxidase); their cellular functions are not completely redundant. For example, cytosolic thioredoxin peroxidase I (Tsa1/YML028W) is specifically important for the defense of yeast with dysfunctional mitochondria (Demasi et al., 2001; Demasi et al., 2006), whereas mitochondrial thioredoxin peroxidase I (PrxI/YBL064C) is more important in conditions where yeast obtain ATP preferentially by respiration (Monteiro et al., 2002; Monteiro and Netto, 2004). Finally, cytosolic thioredoxin peroxidase II (cTPxII/Tsa2/YDR453C) appears to be an important backup for cTPxI for the defense against organic peroxides, independently of the functional state of mitochondria (Munhoz and Netto, 2004). Interestingly, mitochondria are protected not only by the mitochondrial isoform (PrxI/YBL064C) but also by cytosolic isoforms and in cooperation with mitochondrial pool of glutathione against Ca^{2+} induced stress (Monteiro et al., 2004). This partial redundancy observed among yeast peroxiredoxins probably parallels the roles that these peroxidases play in mammalian cells.

Recently, a new kind of peroxidase that also operates through a reactive cysteine was described (Lesniak et al., 2002; Cussiol et al., 2003). Initially, it was demonstrated that the deletion of genes encoding these peroxidases rendered *Xanthomonas campestris* specifically sensitive to organic peroxides, but not to hydrogen peroxide (Mongkolsuk et al., 1998). Therefore, this gene was named organic hydroperoxide resistance (Ohr) and was later shown to be exclusively present in bacteria, most of them pathogenic. Interestingly, only dithiols support the peroxidase activity of Ohr and it is considerably more efficient in the removal of organic peroxides than in the decomposition of hydrogen peroxide (Cussiol et al., 2003). It was noteworthy to observe that differently than other thiol-dependent peroxidases (glutathione peroxidases and peroxiredoxins), Ohr does not possess the thioredoxin fold. Instead, Ohr is a dimer composed of two six-strand β -sheet and two central α -helices (Lesniak et al., 2002; Meunier-Jamin et al., 2004; Oliveira et al., 2006). Contrary to the other thiol/disulfide oxido-reductases

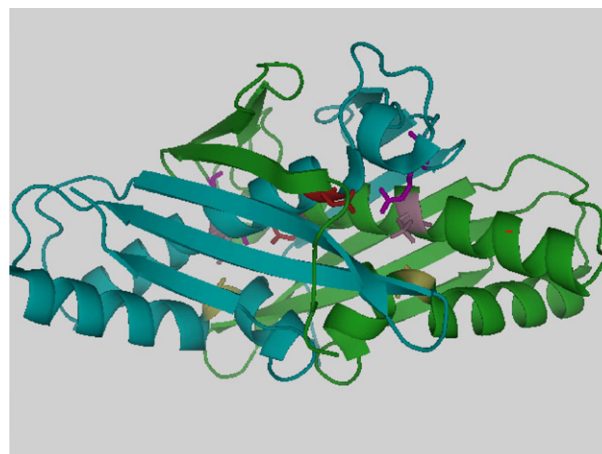


Fig. 5. Ohr structure with hidden cysteines residues. Overall view of *Xylella fastidiosa* quaternary structure (PDB = 1ZB9). Contrary to peroxiredoxins and thiol/disulfide oxido-reductases, reactive cysteine (Cys61 in pink) is buried in the polypeptide backbone (two β -sheet composed of six strands). The side chain of Arg 19 (magenta) that is involved in the stabilization of thiolate form of Cys 61 and Glu51 (red) that forms a salt bridge with Arg19 are also shown in dark color. Cys 125 (in yellow), involved in the formation of an intramolecular disulfide bond, is also represented with black color. Figure was generated by the Pymol software (www.pymol.org). (For interpretation of the reference to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

and peroxidases described so far, the reactive cysteine is located in a very hydrophobic environment (Fig. 5). Due to these differences and because Ohr are exclusively present in bacteria, these peroxidases might represent interesting targets for drug design.

Finally, antioxidant proteins also make use of reactive cysteine to repair oxidative damage. Methionine sulfoxide reductase has a reactive cysteine capable to cleave an $\text{S}=\text{O}$ bond, also by a nucleophilic substitution mechanism (Weissbach et al., 2002), (Fig. 1C).

2.5. Redox signalling

Since reactive cysteines can decompose peroxides yielding products that can be reduced back to the sulfhydryl form, several proteins containing this kind of residues are in principle adapted to participate in redox signaling mediated by hydrogen peroxide. Although hydrogen peroxide has been classically associated with oxidative stress, there is a growing amount of evidences about the role of this mild oxidant as a cell messenger (Rhee et al., 2005b). Hydrogen peroxide can cross membranes and is relatively stable, two features suitable for a cell messenger in analogy to nitric oxide (Stone, 2004). This idea was strengthened by the discovery that non-phagocytic cells also possess NADPH oxidase, a source for hydrogen peroxide (Bokoch and Knaus, 2003). In fact, there are numerous reports about the effect of hydrogen peroxide in terms of both cellular responses and signaling pathways activated (reviewed by Stone, 2004).

The best characterized mediator of peroxide induced stress is OxyR, a transcription activator found only in bacteria. Genes regulated by OxyR includes enzymes involved in peroxide

decomposition (catalase, peroxiredoxin, thioredoxin, glutathione reductase and glutaredoxin) and cell signaling (small RNA molecule). The mechanism by which OxyR senses H_2O_2 involves a reactive cysteine that once again is stabilized in the thiolate form by a conserved arginine among other amino acids (Choi et al., 2001). The oxidation of this cysteine generates a disulfide bond that causes a conformational change in the protein. Both the oxidized and reduced forms of OxyR can bind DNA, but only the oxidized form is capable to recognize specific elements in the promoters of target genes and activate their transcription (Fig. 6A). The reactive cysteine of OxyR possesses a relatively high rate constant ($2 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, see Aslund et al., 1999) and can activate transcription when intracellular concentrations of hydrogen peroxide are as little as 100 nM (Costa Seaver and Imlay, 2001). The activation of OxyR is reversed by reduction of reactive cysteine by GSH and glutaredoxin 1 (Fig. 6).

Response of bacteria to oxidative stress is mediated by other transcriptional regulators besides OxyR. OhrR is a transcriptional repressor that is also capable to sense peroxides through a reactive cysteine (Mongkolsuk and Helmann, 2002). The only one known target of OhrR so far described is Ohr that is specifically induced by organic peroxides, the preferable substrate of this dithiol-dependent peroxidase. Therefore, Ohr/OhrR is a pathway specifically involved in the oxidative stress response to organic, but not to hydrogen peroxide (Klomsiri et al., 2005). In vitro, reduced OhrR binds tightly to its target DNA and therefore blocks the transcription of *ohr* (Fuangthong et al., 2001). Oxidation of a conserved and reactive cysteine in OhrR by peroxides leads to derepression of *ohr* transcription, which is reversed by a reducing agent such as DTT. Differently than OxyR, OhrR is oxidized to a sulfenic acid (CysSOH) instead of a disulfide (Fuangthong and Helmann, 2002).

Another transcriptional repressor of bacteria that was implied in peroxide sensing in bacteria through reactive cysteines is PerR (Mongkolsuk and Helmann, 2002). PerR belongs to a family of transcriptional regulators that are dimeric proteins and

that contain two metal sites per monomer. One binds zinc and appears to play mainly structural roles, whereas the second site can bind both iron and manganese and has a regulatory role. PerR complexed with either Mn^{+2} or Fe^{+2} can bind DNA and repress transcription of its target genes such as catalase and peroxiredoxin. However, only when PerR is complexed with Fe^{+2} there is derepression of gene expression and lack of DNA binding ability (Herbig and Helmann, 2001). Because DNA binding of PerR is restored by thiol reductants and because PerR has a CXXC motif, it was proposed that peroxide sensing might involve a reactive cysteine being oxidized to a disulfide bond. Very recently, however, the same group has shown that PerR senses hydrogen peroxide by a Fenton-like reaction mediated by Fe^{+2} complexed with histidines. This process provokes oxidation of histidine residues (His37 and His91) to 2-oxo-histidines. This is the first description of a metal catalyzed protein oxidation process involved with redox signaling (Lee and Helmann, 2006).

Besides transcriptional regulators, bacteria also possess a chaperone (Hsp33), whose activity is redox regulated through reduction/oxidation cycles that involve a reactive cysteine (Janda et al., 2004). In this case, cysteines residues in the reduced state can bind zinc but after oxidation to disulfide bonds, Hsp33 loses this ability but acquires high affinity for unfolded proteins (chaperone holdase activity). Thioredoxin (or glutaredoxin) can then reduce the reactive cysteine of Hsp33, restoring its ability to bind zinc. This ensures that proteins with transient exposed hydrophobic surfaces do not form insoluble aggregates. Upon return to non stress conditions other chaperone systems are available to interact with the partially unfolded proteins released by Hsp33 (reviewed by Winter and Jakob, 2004). Interestingly, Hsp33 appears to be active in severe oxidative stress, condition in which other chaperones are inactive (Winter et al., 2005).

Another level of regulation was possible in eukaryotes with the appearance of cellular compartments. In fact, the control of a transcriptional regulator's activity by regulated nuclear

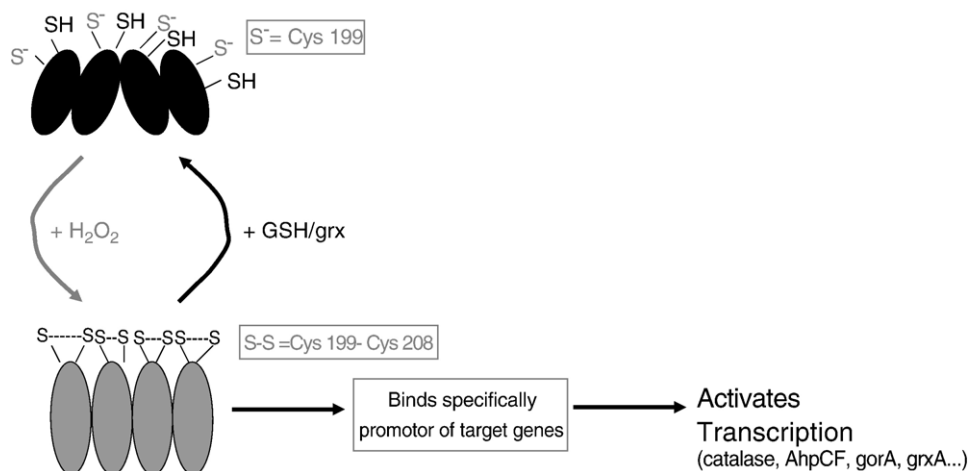


Fig. 6. Redox regulation by OxyR. Each OxyR subunit is represented here by an elliptical symbol. The darker symbols represent the reduced tetramer and the lighter the oxidized (disulfide) tetramer that assumes different conformations. Only the oxidized form is capable to recognize specific sequences (elements) repeated four times in the promoters of target genes and as a consequence stimulate their transcription.

accumulation is a common theme in biology. Therefore, the higher the amount of a transcriptional regulator in the nucleus, the higher is its activity (repression or induction of gene expression). The best characterized mechanism of a redox signaling process in an eukaryotic cell through a reactive cysteine is that mediated by Yap1 (reviewed by Paget and Buttner, 2003). Yap1 belongs to the AP-1 family of proteins that includes the proto-oncogenes Jun and Fos, all of them possessing a Leu zipper involved in the dimerization of these proteins (Fig. 7A). Yap1 also possesses a nuclear export signal (NES) that in basal conditions is recognized by Crm1 that then transport this transcriptional activator from the nucleus to the cytosol (Fig. 7B i). Therefore, in basal conditions Yap1 is preferentially located in the cytosol, does not interact with target promoters and consequently does not induce gene expression. Upon oxidation, Yap1 cysteine residues are oxidized and NES adopt a different conformation, not recognizable by Crm1. Therefore, Yap1 accumulates in the nucleus, being capable to physically interact with target promoters.

Yap1 can be oxidized into two products: (1) a disulfide between cysteines residues of the C-terminal cysteine rich domain (Fig. 7B ii) or (2) a disulfide between one cysteine

of the N-terminal and the other of the C-terminal rich domain (Fig. 7B v). Mode (1) of Yap1 oxidation is the simplest and is mediated by thiol oxidizing agents such as diamide (Fig. 7B ii). The mode (2) is a pathway that involves other proteins besides Yap1. In this case, the oxidant is a peroxide molecule that is sensed by a protein, homologous to the selenium-dependent glutathione peroxidase (Gpx3/Orp1) from mammalian cells (Delaunay et al., 2002). Gpx3/Orp1 is oxidized to a sulfenic acid derivative (Fig. 7B iii), which condenses with a reactive cysteine of Yap1, generating a mixed disulfide bond (Fig. 7B iv). Finally a thiolate group from the N-terminal cysteine rich domain attacks the mixed disulfide, generating an intra-molecular disulfide bond in Yap1, which is not recognized by Crm1 and accumulates in the nucleus (Fig. 7B v). Besides Yap1, other transcriptional regulators are involved in the response of yeast to oxidative stress which is a very complex phenomenon. As an example, the regulation of mitochondrial thioredoxin peroxidase I involves Hap1 (YLR256W), Msn2/4 (YMR037C/YKL062W) and Yap1 among other regulators (Monteiro et al., 2002; Monteiro and Netto, 2004).

The mechanisms by which hydrogen peroxide is sensed in mammalian cells are much more controversial. Much attention

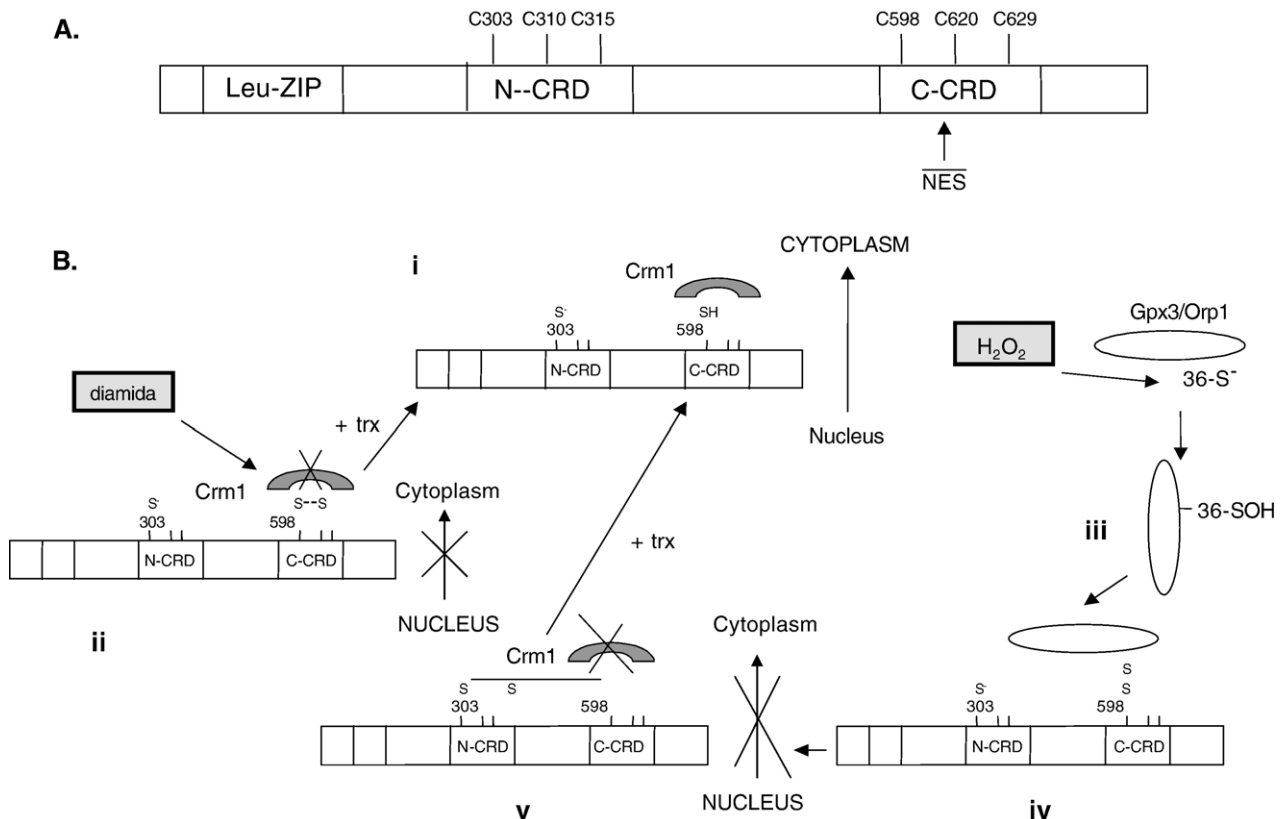


Fig. 7. Yap1 activation by nuclear accumulation dependent on oxidation. (A) Yap1 domains. Leu-ZIP = leucine rich domain; N-CRD = N-terminal cysteine rich domain; C-CRD = C-terminal cysteine rich domain. NES= Nuclear Export Signal. (B) The names of cellular compartments with capital letters indicate the location where Yap1 accumulates. The arrow represents exportation of Yap1 out of the nucleus and the symbols of arrows with an axis represent inhibition of this process by oxidation of Yap1 cysteines. (i) Yap1 in the ground state is reduced and, therefore, its NES is recognized by Crm1, leading to its exportation out of the nucleus. (ii) Thiols oxidizing agents, such as diamide, oxidize thiolate groups of the C-CRD, provoking inhibition of its exportation. After consumption of the oxidant, thioredoxin can reduce Yap1 back to the reduced state (i). (iii) Gpx3/Orp1 is oxidized by peroxide, generating a sulfenic acid derivative. (iv) Sulfenic acid form of Gpx3/Orp1 condenses with a thiolate group from C-CRD generating a mixed disulfide bridge, which is attacked by a thiolate from N-CRD, generating an intra-molecular disulfide bridge between cysteines of different domains (v). After consumption of the peroxide this disulfide can be reduced back to the ground state (i).

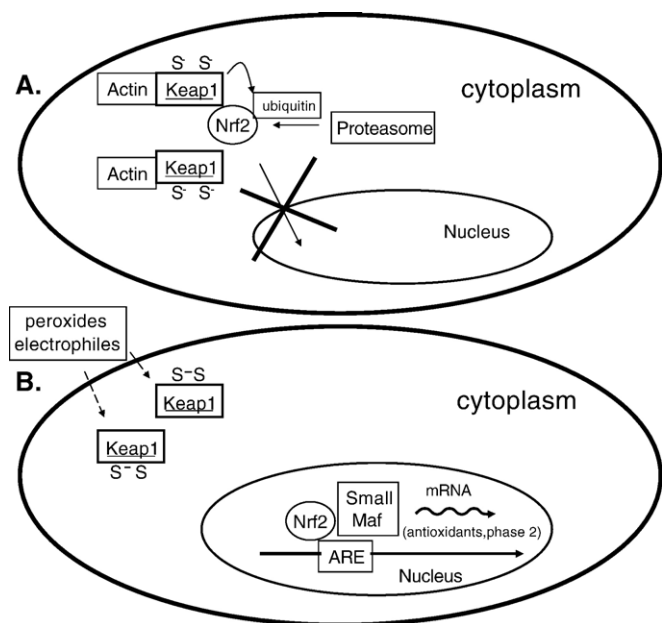


Fig. 8. Nrf2 activation by nuclear accumulation dependent on oxidation of Keap1. (A) Under basal conditions, Keap1 is in the reduced state and sequester Nrf2 in the cytoplasm. Keap1 is also connected to the cell cytoskeleton. In this condition, Keap1 also induces ubiquitination of Nrf2 that is then degraded by proteasome. (B) Under oxidative stress, thiolate groups of Keap1 are oxidized, leading to Nrf2 release that can then accumulate in the nucleus and activate transcription in the target genes.

is given to protein tyrosine phosphatases (PTP) as biological sensors of hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide can react with cysteines from the active site of PTP, generating sulfenic acids, which was proposed to be a redox regulatory event (Lee et al., 1998). Later, two groups have shown independently that sulfenic acids in PTP are converted to sulfenyl-amide by reaction of sulfenic acids with backbone amide of a serine residue (Salmeen et al., 2003; Van Montfort et al., 2003). The sulfenyl-amide form of PTP is inactive; therefore this process should provoke an increase in the levels of tyrosine phosphorylation. As a consequence, PTP targets such as MAP kinases should be phosphorylated in higher levels. Besides sulfenyl-amides, reactive cysteines were also found in the sulfinate (RSO_2^-) and sulfonate (RSO_3^-) forms in the crystal structure of PTP, when these proteins were treated with large excess of hydrogen peroxide (Van Montfort et al., 2003). Contrary to the sulfinate and sulfonate forms, sulfenyl-amides can be reduced back by classical reductants such as DTT and thioredoxin (Salmeen et al., 2003; Van Montfort et al., 2003). Therefore, because their formation is reversible, sulfenyl-amides were proposed as an important step in the redox signaling by PTPs.

However, redox regulation by PTP is controversial, mainly because the reaction of these phosphatases with hydrogen peroxide is slow (reaction constant is around $10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), (Stone, 2004). Considering that intracellular concentration of hydrogen peroxide is in between 1 to 700 nM and that the levels of glutathione are around 1–10 mM, a target for redox regulation should react faster with this mild oxidant than PTP does. In fact, as mentioned before, one biological sensor of hydrogen peroxide in bacteria, the transcriptional factor OxyR

possesses a reaction constant of $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Aslund et al., 1999). OxyR, like other thiol proteins mentioned here, possesses a very reactive cysteine, which is deprotonated at physiological pH. Therefore, the hydrogen peroxide sensor in mammalian cells should be in principle a protein that possesses a reaction constant with hydrogen peroxide in this range.

Peroxiredoxins are good candidates as biological redox sensors in mammalian cell, since their reaction constants with hydrogen peroxide are around $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ or even higher (Akerman and Muller, 2005; Baker and Poole, 2003; Parsonage et al., 2005). In fact, there are many suggestions that peroxiredoxins could be the biological sensors of hydrogen peroxide (Wood et al., 2003a,b). In this regard, it was shown that bacterial 2-Cys Prx are one hundred times more resistant to hydrogen peroxide inactivation than some of their counterparts in eukaryotic cells (Wood et al., 2003a). In both cases, the inactivation by hydrogen peroxide occurs due to oxidation of sulfenic acid (Cys-SOH) in the reactive cysteine to sulfinic acid (Cys-SO₂H). Interestingly, the all 2-Cys Prx that are sensitive to inactivation possess two common motifs: GGLG and YF (Wood et al., 2003a). Therefore, it seems very probable that the high sensitivity of these peroxiredoxins to peroxide inactivation it is not a limitation in the mechanism of catalysis, but instead a property that was selected during evolution of eukaryotes (Wood et al., 2003a).

In support to this hypothesis, it was shown that sulfinic acids in 2-Cys Prx are reduced *in vivo* in sensitive 2-Cys Prx (Woo et al., 2003). This was a quite surprising result, since it is well established that sulfinic acids in peroxiredoxins and in any other protein are not reducible *in vitro* by classical reducing agents, such as DTT and thioredoxin. The enzymatic system responsible to regenerate sulfhydryl groups from sulfinic acids in 2-Cys Prx was first identified in the yeast *S. cerevisiae* and was named sulfiredoxin (Biteau et al., 2003). Sulfiredoxin is a low molecular weight protein (13 kDa) that possesses homologues in higher eukaryotes including human, but its physiological role was unknown. The proposed mechanism of catalysis involves phosphotransferase and thiol transferase activities through a reactive cysteine and it is dependent on ATP. The basis of this mechanism was confirmed by biochemical and crystallographic studies (Jonsson et al., 2005). Biteau et al. (2003) suggested that sulfinic acid formation in 2-Cys Prx could represent an additional level of redox regulation for peroxiredoxins. The sulfiredoxin homologue in mammalian cells was also identified and in this case it was shown that sulfinic acid regeneration is exclusive for 2-Cys Prx (Chang et al., 2004; Woo et al., 2005). Recently, Budanov et al. (2004) have shown that another class of proteins can also reduce sulfinic acids specifically of mammalian peroxiredoxins. Like sulfiredoxins, sestrin possesses a conserved cysteine that is responsible for the catalytic mechanism. Moreover, the reduction is also dependent on ATP. However, sestrins do not share homology with sulfiredoxins. Sestrin expression is regulated by p53 indicating that this process possesses high physiological relevance.

The importance of sulfinic acids generated in the peroxidic cysteines of 2-Cys Prx was further strengthened by the observation that peroxiredoxins from yeast also possess

chaperone activity. Interestingly, the chaperone activity is independent of peroxidatic and resolving cysteines. Both peroxides and high temperatures induce chaperone activity, which is dependent on the oligomerization of peroxiredoxin polypeptides. Remarkably, under oxidative and thermal stresses these protein form very high molecular weight complexes that can be visualized by electron microscopy. Therefore, peroxidatic cysteines of these yeast peroxiredoxins are important not only for the decomposition of peroxides but also to induce protein oligomerization and consequently chaperone activity. In fact, sulfinic acid formation was suggested as a trigger event for the formation of a superchaperone that possesses a molecular weight of more than 1000 kDa (Jang et al., 2004). This dual chaperone/peroxidase activities of yeast 2-Cys Prx was implied with the observation that it specifically protects cells with dysfunctional mitochondria from peroxide insult (Demasi et al., 2006). Recently, the chaperone activity was also described for peroxiredoxins from mammals and bacteria (Moon et al., 2005; Chuang et al., 2006).

The versatility of peroxiredoxin function can be further demonstrated by the observation that addition of single amino acid (Phe) close to the reactive cysteine converts a bacterial peroxiredoxin into a disulfide reductase (Ritz et al., 2001). This appears to be a relevant phenomenon, since bacteria lacking both thioredoxin reductase and glutathione reductase are viable only if cells possess peroxiredoxin with disulfide reductase activity (Ritz et al., 2001).

Recently, a novel redox mechanism for regulation of gene expression was demonstrated in mammals (Venugopal and Jaiswal, 1996; Itoh et al., 1997). As the redox regulation of Yap1 activity, the regulation of Nfr2, also a leucine zipper transcriptional activator, involves control of its nuclear localization. However, differently than Yap1, Nfr2 is not directly redox regulated, but instead reactive cysteines of a cytoplasmic anchor (Keap1) are susceptible to oxidation by peroxides and electrophiles. Under basal conditions, Nfr2 is sequestered from the nuclei by Keap1 through non-covalent interactions (Itoh et al., 1999). Because Keap1 is bound to actin, Nrf2 is also connected to the cell cytoskeleton (reviewed by Motohashi and Yamamoto, 2004). These protein–protein interactions also induced ubiquitination of Nfr2 and consequently proteolytic digestion by proteasome (Fig. 8A). When mammalian cells are exposed to peroxides and electrophiles, reactive cysteines of Keap1 are oxidized to disulfide bonds, it suffers a conformational change and consequently Nfr2 is released and accumulates in the nucleus, being capable to recognize its target promoters (Fig. 8B).

3. Conclusions

The majority of the cysteine residues in proteins play no role in electron transfer reaction, because their pK_a make them appear mainly in the protonated form in physiological conditions. In contrast, some protein foldings create environments in which the deprotonated form of cysteine (RS^- = thiolate) is stabilized, being susceptible to oxidation. Thiol/disulfide reactions are the most frequently considered, but thiol/

sulfenic acid reactions have also been implicated in some biological processes a long time ago. Recently, thiol/sulfinic redox chemistry has received attention in terms of redox signaling. Therefore, the versatile redox chemistry of thiolate in proteins has served to various biological roles as described in this review and should be a promising research field.

Acknowledgements

This work is supported by grants from *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP); *Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia* (CNPq), as part of the *Instituto do Milênio Redoxoma* and by the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) under proposals D03B-1689 and MAS-3149.

References

- Akerman, S.E., Muller, S., 2005. Peroxiredoxin-linked detoxification of hydroperoxides in *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 280, 564–570.
- Aslund, F., Berndt, K.D., Holmgren, A., 1997. Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein–protein redox equilibria. *J. Biol. Chem.* 272, 30780–30786.
- Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., Storz, G., 1999. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 6161–6165.
- Baker, L.M., Poole, L.B., 2003. Catalytic mechanism of thiol peroxidase from *Escherichia coli*. Sulfenic acid formation and overoxidation of essential Cys61. *J. Biol. Chem.* 278, 9203–9211.
- Benesch, R.E., Benesch, R., 1955. The acid strength of the-SH group in cysteine and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 5877–5881.
- Biteau, B., Labarre, J., Toledano, M.B., 2003. ATP-dependent reduction of cysteine–sulphinic acid by *Saccharomyces cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425, 980–984.
- Bokoch, G.M., Knaus, U.G., 2003. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem. Sci.* 28, 502–508.
- Bryk, R., Griffin, P., Nathan, C., 2000. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* 407, 211–215.
- Budanov, A.V., Sablina, A.A., Feinstein, E., Koonin, E.V., Chumakov, P.M., 2004. Regeneration of peroxiredoxins by p53 — regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science* 304, 596–600.
- Carvalho, A.P., Fernandes, P.A., Ramos, M.J., 2006. Similarities and differences in the thioredoxin superfamily. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 91, 229–248.
- Chae, H.Z., Kim, H.J., Kang, S.W., Rhee, S.G., 1999. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 45, 101–112.
- Chang, T.-S., Jeong, W., Woo, H.A., Lee, S.M., Park, S., Rhee, S.G., 2004. Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site cysteine. *J. Biol. Chem.* 279, 50994–51001.
- Chivers, P.T., Prehoda, K.E., Volkman, B.F., Kim, B.M., Markley, J.L., Raines, R.T., 1997. Microscopic pK_a values of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* 36, 14985–14991.
- Chrestensen, C.A., Starke, D.W., Mical, J.J., 2000. Acute Cadmium exposure inactivate thioltransferase (glutaredoxin), inhibits intracellular reduction of protein–glutathionyl-mixed disulfides, and initiates apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275, 26556–26565.
- Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G., Ryu, S., 2001. Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* 105, 103–113.
- Chuang, M.H., Wu, M.S., Lo, W.L., Lin, J.T., Wong, C.H., Chiou, S.H., 2006. The antioxidant protein alkylhydroperoxide reductase of *Helicobacter pylori* switches from a peroxide reductase to a molecular chaperone function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2552–2557.

- Collet, J.F., Bardwell, J.C., 2002. Oxidative protein folding in bacteria. *Mol. Microbiol.* 44, 1–8.
- Copley, S.D., Novak, W.R.P., Babbitt, P.C., 2004. Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry* 43, 13981–13995.
- Costa Seaver, L., Imlay, J.A., 2001. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 7173–7181.
- Cussiol, J.R., Alves, S.V., Oliveira, M.A., Netto, L.E.S., 2003. Organic hydroperoxide resistance gene encodes a thiol-dependent peroxidase. *J. Biol. Chem.* 278, 2636–2643.
- Darby, N.J., Creighton, T.E., 1995. Characterization of the active site cysteine residues of the thioredoxin-like domains of protein disulfide isomerase. *Biochemistry* 34, 16770–16780.
- Davis, D.A., Newcomb, F.M., Strke, D.W., Ott, D.E., Mieyal, J.J., Yarchoan, R., 1997. Thioredoxin (glutaredoxin) is detected within HIV-1 and can regulate the activity of glutathionylated HIV-1 protease in vitro. *J. Biol. Chem.* 272, 25935–25940.
- Delanay, A., Pflieger, D., Barrault, M.B., Vinh, J., Toledano, M.B., 2002. A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111, 471–481.
- Demasi, A.P.D., Pereira, G.A.G., Netto, L.E.S., 2001. Cytosolic thioredoxin peroxidase I is essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria. *FEBS Lett.* 509, 430–434.
- Demasi, M., Silva, G.M., Netto, L.E.S., 2003. 20S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is γ -glutathionylated. *J. Biol. Chem.* 278, 679–685.
- Demasi, A.P.D., Pereira, G.A.G., Netto, L.E.S., 2006. Yeast oxidative stress response: influences of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial functional state. *FEBS J.* 273, 805–816.
- Dillet, V., Dyson, H.J., Bashford, D., 1998. Calculations of electrostatic interactions and pK_as in the active site of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* 37, 10298–10306.
- Discola, K.F., Oliveira, M.A., Silva, G.M., Barcena, J.A., Porras, P., Padilla, A., Netto, L.E.S., Guimarães, B.G., 2005. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of glutaredoxin 2 from *Saccharomyces cerevisiae* in different oxidation states. *Acta Crystallogr., F* 61, 445–447.
- Dubuisson, M., Vander-Stricht, D., Clippe, A., Etienne, F., Nausier, T., Kissner, R., Koppenol, W.H., Rees, J.F., Knoops, B., 2004. Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase. *FEBS Lett.* 571, 161–165.
- Dyson, H.J., Jeng, M.F., Tennant, L.L., Slaby, I., Lindell, M., Cui, D.S., Kuprin, S., Holmgren, A., 1997. Effects of buried charged groups on cysteine thiol ionization and reactivity in *Escherichia coli* thioredoxin: structural and functional characterization of mutants of Asp 26 and Lys 57. *Biochemistry* 36, 2622–2636.
- Fernandes, A.P., Holmgren, A., 2004. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid. Redox Signal.* 6, 63–74.
- Frand, A.R., Cuozzo, J.W., Kaiser, C.A., 2000. Pathways for protein disulfide bond formation. *Trends Cell Biol.* 10, 203–210.
- Fuangthong, M., Helmann, J.D., 2002. The OhrR repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine–sulfenic acid derivative. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6690–6695.
- Fuangthong, M., Atichartpongkul, S., Mongkolsuk, S., Helmann, J.D., 2001. OhrR is a repressor of ohrA, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183, 4134–4141.
- Gan, Z.R., Sardana, M.K., Jacobs, J.W., Polokoff, M.A., 1990. Yeast thioredoxin — the active site cysteines display differential reactivity. *Arch. Biochem. Biophys.* 282, 110–115.
- Goldberger, R.F., Epstein, C.J., Anfinsen, C.B., 1963. Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *J. Biol. Chem.* 238, 628–635.
- Grauschopf, U., Winther, J.R., Korber, P., Zander, T., Dallinger, P., Bardwell, J.C.A., 1995. Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst? *Cell* 83, 947–955.
- Hawkins, H.C., Freedman, R.B., 1991. The reactivities and ionization properties of the active-site dithiol groups of mammalian protein disulfide–isomerase. *Biochem. J.* 275 (Pt 2), 335–339.
- Herbig, A.F., Helmann, J.D., 2001. Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol. Microbiol.* 41, 849–859.
- Hillar, A., Peters, B., Pauls, R., Loboda, A., Zhang, H., Mauk, A.G., Loewen, P.C., 2000. Modulation of the activities of catalase–peroxidase HPI of *Escherichia coli* by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 39, 5868–5875.
- Hofmann, B., Hecht, H.J., Flohe, L., 2002. Peroxiredoxins. *Biol. Chem.* 383, 347–364.
- Holmgren, A., 1972. Tryptophan fluorescence study of conformational transitions of the oxidized and reduced form of thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 247, 1992–1998.
- Holmgren, A., 1976. Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside–diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 2275–2279.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., Nabeshima, Y., 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 313–322.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., Yamamoto, M., 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13, 76–86.
- Jacob, C., Giles, G.I., Giles, N.M., Sies, H., 2003. Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. *Angew. Chem., Int. Ed.* 42, 4742–4758.
- Janda, I., Devedjiev, Y., Derewenda, U., Dauter, Z., Bielnicki, J., Cooper, D.R., Graf, P.C., Joachimiak, A., Jakob, U., Derewenda, Z.S., 2004. The crystal structure of the reduced, Zn²⁺-bound form of the *B. subtilis* Hsp33 chaperone and its implications for the activation mechanism. *Structure* 12, 1901–1907.
- Jang, H.H., Lee, K.O., Chi, Y.H., Jung, B.G., Park, S.W., Park, J.H., Lee, J.R., Lee, S.S., Moon, J.C., Yun, J.W., Choi, Y.K., Kim, W.Y., Kang, J.S., Cheong, G.-W., Yun, D.-J., Rhee, S.G., Cho, M.J., Lee, S.Y., 2004. Two enzymes in one: two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone. *Cell* 117, 625–635.
- Jao, S.C., English Ospina, S.M., Berdis, A.J., Starke, D.W., Post, C.B., Mieyal, J.J., 2006. Computational and mutational analysis of human glutaredoxin (thioltransferase): probing the molecular basis of the low pK_a of cysteine 22 and its role in catalysis. *Biochemistry* 45, 4785–4796.
- Jonsson, T.J., Murray, M.S., Johnson, L.C., Poole, L.B., Lowther, W.T., 2005. Structural basis for the retroreduction of inactivated peroxiredoxins by human sulfiredoxin. *Biochemistry* 44, 8634–8642.
- Jung, G., Breitmaier, E., Voelter, W., 1972. Dissociation equilibrium of glutathione. A Fourier transform-13C-NMR spectroscopic study of pH-dependence and of charge densities. *Eur. J. Biochem.* 24, 438–445.
- Kallis, G.B., Holmgren, A., 1980. Differential reactivity of the functional sulfhydryl groups of cysteine-32 and cysteine-35 present in the reduced form of thioredoxin from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 255, 10261–10265.
- Klomsiri, C., Panmanee, W., Dharmthiti, S., Vattanaviboon, P., Mongkolsuk, S., 2005. Novel roles of ohrR-ohr in *Xanthomonas* sensing, metabolism, and physiological adaptive response to lipid hydroperoxide. *J. Bacteriol.* 187, 3277–3281.
- Lee, J.W., Helmann, J.D., 2006. The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* 440, 363–367.
- Lee, S.R., Kwon, K.S., Kim, S.R., Rhee, S.G., 1998. Reversible inactivation of protein tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 273, 15366–15372.
- Lesniak, J., Barton, W.A., Nikolov, D.B., 2002. Structural and functional characterization of the *Pseudomonas* hydroperoxide resistance protein Ohr. *EMBO J.* 21, 6649–6659.
- Li, H., Hanson, C., Fuchs, J.A., Woodward, C., Thomas Jr., G.J., 1993. Determination of the pK_a values of active-center cysteines, cysteines-32 and -35, in *Escherichia coli* thioredoxin by Raman spectroscopy. *Biochemistry* 32, 5800–5808.
- Link, A.J., Robison, K., Church, G.M., 1997. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis* 18, 1259–1313.

- Lundstrom, J., Holmgren, A., 1993. Determination of the reduction-oxidation potential of the thioredoxin-like domains of protein disulfide-isomerase from the equilibrium with glutathione and thioredoxin. *Biochemistry* 32, 6649–6655.
- Meunier-Jamin, C., Kapp, U., Leonard, G.A., McSweeney, S., 2004. The structure of organic hydroperoxide resistance protein from *Deinococcus radiodurans*: do conformational changes facilitate recycling of the redox disulfide? *J. Biol. Chem.* 279, 25830–25837.
- Mieyal, J.J., Starke, D.W., Gravina, S.A., Hocevar, B.A., 1991. Thioltransferase in human red blood cells: kinetics and equilibrium. *Biochemistry* 30, 8883–8891.
- Miranda-Vizuete, A., Damdimopoulos, A.E., Gustafsson, J., Spyrou, G., 1997. Cloning, expression, and characterization of a novel *Escherichia coli* thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 272, 30841–30847.
- Molina, M.M., Belli, G., Torre, M.A., Rodriguez-Manzaneque, M.T., Herrero, E., 2004. Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins. *J. Biol. Chem.* 279, 51923–51930.
- Mongkolsuk, S., Helmann, J.D., 2002. Regulation of inducible peroxide stress responses. *Mol. Microbiol.* 45, 9–15.
- Mongkolsuk, S., Praituan, W., Loprasert, S., Fuangthong, M., Chamnongpol, S., 1998. Identification and characterization of a new organic hydroperoxide resistance (ohr) gene with a novel pattern of oxidative stress regulation from *Xanthomonas campestris* pv. phaseoli. *J. Bacteriol.* 180, 2636–2643.
- Monteiro, G., Netto, L.E.S., 2004. Glucose repression of PRX1 expression is mediated by Tor1p and Ras2p through inhibition of Msn2/4p in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 241, 221–228.
- Monteiro, G., Pereira, G.A.G., Netto, L.E.S., 2002. Regulation of mitochondrial thioredoxin peroxidase I expression by two different pathways: one dependent on cAMP and the other on heme. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 278–288.
- Monteiro, G., Kowaltowski, A.J., Barros, M.H., Netto, L.E.S., 2004. Glutathione and thioredoxin peroxidases mediate susceptibility of yeast mitochondria to Ca(2+)-induced damage. *Arch. Biochem. Biophys.* 425, 14–24.
- Moon, J.C., Hah, Y.S., Kim, W.Y., Jung, B.G., Jang, H.H., Lee, J.R., Kim, S.Y., Lee, Y.M., Jeon, M.G., Kim, C.W., Cho, M.J., Lee, S.Y., 2005. Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H₂O₂-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 280, 28775–28784.
- Moore, R.B., Mankad, M.V., Shriver, S.K., Mankad, V.N., Plishker, G.A., 1991. Reconstitution of Ca(2+)-dependent K⁺ transport in erythrocyte membrane vesicles requires a cytoplasmic protein. *J. Biol. Chem.* 266, 18964–18968.
- Motohashi, H., Yamamoto, M., 2004. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol. Med.* 10, 549–557.
- Munhoz, D.C., Netto, L.E.S., 2004. Cytosolic thioredoxin peroxidase I and II are important defenses of yeast against organic hydroperoxide insult: catalases and peroxiredoxins cooperate in the decomposition of H₂O₂ by yeast. *J. Biol. Chem.* 279, 35219–35227.
- Nelson, J.W., Creighton, T.E., 1994. Reactivity and ionization of the active site cysteine residues of DsbA, a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Biochemistry* 33, 5974–5983.
- Netto, L.E.S., Chae, H.Z., Kang, S.W., Rhee, S.G., Stadtman, E.R., 1996. Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* 271, 15315–15321.
- Nishinaka, Y., Masutani, H., Nakamura, H., Yodoi, J., 2001. Regulatory roles of thioredoxin in oxidative stress-induced cellular responses. *Redox Rep.* 6, 289–295.
- Oliveira, M.A., Discola, K.F., Alves, S.V., Barbosa, J.A.R.G., Medrano, F.J., Netto, L.E.S., Guimaraes, B.G., 2005. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of NADPH-dependent thioredoxin reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Crystallogr., Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 61, 387–390.
- Oliveira, M.A., Guimaraes, B.G., Cussiol, J.R.R., Medrano, F.J., Gozzo, F.C., Netto, L.E.S., 2006. Structural insights into enzyme-substrate interaction and characterization of enzymatic intermediates of organic hydroperoxide resistance protein from *Xylella fastidiosa*. *J. Mol. Biol.* 359, 433–445.
- Paget, M.S., Buttner, M.J., 2003. Thiol-based regulatory switches. *Annu. Rev. Genet.* 37, 91–121.
- Park, S.G., Cha, M.K., Jeong, W., Kim, I.H., 2000. Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275, 5723–5732.
- Parsonage, D., Youngblood, D.S., Sarma, G.N., Wood, Z.A., Karplus, P.A., Poole, L.B., 2005. Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Biochemistry* 44, 10583–10592.
- Pedrajas, J.R., Miranda-Vizuete, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J.A., Spyrou, G., 2000. Mitochondrial of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* 275, 16296–16301.
- Powis, G., Montfort, W.R., 2001. Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30, 421–455.
- Ralat, L.A., Manevich, Y., Fisher, A.B., Colman, R.F., 2006. Direct evidence for the formation of a complex between 1-cysteine peroxiredoxin and glutathione S-transferase pi with activity changes in both enzymes. *Biochemistry* 45, 360–372.
- Reckenfelderbaumer, N., Krauth-Siegel, R.L., 2002. Catalytic properties, thiol pK value, and redox potential of *Trypanosoma brucei* tryparedoxin. *J. Biol. Chem.* 277, 17548–17555.
- Reutimann, H., Straub, B., Luisi, P.L., Holmgren, A., 1981. A conformational study of thioredoxin and its tryptic fragments. *J. Biol. Chem.* 256, 6796–6803.
- Rhee, S.G., Chae, H.Z., Kim, K., 2005a. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 1543–1552.
- Rhee, S.G., Kang, S.W., Jeong, W., Chang, T.S., Yang, K.S., Woo, H.A., 2005b. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 183–189.
- Ritz, D., Lim, J., Reynolds, C.M., Poole, L.B., Beckwith, J., 2001. Conversion of a peroxiredoxin into a disulfide reductase by a triplet repeat expansion. *Science* 294, 158–160.
- Salmeen, A., Andersen, J.N., Myers, M.P., Meng, T.C., Hinks, J.A., Tonks, N.K., Barford, D., 2003. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* 423, 769–773.
- Stone, J.R., 2004. An assessment of proposed mechanisms for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 422, 119–124.
- Sun, Q.A., Kirnarsky, L., Sherman, S., Gladyshev, V.N., 2001. Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3673–3678.
- Thomas, J.A., Poland, B., Honzatko, R., 1995. Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch. Biochem. Biophys.* 319, 1–9.
- Trivelli, X., Krimm, I., Ebel, C., Verdoucq, L., Prouzet-Mauleon, V., Chartier, Y., Tsan, P., Lauquin, G., Meyer, Y., Lancelin, J.M., 2003. Characterization of yeast peroxiredoxin ahp1 in its reduced and overoxidized inactive forms using NMR. *Biochemistry* 42, 14139–14149.
- Trujillo, M., Budde, H., Pineyro, M.D., Stehr, M., Robello, C., Flohe, L., Radi, R., 2004. *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. *J. Biol. Chem.* 279, 34175–34182.
- Van Montfort, R.L., Congreve, M., Tisi, D., Carr, R., Jhoti, H., 2003. Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature* 423, 773–777.
- Venugopal, R., Jaiswal, A.K., 1996. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14960–14965.
- Vohnik, S., Hanson, C., Tuma, R., Fuchs, J.A., Woodward, C., Thomas Jr., G.J., 1998. Conformation, stability, and active-site cysteine titrations of *Escherichia coli* D26A thioredoxin probed by Raman spectroscopy. *Protein Sci.* 7, 193–200.
- Weissbach, H., Etienne, F., Hoshi, T., Heinemann, S.H., Lowther, W.T., Matthews, B., St John, G., Nathan, C., Brot, N., 2002. Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 172–178.
- Wheeler, G.L., Grant, C.M., 2004. Regulation of redox homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiol. Plant.* 120, 12–20.

- Winter, J., Jakob, U., 2004. Beyond transcription—new mechanisms for the regulation of molecular chaperones. *Crit. Rev. Biochem Mol Biol.* 39, 297–317.
- Winter, J., Linke, K., Jatzek, A., Jakob, U., 2005. Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33. *Mol. Cell* 17, 381–392.
- Wong, C.M., Zhou, Y., Ng, R.W., Kung, H.F., Jin, D.Y., 2002. Cooperation of yeast peroxiredoxins Tsa1p and Tsa2p in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J. Biol. Chem.* 277, 5385–5394.
- Woo, H.A., Chae, H.Z., Hwang, S.C., Yang, K.S., Kang, S.W., Kim, K., Rhee, S.G., 2003. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science* 300, 653–656.
- Woo, H.A., Jeong, W., Chang, T.-S., Park, K.J., Park, S.J., Yang, J.S., Rhee, S.G., 2005. Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-Cys peroxiredoxins. *J. Biol. Chem.* 280, 325–328.
- Wood, Z.A., Poole, L.B., Karplus, P.A., 2003a. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300, 650–653.
- Wood, Z.A., Schroder, E., Harris, J.R., Poole, L.B., 2003b. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 32–40.
- Xiao, R., Lundstrom-Ljung, J., Holmgren, A., Gilbert, H.F., 2005. Catalysis of thiol/disulfide exchange. Glutaredoxin 1 and protein-disulfide isomerase use different mechanisms to enhance oxidase and reductase activities. *J. Biol. Chem.* 280, 21099–21106.
- Yang, Y.F., Wells, W.W., 1991. Identification and characterization of the functional amino acids at the active center of pig liver thioltransferase by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 266, 12759–12765.

Anexo VII.

FEBS J. 2008 Jun;275(11):2942-55. Epub 2008 Apr 23.

Role of glutaredoxin 2 and cytosolic thioredoxins in cysteinyl-based redox modification of the 20S proteasome.

Silva GM, Netto LE, Discola KE, Piassa-Filho GM, Pimenta DC, Bárcena JA, Demasi M.

Instituto Butantan, Laboratório de Bioquímica e Biofísica, São Paulo, Brazil, and Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brazil.

Abstract

The yeast 20S proteasome is subject to sulfhydryl redox alterations, such as the oxidation of cysteine residues (Cys-SH) into cysteine sulfenic acid (Cys-SOH), followed by S-glutathionylation (Cys-S-SG). Proteasome S-glutathionylation promotes partial loss of chymotrypsin-like activity and post-acidic cleavage without alteration of the trypsin-like proteasomal activity. Here we show that the 20S proteasome purified from stationary-phase cells was natively S-glutathionylated. Moreover, recombinant glutaredoxin 2 removes glutathione from natively or in vitro S-glutathionylated 20S proteasome, allowing the recovery of chymotrypsin-like activity and post-acidic cleavage. Glutaredoxin 2 deglutathionylase activity was dependent on its entry into the core particle, as demonstrated by stimulating S-glutathionylated proteasome opening. Under these conditions, deglutathionylation of the 20S proteasome and glutaredoxin 2 degradation were increased when compared to non-stimulated samples. Glutaredoxin 2 fragmentation by the 20S proteasome was evaluated by SDS-PAGE and mass spectrometry, and S-glutathionylation was evaluated by either western blot analyses with anti-glutathione IgG or by spectrophotometry with the thiol reactant 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. It was also observed in vivo that glutaredoxin 2 was ubiquitinated in cellular extracts of yeast cells grown in glucose-containing medium. Other cytoplasmic oxido-reductases, namely thioredoxins 1 and 2, were also active in 20S proteasome deglutathionylation by a similar mechanism. These results indicate for the first time that 20S proteasome cysteinyl redox modification is a regulated mechanism coupled to enzymatic deglutathionylase activity.

PMID: 18435761 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Role of glutaredoxin 2 and cytosolic thioredoxins in cysteinyl-based redox modification of the 20S proteasome

Gustavo M. Silva^{1,2}, Luis E.S. Netto², Karen F. Discola², Gilberto M. Piassa-Filho¹, Daniel C. Pimenta¹, José A. Bárcena³ and Marilene Demasi¹

1 Instituto Butantan, Laboratório de Bioquímica e Biofísica, São Paulo, Brazil

2 Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brazil

3 Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, Spain

Keywords

20S proteasome; deglutathionylation; glutaredoxin; S-glutathionylation; thioredoxins

Correspondence

M. Demasi, Instituto Butantan, Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Avenida Vital Brasil, 1500, 05503 900 São Paulo, Brazil
Fax: +55 11 3726 7222 ext. 2018
Tel: +55 11 3726 7222 ext. 2101
E-mail: marimasi@butantan.gov.br

(Received 8 December 2007, revised 31 March 2008, accepted 3 April 2008)

doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06441.x

The yeast 20S proteasome is subject to sulfhydryl redox alterations, such as the oxidation of cysteine residues (Cys-SH) into cysteine sulfenic acid (Cys-SOH), followed by S-glutathionylation (Cys-S-SG). Proteasome S-glutathionylation promotes partial loss of chymotrypsin-like activity and post-acidic cleavage without alteration of the trypsin-like proteasomal activity. Here we show that the 20S proteasome purified from stationary-phase cells was natively S-glutathionylated. Moreover, recombinant glutaredoxin 2 removes glutathione from natively or *in vitro* S-glutathionylated 20S proteasome, allowing the recovery of chymotrypsin-like activity and post-acidic cleavage. Glutaredoxin 2 deglutathionylase activity was dependent on its entry into the core particle, as demonstrated by stimulating S-glutathionylated proteasome opening. Under these conditions, deglutathionylation of the 20S proteasome and glutaredoxin 2 degradation were increased when compared to non-stimulated samples. Glutaredoxin 2 fragmentation by the 20S proteasome was evaluated by SDS-PAGE and mass spectrometry, and S-glutathionylation was evaluated by either western blot analyses with anti-glutathione IgG or by spectrophotometry with the thiol reactant 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. It was also observed *in vivo* that glutaredoxin 2 was ubiquitinated in cellular extracts of yeast cells grown in glucose-containing medium. Other cytoplasmic oxido-reductases, namely thioredoxins 1 and 2, were also active in 20S proteasome deglutathionylation by a similar mechanism. These results indicate for the first time that 20S proteasome cysteinyl redox modification is a regulated mechanism coupled to enzymatic deglutathionylase activity.

Oxidation of protein cysteine residues into sulfenic acid (Cys-SOH) and the subsequent S-glutathionylation of these residues during enzyme catalysis and redox signaling have been increasingly accepted as commonly occurring events in redox regulation [1–9].

This reversible mechanism is believed to play a regulatory role in enzyme catalysis and binding of transcription factors to DNA targets, among other processes. The first step in protein-Cys-SH oxidation generates Cys-SOH, which is prone to S-glutathionylation by

Abbreviations

20S PT, 20S proteasome core; AMC, 7-amido-4-methylcoumarin; CDL, cardiolipin; Cys-SOH, cysteine sulfenic acid; GR, glutathione reductase; Grx2, recombinant glutaredoxin 2; Grx2C30S, mutant glutaredoxin 2; GSH, glutathione; HED, hydroxyethylsulfide; NBD, 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole; n-PT, natively S-glutathionylated 20S proteasome; PT-SG, *in vitro* S-glutathionylated 20S proteasome; PT-SH, dithiothreitol-treated 20S proteasome; RS, reductive system for Grx2 containing 2 mM NADPH, 0.3 U·mL⁻¹ GR and 0.5 mM GSH; s-LLVY-AMC, succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC; Trx1, recombinant thioredoxin reductase 1; z-ARR-AMC, carbobenzoxy-Ala-Arg-Arg-AMC; z-LLE-AMC, carbobenzoxy-Leu-Leu-Glu-AMC.

sulfhydryls, e.g. glutathione (GSH); otherwise, the oxidation continues to further generate the cysteine sulfenic (Cys-SO₂H) and cysteine sulfonic (Cys-SO₃) acid forms [5,10]. Glutaredoxins [9,11,12], as well as thioredoxins [13], are postulated to be directly responsible for deglutathionylation in yeast cells. The first function assigned to glutaredoxins was the reduction of intramolecular disulfide bonds in the ribonucleotide reductase of thioredoxin-deleted *Escherichia coli* strains [14]. Since then, biochemical and genetic approaches have provided evidence for a protective role of glutaredoxins under oxidative conditions and during redox signaling, e.g. GSH-dependent reduction of protein-mixed disulfides by means of its so-called deglutathionylase activity in various eukaryotic cells [9,11,12,15–17].

Yeast possesses two dithiolic (Grx1 and Grx2) and five monothiolic glutaredoxins. These isoforms differ in their location and response to oxidative stress, among other factors [9,11,18–22]. Evidence indicates that Grx2 is the main glutathione-dependent oxidoreductase in yeast, whereas Grx1 and Grx5 may be required during certain stress conditions or after the formation of particular mixed disulfide substrates [11,12].

We have shown previously that yeast Cys-20S proteasomal residues are S-glutathionylated *in vitro* by reduced glutathione if previously oxidized to Cys-SOH [8]. Moreover, this mechanism was shown to be responsible for a decrease in proteasomal chymotrypsin-like activity. Here, we show that the 20S proteasome core purified from stationary-phase cells is also S-glutathionylated under basal conditions, and that Grx2 was able to dethiolate the 20S core. Another interesting finding is that the resulting deglutathionylation process restores proteasomal chymotrypsin-like activity and post-acidic cleavage concomitant with Grx2 degradation by the 20S particle. We also show that cytoplasmic thioredoxins 1 and 2 play similar roles. Both isoforms were able to deglutathionylate the 20S core, allowing rescue of proteasomal activities.

Results

20S proteasome is natively S-glutathionylated

We demonstrated previously that the 20S proteasome core (PT) is S-glutathionylated when cells are challenged with H₂O₂ [8]. We began the present investigation by verifying whether the 20S PT is also natively S-glutathionylated. Remarkably, the 20S core purified from cells grown to stationary phase in glucose-enriched medium was natively S-glutathionylated, as assessed by western blotting using anti-GSH (Fig. 1A,

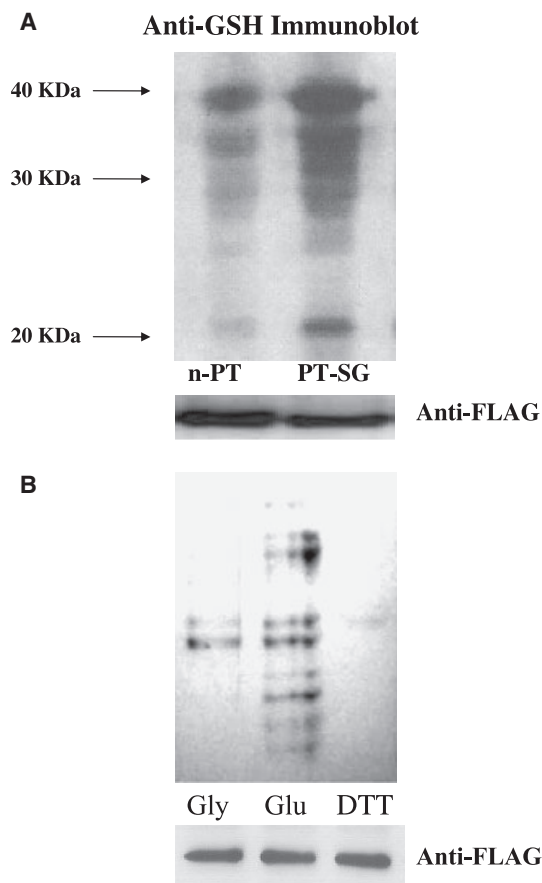


Fig. 1. Anti-GSH blotting of 20S proteasome preparations. After proteasome purification, samples (30 μ g) were dissolved in gel loading buffer containing 10 mM *N*-ethylmaleimide and applied to SDS-PAGE. (A) Representative blots of natively (n-PT) and *in vitro* S-glutathionylated (PT-SG) proteasomal preparations. (B) 20S proteasome preparations obtained from cells grown to stationary phase in glycerol/ethanol- (Gly) or glucose-containing (Glu) media. DTT, sample of the n-PT preparation treated with 300 mM dithiothreitol. Anti-FLAG, loading control performed as described in Experimental procedures on the same membranes utilized for anti-GSH blotting.

n-PT). By comparing the *in vitro* proteasome S-glutathionylation (PT-SG) to that observed in preparations obtained from cells grown to stationary phase (n-PT), we observed that the 20S particle was not fully S-glutathionylated *in vivo* when compared to the *in vitro* process (Fig. 1A). The *in vitro* assay results indicated that the potential for S-glutathionylation of 20S proteasome subunits is much higher than that observed inside cells (Fig. 1A). Moreover, the 20S core purified from cells grown to stationary phase in glucose-containing medium was more greatly S-glutathionylated when compared to preparations obtained

from cells grown in glycerol/ethanol-containing medium (Fig. 1B, lanes Glu and Gly, respectively). As a control, samples purified from cells grown in glucose were treated with 10 mM dithiothreitol before loading onto the gel utilized for the immunoblot assay (Fig. 1B, lane dithiothreitol). After dithiothreitol treatment, 20S proteasome S-glutathionylated bands were completely absent. The purified 20S PT SDS/PAGE profile is shown in supplementary Fig. S1 (lane 2).

As shown previously [23] and confirmed in our laboratory, intracellular reductive ability is higher when yeast cells are grown in glycerol/ethanol-enriched medium (data not shown). Glucose is known to repress expression of genes related to antioxidant defenses and mitochondrial biogenesis [24,25], but glycerol/ethanol growth conditions only support respiratory growth and maintain antioxidant defenses at increased levels [23]. Together with increased antioxidant parameters, we found that the chymotrypsin-like activity of purified 20S proteasome obtained from cells grown in glycerol/ethanol was five times that of preparations obtained from cells grown in glucose-containing medium, with no alteration of 20S proteasome levels (data not shown). These results suggest that proteasomal activity might be modulated according to intracellular redox modifications.

20S proteasome deglutathionylation by Grx2

The observation that the 20S core purified from stationary-phase cells was already S-glutathionylated, together with our data showing that S-glutathionylation of the 20S core particle varies according to the metabolic conditions of yeast cells (Fig. 2 and Demasi M & Silva GM unpublished results), provide strong evidences that this redox alteration plays an important physiological role. Our next goal was to identify an enzymatic mechanism that is able to modulate the proteasomal activity by redox modifications, e.g. deglutathionylation. Based on reports in the literature, Grx2 is one of the enzymes responsible for GSH-dependent deglutathionylase activity in yeast cells [11], and, in addition, Grx2 co-localizes with the proteasome in the cytosol. Thus, recombinant Grx2 was evaluated for its ability to deglutathionylate PT-SG obtained through a multi-step procedure as described in Experimental procedures. Preparations from each step (oxidized, *in vitro* S-glutathionylated and Grx2-treated samples) were reacted with 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD), a sulfhydryl and sulfenic acid reagent [1], and the formation of Cys-S-NBD and Cys-S(O)-NBD adducts or their disappearance was followed by spectral

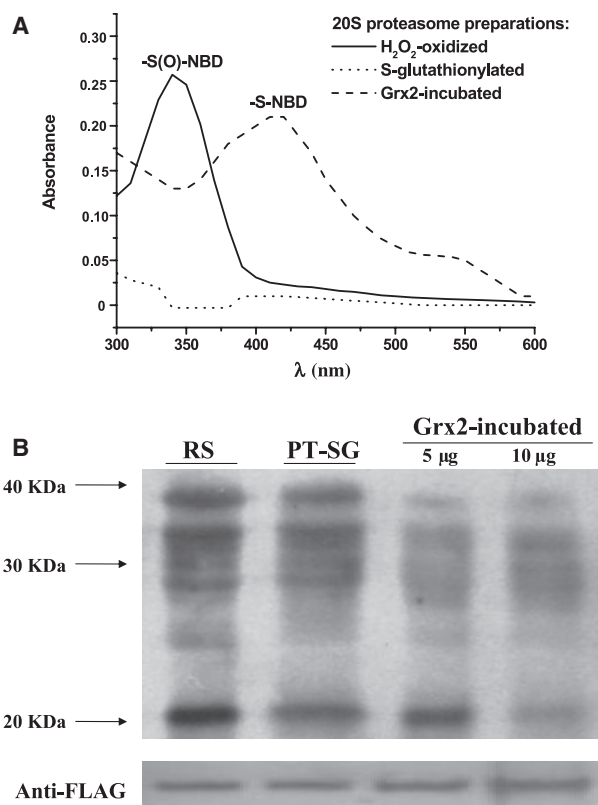


Fig. 2. Recombinant Grx2 deglutathionylase activity on S-glutathionylated 20S PT. (A) Assay with the sulfhydryl and sulfenic acid reactant 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD). The Cys-S(O)-NBD conjugate (solid line) or NBD-reacted S-glutathionylated 20S core (dotted line) were generated by reaction of 100 μM NBD with H₂O₂- or GSH-treated proteasome preparations (described in Experimental procedures) denatured using 5 M guanidine. The Cys-S-NBD conjugate (dashed line) was generated by incubation of S-glutathionylated 20S PT with Grx2 in the presence of the RS (2 mM NADPH, 0.3 U·mL⁻¹ GR and 0.5 mM GSH), followed by reaction with NBD. Excess NBD was removed by filtration as described previously [8]. Spectra were recorded as indicated. (B) Anti-GSH blotting. The *in vitro* S-glutathionylated 20S PT was prepared as described in Experimental procedures. Samples (20 μg PT-SG) were incubated for 30 min at 37 °C under the indicated conditions in a final volume of 40 μL and applied to 12.5% SDS-PAGE for immunoblot analysis. RS, sample incubated in the presence of 0.5 mM GSH, 2 mM NADPH and 0.3 U·mL⁻¹ GR without Grx2; PT-SG, sample incubated without the RS or Grx2; Grx2-incubated, samples incubated in the presence of the RS plus Grx2 at the indicated concentrations. Anti-FLAG, loading control performed as described in Experimental procedures on the same membranes utilized for anti-GSH blotting.

measurement. When the 20S core was oxidized with H₂O₂, sulfenic acid was formed (Fig. 2A, solid line). However, the sulfenic form of the 20S core cysteine residues completely disappeared when H₂O₂-oxidized 20S preparations were treated with GSH (Fig. 2A,

dotted line). This result is consistent with the idea that, under these conditions, cysteine residues of the 20S core are protected from NBD modification by S-glutathionylation. The S-glutathionylated 20S core was reduced to Cys-SH after incubation with recombinant Grx2 (Fig. 2A, dashed line), indicating that this thiol disulfide oxido-reductase is capable of removing GSH residues from the core. Similar S-glutathionylated 20S PT samples were also analyzed by immunoblot with anti-GSH IgG (Fig. 2B). PT-SG was incubated with two concentrations of recombinant Grx2 in the presence of the GSH-dependent reductive system, as described in Experimental procedures. As seen in Fig. 2B, S-glutathionylated bands of the 20S core (PT-SG) significantly decreased after incubation in the presence of Grx2 (Grx2-incubated), and incubation with 10 μg Grx2 increased proteasome deglutathionylation when compared to the incubation with 5 μg Grx2. The molar ratios of PT : Grx2 were 1 : 10 and 1 : 20, respectively. To evaluate the effect of the GSH-dependent reductive system on deglutathionylation, proteasomal preparations were incubated in standard buffer containing the reductive system but not Grx2 (Fig. 2B, RS). The reductive system had no effect on 20S PT deglutathionylation.

Taken together, the results shown in Fig. 2 provide direct evidence that Grx2 is capable of partly deglutathionylating the 20S proteasome.

Grx2 increases chymotrypsin-like activity and post-acidic cleavage of the S-glutathionylated 20S proteasome

To demonstrate to what extent S-glutathionylation interferes with proteasomal activity, site-specific activities were determined using n-PT and *in vitro* S-glutathionylated PT-SG and PT-SH preparations (Fig. 3). Chymotrypsin-like proteasomal activities from n-PT and PT-SG preparations were 62% and 45% of that observed in the PT-SH preparation, respectively, whereas the post-acidic cleavage in the n-PT and PT-SG preparations was 50% and 35%, respectively, of that in PT-SH preparations (Fig. 3; samples indicated by -). As observed previously [8], the trypsin-like activity was not modified by any redox modification of the core. The results shown in Fig. 3 (samples indicated by -) demonstrate that proteasomal activities are inversely correlated to the extent of S-glutathionylation.

As discussed above, chymotrypsin-like activity and post-acidic cleavage were decreased by S-glutathionylation. Next, our goal was to verify whether reduction of S-glutathionylated proteasome by Grx2 would increase

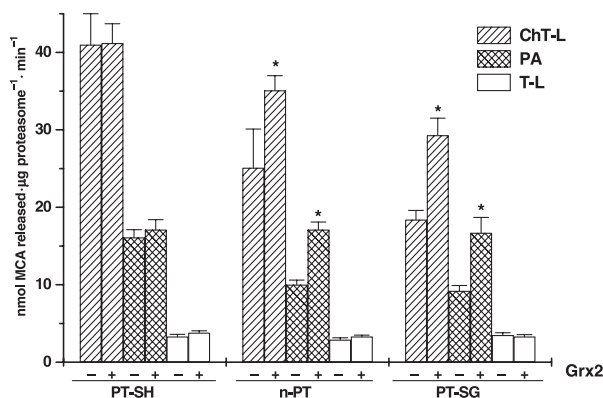
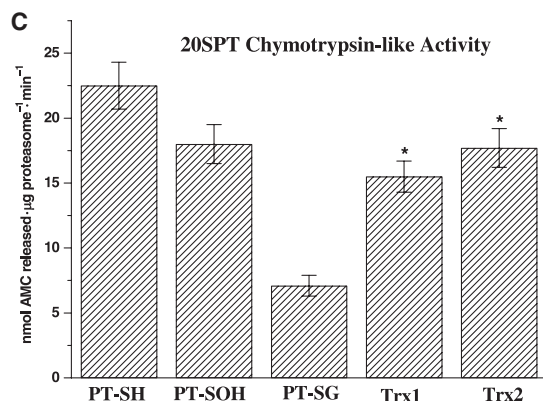
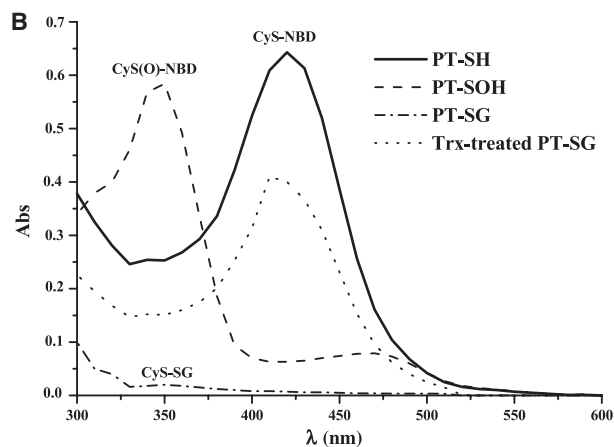
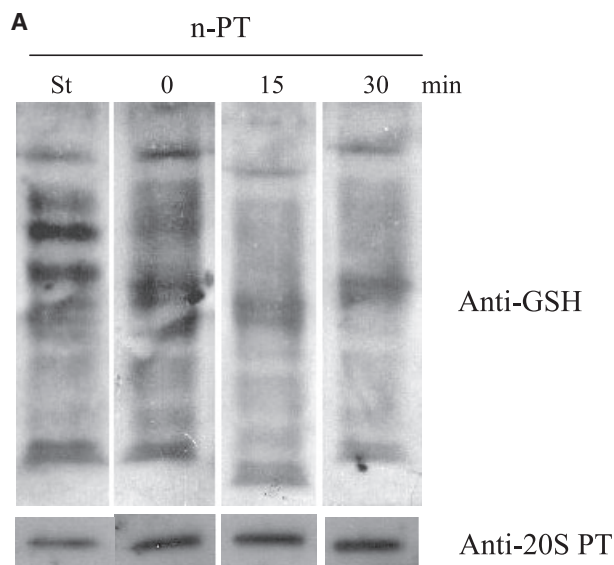


Fig. 3. Effect of Grx2 on proteasomal hydrolytic activities. To test for the recovery of proteasomal chymotrypsin-like activity and post-acidic cleavage after pre-incubation with Grx2, the indicated proteasomal preparations (50 μg ·200 μL^{-1}) were immobilized on anti-FLAG affinity gel as described previously [8]. Grx2 (1 μg) plus the GSH-dependent reductive system (RS) were mixed with immobilized proteasome preparations, and the samples were incubated for 30 min at 37 °C with shaking. After incubation, control (-) and Grx2-incubated samples (+) were washed three times by centrifugation (8000 g \times 15 mins at room temperature) and redilution with standard buffer through Microcon YM-100 filters. Final immobilized proteasome preparations were transferred to 96-well plates in 100 μL standard buffer. Indicated substrates (ChT-L, chymotrypsin-like; T-L, trypsin-like; PA, post-acidic) were added to a final concentration of 50 μM . Hydrolysis was followed for 45 min at 37 °C, and fluorescence (440 nm; excitation 365 nm) was recorded every 5 min. All results are means \pm SD and are expressed as nmol AMC released per μg proteasome per min. Asterisk indicate a *P* value of < 0.0003 (ANOVA) compared to PT-SH samples.

modified proteasomal activities to the levels of the PT-SH preparation. As expected, Grx2 pre-incubation with S-glutathionylated forms of the 20S proteasome (n-PT and PT-SG) resulted in increased chymotrypsin-like activity and post-acidic cleavage (Fig. 3; samples indicated by +). The activities in the PT-SH preparation did not change after incubation with Grx2. If the dithiothreitol-reduced proteasomal activity (PT-SH) is taken as the maximum attainable (100%), chymotrypsin-like activity for n-PT was 63% recovered after incubation with Grx2, whereas the recovery was 48% for PT-SG. Post-acidic cleavage for the PT-SG and n-PT preparations was totally recovered after incubation with Grx2. Again, trypsin-like proteasomal activity was not modified by any of the treatments performed here. Taken together, the results presented so far indicate that S-glutathionylation and Grx2 modulate post-acidic cleavage and chymotrypsin-like activity by modifying the redox state of proteasomal cysteine residues.

Similar experiments to those described above were performed using cytosolic thioredoxins, and they also



exhibited deglutathionylase activity towards 20S PT as evaluated by both anti-GSH probing and NBD assay of similar proteasome preparations (Fig. 4A,B, respectively). An immunoblot analysis performed after

Fig. 4. Deglutathionylation of 20S proteasome preparations by recombinant Trx1 and Trx2. (A) n-PT preparations (20 μg) were mixed with Trx1 (3 μg) plus 2 mM NADPH and 0.5 μg Trr1 and incubated at 37 °C for 15 or 30 min (lanes indicated by 15 and 30, respectively) or kept on ice (lane indicated by 0). Samples were analyzed by western blotting with anti-GSH as described in Fig. 1. St, control n-PT preparation incubated for 30 min at 37 °C in the absence of Trx1. Anti-20SPT, loading control performed with the same membranes utilized for anti-GSH blotting. (B) PT-SH, PT-SOH (PT-SH after treatment with hydrogen peroxide) and PT-SG preparations were generated as described in Experimental procedures. The Cys-S-NBD (solid line), Cys-S(O)-NBD (dashed line) conjugates and the NBD-reacted S-glutathionylated 20S core (dashed/dotted line) were generated from 100 μg PT-SOH or PT-SG preparations. The Cys-S-NBD conjugate (dotted line) was obtained after incubation of PT-SG (100 μg) with Trx1 or Trx2 (1 μg) in the presence of 2 mM NADPH and 0.5 μg Trr1 per 100 μL (final concentration), followed by dilution in 5 M guanidine and reaction with NBD. Results shown are representative of three independent experiments. (C) Effect of Trx1 and Trx2 on the recovery of chymotrypsin-like proteasomal activity. One microgram of PT-SH, PT-SOH or PT-SG, as indicated, was assayed for hydrolysis of the fluorogenic peptide s-LLVY-AMC (10 μM), as described in Experimental procedures. PT-SG samples (50 μg) were incubated for 30 min in the presence of Trx1 (1 μg) or Trx2 (1 μg) plus 2 mM NADPH and 0.5 μg Trr1 per 100 μL. Aliquots (1 μg) of Trx1- and Trx2-treated PT-SG were removed for the hydrolytic assay. The results shown are means ± SD and represent six independent experiments. Asterisks indicate *P* values of < 0.000012 (ANOVA) compared to PT-SG samples.

incubation of n-PT preparations with Trx1 revealed that the time course of proteasomal deglutathionylation was as short as 15 min, and 30 min incubation did not change the extension of deglutathionylation when these blots (Fig. 4A, 15 and 30) were compared to the control sample of n-PT (Fig. 4A, St).

Figure 4B shows results obtained for an NBD assay performed with both Trx1 and Trx2. The molar ratio between thioredoxins and the *in vitro* S-glutathionylated core (PT-SG) was 10 : 1. As shown in Fig. 4B, incubation of PT-SG (Fig. 4B, Cys-S-SG) with either Trx1 or Trx2 promoted the appearance of the reduced Cys-S-NBD adduct. However, formation of proteasomal intraprotein sulfur bonds is expected during treatment with H₂O₂, as *in vitro* S-glutathionylation of proteasomal preparations occurs through formation of cysteine sulfenic acid, as described in supplementary material Doc. S1. To rule out the possibility that the Cys-S-NBD adduct formed after incubation of S-glutathionylated proteasome preparations with thioredoxins was formed by reduction of sulfur bonds instead of deglutathionylation, proteasome preparations were incubated with Trx1 just after treatment with H₂O₂ (molar ratio 20S PT : Trx1 of 1 : 20), followed by reaction with NBD. The results did not indicate formation of the Cys-NBD adduct

(data not shown). The proteasome concentration in the assays was five times the concentration utilized in the experiments shown in Fig. 4B. Thus, we concluded from this set of experiments that formation of the Cys–NBD adduct after incubation of PT-SG preparations with thioredoxins (as shown in Fig. 4B) most likely occurred through deglutathionylation.

Next we performed assays to test whether thioredoxins could recover the hydrolytic activity of S-glutathionylated proteasome preparations. Recovery of the chymotrypsin-like activity of the *in vitro* S-glutathionylated core (PT-SG) by Trx1 and Trx2 was very similar (Fig. 4C). The chymotrypsin-like activity of PT-SG preparations compared to that obtained from dithiothreitol-reduced preparations (PT-SH) was 71% and 77% after incubation with Trx1 and Trx2, respectively. These results were very close to those obtained with Grx2 (63%), as described above.

Mechanism of deglutathionylation

One question raised during the experiments described above was whether the oxido-reductases exerted their effects by reducing only mixed disulfides located on the surface of the 20S core particle, or whether they were also able to enter the latent 20S PT to reduce cysteine residues inside the catalytic chamber. By analyzing structural features of yeast 20S PT from the Protein Data Bank (PDB identification 1RYP), we determined that only a few cysteine residues among the total of 72 are exposed to the environment: 10 solvent-accessible cysteines were determined to be present on the surface, with some of them being totally exposed and others slightly buried but still solvent-accessible. All of the other cysteine residues are either buried in the skeletal structure or exposed to the internal catalytic chamber environment. Therefore, we investigated whether Grx2 enters the core particle. Assuming that Grx2 must be at least partially degraded to reach inside the proteasome, we first evaluated Grx2 degradation using SDS–PAGE (Fig. 5A). Degradation of Grx2 was achieved by incubating n-PT with Grx2 in standard buffer for 2 h (Fig. 5A, lane 2) or by proteasomal stimulation with 0.0125% SDS (Fig. 5A, lane 4). As a control, proteasomal preparations were heated to 100 °C (Fig. 5A, lane 3) prior to incubation with Grx2 and compared to standard Grx2 incubated in standard buffer lacking proteasome (Fig. 5A, lane 1); no proteolysis was seen. Degradation by the proteasome was determined by the decreased intensity of Grx2 bands as evaluated by measurement of optical density. When incubated in standard buffer, n-PT was able to degrade about 70% of Grx2

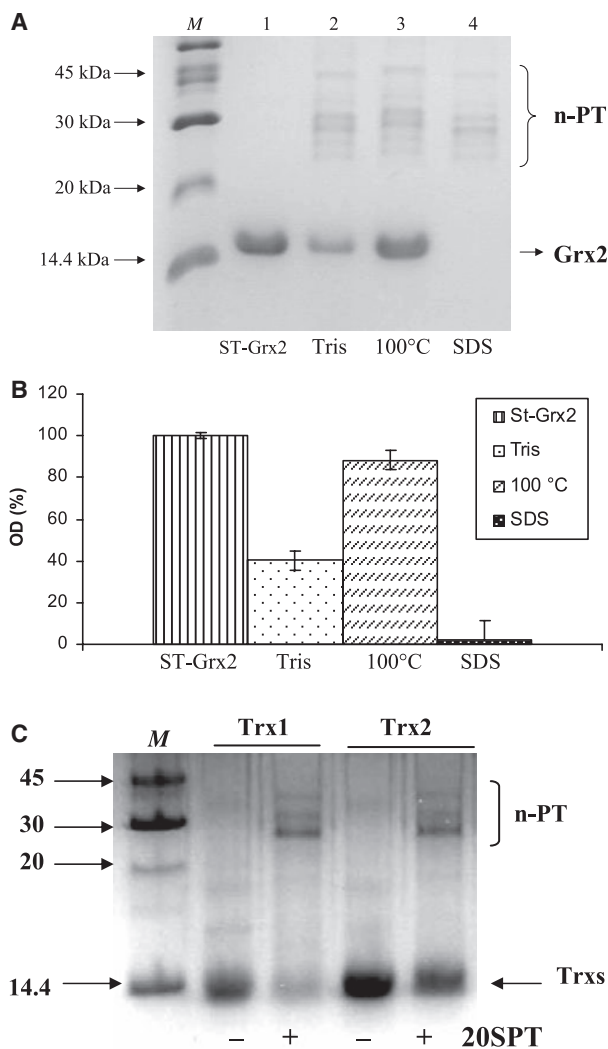


Fig. 5. Degradation of Grx2, Trx1 and Trx2 by n-PT preparations. (A) Grx2 (5 μ g) was incubated in the presence of 2.5 μ g n-PT for 2 h at 37 °C and afterwards applied to 20% SDS–PAGE. Lane 1 represents standard Grx2 (ST-Grx2) incubated in standard buffer without n-PT, and lanes 2–4 represent of Grx2 incubation in the presence of n-PT in standard buffer (Tris), heated at 100 °C or activated by 0.0125% SDS before addition of Grx2. *M*, molecular mass markers. (B) Optical density measurement of Grx2 bands. Grx2 bands shown in (A) were quantified using IMAGEQUANT software. Values are means \pm SD from three independent experiments. The results are expressed as a percentage of the ST-Grx2 band, which was set as 100. (C) Trx1 and Trx2 aliquots (5 and 10 μ g, respectively) were incubated with 2.5 μ g 20SPT (+) in standard buffer for 30 min at 37 °C. After incubation, samples were applied to 20% SDS–PAGE. (–), Trx1 and Trx2 samples incubated under the same conditions in the absence of natively S-glutathionylated 20S PT. *M*, molecular mass markers.

(Fig. 5B). It is well established that 20S PT is activated by SDS at low concentrations [26]. When 0.0125% SDS was added to the buffer (Fig. 5A, lane 4), Grx2

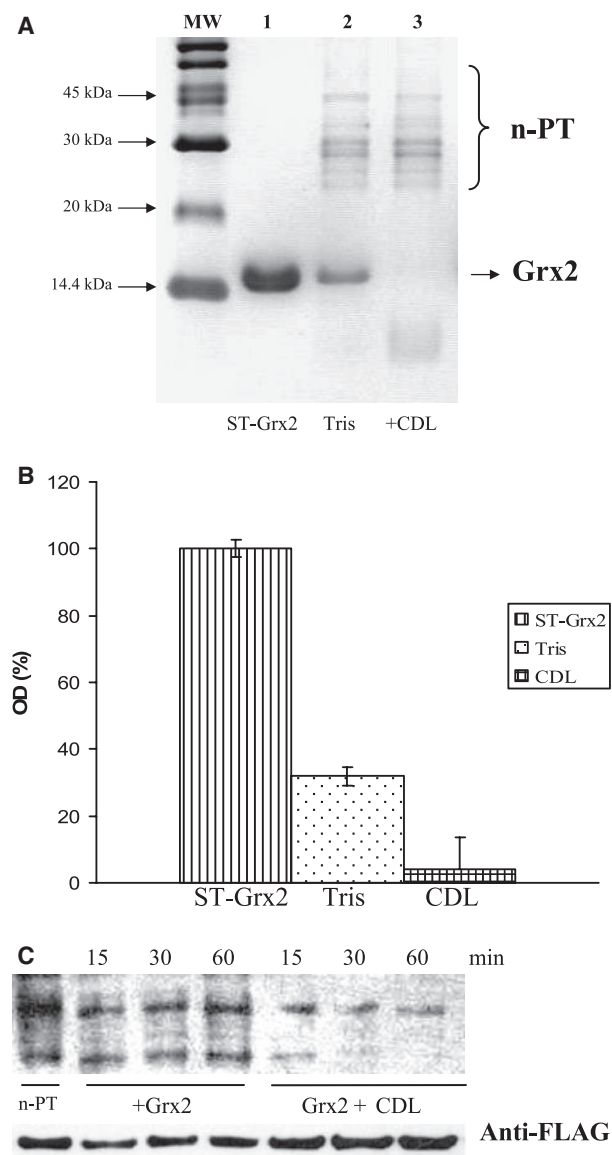


Fig. 6. Stimulation of Grx2-dependent proteasome deglutathionylation by cardiolipin. (A) Increased degradation of Grx2 in the presence of cardiolipin (CDL). 20% SDS-PAGE representative of n-PT preparations (2.5 μ g) incubated for 2 h at 37 °C in standard buffer with Grx2 (5 μ g). Lane 1, purified Grx2 incubated without n-PT; lane 2, Grx2 plus n-PT; lane 3, Grx2 plus CDL-activated n-PT (pre-incubation in the presence of 1.75 μ g CDL per μ g n-PT for 5 min at 37 °C). (B) Optical density quantification of Grx2 bands. Values are means \pm SD for three independent experiments represented in (A). The results are expressed as a percentage of the ST-Grx2 band, which was set as 100%. (C) Anti-GSH immunoblot. N-PT (20 μ g) samples were incubated with Grx2 in a final volume of 40 μ L (10 μ g; +Grx2) in the presence or absence of CDL (Grx2+CDL) for the indicated durations. N-PT, 20S PT preparation incubated under the same conditions without Grx2 or CDL. Anti-FLAG, loading control performed as described in Experimental procedures on the same membranes utilized for anti-GSH blotting.

degradation was increased to 98% when compared to the standard band for Grx2. The same results were obtained with the other deglutathionylases assayed, Trx1 and Trx2. As shown in Fig. 6C, both Trx1 and Trx2 were degraded by the proteasome (molar ratios for n-PT : Trx1 and n-PT : Trx2 were 1 : 10 and 1 : 20, respectively).

To evaluate whether Grx2 degradation was a non-specific process, Grx2, commercially available cytochrome *c*, recombinant peroxidase Ohr (organic hydroperoxide resistance protein), ovalbumin and bovine casein at similar concentrations were incubated with n-PT (supplementary Fig. S2). We selected cytochrome *c* because of its well-known resistance to degradation by the latent form of the 20S particle [27,28], and because its molecular mass (12 kDa) is close to that of recombinant Grx2 (14.1 kDa), eliminating the possibility of size- or protein diameter-specific degradation. The organic hydroperoxide resistance protein Ohr (17 kDa) was tested because of its cysteinyl-based active site [29,30]. Ovalbumin is a larger protein (44 kDa) that known to be degraded *in vitro* by 20S PT only when denatured [31,32]. Moreover, we compared the degradation of all proteins with that of casein, which has a low secondary structure content and is easily hydrolyzed by the 20S core. After incubation and prior to application to SDS-PAGE, n-PT was removed by filtration. The only two proteins degraded by 20S PT were Grx2 and casein (supplementary Fig S2), indicating a specific proteolytic process, probably correlated to the structural characteristics of Grx2 and its interaction with 20S PT. All of the other proteins tested here were resistant to degradation, in agreement with the view that the latent form of the 20S PT recognizes specific features in target proteins. These results gave further support to the notion that Grx2 deglutathionylase activity plays a regulatory role in 20S PT activities.

We next analyzed Grx2 fragmentation using mass spectrometry, by incubating Grx2 in standard buffer for 30 min or 2 h in the presence of n-PT. After incubation, standard Grx2 and fragments recovered by filtering the incubation mixture through 100 kDa cut-off micro filters were processed for MS analysis, as described in Experimental procedures. Grx2 degradation by the core, as shown by SDS-PAGE (Fig. 5A), was confirmed by the MS analysis (Table 1 and supplementary Fig. S3). As expected, Grx2 fragmentation by 20S PT was increased after 2 h incubation compared to the 30 min incubation (supplementary Fig. S3B,C, respectively). MS analysis of purified recombinant Grx2 not incubated with the proteasome confirmed the high degree of purity and absence of

Table 1. Peptides derived from *in vitro* degradation of Grx2 by the 20S proteasome and identified by mass spectrometry. Samples were prepared as described in Experimental procedures. Results shown were obtained as described for supplementary Fig. S3.

Peak ^a	Residues	Parent ion mass	Peptide sequence
a	22–65	4898.75 ± 0.19	VSQETVAHVKDLIGQKEVFVAAKTY ⁴⁷ CPYC ⁵¹ KATLSTLFQELNVPK
b	47–103	6255.05 ± 0.32	⁴⁷ CPYC ⁵¹ KATLSTLFQELNVPKSKALVLELDEMSEIQDALEEISGQKTPVNVYINGK
c	33–72	4445.30 ± 0.31	LIGQKEVFVAAKTY ⁴⁷ CPYC ⁵¹ KATLSTLFQELNVPKSKALVLE
d	41–75	3887.68 ± 0.20	VAAKTY ⁴⁷ CPYC ⁵¹ KATLSTLFQELNVPKSKALVLELDE
e	33–65	3703.95 ± 0.65	LIGQKEVFVAAKTY ⁴⁷ CPYC ⁵¹ KATLSTLFQELNVPK
f	45–75	3517.84 ± 0.42	TY ⁴⁷ CPYC ⁵¹ KATLSTLFQELNVPKSKALVLELDE
g	66–93	3032.25 ± 0.29	SKALVLELDEMSEIQDALEEISGQK

^a Peaks shown in supplementary Fig. S3.

any fragmentation after 2 h incubation in standard buffer at 37 °C (supplementary Fig. S3A). As shown in supplementary Fig. S3B, after 30 min incubation with the proteasome, a 4898 kDa Grx2 fragment was generated (Table 1). Although Grx2 fragmentation was greatly increased after the 2 h incubation when compared to the 30 min incubation (supplementary Fig. S3C and Table 1), the 4898 kDa peptide remained intact. It is noteworthy that almost all the fragments detected after the 2 h incubation, possess the active site (47CPYC51; Table 1). Most probably, these N-terminal fragments are correctly structured and retain oxido-reductase activity as the CPYC domain appears in the inner core of most of them.

To corroborate the results shown above, we tested whether deglutathionylation by Grx2 is increased when its entry into the catalytic chamber is stimulated. Cardiolipin is a well-established proteasome activator that is capable of stimulating 20S core particle entry [33]. Our hypothesis was that cardiolipin would have a synergistic effect on Grx2-dependent deglutathionylation by increasing Grx2 core entry. Therefore, after incubation of 20S PT with cardiolipin and Grx2, samples were analyzed by SDS-PAGE (Fig. 6A,B) and western blot using antibody against GSH (Fig. 6C), in parallel with proteasomal activity measurement in order to confirm catalytic recovery (Table 2).

It was found that activation of the 20S core by cardiolipin increased Grx2 degradation by 30% according to optical density measurements when compared to its degradation by the 20S PT but not stimulated by cardiolipin (Fig. 6A, lanes 3 and 2, respectively, and Fig. 6B). In parallel, deglutathionylation by Grx2 (evaluated by anti-GSH blotting analysis) in the presence of cardiolipin was greatly enhanced (Fig. 6C). It is noteworthy that, with increasing incubation time, the effect of cardiolipin was much more pronounced when compared to proteasome samples solely incubated with Grx2 for the same duration of incubation (Fig. 6C). These results strongly suggest that protea-

Table 2. Effect of Grx2 on chymotrypsin-like activity and post-acidic cleavage of the natively and *in vitro* S-glutathionylated 20S PT pre-incubated with cardiolipin. Natively (n-PT) and *in vitro* (PT-SG) S-glutathionylated proteasome preparations in 20 mM Tris/HCl, pH 7.5 (20 µg·100 µL⁻¹) were pre-incubated for 5 min with cardiolipin (1.75 µg·1 µg⁻¹ proteasome) followed by addition of Grx2 plus the RS. After 30 min at 37 °C, samples were filtered through YM-100 microfilters and washed three times with standard buffer. Proteasome recovered on the microfilter membrane was incubated (1 µg·100 µL⁻¹) with the indicated substrates (each at 50 µM). Fluorescence emission (440 nm; excitation 365 nm) was determined after 45 min incubation at 37 °C. All results are means ± SD and are expressed as nmol AMC released per µg proteasome per min. As controls, n-PT preparations were incubated in standard buffer in the absence of Grx2 or pre-treatment with cardiolipin (CDL), or pre-incubated with CDL in the absence of Grx2. Asterisks indicate a *P* value < 0.00034 compared to same proteasomal samples incubated in the presence of Grx2 without CDL (ANOVA).

	Chymotrypsin-like (s-LLVY-AMC)	Post-acidic (z-LLE-AMC)
n-PT	28 ± 2	14 ± 1.1
Pre-incubated with CDL	30 ± 1.8	15.5 ± 0.9
n-PT/Grx2	40 ± 1.5	19 ± 0.7
+ CDL	50 ± 4*	30.5 ± 1.5*
PT-SG/Grx2	37 ± 2.5	18 ± 1.0
+ CDL	61 ± 4.5*	36 ± 3.5*

some deglutathionylation is dependent on Grx2 entry into the catalytic chamber. The results shown in Table 2 confirm the cardiolipin stimulatory effect on 20S PT deglutathionylation, showing increased chymotrypsin-like activity and post-acidic proteasomal cleavage after simultaneous incubation of proteasome preparations with cardiolipin and Grx2. The results obtained showed 25% and 65% increased chymotrypsin-like activity and 61% and 100% increased post-acidic cleavage of n-PT and PT-SG preparations, respectively, when compared to samples incubated solely in the presence of Grx2. In all of the experiments described, after a 30 min pre-incubation with 20S core particle, Grx2 and cardiolipin were removed

by cycles of filtration and re-dilution, as described in the legend to Table 2, immediately prior to hydrolytic activity measurement. This procedure ensured that the increased post-acidic cleavage and chymotrypsin-like activity observed after 20S PT incubation with Grx2 in the presence of cardiolipin were due to increased de-glutathionylation rather than cardiolipin-dependent proteasomal-stimulated activity, as previously reported when 20S PT activity was determined during incubation with cardiolipin [33]. To control the cardiolipin washing procedure, proteasomal catalytic activity was determined with samples not incubated with Grx2. Under these conditions, proteasomal activity was not increased after washing cardiolipin from the reaction mixture when compared to proteasomal activity determined in samples of untreated 20S PT (Table 2). Our conclusion from this set of experiments was that cardiolipin-stimulated Grx2 entry into the core increased 20S PT de-glutathionylation. These results suggest that cysteine residues located inside the core are critical for redox regulation through S-glutathionylation.

Glutaredoxins with two cysteines in the active site possess two activities: mono- and dithiolic [9]. Therefore, we performed experiments with the Grx2C30S mutant, which lacks the C-terminal cysteine residue and retains only monothiolic activity. Grx2C30S activity determined using hydroxyethylidisulfide (HED) as a substrate, as described in the Experimental procedures, was 70% of that with the wild-type protein (data not shown). Monothiolic Grx2C30S was also able to de-glutathionylate n-PT, although to a lesser extent than wild-type Grx2 (supplementary Fig. S4, C30S and WT, respectively). The active C30S mutant was also degraded by the 20S PT (data not shown). Therefore, monothiolic glutaredoxins should be considered as potential proteasomal de-glutathionylases.

Grx2 is ubiquitinated *in vivo*

To determine whether Grx2 ubiquitination takes place at the physiological level, we next analyzed the presence of Grx2-ubiquitin complexes in crude cellular extract from yeast grown to stationary phase in glucose-enriched medium. During ubiquitination, up to six molecules of ubiquitin (8.5 kDa) can be added to form a polyubiquitin chain. We performed the experiments by immunoprecipitating Grx2 from the crude cellular extracts, followed by anti-ubiquitin and anti-Grx2 western blotting analyses (Fig. 7). Blotting with anti-Grx2 serum under reducing conditions showed the short (11.9 kDa) and long (15.9 kDa) forms of Grx2 (Fig 7, anti-Grx2). The band at 20 kDa is compatible with the size of mono-ubiquitinated short Grx2 iso-

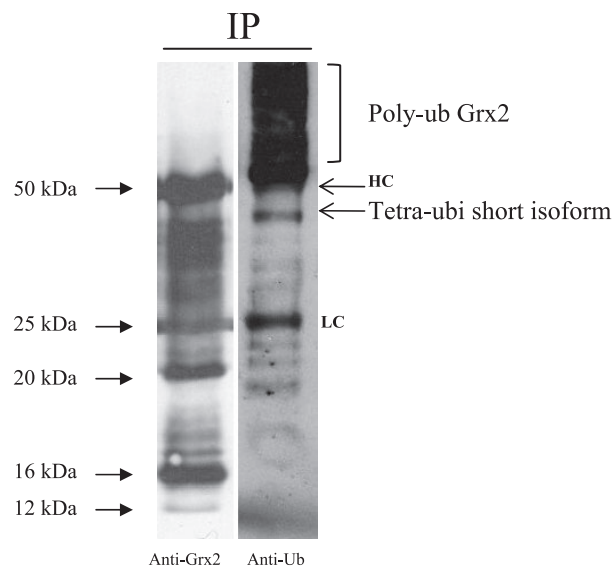


Fig. 7. *In vivo* Grx2 ubiquitination. Grx2 was immunoprecipitated with anti-Grx2 from crude cellular extract of yeast cells grown to stationary phase in glucose-enriched medium, followed by blotting with anti-Grx2 (Anti-Grx2) or anti-ubiquitin (Anti-Ub) as indicated. Immunoprecipitated samples were treated with 100 mM dithiothreitol prior to western blotting analyses. The molecular masses shown were deduced from a molecular mass standard ladder (Kaleidoscope; GE Biosciences, Piscataway, NJ, USA) by overlapping the membrane and overexposed blotted films (data not shown). LC and HC, light and heavy chains of IgG immunoglobulin.

forms (cytosolic and mitochondrial matrix) [34], as the same band was seen in the anti-ubiquitin blot (Fig. 7, anti-Ub). Blotting of the same samples with anti-ubiquitin revealed the presence of higher molecular mass complexes (above 50 kDa), compatible with poly-ubiquitinated Grx2 isoforms (Fig. 7, anti-Ub). These bands were not visualized in the anti-Grx2 blotting, most probably because they represent poly-ubiquitinated isoforms with a low concentration of Grx2. These results are the first demonstration that Grx2 is ubiquitinated *in vivo*.

Discussion

Sulfhydryl groups play a critical role in the function of many proteins, including enzymes, transcription factors and membrane proteins [35]. In a previous report, we concluded that oxidative stress induced proteasome glutathionylation and loss of chymotrypsin-like activity [8]. Now, we show that the S-glutathionylation and de-glutathionylation processes represent biological redox regulation of 20S PT under basal conditions. We also showed the existence of regulatory mechanisms (best characterized in the case of Grx2) that are able to de-glutathionylate the core particle, leading to

concomitant recovery of proteolytic activities. Our data show that two cytosolic thioredoxins also have the same effects on the 20S particle (Fig. 4). Furthermore, in principle, monothiolic glutaredoxins might also dethiolate the core, based on the ability of mutant Grx2C30S to perform this activity (supplementary Fig. S4). The existence of multiple pathways to dethiolate 20S PT may represent a highly tuned process to regulate this protease complex.

The data present in Figs 5 and 6 indicate that either Grx2, Trx1 and Trx2 must enter the latent 20S core to deglutathionylate proteasomal cysteine residues and recover proteasomal activities (Figs 3 and 4C). Moreover, as Grx2 entry into the 20S core particle increased, deglutathionylation and recovery of proteasomal activities were significantly improved (Fig. 6C and Table 2). Therefore, a question to be raised is whether these oxido-reductases undergo catalytic cycles during proteasomal deglutathionylation since they are degraded by the core. We do not have a definitive answer so far. Based on the results obtained by mass spectrometry analysis, a considerable proportion of Grx2 was not cleaved even after 2 h incubation (supplementary Fig. S3C). Furthermore, as noted above, it is possible that the 4898 kDa peptide detected after 30 min incubation that contains the conserved CXXC motif retains dethiolase activity. Nevertheless, the central point addressed here is that Grx2 is involved in redox regulation of the proteasome, either by an enzymatic or chemical reaction. The details of this process will be further investigated.

As already demonstrated in mammals, some proteins are able to enter the 20S core particle, whereas, for others, only partial structural loss or the existence of poorly structured domains allow free entry [36,37]. Crystallographic modeling shows that the molecular architecture of Grx2 consists of a four-stranded, mixed β -sheet and five α -helices. The β -sheet forms the central core of the protein, with helices 1 and 3 located on one side of the sheet and helices 2, 4 and 5 located on the other side [38] (Discola KF & Netto LES, unpublished results). Most probably, a specific interaction of particular domains of these oxido-reductases stimulates 20S PT opening to allow their entry. Additionally, glutaredoxins and thioredoxins share a common fold, the so-called thioredoxin fold [39], and isoforms of both oxido-reductase families (Grx2, Trx1 and Trx2) are able to deglutathionylate the 20S PT. The recognition of structural features in Grx2, Trx1 and Trx2 by 20S PT indicates that the deglutathionylase activity reported here represents a relevant signaling event. We are presently investigating whether that common feature is related to their easy entry into the latent 20S particle.

According to our data, Grx2 is ubiquitinated inside cells (Fig. 7). Although Grx2 degraded by the 20S PT *in vitro*, the present findings show that degradation of Grx2 might be controlled by ubiquitination at the physiological level. Reports in the literature raise the possibility that proteins that can freely enter the 20S PT can be degraded by both ubiquitin-dependent and -independent processes [37].

Experimental procedures

Materials

Anti-FLAG IgG, cardiolipin (CDL), dithionitrobenzoic acid, diethylenetriaminepentaacetic acid, dithiothreitol, *N*-ethylmaleimide, GSH, glutathione reductase (GR), NaBH₄ and Tris(2-carboxy-ethyl) phosphine hydrochloride were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Anti-20S PT serum, cytochrome *c* from equine heart and the fluorogenic substrates carbobenzoxy-Leu-Leu-Glu-AMC (z-LLE-AMC), carbobenzoxy-Ala-Arg-Arg-AMC (z-ARR-AMC) and succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (s-LLVY-AMC) were obtained from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Molecular mass markers for SDS-PAGE and Protein A-Sepharose 4B Fast Flow were obtained from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA). NBD and HED were purchased from Aldrich (St. Louis, MO, USA). AMC (7-amido-4-methylcoumarin) was purchased from Fluka (Buchs Switzerland). Anti-GSH serum was obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Anti-ubiquitin monoclonal serum was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Bradford protein assay reagent was purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Sinapinic acid (matrix) and myoglobin (MS standard) were part of the ProteoMass kit (Sigma).

Yeast strain and growth

Saccharomyces cerevisiae RJD1144 (MATa his3 Δ 200 leu2-3,112 lys2-801 trp1 Δ 63 ura3-52 PRE1^{FH}::Ylplac211 URA3) derived from strain JD47-13C was kindly donated by R. Deshaies (Division of Biology, Caltech, Pasadena, CA, USA). In this strain, the 20S proteasome Pre1 subunit is tagged with the FLAG peptide sequence and a polyhistidine tail, which allows single-step purification [40]. Cells were cultured in glucose-enriched YPD medium (4% glucose, 1% yeast extract and 2% peptone) at 30 °C with reciprocal shaking, and harvested after 60 h incubation.

Extraction and purification of the 20S proteasome

The 20S PT was purified by nickel-affinity chromatography or by immunoprecipitation with anti-FLAG® M2 affinity gel freezer-safe (Sigma) as described previously [8].

Non-tagged 20S PT was purified by conventional multi-step chromatography as described previously [8]. 20S proteasome preparations obtained by affinity chromatography were utilized in all experiments. Preparations obtained by conventional chromatography were utilized as controls for the tagged 20S particle. The purity of 20S PT preparations was confirmed by SDS-PAGE and non-denaturing PAGE as described previously [8].

Proteasome activity determination by hydrolysis of fluorogenic peptides

Fluorogenic peptides (AMC, 7-amido-4-methylcoumarin as the fluorescent probe) were utilized for determination of proteasomal activity, as described elsewhere [41]. s-LLVY-AMC was utilized as a standard peptide to assess the chymotrypsin-like activity of the core, z-LLE-AMC for the post-acidic cleavage and z-ARR-AMC for the trypsin-like activity [41]. 20S PT (0.5–3 µg) was incubated at 37 °C in 20 mM Tris/HCl buffer, pH 7.5, herein referred to as standard buffer. Incubation was started by the addition of 10–50 µM of peptide. Fluorescence emission was recorded at 440 nm (excitation at 365 nm). The amount of AMC released from the substrates was calculated using a standard curve of free AMC.

Reduction, oxidation and S-glutathionylation of the 20S proteasome

Preparations of purified 20S PT (500–1000 µg) extracted from cells grown in glucose-containing medium were incubated overnight at 4 °C in 20 mM Tris buffer, pH 7.5, containing 300 mM dithiothreitol. Then, proteasome preparations were passed through a HiTrap desalting column to remove dithiothreitol, according to the manufacturer's protocol (Amersham Biosciences). Eluted protein fractions were tested for the presence of dithiothreitol by reaction with dithionitrobenzoic acid. Enriched protein fractions, identified by reactivity to Bradford reagent and for which dithiothreitol reactivity was decreased, were selected for further use. Combined fractions were filtered and concentrated through Microcon YM-100 filters (Millipore, Billerica, MA, USA). These preparations are referred to here as dithiothreitol-reduced 20S proteasome (PT-SH). Aliquots of these preparations were oxidized by incubation in standard buffer in the presence of 5 mM H₂O₂ and 100 µM diethylenetriaminepentaacetic acid for 30 min at room temperature. After incubation, excess H₂O₂ was removed by two cycles of centrifugation at 8000 g for 15 mins at room temperature, and re-dilution through Microcon YM-100 filters. S-glutathionylated 20S core (PT-SG) was obtained by incubation of oxidized 20S proteasome (PT-SOH) aliquots (100 µg) at room temperature for 20 min in the presence of 5–10 mM GSH. Afterwards, GSH was removed by four cycles of cen-

trifugation at 8000 g for 15 mins at room temperature, and re-dilution through Microcon filters. The S-glutathionylated core used for the assays described here was either the natively S-glutathionylated proteasome(n-PT) purified from cells grown to stationary phase in glucose-enriched medium or the *in vitro* S-glutathionylated core (PT-SG), as described above. After determination of protein concentration, aliquots of PT-SH, n-PT or PT-SG preparations were used for further incubation, immunoblot analyses, SDS-PAGE and hydrolytic assays.

Cloning and expression of yeast GRX2

Cloning of the yeast *GRX2*, its expression in *E. coli*, and Grx2 purification have been described previously [20]. The recombinant protein is tagged with an N-terminal polyhistidine sequence. Purified Grx2 was analyzed by SDS-PAGE. Grx2 activity was determined spectrophotometrically by measuring the reduction of 0.5 mM HED in the presence of 0.5 mM GSH, 0.1 mM NADPH and 0.3 U·mL⁻¹ GR at 37 °C, and following the disappearance of NADPH at 340 nm. All of the experiments with Grx2 were controlled by assaying non-tagged protein (thrombin-treated Grx2). No difference between tagged and non-tagged Grx2 was observed.

Cloning, expression and purification of yeast thioredoxin reductase 1 (Trr1)

Cloning of the yeast *TRR1*, its expression in *E. coli*, and Trr1 purification have been described previously [42]. The recombinant protein was tagged with an N-terminal polyhistidine sequence.

Cloning, expression and purification of yeast Trx1 and Trx2

The *trx1* and *trx2* genes were amplified by PCR from yeast genomic DNA (Research Genetics, Invitrogen), as described previously [43]. PCR products were cloned into the *NdeI* and *SpeI* restriction sites of pET17b expression vector (Novagen, Darmstadt, Germany). *E. coli* BL21 (DE3) cells were transformed with pET17b/*trx1* or pET17b/*trx2* vectors. Protein purification was performed as described previously [43].

Incubation of S-glutathionylated 20S proteasome with Grx2 and thioredoxins

S-glutathionylated 20S PT (20–50 µg), obtained either by growing cells to stationary phase in 4% glucose (n-PT) or by *in vitro* S-glutathionylation (PT-SG), was incubated at 37 °C for 15–120 min in the presence of Grx2 (5–15 µg) in

0.1 mL standard buffer containing 0.5 mM GSH, 2 mM NADPH and 0.3 U·mL⁻¹ GR, herein referred to as the reductive system (RS). Incubation with thioredoxins was performed under the same conditions with standard buffer containing 2 mM NADPH and 0.5 µg Trx1 per 100 µL (final concentration). When specified, 1.75 µg CDL per µg 20S PT was added to the mixture. After incubation, samples were filtered by four cycles of centrifugation at 8000 *g* for 15 mins at room temperature, and re-dilution through YM-100 Microcon filters. Control samples were incubated in the presence of all reagents except Grx2, Trx1, Trx2 or CDL.

SDS-PAGE analysis of proteins

SDS-PAGE was performed as described previously [44]. Protein preparations, after incubation under the indicated conditions (described in figure legends), were mixed with gel loading buffer (60 mM Tris/HCl, pH 6.8, containing 25% glycerol, 2% SDS and 0.1% bromophenol blue) and frozen until applied to the gel. Gels were stained either by Coomassie brilliant blue or by the silver staining method, as described previously [44].

Immunoprecipitation with anti-Grx2 serum

Grx2 immunoprecipitation from yeast cell lysates was performed as follows: pellets (150–200 mg) of yeast cells were disrupted by vortexing cells mixed with 1 volume of glass beads and 2 volumes of standard buffer, containing 500 mM NaCl plus 1 µL protease inhibitor cocktail (Calbiochem) per 20 mg cellular pellet. After 10 cycles of 2 min vortexing and 1 min resting on ice, the cell lysate was centrifuged at 15 000 *g* for 40 min. The supernatant was used for immunoprecipitation. After pre-clearing the cell lysate (1 mg protein) in 200 µL of pre-treated Protein A-Sepharose, the supernatant obtained after centrifugation was used for incubation with anti-Grx2 serum (1 : 50 dilution). Incubation was performed for 1 h in a cold room at 8°C on a rotary shaker and transferred to 200 µL Protein A-Sepharose for a further 15 h incubation. Samples were then centrifuged at 10 000 *g*, and the Protein A-Sepharose beads were washed five times with 500 µL Tris/NaCl buffer. After removing the final supernatant, 100 µL SDS-PAGE sample buffer was added to the immunoprecipitate, and samples were heated for 10 min at 100 °C. After centrifugation, at 15 000 *g* for 10 mins at room temperature samples were applied to 12.5% SDS-PAGE. Grx2 immunoprecipitates were immunoblotted with anti-Grx2 and anti-ubiquitin serum.

Immunoassays

Immunoblotting was performed using the ECLTM western blotting system (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's protocol. Membranes were incubated with

horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and protein signals were detected using enhanced chemiluminescence western blotting detection reagents (Amersham Biosciences). Proteasome samples analyzed using anti-GSH serum were mixed with gel loading buffer containing 10 mM *N*-ethylmaleimide. As a control, samples of PT-SH were run in parallel to all experiments shown and no background signal was observed. The loading control was evaluated by anti-FLAG blotting, as follows: the same membranes utilized for anti-GSH blotting were incubated overnight with 10 mM Tris(2-carboxy-ethyl) phosphine hydrochloride in NaCl/P_i (100 mM Tris, pH 7.5 containing 200 mM NaCl). Next, membranes were washed five times with NaCl/P_i followed by the anti-FLAG blotting. Dilutions of antibodies were as follows: 1 : 200 (anti-ubiquitin), 1 : 1000 (anti-GSH and anti-20S PT) and 1 : 2000 (anti-Grx2 and anti-FLAG).

Optical density measurements

When specified, optical density measurements were performed using IMAGEQUANT software from Molecular Dynamics (Sunnyvale, CA, USA).

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and the Redoxome Network of CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa). This manuscript was revised by the American Journal Experts (<http://www.journalexperts.com>).

References

- 1 Ellis HR & Poole LB (1997) Novel application of 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole to identify cysteine sulfenic acid in the AhpC component of alkyl hydroperoxide reductase. *Biochemistry* **36**, 15013–15018.
- 2 Barrett WC, DeGnore JP, Keng YF, Zhang ZY, Yim MB & Chock PB (1999) Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* **274**, 34543–34546.
- 3 Claiborne A, Yeh JI, Mallett TC, Luba J, Crane EJ, Charrier V & Parsonage D (1999) Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation. *Biochemistry* **38**, 15407–15416.
- 4 Claiborne A, Mallett TC, Yeh JI, Luba J & Parsonage D (2001) Structural, redox, and mechanistic parameters for cysteine-sulfenic acid function in catalysis and regulation. *Adv Prot Chem* **58**, 215–276.
- 5 Yang KS, Kang SW, Woo HA, Hwang SC, Chae HZ, Kim K & Rhee SG (2001) Inactivation of human

- peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfenic acid. *J Biol Chem* **277**, 38029–38036.
- 6 Nulton-Persson AC & Szwedla LI (2000) Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* **276**, 23357–23361.
 - 7 Nulton-Persson AC, Starke DW, Mieyal JJ & Szwedla LI (2003) Reversible inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase in response to alterations in the mitochondrial glutathione status. *Biochemistry* **42**, 4235–4242.
 - 8 Demasi M, Silva GM & Netto LE (2003) 20S proteasome from *saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is S-glutathionylated. *J Biol Chem* **278**, 679–685.
 - 9 Fernandes AP & Holmgren A (2004) Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antiox Redox Signal* **6**, 63–74.
 - 10 Georgiou G & Masip L (2003) An overoxidation journey with a return ticket. *Science* **300**, 592–594.
 - 11 Luikenhuis S, Perrone G, Dawes IW & Grant CM (1998) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol Biol Cell* **9**, 1081–1091.
 - 12 Shenton D, Perrone G, Quinn KA, Dawes IW & Grant CM (2002) Regulation of protein S-glutathionylation by glutaredoxin 5 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**, 16853–16859.
 - 13 Garrido EO & Grant CM (2002) Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. *Mol Microbiol* **43**, 993–1003.
 - 14 Holmgren A (1976) Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**, 2275–2279.
 - 15 Jung CH & Thomas JA (1996) S-glutathiolated hepatocyte proteins and insulin disulfides as substrates for reduction by glutaredoxin, thioredoxin, protein disulfide isomerase, and glutathione. *Arch Biochem Biophys* **335**, 61–72.
 - 16 Davis DA, Newcomb FM, Starke DW, Ott DE, Mieyal JJ & Yarchoan R (1997) Thioltransferase (glutaredoxin) is detected within HIV-1 and can regulate the activity of glutathionylated HIV-1 protease in vitro. *J Biol Chem* **272**, 25935–25940.
 - 17 Bandyopadhyay S, Starke DW, Mieyal JJ & Gronostajski RM (1998) Thioltransferase (glutaredoxin) reactivates the DNA-binding activity of oxidation-inactivated nuclear factor I. *J Biol Chem* **273**, 392–397.
 - 18 Rodríguez-Manzaneque MT, Ros J, Cabisco E, Sorribas A & Herrero E (1999) Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**, 8180–8190.
 - 19 Gan ZR (1992) Cloning and sequencing of a gene encoding yeast thioltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* **187**, 949–955.
 - 20 Pedrajas JR, Porras P, Martínez-Galisteo E, Padilla CA, Miranda-Vizuete A & Bárcena JA (2002) Two isoforms of *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 2 are expressed in vivo and localize to different subcellular compartments. *Biochem J* **364**, 617–623.
 - 21 Lee JH, Kim K, Park EH, Ahn K & Lim CJ (2007) Expression, characterization and regulation of a *Saccharomyces cerevisiae* monothiol glutaredoxin (Grx6) gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cells* **24**, 316–322.
 - 22 Mesecke N, Mittler S, Eckers E, Herrmann JM & Deponte M (2008) Two novel monothiol glutaredoxins from *Saccharomyces cerevisiae* provide further insight into iron-sulfur cluster binding, oligomerization, and enzymatic activity of glutaredoxins. *Biochemistry* **47**, 1452–1463.
 - 23 Jamieson DJ (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1511–1527.
 - 24 Moradas-Ferreira P & Costa V (2000) Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. *Redox Rep* **5**, 277–285.
 - 25 Maris AF, Assumpcao AL, Bonatto D, Brendel M & Henriques JA (2001) Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. *Curr Genet* **39**, 137–149.
 - 26 Reshetnyak YK, Kitson RP, Lu M & Goldfarb RH (2004) Conformational and enzymatic changes of 20S proteasome of rat natural killer cells induced by mono- and divalent cations. *J Struct Biol* **145**, 263–271.
 - 27 Huffman HA, Sadeghi M, Seemuller E, Baumeister W & Dunn MF (2003) Proteasome-cytochrome *c* interactions: a model system for investigation of proteasome host-guest interactions. *Biochemistry* **42**, 8679–8686.
 - 28 Sharon M, Felderer WS, Rockel B, Baumeister W & Robinson CV (2006) 20S proteasomes have the potential to keep substrates in store for continual degradation. *J Biol Chem* **281**, 9569–9575.
 - 29 Cussiol JR, Alves SV, de Oliveira MA & Netto LE (2003) Organic hydroperoxide resistance gene encodes a thiol-dependent peroxidase. *J Biol Chem* **278**, 11570–11578.
 - 30 Oliveira MA, Guimarães BG, Cussiol JR, Medrano FJ, Gozzo FC & Netto LE (2006) Structural insights into enzyme-substrate interaction and characterization of enzymatic intermediates of organic hydroperoxide resistance protein from *Xylella fastidiosa*. *J Mol Biol* **359**, 433–445.

- 31 Cascio P, Hilton C, Kisselev AF, Rock KL & Goldberg AL (2001) 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J* **20**, 2357–2366.
- 32 Kisselev AF, Callard A & Goldberg AL (2006) Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem* **281**, 8582–8590.
- 33 Ruiz de Mena I, Mahillo E, Arribas J & Castaño PG (1993) Kinetic mechanism of activation by cardiolipin (diphosphatidylglycerol) of the rat liver multicatalytic proteinase. *Biochem J* **296**, 93–98.
- 34 Porras P, Padilla CA, Krayl M, Voos W & Bárcena JA (2006) One single in-frame AUG codon is responsible for a diversity of subcellular localizations of glutaredoxin 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281**, 16551–16562.
- 35 Netto LE, Oliveira MA, Monteiro G, Demasi AP, Cusiol JR, Discola KF, Demasi M, Silva GM, Alves SV, Faria VG *et al.* (2006) Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **146**, 180–193.
- 36 Forster A & Hill CP (2003) Proteasome degradation: enter the substrate. *Trends Cell Biol* **13**, 550–553.
- 37 Orłowski M & Wilk S (2003) Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch Biochem Biophys* **415**, 1–5.
- 38 Discola KF, Oliveira MA, Silva GM, Barcena JA, Porras P, Padilla A, Netto LE & Guimarães BG (2005) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of glutaredoxin 2 from *Saccharomyces cerevisiae* in different oxidation states. *Acta Crystallogr F Struct Biol Cryst Commun* **61**, 445–447.
- 39 Copley SD, Novak WR & Babbitt PC (2004) Divergence of function in the thioredoxin fold superfamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry* **43**, 13981–13995.
- 40 Verma R, Chen S, Feldman R, Schieltz D, Yates J, Dohmen J & Deshaies RJ (2000) Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. *Mol Biol Cell* **11**, 3425–3439.
- 41 Gaczynska M & Osmulski PA (2005) Characterization of noncompetitive regulators of proteasome activity. *Methods Enzymol* **398**, 425–438.
- 42 Oliveira MA, Discola KF, Alves SV, Barbosa JA, Medrano FJ, Netto LE & Guimarães BG (2005) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of NADPH-dependent thioredoxin reductase I from *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Cryst Commun* **61**, 387–390.
- 43 Jeong JS, Kwon SJ, Kang SW, Rhee SG & Kim K (1999) Purification and characterization of a second type thioredoxin peroxidase (type II TPx) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **38**, 776–783.
- 44 Bollag DM, Rozycki MD & Edelman ST (1996) *Protein Methods*, 2nd edn. Wiley-Liss Publishers, New York.

Supplementary material

The following supplementary material is available online:

Fig. S1. SDS/PAGE profile of 20S PT preparations. 12.5% SDS-PAGE of 20S PT stained with Coomassie brilliant blue (lane 2). Lane 1 contains molecular mass markers.

Fig. S2. *In vitro* degradation of standard proteins by the 20S PT. Five micrograms of each protein, except casein (10 µg), were incubated for 2 h at 37 °C in standard buffer with 2.5 µg n-PT.

Fig. S3. MALDI-TOF analyses of Grx2 after incubation with natively S-glutathionylated 20S PT.

Fig. S4. Comparative 20S PT deglutathionylation by Grx2C30S and wild-type Grx2.

Doc. S1. MALDI-TOF analyses of Grx2.

This material is available as part of the online article from <http://www.blackwell-synergy.com>

Please note: Blackwell Publishing are not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

SUPPLEMENTAL DATA

FIGURE S1

12.5% SDS-PAGE pattern of 20S PT stained with Coomassie Brilliant Blue is shown (lane 2) and a molecular weight marker (lane 1).

FIGURE 1S

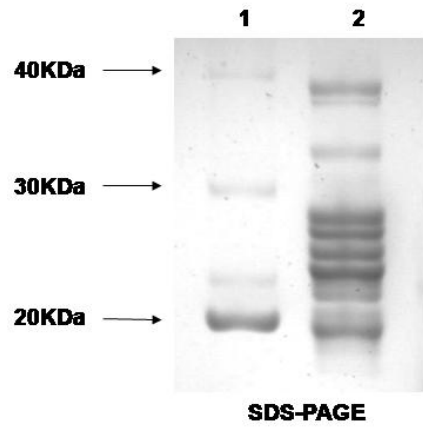


FIGURE S2

Five micrograms of each protein, except casein (10 µg), were incubated for 2 h at 37°C in standard buffer with 2.5 µg n-PT (+, even samples). The odd bands (-) correspond to standard protein samples incubated at the same conditions without n-PT. After incubation, n-PT was removed by filtration prior to application to a 15% SDS-PAGE gel. Protein samples were Grx2, Cytochrome C (*CytC*), Organic hydroperoxide resistance protein (*Ohr*), Ovalbumin (*Ova*) and Casein (*Cas*).

FIGURE 2S

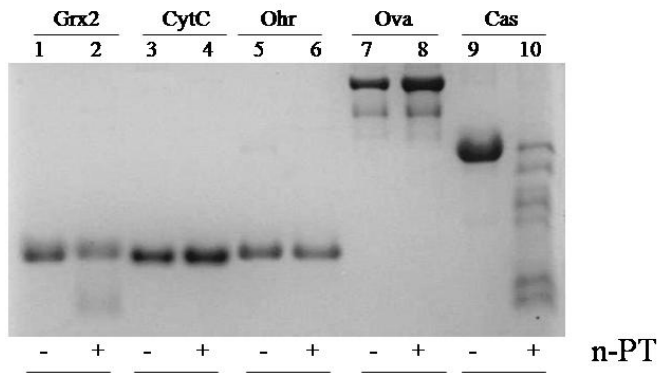


FIGURE S3

MALDI-TOF analyses of Grx2 after incubation with natively S-glutathionylated 20S PT.

All incubations were performed in standard buffer at 37°C. Molar ratio (n-PT:Grx2) was 1:20.

After incubation, proteasome was removed by filtration, and Grx2 samples were utilized for

MALDI-TOF analyses as described in Materials and Methods. (A) purified Grx2 incubated for

2h in the absence of proteasome and in the presence of n-PT (B) for 30 minutes or (C) 2 hours

incubation. The fragments generated during incubation (ordered by letters) are shown in Table 1.

FIGURE 3S

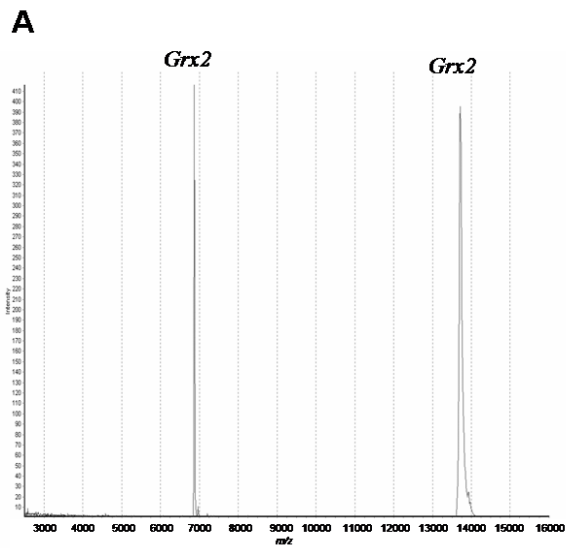


FIGURE 3S

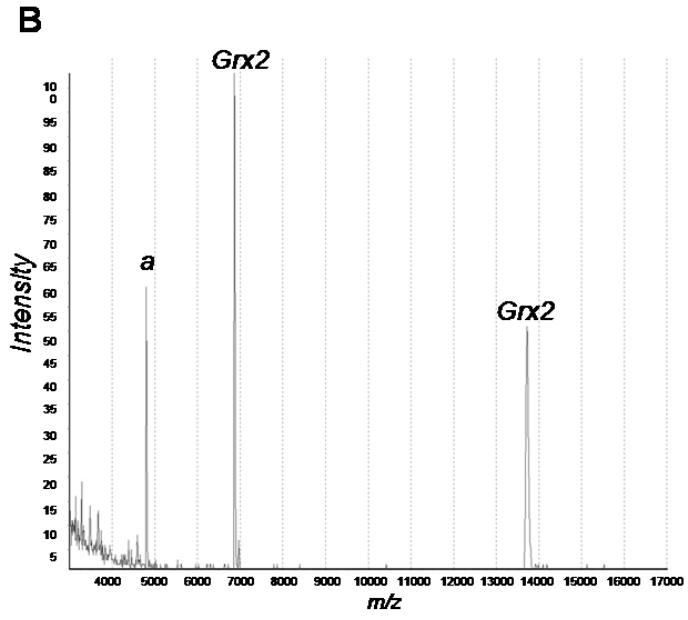


FIGURE 3S

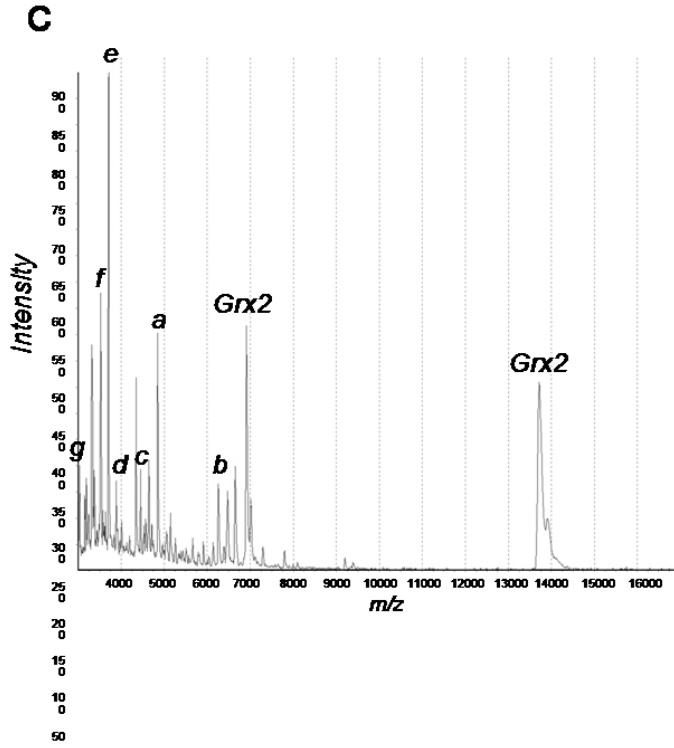
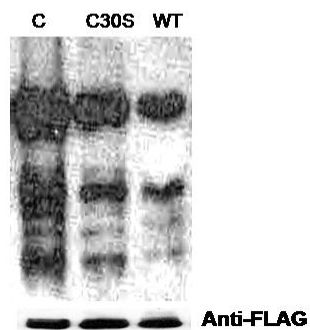


FIGURE S4

Comparative 20S PT deglutathionylation by Grx2C30S and wild type Grx2. 20 μ g n-PT was incubated (final volume of 40 μ L standard buffer containing 2 mM NADPH, 0.3 U/ml GR and 0.5 mM GSH) in the presence of 10 μ g Grx2C30S (*C30S*) or 10 μ g wild type Grx2 (*WT*) for 30 minutes. *C*, n-PT samples incubated under the same conditions in the absence of the oxidoreductases. *Anti-FLAG*, loading control performed as described in Materials and Methods on the same membranes utilized for the anti-GSH blotting.

FIGURE 4S



Doc. S1. MALDI-TOF analyses of Grx2

Prior to incubation with the 20S PT, Grx2 samples were filtered through YM-30 Microcon filters, and the protein recovered on the membrane was diluted into standard buffer. After incubation in the presence of the 20S core, the samples were filtered through 100 kDa cutoff microfilters to separate the proteasome from intact and fragmented Grx2. Total Grx2 obtained in the filtrate was used for MS determination. Samples were desalted through reverse-phase C₁₈ Zip-Tips (Millipore), according to the manufacturer's protocol. MS analyses were performed on an Ettan MALDI/ToF-Pro instrument (Amersham Biosciences) under linear mode using sinapinic acid as the matrix. Briefly, 1 µl Zip-Tip processed samples were mixed with 1 µL saturated matrix solution (50% ACN containing 0.1% TFA) and 0.4 µl were deposited onto the sample slide and allowed to dry. Data acquisition and processing were performed using Ettan MALDI software. External calibration was performed with myoglobin

Cloning and expression of Grx2-C30S

Site-directed mutagenesis was employed to mutate the Grx2 cysteine 30 to a serine residue. The *GRX2* gene was PCR-amplified from *S. cerevisiae* genomic DNA (strain W303). Forward and reverse primers (mutated sequence is underlined), respectively, were 5'cgcgatccatgatgatggtatcccaggaaacagttgctcacgtaaaggatctgattggccaaaaggaagtgtttgttcagcaaagacatactgcccttacagcaaaagctactttg3', containing the NdeI restriction site, and 5'cgcaagcttgatccctattgaaataccggcttc3', containing the BamHI restriction site. The gene sequence was confirmed with an automated DNA sequencer. The *E. coli* BL21 (DE3) strain was transformed with the resulting pET15b/*grx2*-C30S construct. Expression was induced with 1 mM

isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 3 hours. The protein was purified by cobalt-affinity chromatography, and purity grade was confirmed by SDS-PAGE.