



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Análise de duas possíveis nitrorredutases codificadas
pelos genes *FRM2* e *HBN1* em *Saccharomyces cerevisiae*
e suas funções na resposta ao estresse oxidativo**

Dissertação de Mestrado

Iuri Marques de Oliveira

Porto Alegre

2008

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Análise de duas possíveis nitrorredutases codificadas pelos genes *FRM2* e *HBN1* em *Saccharomyces cerevisiae* e suas funções na resposta ao estresse oxidativo

Iuri Marques de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Porto Alegre, fevereiro de 2008

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Reparação de DNA de Eucariotos do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O projeto foi subsidiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pelo Laboratório de Genotoxicidade do – GENOTOX - Instituto Royal, Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A redação da tese fundamentou-se nas recomendações do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, dessa Universidade.

“Tu vê””

A meus pais
À minha família e meus amigos

AGRADECIMENTOS

No final desta etapa são muitos os amigos e colegas a quem gostaria de agradecer o auxílio, estímulo e companheirismo. Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente, para realização e concretização deste trabalho.

Ao Professor João Antonio Pêgas Henriques, pela oportunidade de aprendizado e confiança depositada em mim durante esses anos e pela amizade. Dispensa comentários como pesquisados, é um imortal, mas é também uma grande pessoa e sempre disposto a ajudar e dar condições para que possamos alcançar os objetivos do projeto, mesmo que muitas vezes tenha pouco tempo disponível, mas como disse a Prof. Célia certa vez “Dez minutos com o Henriques vale mais do que duas horas com outro orientador”

Ao Diego, ops, digo Professor Diego Bonatto, meu “co-orientador não oficial” por todo apoio e colaboração ao longo desses dois anos, podemos resumir tudo dizendo que sem ele este projeto nem sequer existiria. O Diego é uma pessoa que pode ser definida em apenas uma palavra: Gênio.

Ao departamento de biofísica, um ambiente de trabalho muito divertíssimo, onde tudo é possível acontecer, até as coisas mais inacreditáveis.

Ao Elmo e a Ellen (Miss Genética) por estar sempre prontos para ajudar.

Ao mestrando Alfeu Zanotto-Filho e ao Professor José Cláudio Fonseca Moreira por toda ajuda e colaboração nos ensaios bioquímicos, fundamentais neste trabalho.

Para Professora Kátia Valença (Maíinha), pessoa maravilhosa e agradabilíssima, pelas conversas, ensinamentos, desabafos e por ser um exemplo a ser seguido no ensino e relacionamento com os alunos e também pela oportunidade de permitir a realização do estagio didático na sua disciplina.

Ao grande amigo Renato, caro “co-co-orientador”, pelas tardes divertidíssimas, parceria sem igual no orkut, youtube e principalmente no MSN. Se a nossa produção científica

fosse igual à produção de besteiras, seríamos capa da Nature, mas a vida não seria tão divertida certamente. Agradeço também pelos ensinamentos e por toda ajuda, que foi enorme. O Renato é quem dá vida ao laboratório e ao departamento. Espero que essa amizade dure ainda muitos anos.

Às meninas Super-poderosas: Dinara, Valéria e especialmente a Albanin, por sempre atender os vários “me ensina” e “me empresta”. Aos anexos das Super-poderosas: Ana Bárbara (Ana Barbie), Bruna1 e Bruna2 (Vermelhinha) e Ângelo (um caso de nepotismo...).

Às minhas “filhas científicas”: Pâmela Portela (Panelinha), por muitas tardes engraçadas no laboratório (na verdade mais para mim do que para ela) e por ser uma pessoa tão importante e especial para mim. À minha outra filha Elaine Melo (Lala, óóóó minha patizinha) que foi a melhor coisa que me aconteceu neste período, ter conhecido essa pessoa tão doce e incrível (de uma maneira não menos incrível, que só acontece com pessoas habitantes da Biofísica), mas mesmo conhecendo há pouco tempo, já ocupa um grande espaço na minha vida.

Aos colegas e amigos que já se foram em especial o Rafael Beneduzzi (Meia Dúzia), a Fernanda, a Priscila (Chatinha Querida), Ana Catarina, Giovanni (Didjo), Knulp. E mais especialmente aos estagiários e amigos Gabriel Vazata Furtado (Furtadinho) por sempre conseguir levantar nosso astral e fazer nos sentirmos grandes e ao Attilio Galhardo (Titi! Titi! Titi!) pela tardes divertidas e por ser o cara mais viajante q conheço (no sentido literal da palavra, quase um guia turístico). Ao Eduardo (Fada das 1001 utilidades) pelo seu trabalho voluntário, generoso e caridoso no nosso laboratório. Ao novo colega, Tiago Degrandi, já que é uma grande honra trabalhar ao lado de uma lenda viva da Biologia da UFRGS. Aos membros sazonais e amigos: Gustavo Reolon, Natasha (The Rodo), Samuel, Cláudio, Daniel Prá, Aline Zandonai, Ana Paula.

Aos amigos do 219: Renata Matuo, Frabício Garmus, Jaque Cardone, Cassiana Viau. Ao pessoal do Laboratório GENOTOX – ROYAL: Gabriel Rübensam, Márcia, Miriana, Rosel, Jaqueline de Deos, mas especialmente à minha ex-orientadora e amiga Izabel Villela, pois tanto os seus ensinamentos como a sua amizade permanecem muito vivos.

Aos meus grandes amigos de muitos anos Andrei Gibbon Neves, Rafael Leandro Bitencourt, Rodrigo Adalberto Arruda da Silva, Leonardo Barbosa Leiria, Markus Berger Oliveira, Cláudia Clebsch, Ana Paula Moreira, Cristina Fadanelli, Fábio Culau (Culau), Denis Santos Silva, Cíntia Bitencourt (ou Bean?) (Tutti) Fernando Hayashi (Japa), Shana Webber (Grande Shena), Geraldo Mader, Alana Poloni (Melissa), Daniele Siqueira, Juliana Gibbon (Juju), Marcelo Vainsterbauer que têm sido como uma grande família para mim durante nestes muitos anos de convivência. Em especial ao Rafael, que, além disso, sempre me auxilia no Inglês. Poderia escrever muitas páginas falando de cada uma dessas pessoas, mas infelizmente só citarei os nomes, mas isso não diminui em nada a importância que possuem na minha vida.

As varias amigas novas que fiz neste período: Andressa (meu bombom) que teve um papel importante na minha vida, Carol, Shirley, Édina, Vanessa, Juciara (Baiana Maravilhosa), Fabiana Raimundo, Fabiana (Bia) e Camila.

À toda minha família, que sempre me deu base para prosseguir, em especial à minha tia Tereza, tia Mariazinha, tio “Alemão” (*em memória*), tio “Dinho”, primas Alessandra, Jaqueline, Rosângela e Deisy, tia Lúdia e tio Carlinhos, tio Darci e tia Nilda. Aos meus primos e amigos Lucas e Adriano pela inestimável amizade.

Aos meus pais ANTÔNIO CASTRO DE OLIVEIRA e ONEIDE RODRIGUES MARQUES, pelo amor e apoio que sempre me deram, por me possibilitarem tudo na vida e sem eles eu não estaria aqui.

SUMÁRIO

Índice de Figuras	1
Índice de Tabelas	4
Lista de siglas e abreviaturas	5
Resumo	6
Abstract	8
Introdução	10
1. Nitrocompostos	11
2. Nitrorredutases	12
3. As Proteínas Frm2 e Hbn1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
4. Espécies Reativas de Oxigênio	18
4.1. Ânion Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	20
4.2. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	21
4.3. Radical hidroxil (HO^{\bullet})	21
4.4. Oxigênio <i>singlet</i> (1O_2)	23
4.5. Radical Peroxil (RO_2^{\bullet})	23
5. Danos Oxidativos nas Biomoléculas	24
5.1. Danos oxidativos no DNA	24
5.2. Danos oxidativos em lipídios	27
5.3. Danos oxidativos em proteínas	28
6. Agentes Indutores de Danos Oxidativos Utilizados Neste Estudo	29
6.1. Óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO)	29
6.2. N-nitrosodietilamina (NDEA)	30
6.3. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	30
6.4. tert-butil-hidroperóxido (<i>t</i> -BOOH)	31
7. Resposta ao Estresse Oxidativo	31
7.1. Principais Defesas Antioxidantes	32
7.1.1. Superóxido dismutase (SOD)	32
7.1.2. Catalase (CAT)	34
7.1.3. Glutaciona Peroxidase (GPx)	34
7.1.4. Glutaciona (GSH)	35
8. A Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Como Modelo de Estudo.....	36
8.1. Ciclo de vida e metabolismo	38
8.2. Defesas antioxidantes em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
Objetivos	43
Objetivo geral	44
Objetivos específicos	44

Capítulo I - <i>In silico</i> identification of a new group of specific bacterial and fungal nitroreductases-like proteins.....	46
Capítulo II - The role of two putative nitroreductases, Frm2p and Hbn1p, in the oxidative stress response in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
Discussão	93
Conclusão	106
Conclusões específicas	107
Conclusão geral	109
Perspectivas	110
Referências bibliográficas	113

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Os mecanismos de ação das nitrorredutase	14
Figura 2. Domínio característico de nitrorredutases encontrado nas proteínas Frm2 e Hbn1, utilizando o programa BLAST	16
Figura 3. Formação de espécies reativas de oxigênio	18
Figura 4. Representação da formação do radical OH [•] pelas reações de Haber Weiss/Fenton	22
Figura 5. Representação da formação do radical OH [•] pela reação de Fenton com o radical peroxil	24
Figura 6: Principais modificações nas bases do DNA ocasionadas por lesões oxidativas .	25
Figura 7: Reação de dismutação do O ₂ ^{•-} pela SOD	33
Figura 8: Reação de dismutação do H ₂ O ₂ pela catalase	34
Figura 9: Mecanismo catalítico da GPx	34
Figura 10. Representação esquemática da interação e localização dos mecanismos oxidantes e antioxidantes, na qual estão mostradas as principais vias endógenas antioxidantes e os principais efeitos das EROs	36
Figura 11: Curva de crescimento de uma linhagem selvagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39

CAPÍTULO I

Figura 1. Unrooted phylogenetic tree obtained from the global alignment of all proteins listed in Table 1.....	50
Figura 2. HCA of selected bacterial Nr1Ap and fungal Frm2p/Hbn1p sequences.	51
Figura 3. Threading three-dimensional model of <i>SceHbn1p</i>	52

CAPÍTULO II

Figura 1. Sensitivity of yeast mutant strains against different oxidants in the stationary growth phase.....	86
Figura 2. Induction of respiratory deficient colonies in WT and mutant yeast strains during metabolism respiratory growth.	87
Figura 3. Basal level de SOD, CAT, and GPx activity and quantification of GSH in <i>S. cerevisiae</i> strains proficient and deficient Frm2p and Hbn1p	88
Figura 4. Production of intracellular reactive species in <i>S. cerevisiae</i> strains proficient and deficient in nitroreductases evaluated by the DCFH-DA real-time fluorescence assay ...	89
Figura 5. Production of intracellular superoxide in yeast strains proficient and deficient in Frm2p and Hbn1p evaluated by the NBT real-time fluorescence assay	90
Figura 6. Determination of TBARS in yeast strains proficient and deficient in nitroreductases treated and no treated with oxidants.....	91
Figure 7. Assessment from capacity of nitroreduction by sensitivity of <i>S. cerevisiae</i> exposure to 1,6-dinitropyrene (1,6-DNP) in solid medium	92

DISCUSSÃO

Figura 12. Esquema simplificado mostrando os efeitos da ausência das proteínas Frm2 e Hbn1 exercem na modulação da resposta a estresse oxidativo em *S. cerevisiae* 105

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1. Principais nitrorredutases já caracterizadas até o momento	16
--	----

CAPÍTULO I

Table 1. Bacterial and fungal nitroreductase-like proteins used in this study	49
---	----

Table 2. Physico-chemical analyses of bacterial NrlA and fungal Frm2/Hbn1 proteins ...	50
--	----

CAPÍTULO II

Table 1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains used in this study	83
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADEPT	<i>antibody-directed enzyme prodrug therapy</i>
CAT	catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
DCFH-DA	diacetato de 2',7 diclorodihidrofluoresceína
DNA	ácido desoxirribonucléico
dAMP	deoxiadenosina monofosfato
EROs	espécies reativas de oxigênio
FAD	flavina adenina dinucleotídeo oxidado
FMN	flavina mononucleotídeo
Fapy	formamidopirimidinas
GDEPT	<i>gene-directed enzyme prodrug therapy</i>
GPx	glutathiona peroxidase
GR	glutathiona redutase
GSH	glutathiona reduzida
GSSG	glutathiona oxidada
HCA	análise de agrupamentos hidrofóbicos
HNE	4-hidroxi-nonenal
MDA	malondialdeído
MMS	metil metano sulfonato
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NBT	<i>nitroblue tetrazolium</i>
NDEA	N-nitrosodietilamina
PCP	pentaclorofenol
RNA	ácido ribonucléico
ROH	forma alcoólica após redução de algum hidroperóxido orgânico
ROOH	hidroperóxido orgânico
SOD	superóxido dismutase
STRE	elemento de resposta a estresse

RESUMO

As nitrorredutases compreendem uma família de proteínas conservadas evolutivamente e originalmente identificadas em eubactérias. São enzimas capazes de catalisar a redução do grupo nitro e utilizam FMN (flavina mononucleotídeo) ou FAD (flavina adenina dinucleotídeo oxidado) como grupo prostético e NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido) ou NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) como agentes redutores. As nitrorredutases podem ser encontradas em bactérias e em menor extensão em eucariotos. Dois subgrupos de nitrorredutases foram caracterizados em bactérias: oxigênio-insensível ou tipo I e oxigênio-sensível ou tipo II. Na levedura *Saccharomyces cerevisiae* duas prováveis nitrorredutases, Frm2p/Hbn1p foram identificadas. Em relação às enzimas pertencentes à família das nitrorredutases não se tem conhecimento sobre a sua função biológica, bem como em relação à sua posição filogenética. Tendo isso em vista, o objetivo deste trabalho é esclarecer a possível função das proteínas Frm2 e Hbn1 de *Saccharomyces cerevisiae* na resposta ao estresse oxidativo, bem como determinar a posição filogenética e a sua presença em outros organismos procariotos e eucariotos. Os resultados da análise filogenética mostram que bactérias possuem seqüências similares a Frm2p/Hbn1p (denominadas Nr1Ap) que formam um clado distinto dentro da família Frm2p/Hbn1p. Análises de agrupamentos hidrofóbicos (HCA) e modelagem tri-dimensional foram realizadas para comparar regiões conservadas entre proteínas Nr1Ap e Frm2p/Hbn1p. A nitrorredutase Frm2p possivelmente esteja atuando na via de sinalização lipídica, enquanto a função da Hbn1p é desconhecida. Entretanto, alguns estudos têm indicado que as nitrorredutases podem estar envolvidas na resposta a estresse oxidativo. Com o objetivo de esclarecer a função de Frm2p e Hbn1p, foi avaliada a sensibilidade de linhagens de levedura proficientes e deficientes em ambas

proteínas ao estresse oxidativo, investigando a competência respiratória, as atividades de enzimas antioxidantes, a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a peroxidação lipídica. Os resultados mostram uma menor atividade basal de superóxido dismutase (SOD) e elevada sensibilidade a óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO) e N-nitrosodietilamina (NDEA), indução de mutantes citoplasmáticos (petites), produção intracelular de EROs e peroxidação lipídica quando expostas a estes agentes geradores de superóxido nas linhagens *frm2Δ*, *hbn1Δ* e *frm2Δ hbn1Δ*. Ainda podemos observar elevada atividade basal de catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e conteúdo de glutathiona (GSH) nas linhagens *frm2Δ* e *frm2Δ hbn1Δ*. Estas linhagens possuem menor produção de EROs e peroxidação lipídica quando expostas aos agentes geradores de peróxidos H₂O₂ e *t*-BOOH. Isso sugere que a ausência da Frm2p é o fator responsável por estas alterações vistas.

Portanto, neste trabalho foi mostrada a influência das nitrorredutases Frm2 e Hbn1 na resposta ao estresse oxidativo em *S. cerevisiae*, pela modulação da atividade das enzimas antioxidantes, SOD, CAT e GPx, bem como do conteúdo de GSH. Adicionalmente também foi constatado que as nitrorredutases Frm2p e Hbn1p provavelmente não atuam na metabolização de nitrocompostos. Estes resultados são consistentes com os dados encontrados na análise filogenética, que apontam estas proteínas como constituindo uma nova família de prováveis nitrorredutases ainda não caracterizada, encontrada em bactérias e fungos.

ABSTRACT

The nitroreductase family comprises a group of FMN (flavine mononucleotide) or FAD (flavine adenine dinucleotide oxidase)-dependent enzymes able to metabolize nitrosubstituted compounds using the reducing power of NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reductase) or NADH (nicotinamide adenine dinucleotide reductase). The nitroreductases can be found within bacterial species and, in a less extent, in eukaryotes. Two types of nitroreductase subgroups were characterized in bacteria: oxygen-insensitive or type I and oxygen sensitive or type II. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* two putative nitroreductase proteins, Frm2p and Hbn1p, were described. A feature of the nitroreductase family is our lack of knowledge about its biological function and evolutionary history. Taking into account these considerations, the purpose of this work was to elucidate the possible participation of these enzymes in response to oxidative stress as well as to determine the phylogenetic position of Frm2p and Hbn1p and the presence of homologous sequences in other prokaryotic and eukaryotic species. In order to obtain data about the phylogenetic position of Frm2p/Hbn1p, we performed an in-depth phylogenetic analysis of these proteins. The phylogenetic analysis of these proteins showed that bacterial cells have a Frm2p/Hbn1p-like sequences (termed NrlAp) which form a distinct clade within the fungal Frm2p/Hbn1p family. Hydrophobic cluster analysis (HCA) and three-dimensional protein modeling allowed us to compare conserved regions among NrlAp and Frm2p/Hbn1p proteins. While Frm2p appears to act in the lipid signaling pathway, the function of Hbn1p is unknown. However, some works suggests a possible involvement from the nitroreductases in response the stress oxidative. In order to elucidate the functions of Frm2p and Hbn1p, we evaluate the sensitivity of proficient and deficient yeast strains for both proteins for oxidative stress, considering the respiratory competence,

antioxidant enzyme activities, intracellular reactive oxygen species (ROS) production and lipid peroxidation. The results showed a weaker basal activity of superoxide dismutase (SOD) and higher sensitivity for 4-nitroquinoline-oxide (4-NQO) and N-Nitrosodiethylamine (NDEA), induction of *petites*, ROS production and lipid peroxidation when exposed to these superoxide generating agents. The results showed a higher basal activity of catalase (CAT), glutathione peroxidase (Gpx) and reduced glutathione (GSH) content in the single and double mutant strains *frm2Δ* and *frm2Δ hbn1Δ*. These strains were less ROS-producing and lipid peroxidation when exposed to peroxides-generating agents H₂O₂ and *t*-BOOH. Thus, the absence of Frm2p may be the event responsible for these alterations. Considering the data gathered in this work, we showed the influence of nitroreductases Frm2p and Hbn1p in response to oxidative stress in *S. cerevisiae* yeast by modulation of antioxidant enzymes activities, such as SOD, CAT, GPx and GSH content. Additionally, it was shown that the nitroreductases Frm2p and Hbn1p are not involved in the activation of nitrocompounds. These results are consistent with those found in the filogenetic analysis that indicated that these proteins belong to the new bacterial and fungal Frm2p/Hbn1p nitroreductase-*like* family.



Introdução

Introdução

1 - Nitrocompostos

Os nitrocompostos constituem um grande grupo de agentes químicos que são caracterizados pela presença de um ou mais grupos nitro (NO_2^-). Por muitos anos, essas substâncias são utilizadas na produção de plásticos, explosivos, produtos farmacêuticos, agentes microbianos, aditivos alimentares, defensivos agrícolas e também como matéria-prima em vários processos industriais (Drzyzga *et al.*, 1995; Samuelson, 1999). Também são largamente encontrados em cigarros, exaustores a diesel e partículas aéreas urbanas (Topinka *et al.*, 2000). Atualmente, os nitrocompostos têm sido identificados como produtos de uma variedade de processos de combustão incompleta. Desta forma, são considerados como um importante grupo de poluentes ambientais (Tazima *et al.*, 1975; McCalla *et al.*, 1978; Spain 1995; Möller *et al.*, 1993; De Marini *et al.*, 1996).

Estes compostos têm atraído muita atenção pelo seu potencial risco à saúde humana, pois a sua metabolização leva à formação de intermediários tóxicos, genotóxicos/mutagênicos ou carcinogênicos (Padda *et al.*, 2003). Muitos nitrocompostos podem gerar espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (EROs e ERNs, respectivamente) que podem reagir com biomoléculas (Sies & de Groot, 1993; Homma-Takeda *et al.*, 2002).

As vias metabólicas que resultam na ativação desses nitrocompostos são complexas. A nitrorredução é o passo inicial no catabolismo de uma variedade de nitrocompostos, geralmente resultando em espécies mais reativas, responsáveis por sua

toxicidade (Padda *et al.*, 2003). As nitrorredutases desempenham um papel central na ativação dos nitrocompostos.

2 – Nitrorredutases

As nitrorredutases compreendem uma família de proteínas conservadas evolutivamente e originalmente identificadas em eubactérias. São enzimas capazes de catalisar a redução do grupo nitro e utilizam FMN (flavina mononucleotídeo) ou FAD (flavina adenina dinucleotídeo oxidado) como grupo prostético e NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido) ou NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) como agentes redutores (Bryant & DeLuca, 1991).

Estas proteínas têm atraído um enorme interesse devido ao seu papel central na metabolização e conseqüentemente na toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade de nitrocompostos. Apresentam ainda um potencial uso em biorremediação, sendo empregadas principalmente em solos contaminados com TNT, bem como na biocatálise (Kitts *et al.*, 2000; Hannink *et al.*, 2001; Kadiyala *et al.*, 2003). Foi demonstrado que estas enzimas também possuem a capacidade de reduzir cromato (Ackerley *et al.*, 2004; Kwak *et al.*, 2003). As nitrorredutases apresentam aplicação clínica devido à sua capacidade de converter pró-drogas não tóxicas, como a CB1954 (5-aziridin-1-il-2,4-dinitrobenzamida) em potentes agentes citotóxicos. Dessa forma estas enzimas têm sido utilizadas nas terapias *gene-directed enzyme prodrug therapy* (GDEPT) e *antibody-directed enzyme prodrug therapy* (ADEPT) para emprego potencial no tratamento de certos tumores (Denny, 2002; Knox *et al.*, 2003; Parkinson *et al.*, 2000; Searle *et al.*, 2004). Também muitos estudos têm associado as nitrorredutases à suscetibilidade a antibióticos, já que muitos necessitam ser ativados por estas enzimas (Margaret *et al.*, 2001; Samuelson, 1999;

Han *et al.*, 2007). Diversos testes genotóxicos, como Teste de Ames, vêm sendo realizados utilizando linhagens de *Salmonella* mutantes para nitrorredutase, deficientes ou que superexpressam estas enzimas, para identificar e avaliar a genotoxicidade de vários nitrocompostos (Carrol *et al.*, 2002; Metosh-Dickey, 1999). Estas estratégias têm aumentado enormemente a sensibilidade deste teste e tem auxiliado na elucidação o mecanismo molecular da mutagênese de vários compostos nitroheterocíclicos e nitroaromáticos.

Um aspecto da família das nitrorredutases é a falta de conhecimento sobre a função biológica dos seus membros. Considerando a presença de um grupo nitro em biomoléculas, tem sido hipotetizado que as nitrorredutases pudessem apresentar a capacidade reduzir 3-nitrotirosina em proteínas. Entretanto estudos realizados por Lightfoot *et al.* (2000) indicaram que NfsA e NfsB de *E.coli* não reduzem 3-nitrotirosina.

Alguns estudos têm mostrado que as nitrorredutases podem estar envolvidas na resposta a estresse oxidativo (Benov & Fridovich, 2002; Liochev *et al.*, 1999; Paterson *et al.*, 2002; Streker *et al.*, 2005). Em *E. coli* o gene *nfsA* é altamente induzido por paraquat, um conhecido oxidante que gera superóxido por ciclo redox, e está sob o controle do regulon *SoxRS*, que é reconhecidamente induzido por superóxido, atuando na regulação de diversos genes envolvidos na resposta a estresse oxidativo bem como na ativação de sistemas de reparação de DNA (Amábile-Cuevas & Demple, 1991; Pomposiello & Demple, 2001; Martin & Rosner, 2003). O gene *nprA* em *Rhodobacter capsulatos* é também induzido por paraquat (Nokhbeh *et al.* 2002; Pérez-Reinado *et al.*, 2005). Algumas proteínas *NfsA-like* de *Bacillus subtilis* and *NfrA* de *Staphylococcus aureus* podem estar atuando no balanço tiólico celular sugerindo o envolvimento das nitrorredutases na resposta a estresse oxidativo (Sterker *et al.*, 2005).

Dois grupos de nitrorredutases têm sido bioquimicamente caracterizados: as nitrorredutases insensíveis ao oxigênio (tipo I) que realizam uma redução seqüencial nitrocomposto transferindo dois elétrons do NADPH ou NADH para o grupo NO_2^- , elevando à formação de intermediários nitroso, hidroxilamina e finalmente aminas primárias (Haack *et al.*, 2001; Kobory *et al.*, 2001; Sarlauskas *et al.*, 2004); e as nitrorredutases sensíveis ao oxigênio (tipo II) catalisam a redução seqüencial do nitrocomposto transferindo um elétron dos agentes redutores para o grupo NO_2^- , produzindo um radical nitro-ânion o qual reage com oxigênio e origina superóxido e regenerando o nitrocomposto original. Este “ciclo fútil” pode causar estresse oxidativo por produzir grandes quantidades de superóxido (Peterson *et al.*, 1979; Angermaier & Simon, 1983) (Fig. 1).

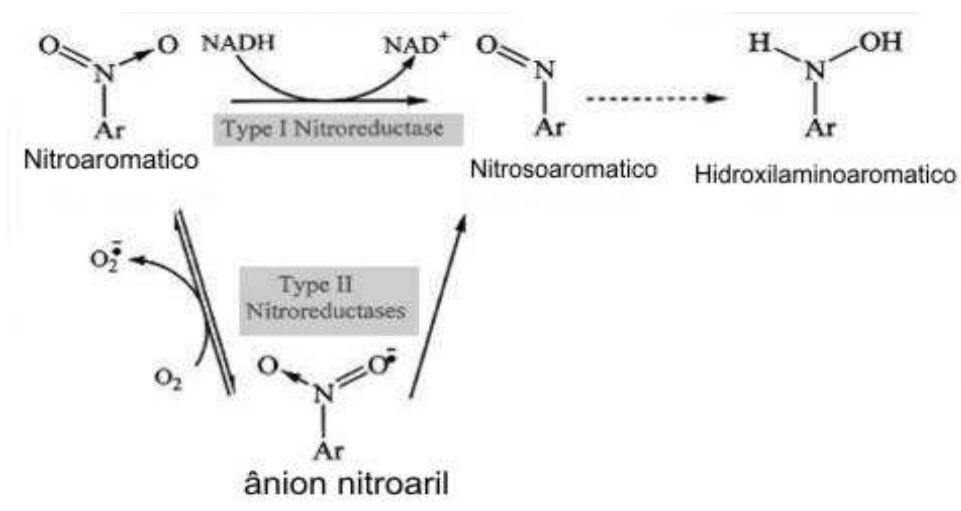


Figura 1: Os mecanismos de ação das nitrorredutase. Adaptado de Koder *et al.* (1998).

As nitrorredutases do tipo I participam da redução de uma variedade de nitrocompostos, incluindo nitrofuranos, nitrobenzenos, nitrofenóis, nitrobenzoatos, nitrotoluenos (TNT), nitroimidazóis, entre outros (McCalla *et al.*, 1978; Kadiyala *et al.*,

2003; Caballero *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2007). Por sua importância, muitos estudos em termos de clonagem, isolamento de genes, análise estrutural das proteínas e caracterização funcional têm sido realizados em relação à nitrorredutases de vários organismos (Tab. 1). Entretanto, os genes para nitrorredutases do tipo II não foram clonados até o momento, assim como não foi realizado a caracterização estrutural dessas proteínas (Whiteway *et al.*, 1998).

Os registros de nitrorredutases em eucariotos são bastante restritos. Em mamíferos existem algumas enzimas funcionalmente relacionadas com as nitrorredutases do tipo I, como a NAD(P)H-quinona oxidoreductase (DT –diaforase) e a xantina desidrogenase, mas não são filogeneticamente relacionadas, não apresentando o domínio característico desta família (Djuric *et al.*, 1986; Friedlos *et al.*, 1992). Da mesma forma, enzimas funcionalmente relacionadas às nitrorredutases do tipo II também são encontradas em diversos organismos, principalmente em eucariotos (Bryant *et al.*, 1991) como a aldeído oxidase (Djuric *et al.*, 1986), citocromo c oxidase (Djuric *et al.*, 1986), NADPH citocromo P-450 redutase (Djuric *et al.*, 1986; Orna & Mason, 1989) e outras. Entretanto, uma proteína com domínio de nitrorredutases foi descrita em humanos, a iodotirosina deiodinase, responsável por catalisar a deiodinação de mono e diiodotirosina (Friedman *et al.*, 2006) (Tabela 1).

Tabela 1 – Principais nitrorredutases caracterizadas até o momento

Nitrorredutase	Organismo	Tipo	Ref.
NfrA1 (YwcG)	<i>Bacillus subtilis</i>	Oxigênio-Insensível	Moch <i>et al.</i> , 1998; Zenno <i>et al.</i> , 1998
NitA e NitB	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Oxigênio-Insensível	Kutty & Bennett 2005
NfsI e NR	<i>Enterobacter cloacae</i>	Oxigênio-Insensível	Bryant & DeLuca, 1991; Hannink <i>et al.</i> , 2001; Haynes <i>et al.</i> 2002
NfsA e NfsB	<i>Escherichia coli</i>	Oxigênio-Insensível	Zenno <i>et al.</i> , 1996a,1996b; Paterson <i>et al.</i> , 2002
RdxA e FrxA	<i>Helicobacter pylori</i>	Oxigênio-Insensível	Kwon <i>et al.</i> , 2000; Goodwin <i>et al.</i> 1998
Nitrobenzenoreductase	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Oxigênio-Insensível	Somerville <i>et al.</i> , 1995
PnrA e PnrB	<i>Pseudomonas putida</i>	Oxigênio-Insensível	Caballero <i>et al.</i> , 2005
NprA e NprB	<i>Rhodobacter capsulatos</i>	Oxigênio-Insensível	Pérez-Reinado <i>et al.</i> , 2005
SrnA e Cnr	<i>Salmonella typhimurium</i>	Oxigênio-Insensível	Watanabe <i>et al.</i> , 1990; Nokhbeh <i>et al.</i> , 2002
NfrA	<i>Staphylococcus aureus</i>	Oxigênio-Insensível	Streker <i>et al.</i> , 2005
DrgA	<i>Synechocystis</i> sp	Oxigênio-Insensível	Takeda <i>et al.</i> , 2007
NOX	<i>Thermus thermophilus</i>	Oxigênio-Insensível	Park <i>et al.</i> , 1993
FRase I	<i>Vibrio fischeri</i>	Oxigênio-Insensível	Zenno <i>et al.</i> , 1994
Frp	<i>Vibrio harveyi</i>	Oxigênio-Insensível	Lei <i>et al.</i> , 1994
Iodotirosina deiodinase	<i>Homo sapiens</i>	Oxigênio-Insensível	Friedman <i>et al.</i> , 2006

Em *Saccharomyces cerevisiae* há dois genes chamados *FRM2* (YCL026c-A) e *HBN1* (YCL026c-B) que codificam duas prováveis nitrorredutases. Essa descrição foi realizada nesse trabalho, utilizando abordagens de análise filogenética (ver Capítulo I), sendo encontrado o domínio característico da família como mostrado na Fig. 2.

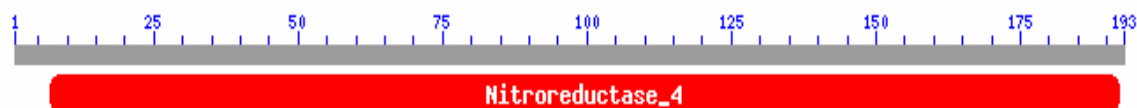


Figura 2: Domínio característico de nitrorredutases encontrado nas proteínas Frm2 e Hbn1, utilizando o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

3 – As Proteínas Frm2 e Hbn1p de *Saccharomyces cerevisiae*

As enzimas Frm2p e Hbn1p são encontradas no núcleo e no citoplasma da célula. A Frm2p foi descrita primeiramente por McHale *et al.* (1996). Esta proteína foi identificada em uma triagem de mutantes que não conseguiam reprimir, na presença de ácido araquidônico, a expressão do gene *OLE1*, o qual codifica uma $\Delta 9$ -ácido graxo desaturase, responsável pela insaturação de ácidos graxos. Neste estudo, McHale *et al.* (1996) ainda demonstraram que o gene *FRM2* apresenta elementos de resposta que previamente foram identificados como importantes na regulação da expressão gênica em resposta a glicose e a certos ácidos graxos. Outro resultado importante apresentado foi a presença de STRE (*stress response element*) na região promotora do gene, os quais são conhecidamente envolvidos na regulação da transcrição em resposta geral a estresse (McHale *et al.*, 1996). As propriedades da Frm2p sugerem que essa proteína possua uma função na via de sinalização de ácidos graxos e que sua expressão seja regulada por esses.

Quanto ao gene *FRM2* foi registrada a presença de um sítio de ligação a Yap2p, um fator de transcrição associado com resposta a cádmio e resistência a drogas, e confirmou-se que sua expressão é altamente dependente deste fator (Azevedo *et al.*, 2007). Recentemente Kim *et al.* (2007) identificaram por eletroforese bidimensional (2-D) diversas proteínas que aumentam a sua expressão em resposta a menadiona, um conhecido gerador de superóxido. Entre as proteínas identificadas estava presente a Hbn1p, sugerindo sua participação na resposta a estresse oxidativo provocado por este oxidante.

4 – Espécies Reativas de Oxigênio

Todos os organismos vivos aeróbios utilizam o oxigênio como acceptor final de elétrons na cadeia transportadora de elétrons. A redução do oxigênio à água (Fig. 3), entretanto, gera subprodutos altamente reativos, conhecidos espécies reativas de oxigênio (EROs) (Scandalios, 2002; Halliwell & Gutteridge, 2007).

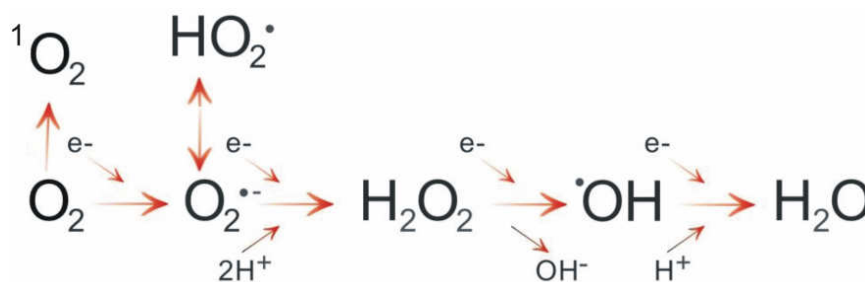


Figura 3. Formação de espécies reativas de oxigênio. Adaptado de Inlay (2008).

Um radical livre pode ser definido como qualquer espécie química que seja capaz de uma existência independente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, ocupando um orbital atômico molecular sozinho (Toledano *et al.*, 2003; Halliwell, 2006). Uma molécula pode tornar-se um radical livre, tanto ganhando como perdendo um elétron em uma reação química, bem como por fissão homogênea de uma ligação covalente. Geralmente estas espécies são instáveis, possuindo uma meia vida curta, por reagir rapidamente com diversos compostos e alvos celulares (Vranová *et al.*, 2002; Halliwell & Gutteridge, 2007).

Muitos termos são empregados na literatura para descrever os radicais livres e espécies de oxigênio. O termo EROs inclui todas as moléculas quimicamente reativas derivadas de oxigênio, abrangendo radicais livres como o radical hidroxil (HO^\bullet) e o ânion

superóxido ($O_2^{\bullet-}$), bem como não radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) oxigênio *singlet* (1O_2) (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Nos organismos as EROs podem ser produzidas como subprodutos normais do metabolismo celular por consequência de diversas reações de transferências de elétrons. Cerca de 95 a 98% do oxigênio consumido durante a respiração celular é para a produção de energia, o restante (2 a 5% do oxigênio metabolizado), produz EROs (Halliwell & Gutteridge, 2007).

As EROs formadas e degradadas por todos organismos são mantidas em certas concentrações, já que são importantes em determinadas funções celulares. Benefícios fisiológicos celulares vitais de EROs são demonstrados em diferentes áreas, incluindo sinalização intracelular e regulação redox (Rhee *et al.*, 2005; Cimen, 2008). EROs podem atuar como segundos mensageiros independente de estresse oxidativo e na sinalização celular para a proliferação celular, a necrose e a apoptose (Costa & Ferreira, 2001; Scandalios, 2002; Leonard *et al.*, 2004). Uma vez que foi observado que a produção de EROs leva à mudanças na transcrição de genes, via regulação redox e fosforilação de fatores de transcrição (Halliwell & Gutteridge, 2007). A regulação de proteínas por oxidação e redução, como ativação e inativação de fosfatases também é fundamental na sinalização celular (Rhee *et al.*, 2005; Halliwell, 2006).

As EROs podem ser produzidas em quantidades excessivas, provocando um desbalanço entre geração de EROs e defesas antioxidantes, estado este denominado estresse oxidativo. Desta forma comprometem a integridade celular por causar danos à membrana, perda de função de organelas, redução na eficiência metabólica, danos na cromatina e mutações, levando à morte celular (Henriques *et al.*, 2001; Scandalios, 2002; Valko *et al.*, 2006).

4.1 - Ânion Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

O ânion superóxido é formado a partir do oxigênio pela adição de um elétron e, apesar de ser um radical, não é altamente reativo. A formação de $O_2^{\bullet-}$ acontece especialmente em ambientes aeróbios ricos em elétrons, como na mitocôndria, sendo os complexos I e III a maior fonte de produção deste radical (Raha & Robinson, 2000; Halliwell & Gutteridge, 2007). O $O_2^{\bullet-}$ também pode ser gerado por algumas enzimas como a xantina oxidase e as flavoproteínas (Anderson, 1996; Nordberg & Årner, 2001; Mittler *et al.*, 2004). Também pode ser produzido por meio da auto-oxidação via interação com agentes redutores celulares (glutathiona, NADH e outros) e ação de diferentes compostos químicos como paraquat, óxido de 4-nitroquinoleína (4-NQO) e N-nitrosodietilamina (NDEA) (Boveris, 1998; Cabiscol *et al.*, 2000; Osório *et al.*, 2003).

O $O_2^{\bullet-}$ pode gerar H_2O_2 e oxigênio espontaneamente ou pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD) (Nordberg & Årner, 2001; Halliwell & Gutteridge, 2007).

Um mecanismo proposto de toxicidade do $O_2^{\bullet-}$ é baseado na observação de que o este radical pode especificamente oxidar o sítio [4Fe-4S] de enzimas importantes no metabolismo energético e de aminoácidos, de maneira a inibir certas vias metabólicas. Esse processo pode causar a liberação do íon Fe^{+2} do sítio e a inativação da enzima, bem como levar a um dano oxidativo adicional de outros componentes celulares, uma vez que o ferro livre pode promover, via reação de Fenton, a formação do HO^{\bullet} (Srinivasan *et al.*, 2000; Liochev & Fridovich, 2002; Leonard *et al.*, 2004; Imlay, 2006) (Fig. 5). A forma protonada do $O_2^{\bullet-}$, radical hidroperoxil (HO_2^{\bullet}), sendo mais reativa do que o $O_2^{\bullet-}$, e pode atacar ácidos graxos insaturados, iniciando a cascata de peroxidação lipídica e ocasionar destruição das membranas biológicas (De Grey, 2002; Levine, 2002; Vorbach *et al.*, 2003).

4.2 - Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O H_2O_2 não é um radical livre, mas participa da reação que produz formas mais reativas como OH^\bullet via oxidação com metais de transição. Uma função importante do H_2O_2 é como molécula sinalizadora. O H_2O_2 é formado principalmente na matriz mitocondrial durante o processo de redução do O_2 , ou pela dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$, pela enzima superóxido dismutase (Fridovich, 1998; Halliwell & Gutteridge, 2007). Pode ainda ser produzido endogenamente na β -oxidação (Nordberg e Àrner, 2001; Halliwell & Gutteridge, 2007).

4.3 - Radical hidroxil (HO^\bullet)

Devido a sua alta reatividade com biomoléculas, o radical HO^\bullet é provavelmente o radical capaz de causar mais danos aos sistemas biológicos do que qualquer outra ERO. O radical é formado pelo H_2O_2 na reação catalisada por íons metálicos (Fe^{2+} e Cu^+), muitas vezes ligados em complexos com diferentes proteínas ou outras moléculas. Esta reação é conhecida como Reação de Fenton (Fig. 4) (Kakhlon & Cabantchik; 2002; Halliwell & Gutteridge, 2007).

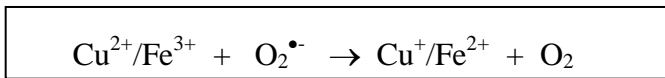
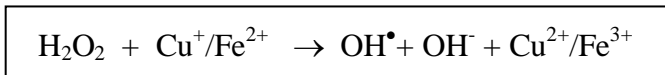
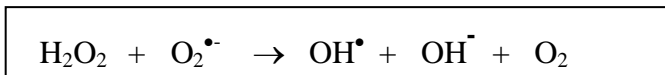
Reação de Waber-Weiss**Reação de Fenton****Reação de Harber-Weiss/Fenton**

Figura 4: Representação da formação do radical HO^{\bullet} pelas reações de Haber Weiss/Fenton. Adaptado de Norberg & Árner (2001).

De modo geral o HO^{\bullet} pode reagir por abstração de hidrogênio, transferência de elétrons e reações de adição. A reação deste radical com biomoléculas normalmente produz um outro radical de menor reatividade, o qual também pode atacar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Boiteux *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2007).

A capacidade deste radical em lesar as células é superior às demais EROs, já que o organismo não dispõe de um sistema enzimático de defesa contra a HO^{\bullet} (Halliwell & Gutteridge, 2007). Por isso, a melhor defesa que a célula tem contra este radical é evitar que o mesmo seja gerado. Por esta razão as células mantêm um rígido controle sobre a homeostase metálica. O transporte de metais é altamente regulado e os íons metálicos são

mantidos em sua valência mais alta ou estão em alguma forma complexados a enzimas e proteínas onde são armazenados e/ou fazem parte funcional das mesmas (Fridovich, 1998; Helliwell & Gutteridge, 2007).

4.4 - Oxigênio *singlet* ($^1\text{O}_2$)

Trata-se da forma mais reativa do oxigênio molecular gerada pelo movimento de um elétron desemparelhado para completar uma camada quântica. Pode reagir diretamente com lipídios, proteínas e com o DNA. (Cadenas, 1989; Dickison & Schweizer, 1999; Helliwell & Gutteridge, 2007). A geração de $^1\text{O}_2$ pode ocorrer em sistemas biológicos, mas requer consumo de energia através de fotoexcitação. Entretanto, fisiologicamente pode atuar como molécula sinalizadora em alguns casos (Holt *et al.*, 2005).

4.5 - Radical Peroxil (RO_2^\bullet)

O radical peroxil é um peróxido orgânico e pode participar de uma grande diversidade de reações biológicas, assim como pode causar clivagem do DNA e modificação de proteínas (Valko *et al.*, 2006). Pode ser formado pelo ataque de EROs, como o HO^\bullet , $^1\text{O}_2$ ou HO_2^\bullet a compostos orgânicos ou por decomposição de peróxidos orgânicos (LOOH). A reatividade do RO_2^\bullet está relacionada com a parte orgânica do radical, sendo os radicais aromáticos menos reativos pela possibilidade de rearranjo dos elétrons. Além disso ainda podem participar da reação de Fenton (Fig. 5) (Helliwell & Gutteridge, 2007).

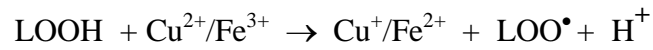
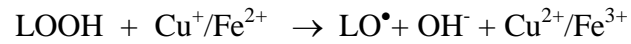


Figura 5: Representação da formação do radical OH^\bullet pela reação de Fenton com o radical peroxil. Adaptado de Helliwell (2006)

5 - Danos oxidativos nas biomoléculas

Devido ao tempo entre a geração de EROs e sua destruição pelos mecanismos de defesa, as EROs podem existir por um tempo suficiente danificar diferentes biomoléculas, tais como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (RNA, DNA), comprometendo a integridade celular.

5.1 - Danos oxidativos no DNA

Mesmo apresentando estes vários níveis de defesa, o DNA não está completamente protegido. Aproximadamente 100 diferentes modificações em bases e açúcares já foram identificadas (Friedberg, 2006). No DNA, de modo geral, as EROs podem produzir uma série de lesões, danificando as bases nitrogenadas, desoxirriboses, causando quebras simples e duplas na cadeia, criando sítiosapurínicos e apirimidínicos (sítios AP), modificações nas bases e ligações cruzadas entre DNA e proteínas. Portanto, os danos oxidativos no DNA podem provocar bloqueio na replicação, mutações,

anormalidades cromossômicas e conseqüentemente uma grande citotoxicidade (Cadet *et al.*, 1999; Boiteux *et al.*, 2002; Friedberg, 2006).

Uma das mais importantes modificações de bases geradas pelo radical HO• é a 7,8-diidro-8-oxo-2'-desoxiguanina (8-oxo-G) (Fig. 6), devido à oxidação do átomo C8 do anel da guanina. O 8-oxo-G é o produto de dano oxidativo de base melhor caracterizado, embora não cause bloqueio na síntese de DNA, é fortemente mutagênico *in vitro* e *in vivo*, pois a DNA polimerase α pode incorporar deoxiadenosina monofosfato (dAMP) oposto a 8-oxo-G, causando transversões do tipo G→T (Boiteux *et al.*, 2002; Friedberg, 2006).

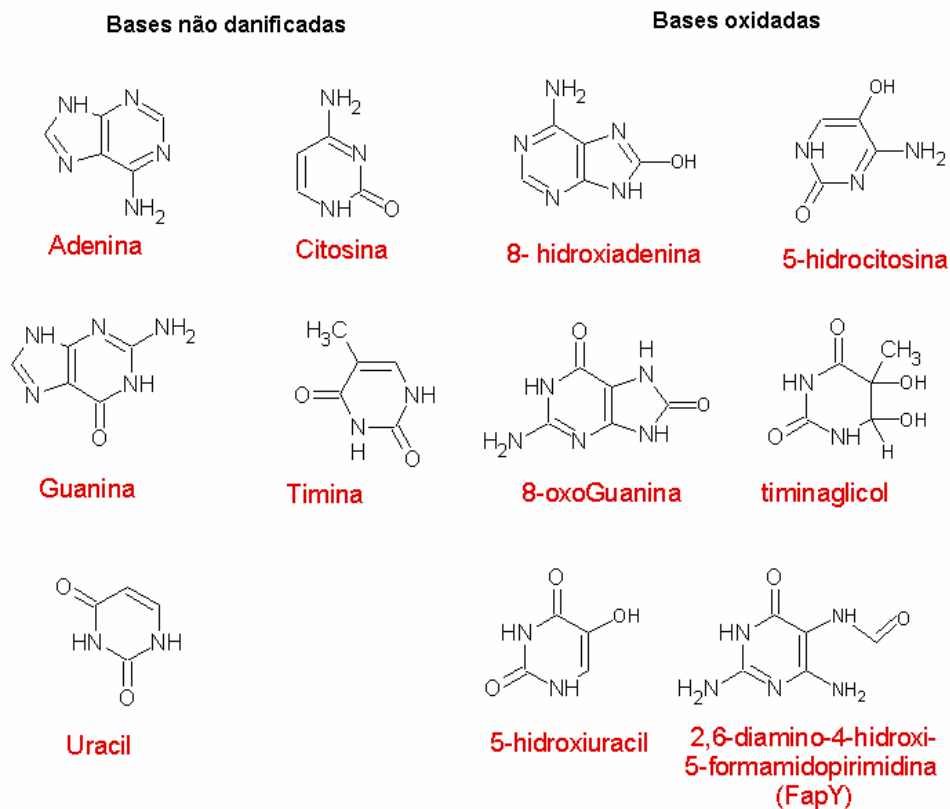


Figura 6: Principais modificações nas bases do DNA ocasionadas por lesões oxidativas.

Adaptado de Croteau & Bohr (1997).

O ataque a purinas provoca também a formação de formamidopirimidinas (Fapy), (Fig. 6) produtos da abertura do anel imidazólico. Em relação às pirimidinas, o radical hidroxil reage preferencialmente com ligações duplas C5-C6, formando glicóis de timina e citosina. A base oxidada 5'hidróxi-2'-desoxicitidina causa transições do tipo C→T, e a timina glicol causa transições do tipo T→C, sendo altamente mutagênicas. As riboses são alvos menos freqüentes, porém o ataque do radical hidroxila pode abstrair um dos átomos de hidrogênio da ribose, formando radicais que podem levar a quebra simples de cadeia, sítios abásicos e sítios álcali-lábeis (Brozmanová *et al.*, 2001).

É bem conhecida a pouca reatividade do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio com biomoléculas, entretanto, o radical HO• e o ¹O₂ são altamente reativos. O HO• pode, portanto, reagir com bases ou com as desoxirriboses, produzindo danos nas bases e quebras nas fitas do DNA (Helliwell & Gutteridge, 2007). A grande quantidade de quebras geradas por este radical é provavelmente devida ao acesso que este tem aos átomos de hidrogênio das desoxirriboses nas fitas do DNA (Schafer *et al.*, 2000; Valko *et al.*, 2006). Pode ainda causar reações de adição nas bases do DNA levando a uma variedade de produtos oxidados, sendo que os mais freqüentes são 8-oxo-G e Fapy-G (Fig. 6). A adenina reage de maneira similar à guanina, embora as lesões sejam menos prevalentes nas fitas do DNA (Jaruga *et al.*, 2001). Nas purinas pode adicionar resultando em adutos C4-OH, C5-OH e C8-OH. Pode também adicionar nas pirimidinas nas posições C5 e C6, na timina e citosina, respectivamente, formando C5-OH e radicais aduto-C6-OH, seguido pela adição de água ou OH⁻ e a desprotonação leva à formação de glicóis de pirimidinas (Dizdaroglu, 1992; Breen & Murphy, 1995).

O ¹O₂ pode retirar elétrons ou pode causar ciclo-adição aos carbonos de ligação dupla do anel imidazol. A guanina é o alvo preferencial das lesões e o produto final mais

freqüente é a 8-hidroxi guanina (8-HG). Mas, raramente, pode gerar sítios AP, alcalilábeis e quebras de cadeia simples em posições adjacentes à guanina (OhUigin *et al.*, 1987; Dizdaroglu, 1993; Cadet *et al.*, 1997). O RO_2^{\bullet} está envolvido na clivagem do DNA (Kanazawa *et al.*, 2002).

5.2 - Danos oxidativos em lipídios

Os fosfolipídios das membranas celulares são muito sensíveis à oxidação e tem-se observado freqüentes marcas de danos induzidos por EROs capazes de gerar reações em cadeia. Os ácidos graxos insaturados contém um ou mais grupos metileno posicionados entre as duplas ligações *cis*. Esses grupamentos são altamente reativos em relação a agentes oxidantes, atuando como doadores de hidrogênios para radicais centrados em carbono, os quais reagem com o oxigênio formando radicais peroxil, cujo destino pode ser a conversão a hidroperóxidos. Na presença de complexos metálicos e metaloproteínas, ocorre redução dos hidroperóxidos de ácidos graxos produzindo radicais alcóxil, iniciando uma reação em cadeia responsável pela produção de diversos epóxidos, hidroperóxidos e compostos carbonilados, denominada peroxidação lipídica (Porter, 1986; Tang *et al.*, 2002; Valko *et al.* 2004).

O processo de peroxidação lipídica consiste de três estágios: iniciação, propagação e terminação. O produto inicial da oxidação de ácidos graxos insaturados são os hidroperóxidos lipídicos, mas são formados diversos intermediários. Um dos mais conhecidos produtos formados na peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA). As sucessivas gerações de hidroperóxidos e clivagem da cadeia de ácido graxo no carbono β poderiam produzir hidroperoxialdeído, e a posterior β -cisão liberaria MDA (Marnett, 1999). Já foi visto que o MDA tem ação mutagênica em bactérias e mamíferos (Tang *et al.*,

2002). Outro maior aldeído formado é o 4-hidroxi-noneal (HNE). O MDA pode reagir com o as bases do DNA, formando adutos, já o HNE, embora seja pouco mutagênico, mas parece ser o produto mais tóxico formado na peroxidação lipídica e possui um grande efeito em vias de transdução de sinais. Em alguns casos podem se formar adutos de etenos e propanos (Marnett, 1999; Tange *et al.*, 2002; Helliwell & Gutteridge, 2007).

O HO[•] ataca as membranas lipídicas e pode causar uma série de reações que pode levar a danos celulares, sendo inquestionável a sua capacidade de iniciar a peroxidação lipídica. Radicais RO₂[•] também são conhecidos por causar peroxidação lipídica. Esses radicais podem abstrair hidrogênio de uma molécula de lipídio e assim propagar o processo nas demais moléculas adjacentes (Valko *et al.*, 2004; Helliwell & Gutteridge, 2007).

O O₂^{•-} não pode iniciar a peroxidação lipídica, mas a sua forma protonada tem-se mostrado muito eficiente neste tipo de reação, bem como o ¹O₂ (Helliwell & Gutteridge, 2007).

5.3 - Danos oxidativos em proteínas

Os aminoácidos são muito sensíveis a ataques por várias EROs. Diversos estudos demonstram que reações de aminoácidos com HO[•] levam a abstração de hidrogênio da proteína, que pode formar diversos produtos em determinadas condições como radicais peroxil. O HO[•] pode causar clivagem da proteína por reagir com resíduos como ácido glutâmico, triptofano, metionina e prolina, formando diversos produtos. Pode ainda inativar várias proteínas, ao oxidar seus grupos sulfidril (-SH) a pontes de dissulfeto (-S-S), conseqüentemente, resíduos de cisteína também são muito sensíveis a EROs (Levine & Stadtman, 2001; Stadtman, 2001; Helliwell & Gutteridge, 2007).

O $^1\text{O}_2$ pode provocar inativação de proteínas reagindo principalmente com os aminoácidos histidina, tirosina, metionina, cisteína e triptofano. O $\text{O}_2^{\bullet-}$ pode oxidar o sítio [4Fe-4S] de enzimas e levar a sua inativação. O H_2O_2 e os peróxidos orgânicos também podem oxidar esses clusters [4Fe-4S] e pontes de dissulfeto (Helliwell & Gutteridge, 2007).

6 – Agentes Indutores de Danos Oxidativos Utilizados Neste Estudo

Diversos agentes são capazes de gerar espécies reativas, entre eles estão 4-NQO (óxido de 4-nitroquinolina); NDEA (N-nitrosodietilamina); H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e tert-butil-hidroperóxido (*t*-BOOH)

6.1 – Óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO)

O 4-NQO é um conhecido agente carcinogênico, sendo considerado UV-mimético. A ação tóxica deste composto é iniciada por redução enzimática do grupo nitro. O 4-NQO é convertido a óxido de 4-hidroxiaminolina (4HAQO) e, finalmente, a óxido de 4-aminoquinolina (4AQO) que serve comoceptor final de hidrogênio. Este intermediário pode formar monoadutos de quinolina estáveis com o DNA como 3-(deoxyadenosin-N⁶-yl)-4AQO e N⁴-(guanosin-7-yl-4AQO) (Nunoshiba & Demple, 1993; Friedberg, 2006). 4-NQO pode ainda ser metabolizado por nitrorredução gerando um ciclo redox, produzindo grande quantidade de EROs. Já foi constatado o aumento, sobretudo nos níveis de $\text{O}_2^{\bullet-}$, mas também de H_2O_2 e radicais HO^{\bullet} em diversos modelos biológicos tratados com 4-NQO (Nunoshiba T & Demple, 1993). É capaz de formar lesões do tipo 8-hidroxi-2-

deoxiguanosina (8-HG), bem como outros danos oxidativos como peroxidação lipídica (Arima *et al.*, 2006; Friedberg, 2006; Srinivasan *et al.*, 2007).

6.2 – N-nitrosodietilamina (NDEA)

A NDEA é um agente carcinogênico bem conhecido, capaz de produzir danos no DNA (principalmente O⁴-etilamina) bem como induzir lesões oxidativas (8-hidroxi-guanina) e também produzir estresse oxidativo (Goto *et al.*, 1999; Aiub *et al.*, 2003). Agentes N-nitroso não interagem diretamente com biomoléculas como o DNA, sendo que necessitam ser metabolizados, por redução do grupo nitro, para exercer o seu efeito tóxico (Josephy *et al.*, 1997; Aiub *et al.*, 2006).

Diversos estudos têm sugerido que N-nitrosodietilamina causa estresse oxidativo e danos celulares pelo envolvimento de radicais livres, gerados por ciclo redox produzindo derivados nitrosaminas e EROs (Masuda *et al.*, 2000; Aiub *et al.*, 2006). Os dados obtidos em diversos modelos biológicos mostram que a exposição a este agente leva a um aumento na peroxidação lipídica (Boitier *et al.* 1995; Blanco *et al.*, 1998; Bansal *et al.*, 2005; Mittal *et al.*, 2008).

6.3 – Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Alguns danos celulares podem ser mediados pelo H₂O₂ diretamente, como a inativação da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Helliwell & Gutteridge, 2007). Já a adição de H₂O₂ leva a oxidação de lipídios, DNA e proteínas, mas que não pode ser mediada pelo H₂O₂ sozinho. H₂O₂ pode cruzar a membrana rapidamente e, já dentro da

célula pode reagir com íons metálicos, como ferro ou cobre, para formar muito mais EROs como HO[•] pela reação de Fenton (Helliwell & Gutteridge, 2007).

6.4 – *tert*-butil-hidroperóxido (*t*-BOOH)

O *t*-BOOH é um análogo de cadeia curta de hidroperóxidos lipídicos, amplamente utilizado para induzir estresse oxidativo em um variado tipo de células. A toxicidade do *t*-BOOH é atribuída a sua capacidade de gerar radicais HO[•] e butoxil devido à reação de Fenton (Baker & He, 1991; Plazar *et al.*, 2007). É capaz de induzir diversas disfunções celulares, como peroxidação de lipídios da membrana, redução dos níveis de GSH, oxidação de resíduos tiólicos, bem como quebras simples no DNA e danos na mitocôndria (Goya *et al.*, 2007; Kanupriya *et al.*, 2007).

7 – Resposta ao Estresse Oxidativo

A resposta ao estresse oxidativo é designada como o fenômeno em que a célula responde a alterações no estado redox devido à geração de EROs, por eventos metabólicos ou pela exposição a diversos agentes físicos ou químicos. Portanto, todas as células devem ser capazes de perceber, responder e repararem macromoléculas e inativar as EROs produzidas (Hohmann & Mager, 1997; Rodrigues-Pousada *et al.*, 2004; Lau *et al.*, 2008).

O controle primário da resposta ao estresse oxidativo encontra-se na síntese de proteínas envolvidas na proteção celular, podendo ser por mecanismos transcricionais, pós-transcricionais ou pós-traducionais ou até alterações no fluxo metabólico (Dalton, 1999; Rodrigues-Pousada *et al.*, 2004; Grant, 2007; Cappellini & Fiorelli, 2008).

7.1 - Principais Defesas Antioxidantes

Para proteger o organismo do ataque de EROs, existe uma série de sistemas de defesas antioxidantes que pode ocorrer por sistemas enzimáticos ou não enzimáticos. As estratégias de defesa compreendem três etapas, que são: a prevenção (evitar a formação de EROs), interceptação (neutralização de EROs gerada) e reparação (de danos ocasionados por EROs). A prevenção contra a formação de EROs é representada, por exemplo, pelos sistemas de homeostase metálica na prevenção ao estresse oxidativo. A interceptação pode ser representada pelos sistemas enzimáticos como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) ou não enzimáticos como glutaciona (GSH), vitaminas, compostos fenólicos. Estes consistem em evitar que as EROs provoquem danos aos componentes celulares. Por último quando o dano já estiver ocorrido, existem sistemas capazes de repará-lo, como, por exemplo, os sistemas de reparo de DNA (Sies, 1997; Sen & Packer, 1996; Halliwell & Gutteridge, 2007).

7.1.1 - Superóxido dismutase (SOD)

A SOD foi a primeira enzima antioxidante a ser descoberta presente tanto em eucariotos como em procariotos. São metalo-enzimas responsáveis que catalizam a dismutação de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 e oxigênio (Fig. 7) (Mittler *et al.*, 2004; Halliwell & Gutteridge, 2007). Há várias isoenzimas do tipo SOD, sendo classificadas de acordo com seu grupo prostético, podendo conter zinco, manganês ou ferro em seus sítios ativos e geralmente são responsáveis por compartimentos celulares distintos (Freitas *et al.*, 2000; Henriques *et al.*, 2001; Culotta *et al.*, 2006). A CuZnSOD é homodimérica e possui Cu^{+2} e Zn^{+2} e está presente principalmente no citosol de células eucarióticas, mas também pode ser encontrada nos lisossomos, núcleo, bem como nos espaços entre as membranas

mitocondriais interna e externa (Longo *et al.*, 1996; Landis & Tower, 2005; Halliwell & Gutteridge, 2007). A MnSOD é homotetramérica e contém um íon de Mn^{+3} em cada uma das suas subunidades, está localizada primariamente na mitocôndria. A FeSOD possui um íon Fe^{+2} em seu sítio ativo e é a SOD constitutiva da maioria dos organismos eucarióticos (Fridovich, 1998).

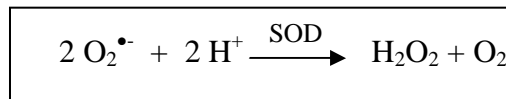


Figura 7: Reação de dismutação do $O_2^{\bullet-}$ pela SOD

Na mitocôndria, o $O_2^{\bullet-}$ é formado relativamente em altas concentrações, devido à dispersão de elétrons da cadeia respiratória, sendo a MnSOD essencial (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A função principal das enzimas SOD seria proteger as proteínas contendo [4Fe-4S] da ação do $O_2^{\bullet-}$, prevenindo o acúmulo de ferro intracelular (Imlay, 2006 & 2008). Estudos mostram que a redução na atividade de SOD leva a uma diminuição na atividade nas vias de reparação e a superexpressão de SOD em células deficientes em reparo mostram um nível aumentado de danos na cromatina (Dizdaroglu, 1992). As análises de biologia de sistemas sugerem que as SODs de *S. cerevisiae* atuam como sensor de $O_2^{\bullet-}$ sob condições de estresse oxidativo, ativando e controlando mecanismos específicos de reparação de DNA, como o reparo recombinacional e por excisão, o remodelamento da cromatina e a síntese de dNTPs (Bonatto, 2007).

7.1.2 - Catalase (CAT)

A CAT é uma hemoproteína que catalisa a dismutação de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Fig. 8) (Fridovich, 1998). Como a CAT tem o H₂O₂ como único substrato, a sua atividade está intimamente relacionada com a concentração desta espécie reativa. A ação desta enzima envolve oxidação divalente do ferro heme (IV), acompanhada pela redução divalente do H₂O₂. Elas contêm NADPH fortemente ligado, o qual pode prevenir a acumulação da forma ferro (IV) da enzima, a qual é inativa (Henriques *et al.*, 2001). Em células eucariotas, há catalases citosólicas e peroxissomais (Halliwell & Gutteridge, 2007).

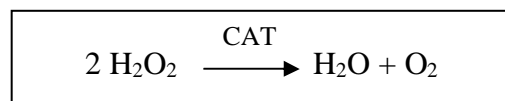


Figura 8: Reação de dismutação do H₂O₂ pela catalase

7.1.3 - Glutathione Peroxidase (GPx)

A GPx clássica é multimérica e importante para a proteção contra peróxidos inorgânicos e orgânicos. Para sua atividade, a GPx necessita da presença de GSH e converte esta para o dissulfeto correspondente glutathione oxidada (GSSG) (Fig. 9).

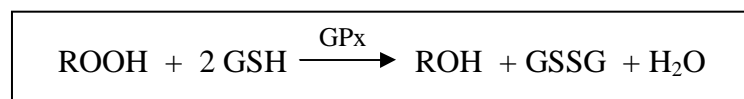


Figura 9: Mecanismo catalítico da GPx

Existem ainda as PHGPx (fosfolipídio hidropérido glutathione peroxidase), que são enzimas monoméricas e associadas a membrana, capazes de reduzir peróxidos

orgânicos. Essas enzimas são as principais na reparação de peróxidos lipídicos na membrana (Halliwell & Gutteridge, 2007).

7.1.5 - Glutathione (GSH)

A GSH é um tripeptídeo (γ -glutamil-cisteinil-glicina) que desempenha função fundamental na proteção das células contra danos oxidativos causados por oxidantes, atuando como seqüestradora de radicais (Meister, 1995; Pastore *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2007). Está envolvida na destoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos, bem como pode interagir com outras espécies reativas como $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ e HO^{\bullet} (Blokhina *et al.*, 2003; Halliwell & Gutteridge, 2007). A GSH tem importância em vários processos fisiológicos, além da proteção celular contra formação de radicais livres, como na homeostasia tiólica, manutenção do balanço redox da célula e defesa contra agentes eletrofilicos, como xenobióticos. Além disso, participa na regulação alostérica de enzimas envolvidas com o transporte de aminoácidos, bem como também envolvida em processos de sinalização celular (Thannickal & Fanburg; 2000; Dröge, 2002; Masella 2005). É utilizada por uma série de enzimas como GPx, glutathione-S-transferase e glutaredoxina (Meister, 1995; Masella *et al.*, 2005; Halliwell & Gutteridge, 2007).

Os mecanismos de sistemas antioxidantes atuam cooperativamente (Fig 10), onde a ausência de uma das defesas acarreta um desequilíbrio no estado redox da célula podendo levá-la a um aumento na sensibilidade a agentes oxidantes intra ou extracelular (Gralla *et al.*, 1992; Dröge; 2002).

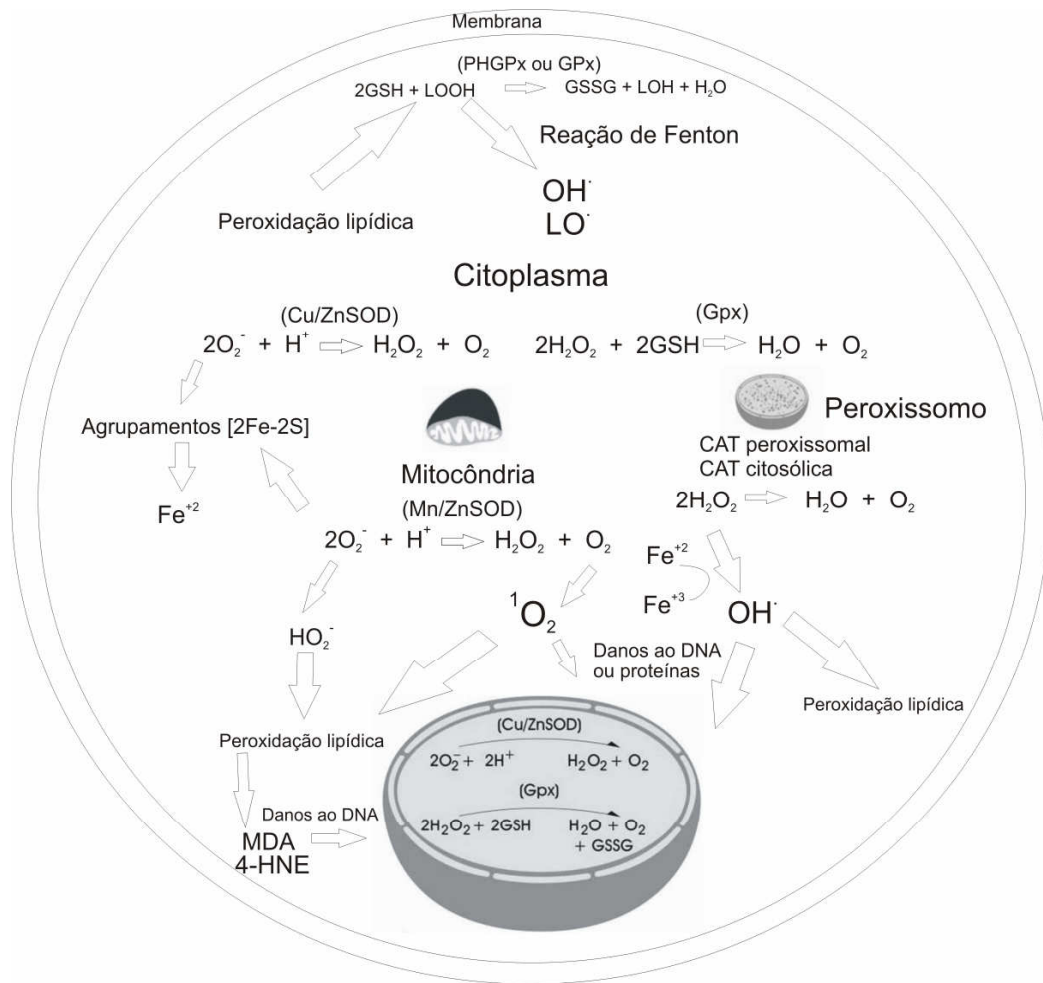


Figura 10. Representação esquemática da interação e localização dos mecanismos oxidantes e antioxidantes, na qual são mostradas as principais vias endógenas antioxidantes e os principais efeitos das EROs Adaptado de Engelhardt (1999)

8 - A Levedura *Saccharomyces cerevisiae* Como Modelo de Estudo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um fungo unicelular e tem sido amplamente estudada, tornando-se ferramenta importante nas pesquisas em razão da sua simplicidade e similaridade genética, bioquímica e funcional com mamíferos e outros organismos em vários aspectos. Dessa maneira, esse organismo é um modelo útil para o

melhor entendimento de diversas funções biológicas (Altmann & Trachsel 1994; Foury 1997; Jeansonne 1994; Lecrenier *et al.* 1997; Minic *et al.* 2005; Smardova 1999). Além disso, é utilizada na indústria química e de alimentos; na indústria farmacêutica, com ênfase na produção de proteínas terapêuticas, incluindo proteínas humanizadas, vacinas e probióticos; e na tecnologia ambiental, com fins de biorremediação, tratamento de resíduos e recuperação do solo (Forsburg 2001; Lafon *et al.*, 2007; Lushchak 2006; Menacho-Marquez & Murguia 2007; Simon & Bedalov 2004; Steinmetz & Scharfe, 2002; Sturgeon *et al.*, 2006).

Algumas das propriedades que fazem a levedura particularmente apropriada para estudos biológicos incluem o seu rápido crescimento, segurança, possuir um sistema genético bem definido e mais significativamente, o conhecimento da sequência completa do seu genoma. *S.cerevisiae* foi o primeiro organismo eucarioto a possuir o genoma completamente sequenciado e depositado em bancos de dados especializados (como <http://www.yeastgenome.org>) permitindo a clonagem de diferentes genes, sua rápida identificação e caracterização, assim como melhor compreensão da sua função celular. Também existem ferramentas moleculares apropriadas para manipulação gênica e estudos de expressão, como o transcriptoma, proteoma, metaboloma e interatoma, bem como esclarecimento de diversas rotas metabólicas (Pena-Castillo & Hughes 2007; Jones *et al.*, 2008; Maya *et al.*, 2008; Schuster *et al.*, 2008).

Por isso, não surpreende o uso de células de levedura como um sistema modelo com relevante contribuição para compreender o mecanismo molecular básico da resistência ao estresse oxidativo.

8.1 – Ciclo de vida e metabolismo

A levedura *S. cerevisiae* apresenta um ciclo eucariótico típico, completo e bem definido. As células se dividem por brotamento logo após a duplicação de seu DNA, com tempo de geração de aproximadamente 90 minutos, quando incubadas a temperaturas de 28-30°C. Além disso, existe a possibilidade de células diplóides poderem ser induzidas à meiose e a uma conseqüente esporulação. A esporulação origina células haplóides que, por sua vez, se multiplicam por divisão mitótica e brotamento (Zimmermann *et al.*, 1984; Kitamura *et al.*, 2007; Stuart, 2008).

Leveduras podem crescer tanto em condições anaeróbias quanto aeróbias e, portanto, são expostas continuamente a EROs gerados como bioprodutos do metabolismo (Costa & Ferreira, 2001). A *S. cerevisiae* pertence ao grupo das leveduras anaeróbias facultativas. Isto significa que fermenta hexoses como a glicose e a frutose, independente da concentração de oxigênio, também chamado de efeito Pasteur. A glicose é a principal fonte de carbono da *S. cerevisiae*, uma preferência que é mediada por um complexo processo de repressão e ativação de genes e de proteínas, usualmente conhecido como repressão da glicose ou repressão catabólica (Wills, 1990; Maris *et al.*, 2000; Usaite *et al.*, 2008). Quando a concentração de glicose cai para menos de 0,2% no meio, há a desrepressão das enzimas que participam da biossíntese na mitocôndria e de outros genes necessários para o crescimento respiratório (de Vries & Marres, 1988; Fei *et al.*, 2008). Esse crescimento apresenta fases distintas do ponto de vista metabólico e cinético (Fig. 11). Após um breve período de adaptação em meio rico (YPD - 2% glicose), chamado de fase lag, as células iniciam uma divisão celular a cada hora e meia (fase exponencial), com energia proveniente da fermentação da glicose. Ao diminuir a disponibilidade de glicose no meio, ocorre a desrepressão catabólica (transição diáuxica), na qual há uma parada

transiente na divisão celular, enquanto as células são preparadas para o metabolismo respiratório. Após, ela reassume a divisão celular em um ritmo mais lento (uma divisão a cada três ou quatro horas), utilizando o etanol como fonte de carbono produzido durante a fermentação (fase pós-diáuxica). Quando todas as fontes de carbono forem exauridas, as células entram na fase estacionária na qual podem sobreviver por muito tempo na ausência de nutrientes (Fuge & Werner-Washburne, 1997; Maris *et al.*, 2000; Usaite *et al.*, 2008).

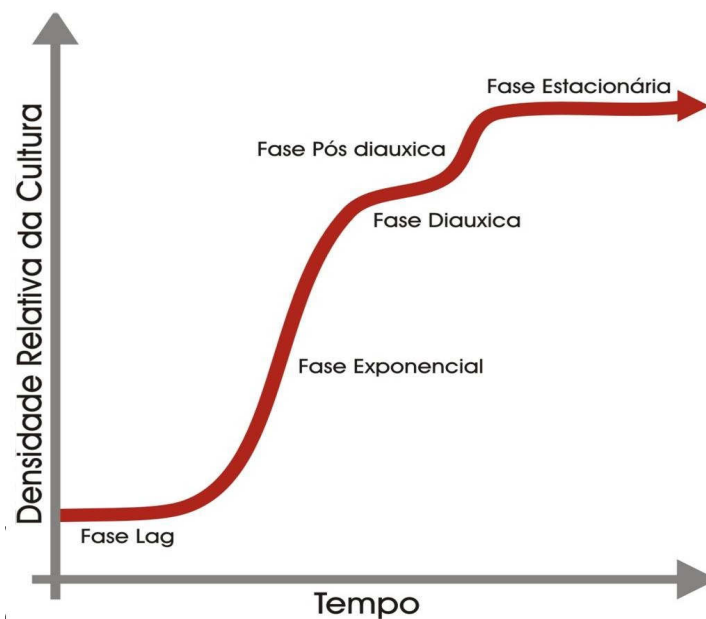


Figura 11: Curva de crescimento de uma linhagem selvagem de *Saccharomyces cerevisiae*

8.3 – Defesas antioxidantes em *Saccharomyces cerevisiae*

Nos últimos anos, os estudos em *Saccharomyces cerevisiae* têm emergido importantes princípios de como as células podem responder ao estresse oxidativo (Grant, 2001; Toledano *et al.*, 2003). As leveduras têm esclarecido e revelado novas informações quanto ao papel de enzimas envolvidas na defesa contra o estresse oxidativo e na regulação do metabolismo redox, bem como a modulação de proteínas pelo estado redox das mesmas e reparo de danos oxidativos nas moléculas (Herrero *et al.*, 2008).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, pode responder de maneiras diferentes ao estresse oxidativo dependendo da magnitude deste. A levedura detecta o estresse por meio do estado redox de proteínas-chave. Em baixas doses de EROs, as células se adaptam tornando-se mais resistentes para oxidação, enquanto que, em altas doses há a indução de sistemas antioxidantes e de reparo e em doses muito elevadas há morte celular (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2004).

S. cerevisiae apresenta uma variedade de mecanismos de defesas antioxidantes. Possui duas enzimas superóxido dismutases: CuZnSod, localizada no citoplasma, codificada pelo gene *SOD1*; e a MnSod, localizada na mitocôndria, codificada no núcleo pelo gene *SOD2* (Gralla & Kosman, 1992; Longo *et al.*, 1999; Halliwell & Gutteridge, 2007). Fenótipos mutantes de *S. cerevisiae* com deleção para os genes *SOD1* e/ou *SOD2* providenciam informações com relação à função destas enzimas. Então, Sod2p parece ser importante na defesa contra o O_2^{\bullet} gerado na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, portanto, mutantes *sod2* Δ são hipersensíveis a hiperóxia e crescem pobremente em condições respiratórias. Entretanto, Sod2p não parece ter um papel importante na proteção a oxidantes externos (Van Loon *et al.*, 1986; Halliwell & Gutteridge, 2007). Os mutantes *sod1* Δ apresentam uma variedade de fenótipos incluindo crescimento reduzido em condições respiratórias, perda de viabilidade em fase estacionária e têm importante papel na defesa contra oxidantes externos, como paraquat e menadiona, ainda apresentando deficiência na produção dos aminoácidos lisina e metionina (Longo *et al.*, 1996; Jensen *et al.*, 2004; Halliwell & Gutteridge, 2007).

Duas catalases foram identificadas, uma citosólica codificada pelo gene *CTT1* e outra peroxissomal codificada pelo gene *CTA1* (Izawa *et al.*, 1996). Cta1p está envolvida na detoxificação do peróxido de hidrogênio gerado pela acil-CoA oxidase durante a β -

oxidação de ácidos graxos nos peroxissomos (Hiltunen *et al.*, 2003). Já a Ctt1p possui um papel não muito claro, já que os mutantes não apresentam defeitos no crescimento nem sensibilidade aumentada a peróxidos. Entretanto o duplo mutante apresenta hipersensibilidade a peróxidos (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Existem três GPx em levedura, Gpx1, Gpx2 e Gpx3. Entre os diferentes tipos de Gpx a mais importante na resposta a estresse oxidativo parece ser a Gpx3, já que o mutante apresenta hipersensibilidade a peróxidos orgânico e inorgânico, bem como sensibilidade a metais e ácidos graxos insaturados. Já as Gpx1 e Gpx2 parecem ter uma menor participação na resposta a este tipo de estresse (Avery *et al.*, 2004; Basu *et al.*, 2004; Kho *et al.*, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2007).

O gene *GSH1* codifica a γ -glutamil-cisteinil sintetase, enzima responsável pelo primeiro passo e ponto limitante as síntese de GSH. Os mutantes são hiperssensíveis a peróxidos e a outros oxidantes (Lisowsky, 1993; Brendel *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2007).

S.cerevisiae apresenta duas tioredoxinas redutases (Trx1 e Trx2) citosólicas e uma mitocondrial (Trx3) (Trotter & Grant, 2005; Koc *et al.*, 2006; Camier *et al.*, 2007). Ainda há duas glutarredoxinas, Grx1 e Grx2, sendo presentes no citosol e a Grx2 também está localizada na mitocôndria (Cheng *et al.*, 2006; Ojeda *et al.*, 2006; Herrero & Torre-Ruiz, 2007).

O fator de transcrição Yap1p, homólogo ao fator humano AP1, é apontado como um dos mais importantes mediadores das respostas adaptativas de *S. cerevisiae*, modulando a transcrição de genes envolvidos na defesa contra oxidantes (Meister, 1995; Delaunay *et al.*, 2002; Molin *et al.*, 2007). Yap1p parece regular genes de forma direta e indireta. Alguns dos alvos da regulação direta que foram identificados são os genes *TRX2*,

dois genes que codificam a tiorredoxina em *S. cerevisiae* (Kuge & Jones, 1994; Tanaka *et al.*, 2005); *GSH1* codifica a γ -glutamil-cisteinil sintetase (Wu & Moye-Rowley, 1994; Smith *et al.*, 2007); *TRR1*, que codifica tiorredoxina redutase (Morgan *et al.*, 1997; Missal & Lodge, 2005; Trotter & Grant, 2005); *GLR1* que codifica a GSSG-redutase (Grant *et al.*, 1996; Wood *et al.*, 2004). Yap2p está envolvido na regulação da resposta a resistência a estresse por metal e a drogas como 1,10-fenantrolina e 4-NQO, possivelmente atuando na resposta a estresse oxidativo (Azevedo *et al.*, 2007). Algumas respostas mediadas por Yap1 exigem uma cooperação de outro fator de transcrição, o fator Skn7 (Dormer *et al.*, 2002; Coenjaerts *et al.*, 2006; Brombacher *et al.*, 2007).

Os avanços recentes na análise genômica têm mostrado que muitos genes estão envolvidos nestas respostas fisiológicas. Vários genes são induzidos ou reprimidos em vias específicas para EROs (Alic *et al.*, 2004). O desenvolvimento também, de diversas ferramentas como a construção de mutantes com deleção para genes não essenciais e extensivos registros de interações proteína-proteína (Winzeler, 2001; Salwisnk, 2004; Scherens & Goffeau, 2004).

A utilização da bioinformática na comparação tanto de proteínas quanto de ácidos nucleicos vem sendo uma ferramenta extremamente importante neste estudo, pois permite inferir, por exemplo, os padrões estruturais de proteínas que são evolutivamente conservadas, detectar ou demonstrar homologias entre seqüências e/ou famílias de seqüências, sendo possível estabelecer correlações funcionais entre grupos ou famílias protéicas (Bonatto, 2005). Todas estas ferramentas estão sendo essenciais na detecção de novos genes e proteínas importantes para resistência e resposta ao estresse oxidativo (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2004).



Objetivos

Objetivos

Objetivo geral

- Avaliar a possível função das proteínas Frm2 e Hbn1 de *Saccharomyces cerevisiae* na resposta ao estresse oxidativo, bem como determinar a posição filogenética e a sua presença em organismos procariotos e eucariotos

Objetivos específicos

- Construir linhagens simples e duplo mutante de *S. cerevisiae* para os genes *FRM2* e *HBN1* que codificam para as duas nitrorredutases;
- Determinar a sensibilidade das linhagens mutantes *frm2Δ* e *hbn1Δ* e da selvagem isogênica expostas a diferentes tipos de agentes geradores de estresse oxidativo;
- Investigar a indução de mutantes citoplasmáticos “*petites*” nas linhagens mutantes *frm2Δ* e *hbn1Δ* e na selvagem isogênica tratadas com agentes oxidantes;
- Verificar uma possível participação das nitrorredutase Frm2p e Hbn1p na ativação de nitrocompostos;
- Avaliar o conteúdo de espécies reativas de oxigênio (ROS) gerado nas linhagens selvagem e mutantes sob condições de estresse oxidativo;

- Verificar uma possível influência das nitrorredutases no nível de peroxidação lipídica pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Realizar a determinação da atividade das principais enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase), bem como conteúdo de glutathione, com a finalidade de entender a modulação das defesas celulares contra o estresse oxidativo mediada pelas nitrorredutases;
- Determinar o parentesco filogenético das proteínas Frm2p e Hbn1p em relação a nitrorredutases bacterianas e bem como a conservação evolutiva de estruturas primárias, secundárias e terciárias por meio de ferramentas de bioinformática.



Capítulo I

In silico identification of a new group of specific bacterial and fungal nitroreductases-like proteins

Biochemical and Biophysical Research Communications, 355:919-925, 2007

In silico identification of a new group of specific bacterial and fungal nitroreductases-like proteins

Iuri Marques de Oliveira ^a, João Antonio Pêgas Henriques ^{a,b}, Diego Bonatto ^{b,*}

^a Centro de Biotecnologia/Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratório de Genética Toxicológica 206, Instituto de Biotecnologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Rua Francisco Getúlio Vargas 1130, Bloco 57, Caixa Postal 1352, Caxias do Sul, RS, Brazil

Received 4 February 2007

Available online 20 February 2007

Abstract

The nitroreductase family comprises a group of FMN- or FAD-dependent and NAD(P)H-dependent enzymes able to metabolize nitrosubstituted compounds. The nitroreductases are found within bacterial and some eukaryotic species. In eukaryotes, there is little information concerning the phylogenetic position and biochemical functions of nitroreductases. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has two nitroreductase proteins: Frm2p and Hbn1p. While Frm2p acts in lipid signaling pathway, the function of Hbn1p is unknown. In order to elucidate the function of Frm2p/Hbn1p and the presence of homologous sequences in other prokaryotic and eukaryotic species, we performed an in-depth phylogenetic analysis of these proteins. The results showed that bacterial cells have Frm2p/Hbn1p-like sequences (termed NrlAp) forming a distinct clade within the fungal Frm2p/Hbn1p family. Hydrophobic cluster analysis and three-dimensional protein modeling allowed us to compare conserved regions among NrlAp and Frm2p/Hbn1p proteins. In addition, the possible functions of bacterial NrlAp and fungal Frm2p/Hbn1p are discussed.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Nitroreductases; Type I nitroreductase; Yeast Frm2p/Hbn1p; Bacterial NrlAp; Reactive nitrogen oxide species

A large number of nitroaromatic and nitroheterocyclic derivatives (nitrosubstituted compounds) are present in environmental samples [1,2] as a consequence of manufacturing processes and as antimicrobial agents [3]. In addition, nitropolyaromatic compounds have been identified as by-products of a variety of combustion processes [4,5]. These nitrosubstituted compounds have attracted a considerable health concern because their metabolization leads to the formation of potent genotoxic and/or mutagenic metabolites [6]. In addition, many nitrosubstituted compounds are able to generate reactive nitrogen oxide species (RNOxS), which readily react with biological macromolecules [7]. The metabolic pathways that result in the activation of nitrosubstituted compounds are complex, and the nitroreductase proteins have a central role on the activa-

tion of nitroheterocyclic and nitroaromatic compounds. The nitroreductases are also biotechnologically attractive, showing potential applications for bioremediation, biocatalysis, and chemotherapeutic tumor treatment [8–11].

The nitroreductases comprise a family of eubacterial conserved sequences that catalyze the reduction of nitrosubstituted compounds using FMN or FAD as prosthetic group and NADH or NADPH as reducing power agents [12,13]. Until now, two types of bacterial nitroreductases have been biochemically characterized: type I (oxygen-insensitive) and type II (oxygen-sensitive) [13]. In *Escherichia coli*, type I nitroreductases are known to catalyze the reduction of organic nitroaromatic and nitroheterocyclic compounds such as nitrofurazone and nitrofurantoin. Two type I genes, *nfsA* and *nfsB*, were cloned and their enzymatic activities have been characterized [14,15]. It has been shown that paraquat strongly induces *nfsA* whereas *nfsB* levels remain essentially unchanged [16].

* Corresponding author. Fax: +55 54 3218 2293.

E-mail address: diegobonatto@gmail.com (D. Bonatto).

Interestingly, the genes that codify for bacterial type II nitroreductases have not been cloned until now [17].

The data available about the distribution of nitroreductase-like sequences in eukaryotic cells are very restricted, but a mammalian iodotyrosine deiodinase that contains a nitroreductase domain was described [18]. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* two genes named *FRM2* (YCL026c-A) and *HBN1* (YCL026c-B) codifies for nitroreductase-like proteins. The functions of Frm2 and Hbn1 proteins are not completely known, but experimental data of McHale et al. [19] indicated that Frm2p is possibly involved in lipid signaling pathway and cellular homeostasis. Considering that the phylogenetic position of both proteins is little known as well as their presence in other prokaryotic and eukaryotic organisms, we identified and characterized *in silico* a new bacterial and fungal Frm2p/Hbn1p nitroreductase-like family. This new family was identified by searching in bacterial and eukaryotic genomic databases using sensitive methods of phylogenetic analysis. Additional hydrophobic cluster analysis (HCA) and three-dimensional protein modeling allowed us to refine the results obtained from phylogeny and to map conserved domains within these new nitroreductase-like proteins.

Experimental procedures

Protein data mining and sequence analyses. Sixty-one protein sequences were obtained directly from GenBank hosted in the National Center for Biotechnological Information (NCBI) web page (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Tables 1 and 2). BLAST and PSI-BLAST programs were used for initial domain screening and comparison [20]. Moreover, the *SceFrm2p* sequence (Table 1) was used as template in the Genolevures Database (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/index.php>) in order to identify possible nitroreductase homologous sequences in unconventional yeast species. All searches were made to saturation. Wise2 program at European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/wise2/>) was used to identify Hbn1/Frm2 proteins from the unfinished genomic sequences of fungal species. The parameters for prediction were: local mode; no intron bias; splice site modeled; synchronous model; and GeneWise623 algorithm. The theoretical *pI* and molecular weight of selected bacterial NrlA and fungal Hbn1/Frm2 proteins (complete sequences) were calculated with COMPUTE *pI*/Mw program hosted in ExPASy Molecular Biology Server at Swiss Institute of Bioinformatics (<http://us.expasy.org/tools/pitool.html>). The presence of mitochondrial target signals in selected fungal Hbn1/Frm2 proteins was analysed by MitoProt software [21].

Algorithms for sequence comparison and phylogenetic inference. Global pair-wise multiple-alignment of members of prokaryotic NrlAp and eukaryotic Hbn1p/Frm2p groups was performed in the CLUSTALX 1.8 program [22]. The following alignment parameters were used: gap open penalty 10.00; gap extension 0.20; sequences >10% diverged delayed; BLOSUM series matrix; residue-specific penalties on; and hydrophilic penalties on. When necessary, the alignments were manually adjusted using the BioEdit program [23].

Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 3.1 [24]. Neighbor-Joining (NJ) method was used for phylogenetic tree searching and inference. The statistical reliability of the phylogenetic trees was tested by interior branch analysis with 1000 replications. Moreover, the Poisson correction was applied in NJ for distance estimation. The complete deletion option was used in handling gaps or missing data obtained from the alignment.

Hydrophobic cluster analysis (HCA). HCA of selected protein sequences was performed as previously published [25]. Briefly, it consisted in displaying the primary protein structure on a duplicated α -helical net,

where the hydrophobic residues are automatically contoured. The hydrophobic clusters observed in an HCA plot are not distributed in a random manner, but correspond highly with the secondary protein structures associated with conserved globular domains. Thus, HCA plots are extremely valuable for phylogenetic inferences when protein sequences have a weak homology (<25% of identity/similarity) or to define conserved domains and sequence signatures in a set of homologous proteins [25]. It should be noted that HCA, when compared with 'linear' or one-dimensional methods of database screening, e.g., BLAST and PSI-BLAST (which need, at least, >30% of aa identity/similarity over a sufficient length), is a more effective tool to detect sequence similarity that reflects a true three-dimensional relationship between two or more proteins [26]. Moreover, HCA has the advantage that sequence conservation can be detected in a group of proteins without any previous one-dimensional alignment [26,27]. Additionally, an homology score can be calculated from HCA data as previously described by Gaboriaud et al. [27]. The program DRAWHCA, used in such analysis, is available as a freeware at <http://bioserv.rpbs.jussieu.fr/RPBS/>.

Algorithms for three-dimensional modeling. *In silico* three-dimensional (3-D) modeling of *SceHbn1p* sequence was performed with 3D-JIGSAW [28] threading algorithm using as template the *SmuNrlAp* sequence of *Streptococcus mutans* (Table 1), which belongs to the bacterial NrlAp family (Protein Data Bank Accession No. 1YW3). Three-D comparative models were generated by UCSF Chimera software [29].

Results and discussion

Phylogenetic analysis of bacterial and fungal nitroreductase-like proteins

With the aim of identifying new Frm2p/Hbn1p-like sequences in bacterial and fungal species, the *S. cerevisiae* Frm2p sequence (*SceFrm2p*) was used to query in BLAST and PSI-BLAST programs. Our data mining of bacterial and fungal genomes revealed new homologous proteins similar to *SceFrm2p* (Table 1). We named the new bacterial Frm2p/Hbn1p-like sequences as NrlA (*NitroReductase-Like A* sequence; Table 1). Interestingly, these new NrlAp sequences have low similarity level when compared to type I nitroreductases of *Bacillus* genus (data not shown).

NfsA, the major type I nitroreductase from *E. coli* has been purified and biochemically characterized. It can reduce nitrofurazone generating a two electron transfer product and has a tightly associated FMN group [15]. Purification and characterization of NfsB, a minor oxygen-insensitive nitroreductase from *E. coli* has been reported [14]. The NfsA and NfsB nitroreductases have also been shown to function as lawsone (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone)-dependent azo reductases under anaerobic conditions [30]. Moreover, it was reported that some NfsA-like proteins from *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* act in the oxidative stress response, keeping the cellular thiol-dissulfide balance [31].

These new NrlAp/Frm2p/Hbn1p sequences were subjected to a global sequence comparison followed by a phylogenetic analysis (Fig. 1). The phylogenetic data indicated that both bacterial NrlAp and fungal Frm2p/Hbn1p sequences share a recent last universal common ancestor (LUCA), highly supported by interior branch analysis

Table 1
Bacterial and fungal nitroreductase-like proteins used in this study

Protein Group	Species	Protein name	Accession No. (GenBank)	
Bacterial nitroreductase-like	<i>Acidovorax</i> sp.	<i>AspNrlAp</i>	gi 121594458	
	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>AciNrlAp</i>	gi 50085393	
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>AhyNrlAp</i>	gi 117617740	
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>AtuNrlAp</i>	gi 16119431	
	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>BanNrlAp</i>	gi 65319266	
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>BceNrlAp</i>	gi 52142142	
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>BthNrlAp</i>	gi 49478207	
	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>BfrNrlAp</i>	gi 53711523	
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>BatNrlAp</i>	gi 29348801	
	<i>Brucella melitensis</i>	<i>BmeNrlAp</i>	gi 17989117	
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>CacNrlAp</i>	gi 15896557	
	<i>Clostridium cellulolyticum</i>	<i>CcelNrlAp</i>	gi 118725480	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>EfaNrlAp</i>	gi 29375254	
	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>EnfNrlAp</i>	gi 69246358	
	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>EcaNrlAp</i>	gi 50121762	
	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>LbrNrlAp</i>	gi 116333485	
	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>LcaNrlAp</i>	gi 116494949	
	<i>Leishmania major</i> ^a	<i>LmaNrlAp</i>	gi 68130245	
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>LmeNrlAp</i>	gi 116618834	
	<i>Listeria innocua</i>	<i>LinNrlAp</i>	gi 16802020	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>LmoNrlAp</i>	gi 16804866	
	<i>Listeria welshimeri</i>	<i>LweNrlAp</i>	gi 116874175	
	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>NmeNrlAp</i>	gi 15795064	
	<i>Paracoccus denitrificans</i>	<i>PdeNrlAp</i>	gi 69937297	
	<i>Peptococcus pentosaceus</i>	<i>PpeNrlAp</i>	gi 116492034	
	<i>Pedictyon luteolum</i>	<i>PluNrlAp</i>	gi 78186978	
	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	<i>PviNrlAp</i>	gi 71482181	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>PaeNrlAp</i>	gi 15597771	
	<i>Psychrobacter arcticus</i>	<i>ParNrlAp</i>	gi 71066332	
	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	<i>PcrNrlAp</i>	gi 93006371	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>SauNrlAp</i>	gi 82751635	
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>ShaNrlAp</i>	gi 70725999	
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>SagNrlAp</i>	gi 22538047	
	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>SmuNrlAp</i>	gi 24378768	
	<i>Thermosinus carboxydivorans</i>	<i>TcaNrlAp</i>	gi 121533904	
	<i>Trypanosoma brucei</i> ^a	<i>TbrNrlAp</i>	gi 72391262	
	Fungal nitroreductase-like	<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>AcI</i> Frm2p A	gi 121707539
		<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>AcI</i> Frm2p B	gi 121713376
		<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Afu</i> Frm2p A	gi 70986358
		<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Afu</i> Frm2p B	gi 70993974
<i>Aspergillus fumigatus</i>		<i>Afu</i> Frm2p C	gi 70997834	
<i>Aspergillus nidulans</i>		<i>Ani</i> Frm2p A	gi 67523147	
<i>Aspergillus nidulans</i>		<i>Ani</i> Frm2p B	gi 67522793	
<i>Aspergillus nidulans</i>		<i>Ani</i> Frm2p C	gi 67523775	
<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Aor</i> Frm2p A	gi 83776359	
<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Aor</i> Frm2p B	gi 83774315	
<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Aor</i> Frm2p C	gi 83776268	
<i>Aspergillus terreus</i>		<i>Ate</i> Frm2p A	gi 115492421	
<i>Aspergillus terreus</i>		<i>Ate</i> Frm2p B	gi 115401210	
<i>Candida glabrata</i>		<i>Cgl</i> Hbn1p	gi 50285171	
<i>Chaetomium globosum</i>		<i>Chg</i> Frm2p	gi 116198311	
<i>Cryptococcus neoformans</i>		<i>Cne</i> Frm2p	gi 58260498	
<i>Gibberella zeae</i>		<i>Gze</i> Frm2p	gi 46109968	
<i>Khuyveromyces lactis</i>		<i>Kla</i> Hbn1p	gi 50304619	
<i>Magnaporthe grisea</i>		<i>Mgr</i> Frm2p	gi 39957916	
<i>Neosartorya fischeri</i>		<i>Nfi</i> Frm2p	gi 119479343	
<i>Neurospora crassa</i>		<i>Ncr</i> Frm2p	gi 85103226	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		<i>Sce</i> Hbn1p	gi 10383764	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		<i>Sce</i> Frm2p	gi 10383765	
<i>Ustilago maydis</i>	<i>Uma</i> Frm2p	gi 71015252		

^a Both protozoan sequences probably were acquired by genetic lateral transfer.

Table 2
Physico-chemical analyses of bacterial NrlA and fungal Frm2/Hbn1 proteins

Protein Group	Protein name	Length	pI	M.W. (kDa)
Bacterial NrlAp				
	<i>CcelNrlAp</i>	205	6.32	23700.9
	<i>LcaNrlAp</i>	200	4.98	22827.7
	<i>EcaNrlAp</i>	199	5.59	22211.2
	<i>LmaNrlAp</i>	233	8.78	25429.7
	<i>ParNrlAp</i>	202	5.89	22916.0
	<i>SauNrlAp</i>	208	5.27	24034.0
	<i>SmuNrlAp</i>	200	4.95	22384.3
	<i>TbrNrlAp</i>	190	6.84	21208.4
Fungal Frm2p/Hbn1p				
	<i>AniFrm2p A</i>	208	6.31	23275.5
	<i>AniFrm2p B</i>	242	9.94	27067.2
	<i>AniFrm2p C</i>	222	5.45	24518.0
	<i>CglHbn1p</i>	193	6.19	20741.3
	<i>KlaHbn1p</i>	196	5.56	21080.8
	<i>NcrFrm2p</i>	208	5.15	22886.9
	<i>SceFrm2p</i>	193	6.51	21232.1
	<i>SceHbn1p</i>	193	6.43	20993.8

(Fig. 1). Interestingly, two bacterial NrlAp sequences were found in the genomes of the protozoan species *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*, respectively (Fig. 1). We hypothesized that these two protozoan NrlAp sequences were acquired by lateral gene transfer. Supporting this idea, it was reported that the anaerobic protozoan *Giardia lamblia* also has an oxygen-insensitive nitroreductase with high similarity to *Clostridium acetobutylicum* nitroreductase sequence [32]. Moreover, we could observe the presence of paralogous Frm2p-like sequences in the genomes of different *Aspergillus* species (Table 1 and Fig. 1). The *Aspergillus* paralogous Frm2p-like sequences are an indicative that these proteins could have an important and possible distinct physiological roles within this genera.

The phylogenetic results obtained from the primary structures led us to study the theoretical physico-chemical properties of these new proteins (Table 2). The physico-chemical data showed that bacterial NrlA and fungal Frm2/Hbn1 proteins have an acidic pI (average pI of 6.08 and 6.44, respectively). The polypeptide chains lengths vary from 190 to 233 aa [molecular weight (M.W.) from 21.21 to 25.43 kDa; Table 2] for bacterial NrlAp, while the fungal Frm2p/Hbn1p sequences showed polypeptide chains in the range of 193–242 aa (M.W. from 20.74 to 27.07 kDa; Table 2).

HCA and three-dimensional protein modeling of nitroreductase-like sequences

An HCA comparison between bacterial NrlAp (*SmuNrlAp* and *LcaNrlAp*, respectively; Table 1) and fungal Frm2/Hbn1 proteins (*SceFrm2p*, *SceHbn1p*, and *MgrFrm2p*, respectively; Table 1) indicated a high degree of similarity of secondary structures among the proteins, being composed in a greater extent by α -helices ($\alpha 1$ – $\alpha 8$;

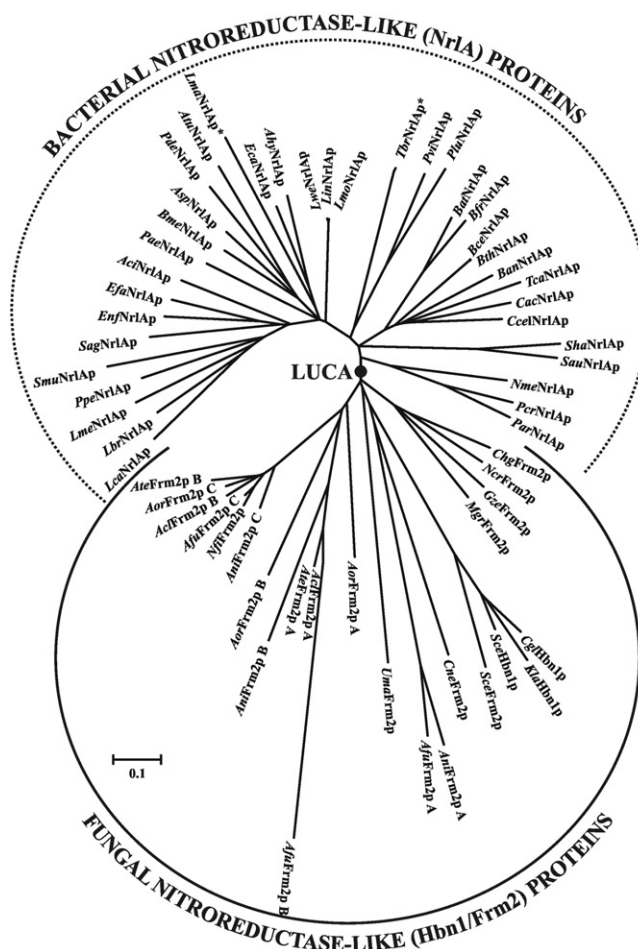


Fig. 1. Unrooted phylogenetic tree obtained from the global alignment of all proteins listed in Table 1. The bacterial nitroreductase-like (NrlA) proteins compose a phylogenetically distinct group (dotted line) when compared to fungal Frm2p/Hbn1p sequences (solid line). An asterisk on *TbrNrlAp* and *LmaNrlAp* indicate two protozoan sequences that were acquired from bacteria by lateral gene transfer. The unrooted tree is supported by an internal branch analysis value of >90% and the horizontal bar represents a distance of 0.1 substitutions per site. LUCA: last universal common ancestor.

Fig. 2). Two subdomains (subdomains 1 and 2; Fig. 2) separated by a hinge region (Fig. 2) could be clearly identified in all proteins analysed. Both subdomains 1 and 2 show an average similarity score of 68% and 63%, respectively. In addition, the Frm2p sequence of *Magnaporthea grisea* (*MgrFrm2p*; Table 1) contains a signal peptide for mitochondrial location (Fig. 2), indicating a possible role of *MgrFrm2p* within this organelle. We could not identify mitochondrial targeting sequences in the yeast Frm2p/Hbn1p, but experimental data from our laboratory shows that yeast cells defective for Frm2p and/or Hbn1p have a high induction of *petite* colonies (data not shown).

Three-dimensional modeling of *SceHbn1p* and *SmuNrlAp* using threading (3D-JIGSAW) algorithm was done to corroborate the results obtained by HCA (Fig. 3A–C). It was possible to model *SceHbn1p* (Fig. 3A) using the atomic coordinates of crystalized *SmuNrlAp* complexed

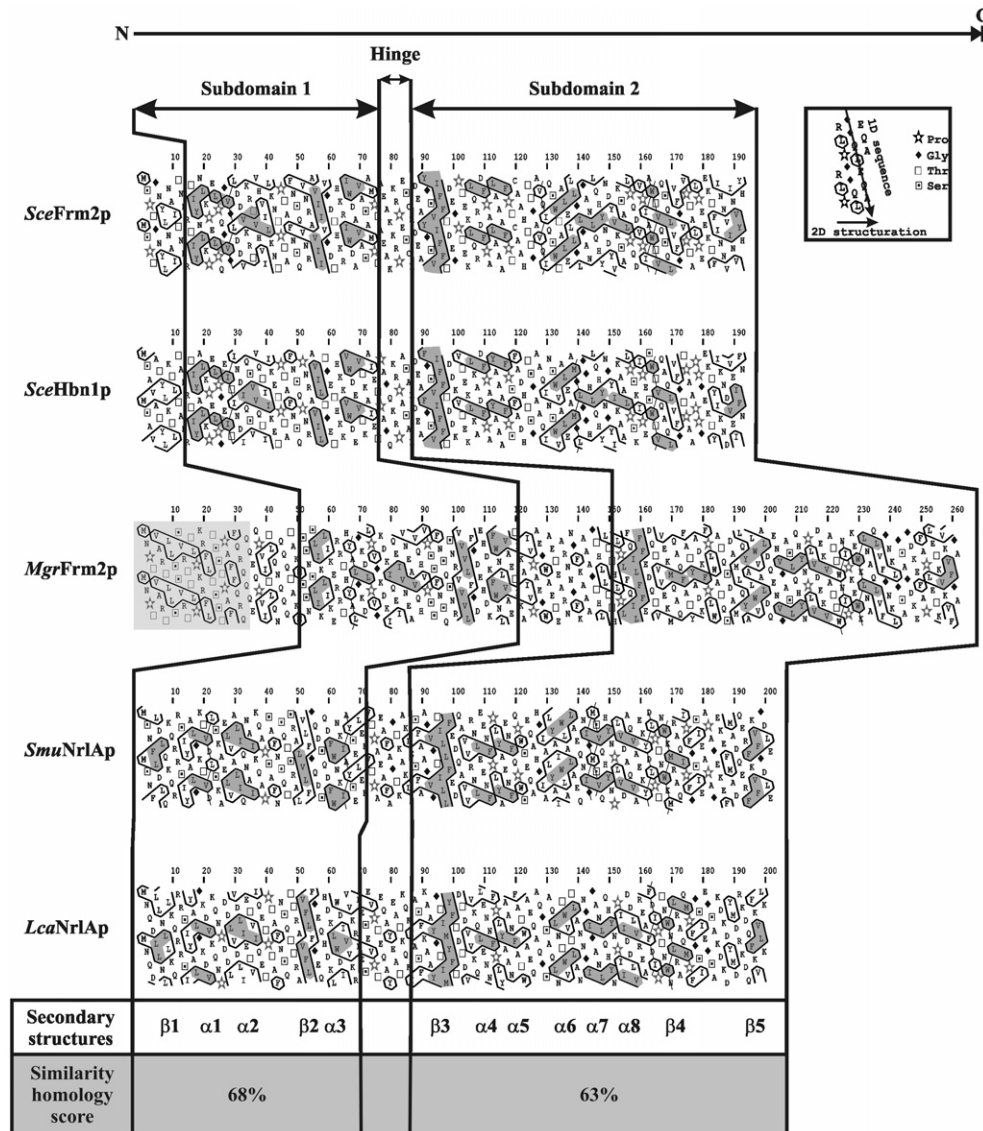


Fig. 2. HCA of selected bacterial NrlAp and fungal Frm2p/Hbn1p sequences. Solid vertical lines separate subdomains 1 and 2 within the nitroreductase domain. Conserved hydrophobic nucleotides as well as the mitochondrial targeting sequence in *MgrFrm2p* are shaded in gray. Secondary structures (α or β) of subdomains 1 and 2 derived from HCA are shown. An average similarity score (%) calculated from HCA for each region is given at the bottom. An arrow indicates N-terminus to C-terminus directionality. A legend for sequences and special HCA symbols is provided in the inset.

with a FMN molecule (Fig. 3B). The superimposition of both models allowed to identify the FMN binding site in *SceHbn1p* model (E -value of 2×10^{-71} ; Fig. 3C). One interesting aspect of type I nitroreductases is that they are either monomeric or homodimeric FMN-containing proteins with a subunit size of approximately 25 kDa and use NAD(P)H as a reductant [13]. The crystallographic data of *SmuNrlAp* (Protein Data Bank Accession No. 1YW3) also indicated that this protein occurs as a homodimeric protein and probably the same is true for fungal Frm2p/Hbn1p.

The functions of Frm2p/Hbn1p are little understood, and yeast cells mutated for *FRM2* gene are sensitive to polyunsaturated fatty acids, e.g., arachidonic acid [19]. It was reported recently that the *FRM2* gene promoter contains

a Yap2p binding site [33], a transcriptional factor associated with cadmium ion (Cd^{2+}) and drug resistance [34,35]. In this sense, the metabolism of polyunsaturated fatty acids and Cd^{2+} generate large amounts of reactive species, including reactive oxygen and nitrogen oxides species (ROS and RNOxS, respectively), able to induce damage or loss-of-function in biological macromolecules [36,37]. Some RNOxS, including peroxynitrite (ONOO^-) and nitryl chloride (NO_2Cl), are capable of nitrating virtually all classes of biomolecules. One of the major nitrated products formed in the cell is 3-nitrotyrosine (3-NT) that is generated by ONOO^- and is also found in mammalian inflamed tissues, being implicated in the promotional stage of carcinogenesis and in many degenerative diseases [38]. Moreover, 3-NT induces protein modification, which leads to alteration of

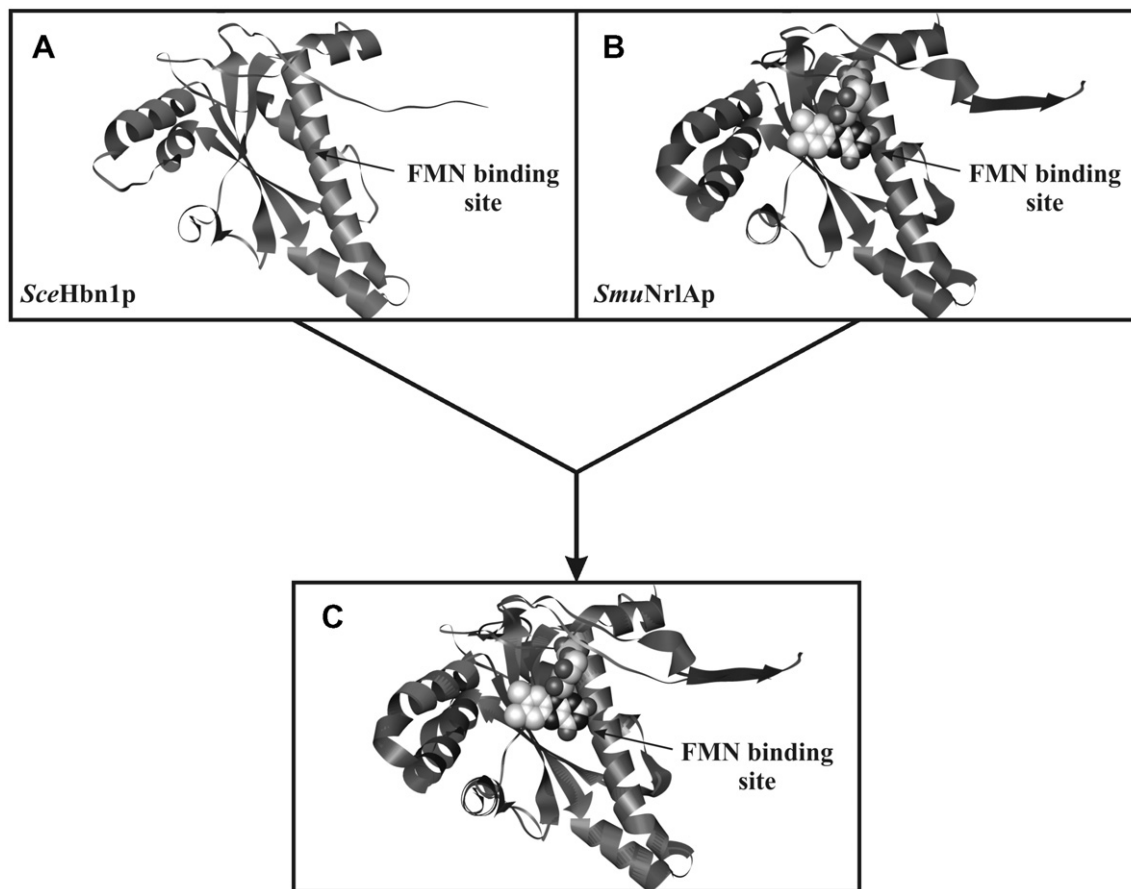


Fig. 3. Threading three-dimensional model of *SceHbn1p* (A). The *SmuNrlAp* 3-D model (B) was used for structure comparison with *SceHbn1p* (C). The FMN-binding site is indicated by an arrow in (A), (B), and (C). A molecule of FMN is shown in (B) and (C).

protein functions [38]. Besides protein modification by RNOxS, DNA is also a RNOxS-target molecule, generating nitrated DNA adducts, like 8-nitroanthine (8-NX). 8-NX is the major nitrated DNA adduct in NO_2Cl -treated DNA [38,39]. Once DNA is nitrated, the glycosidic bonds of these nitrated DNA adducts are labile and tend to form the mutagenic apurinic sites [38,39].

Considering the presence of a nitro group in biological macromolecules, it has been postulated that NfsB may also be able to reduce the 3-NT residues in proteins [16]. However, a study performed by Lightfoot et al. [40] indicated that both NfsA and NfsB of *E. coli* do not reduce 3-NT. Interestingly, *E. coli* does not possess a NrlAp-like sequence, and accumulate nitrated proteins within the cell [40]. On the other hand, there are evidences that eukaryotic cells are capable to degrade and/or repair nitrated proteins and DNA at higher rates than unmodified molecules [41]. Considering the data gathered about bacterial NrlA and fungal Frm2/Hbn1 proteins in this work, we could think that these proteins can act keeping the oxidative and/or nitrosative balance within these cells. Experimental data from our laboratory have indicated that yeast cells single or double mutant for *FRM2* and *HBN1* genes are extremely sensitive to nitrosative substances, like 4-NQO (manuscript in preparation), corroborating our sequence analyses data.

Acknowledgments

We thank Dr. Kátia Gonçalves dos Santos for critical reading of this manuscript. This work was supported by research grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

- [1] D.R. McCalla, C. Kaiser, M.H.L. Green, Genetics of nitrofurazone resistance in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 133 (1978) 10–16.
- [2] Y. Tazima, T. Kada, A. Murakami, Mutagenicity of nitrofurans derivatives, including furylfuramide, a food preservative, *Mutat. Res.* 32 (1975) 55–80.
- [3] J.C. Spain, Biodegradation of nitroaromatic compounds, *Annu. Rev. Microbiol.* 49 (1995) 523–555.
- [4] D.M. DeMarini, M.L. Shelton, D.A. Bell, Mutation spectra of chemical fractions of a complex mixture: role of nitroarenes in the mutagenic specificity of municipal waste incinerator emissions, *Mutat. Res.* 349 (1996) 1–20.
- [5] L. Möller, I. Lax, L.C. Eriksson, Nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons: a risk assessment for the urban citizen, *Environ. Health Perspect.* 101 (1993) 309–315.
- [6] R.S. Padda, C. Wang, J.B. Hughes, R. Kutty, G.N. Bennett, Mutagenicity of nitroaromatic degradation compounds, *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (2003) 2293–2297.
- [7] H. Sies, H. de Groot, Role of reactive oxygen species in cell toxicity, *Toxicol. Lett.* 64–65 (1992) 547–551.

- [8] N. Hannink, S.J. Rosser, C.E. French, A. Basran, J.A. Murray, S. Nicklin, N.C. Bruce, Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase, *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) 1168–1172.
- [9] C.L. Kitts, C.E. Green, R.A. Otley, M.A. Alvarez, P.J. Unkefer, Type I nitroreductases in soil enterobacteria reduce TNT (2,4,6-trinitrotoluene) and RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine), *Can. J. Microbiol.* 46 (2000) 278–282.
- [10] V. Kadiyala, L.J. Nadeau, J.C. Spain, Construction of *Escherichia coli* strains for conversion of nitroacetophenones to ortho-aminophenols, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 6520–6526.
- [11] P.F. Searle, M.J. Chen, L. Hu, P.R. Race, A.L. Lovering, J.I. Grove, C. Guise, M. Jaberipour, N.D. James, V. Mautner, L.S. Young, D.J. Kerr, A. Mountain, S.A. White, E.I. Hyde, Nitroreductase: a prodrug-activating enzyme for cancer gene therapy, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31 (2004) 811–816.
- [12] D.W. Bryant, D.R. McCalla, M. Leeksa, P. Laneville, Type I nitroreductases of *Escherichia coli*, *Can. J. Microbiol.* 27 (1981) 81–86.
- [13] T. Kobori, H. Sasaki, W.C. Lee, S. Zenno, K. Saigo, M.E. Murphy, M. Tanokura, Structure and site-directed mutagenesis of a flavoprotein from *Escherichia coli* that reduces nitrocompounds: alteration of pyridine nucleotide binding by a single amino acid substitution, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 2816–2823.
- [14] S. Zenno, H. Koike, M. Tanokura, K. Saigo, Gene cloning, purification, and characterization of NfsB, a minor oxygen-insensitive nitroreductase from *Escherichia coli*, similar in biochemical properties to FRase I, the major flavin reductase in *Vibrio fischeri*, *J. Biochem.* 120 (1996) 736–744.
- [15] S. Zenno, H. Koike, A.N. Kumar, R. Jayaraman, M. Tanokura, K. Saigo, Biochemical characterization of NfsA, the *Escherichia coli* major nitroreductase exhibiting a high amino acid homology to Frp, a *Vibrio fischeri* flavin oxidoreductase, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 4508–4514.
- [16] S.I. Liochev, A. Hausladen, I. Fridovich, Nitroreductase A is regulated as a member of the *soxRS* regulon of *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 3537–3539.
- [17] J. Whiteway, P. Koziarz, J. Veall, N. Sandhu, P. Kumar, B. Hoecher, I.B. Lamber, Oxygen-insensitive nitroreductases: analysis of the roles of *nfsA* and *nfsB* in development of resistance to 5-nitrofurantoin derivatives in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 5529–5539.
- [18] J.E. Friedman, J.A. Watson Jr., D.W. Lam, S.E. Rokita, Iodotyrosine deiodinase is the first mammalian member of the NADH oxidase/flavin reductase superfamily, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 2812–2819.
- [19] M.W. McHale, K.D. Kroening, D.A. Bernlohr, Identification of a class of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in fatty acid repression of gene transcription and analysis of the *frm2* gene, *Yeast* 12 (1996) 319–331.
- [20] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389–3402.
- [21] M.G. Claros, P. Vincens, Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences, *Eur. J. Biochem.* 241 (1996) 779–786.
- [22] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673–4680.
- [23] T.A. Hall, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41 (1999) 95–98.
- [24] S. Kumar, K. Tamura, M. Nei, MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment, *Brief. Bioinform.* 5 (2004) 150–163.
- [25] C. Gaboriaud, V. Bissery, T. Benchetrit, J.P. Mornon, Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences, *FEBS Lett.* 224 (1987) 149–155.
- [26] I. Callebaut, G. Labesse, P. Durand, A. Poupon, L. Canard, J. Chomilier, B. Henrissat, J.P. Mornon, Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives, *Cell Mol. Life Sci.* 53 (1997) 621–645.
- [27] L. Lemesle-Varloot, B. Henrissat, C. Gaboriaud, V. Bissery, A. Morgat, J.P. Mornon, Hydrophobic cluster analysis: procedures to derive structural and functional information from 2-D-representation of protein sequences, *Biochimie* 72 (1990) 555–574.
- [28] P.A. Bates, L.A. Kelley, R.M. MacCallum, M.J.E. Stenberg, Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM, *Proteins* 5 (2001) 39–46.
- [29] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605–1612.
- [30] J. Rau, A. Stolz, Oxygen-insensitive nitroreductases NfsA and NfsB of *Escherichia coli* function under anaerobic conditions as lawson-dependent Azo reductases, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 3448–3455.
- [31] K. Streker, C. Freiberg, H. Labischinski, J. Hacker, K. Ohlsen, *Staphylococcus aureus* NfrA (SA0367) is a flavin mononucleotide-dependent NADPH oxidase involved in oxidative stress response, *J. Bacteriol.* 187 (2005) 2249–2256.
- [32] J.E. Nixon, A. Wang, J. Field, H.G. Morrison, A.G. McArthur, M.L. Sogin, B.J. Loftus, J. Samuelson, Evidence for lateral transfer of genes encoding ferredoxins, nitroreductases, NADH oxidase, and alcohol dehydrogenase 3 from anaerobic prokaryotes to *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*, *Eukaryot. Cell.* 1 (2002) 181–190.
- [33] D. Azevedo, L. Nascimento, J. Labarre, M.B. Toledano, C. Rodrigues-Pousada, The *S. cerevisiae* Yap1 and Yap2 transcription factors share a common cadmium-sensing domain, *FEBS Lett.* 581 (2007) 187–195.
- [34] E. Lesuisse, P. Labbe, Effects of cadmium and of *YAP1* and *CAD1/YAP2* genes on iron metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology* 141 (1995) 2937–2943.
- [35] K. Miyahara, D. Hirata, T. Miyakawa, yAP-1- and yAP-2-mediated, heat shock-induced transcriptional activation of the multidrug resistance ABC transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.* 29 (1996) 103–105.
- [36] M. Valko, H. Morris, M.T. Cronin, Metals, toxicity and oxidative stress, *Curr. Med. Chem.* 12 (2005) 1161–1208.
- [37] M. Balazy, C.D. Poff, Biological nitration of arachidonic acid, *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2 (2004) 81–93.
- [38] H.-J.C. Chen, Y.-M. Chen, C.M. Chang, Lipoyl dehydrogenase catalyzes reduction of nitrated DNA and protein adducts using dihydrolipoic acid or ubiquinol as the cofactor, *Chem. Biol. Interact.* 140 (2002) 199–213.
- [39] H.-J.C. Chen, Y.-M. Chen, T.-F. Wang, K.-S. Wang, J. Shiea, 8-Nitroxanthine, an adduct derived from 2'-deoxyguanosine or DNA reaction with nitryl chloride, *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 536–546.
- [40] R.T. Lightfoot, D. Shuman, H. Ischiropoulos, Oxygen-insensitive nitroreductases of *Escherichia coli* do not reduce 3-nitrotyrosine, *Free Radical Biol. Med.* 28 (2000) 1132–1136.
- [41] A. Gow, D. Duran, S. Malcolm, H. Ischiropoulos, Effects of peroxynitrite induced modifications to signal transduction and protein degradation, *FEBS Lett.* 385 (1996) 63–66.



Capítulo II

The role of two putative nitroreductases, Frm2p and Hbn1p, in the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*

**A Ser Submetido a
FEMS Yeast Research**

The role of two putative nitroreductases, Frm2p and Hbn1p, in the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*

Iuri Marques de Oliveira¹, Alfeu Zanotto-Filho², José Cláudio Fonseca Moreira²,
Diego Bonatto³, João Antonio Pêgas Henriques^{1,3,*}

¹Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, 91507-970 Porto Alegre, RS, Brazil.

²Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, ICBS/Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ramiro Barcelos 2600 – anexo, 90035-003 Porto Alegre, Brazil

³Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Rua Francisco Getúlio Vargas 1130, Bloco 57, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil.

Short title: Frm2p and Hbn1p and oxidative stress

***Address to which correspondence should be sent:**

João Antonio Pêgas Henriques

Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, UFRGS,

Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, Brazil, 91507-970.

Telephone: 55-51-3308-7602; Fax: 55-51-3308-6084.

E-mail: pegas@cbiot.ufrgs.br

Contract/grant sponsor: FAPERGS, CNPq, GENOTOX/ROYAL laboratory.

Abstract

The nitroreductase family comprises a group of FMN or FAD-dependent enzymes able to metabolize nitrosubstituted compounds using the reducing power of NAD(P)H. The nitroreductases could be found within bacterial species and, in a less extend, in eukaryotes. There are few informations concerning the biochemical functions of nitroreductases. Some works suggests a possible involvement from the nitroreductases in response the stress oxidative. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* two nitroreductase proteins, Frm2p and Hbn1p, were described. While Frm2p appears to act in the lipid signaling pathway, the function of Hbn1p is completely unknown. In order to elucidate the functions of Frm2p and Hbn1p, we evaluate the sensitivity of proficient and deficient yeast strains for both proteins for oxidative stress, considering the respiratory competence, antioxidant enzyme activities, intracellular reactive oxygen species (ROS) production and lipid peroxidation. The results showed a weaker basal activity of superoxide dismutase (SOD) in *frm2Δ*, *hbn1Δ* and *frm2Δ hbn1Δ* strains and higher sensibility, increase of intracellular ROS production and lipid peroxidation when exposed the superoxide generating agents, 4-nitroquinoline-oxide (4-NQO) and N-Nitrosodiethylamine (NDEA), present also elevated induction of petites. However, the basal activity of catalase (CAT), and glutathione peroxidase (Gpx) and glutathione (GSH) content were higher in the *frm2Δ* and *frm2Δ hbn1Δ* strains and were less ROS-producing and lipid peroxidation when exposed to peroxides. In addition, we verified that Frm2p and Hbn1p nitroreductases appears to be not involved in the activation of nitrocompounds.

Keywords

Saccharomyces cerevisiae; Frm2p; Hbn1p; nitroreductases; reactive oxygen species.

Introduction

Nitroaromatic and nitroheterocyclic derivatives (nitrosubstituted compounds) constitute an enormous range of chemicals that are characterized by the presence of one or more nitro groups on a heterocyclic or aromatic nucleus. For many years nitro-substituted compounds have been used as pharmaceuticals, pesticides, herbicides, explosives, antimicrobial agents, food additives and raw materials in several industrial processes, becoming, and as a result comprise an important group of environmental pollutants (Tazima *et al.*, 1975; McCalla *et al.*, 1978; Spain 1995). In addition, nitropolyaromatic compounds have been identified as by-products of a variety of combustion processes (Möller *et al.*, 1993; De Marini *et al.*, 1996). There is a human health concern in regard to all of these compounds because their metabolization leads to the formation of potent genotoxic and/or mutagenic metabolites (Padda *et al.*, 2003). In addition, many nitrosusbtituted compounds are able to generate reactive nitrogen oxide species (RNOxS), which readily react with biological macromolecules (Sies & de Groot, 1993; Homma-Takeda *et al.*, 2002). The metabolic pathways that result in the activation of nitrosubstituted compounds are complex, and the nitroreductase proteins have a central role on the activation of nitroheterocyclic and nitroaromatic compounds. Research on these proteins has been of significant interest due to their central role in mediating nitrosubstituted compounds toxicity, mutagenicity and carcinogenicity, potential applications in bioremediation, biocatalysis and bioactivating of a range of prodrugs in cancer chemotherapy (Kitts *et al.*, 2000; Hannink *et al.*, 2001; Kadiyala *et al.*, 2003; Searle *et al.*, 2004). Recently, it has been shown that these enzymes have also chromate reduction activity (Ackerley *et al.*, 2004; Kwak *et al.*, 2003).

The nitroreductases comprise a family of conserved sequences originally discovered in eubacteria and grouped together according to sequence similarity. These enzymes are capable of catalyze the reduction of nitrosubstituted compounds using FMN or FAD as prosthetic group and NADH or NADPH as reducing power agents (Bryant & DeLuca, 1991). Until now, two types of bacterial nitroreductases have been biochemically characterized: (i) type I (oxygen-insensitive), which catalyze the reduction of nitro groups by sequential two-electron reductions to nitroso, hydroxylamine intermediates and finally primary amine (Haack *et al.*, 2001; Kobory *et al.*, 2001; Sarlauskas *et al.*, 2004); and (ii) type II (oxygen-sensitive), catalyzes one electron reduction of the nitro group, which produces a nitro anion radical, and this radical subsequently reacts with oxygen forming a superoxide radical and regenerating the original nitroaromatic compound. This “futile cycle” can cause oxidative stress by producing large amounts of superoxide (Peterson *et al.*, 1979; Angermaier & Simon, 1983). Type I nitroreductases are known to catalyze the reduction of organic nitroaromatic and nitroheterocyclic compounds such as nitrobenzene, TNT, nitrofurazone, metronidazole and nitrofurantoin (McCalla *et al.*, 1978; Kadiyala *et al.*, 2003; Caballero *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2007). Type I genes of *Escherichia coli* (Zenno *et al.*, 1996a; 1996b), *Salmonella typhimurium* (Watanabe *et al.*, 1990; Nokhbeh *et al.*, 2002), *Enterobacter cloacae* (Bryant & DeLuca, 1991; Haynes *et al.*, 2002), *Helicobacter pylori* (Goodwin *et al.*, 1998), have been cloned and their activities have been characterized. Interestingly, the genes that codify for bacterial type II nitroreductases have not been cloned until now (Whiteway *et al.*, 1998).

The data available about the distribution of nitroreductase-like sequences in eukaryotic cells is very restricted. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* two genes named *FRM2* (YCL026c-A) and *HBN1* (YCL026c-B) codifies for putative nitroreductase-like

proteins, as recently we identified and characterized using *in silico* analysis (de Oliveira *et al.*, 2007).

A feature of the nitroreductase family is our lack of knowledge about the biological function of protein members. Some works suggests a possible involvement from the nitroreductases in response the stress oxidative (Liochev *et al.*, 1999; Paterson *et al.*, 2002; Streker *et al.*, 2005). The functions of Frm2 protein is not completely known, but experimental data of McHale *et al.*, (1996) indicated that Frm2p is possibly involved in lipid signaling pathway and cellular homeostasis. The function of Hbn1p is completely unknown. Considering the lack of knowledge about the biochemical functions of nitroreductases and the possible participation of these enzymes in response stress oxidative, the aim of the present study was to investigate the influence of the proteins Frm2 and Hbn1 in redox homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. For this purpose, we evaluate the sensitivity of *S. cerevisiae* strains proficient and deficient in Frm2p and Hbn1p to oxidative agents and investigated the respiratory competence, antioxidant enzyme activities, intracellular reactive oxygen species (ROS) production and lipid peroxidation.

Materials and Methods

Chemicals

The 4-nitroquinoline-oxide (4-NQO), N-Nitrosodiethylamine (NDEA), hydrogen peroxide (H₂O₂), tert-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH), 1,6-dinitropyrene (1,6-DNP), reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), NADPH, glutathione reductase, thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5,5-dithionitrobenzoic acid (DTNB), 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCHFDA), nitroblue tetrazolium (NBT), Dioxin, 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC), amino acids (L-histidine, L-threonine, L-metionine, L-tryptophan, L-leucine, and L-lysine), bases (adenine and uracil) were purchased from Sigma (Saint Louis, MO, USA). Yeast extract, bacto-peptone, and bacto-agar were obtained from Difco Laboratories (Detroit, MI).

Yeast strains, media and growth conditions

The yeast *S. cerevisiae* strains used in this work are all isogenic derivatives of wild-type (WT) strain BY4741 (Table 1). Complete YPD medium containing 0.5 % (w/v) yeast extract, 2% (w/v) bacto-peptone, and 2% (w/v) glucose was used for routine growth of yeast cells (yeast fermenting cells). Whenever necessary was used YPG medium containing 0.5% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) bacto-peptone, and 3% (w/v) glycerol (yeast respiring cells). For plates, the medium was solidified with 2% (w/v) bacto-agar. The minimal medium (MM) containing 0.67% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids, 2% (w/v) glucose, and 2% (w/v) bacto-agar was supplemented with the appropriate amino acids. The synthetic complete medium (SynCo) was supplemented with 2 mg of adenine, 2

mg of arginine, 5 mg of lysine, 1 mg of histidine, 2 mg of leucine, 2 mg of methionine, 2 mg of uracil, 2 mg of tryptophan, and 24 mg of threonine per 100 mL MM. The SynCo medium without uracil (SynCo-ura) was used for selection of yeast transformant cells. All yeast strains were grown in complete YPD medium at 30 °C for 48 h with aeration by shaking, until stationary phase.

Disruption of *HBN1* gene

The strains *hbn1*Δ and the double mutant *frm2*Δ *hbn1*Δ were generated by the one-step gene replacement as described by Rhotstein (1983). Briefly, the gene *URA3* was amplified by PCR from YCpLac33 vector (Gietz & Sugino, 1988) using the following oligonucleotides: HBN1-S (5'atgtctgctgttgcaacttattgaaaactttaactgctACCGAGGAACTCTTGGTATT3') and HBN1-A (5'ttaattgaagatttcaacatcgTTTTgatgtaggtcttCGCACATTTCCCCGAAAAGT3'). Lowercase letters indicate the flanking region for *HBN1* gene, while uppercase letters represent the first 20 nt complementary to *URA3* sequence. Haploid BY4741 and *frm2*Δ strains were transformed with PCR product by lithium acetate/ssDNA protocol, as described by Gietz & Woods (2002). Transformants were selected in SynCo-ura medium.

Yeast survival curves

Stationary phase cultures were obtained by the inoculation of *S. cerevisiae* strains in liquid YPD. After 48 h at 30 °C the cells were harvested by centrifugation (1 min/1,500 g), washed twice in phosphate buffer (PBS 0.067M pH 7.0), the cell density was determined microscopically by using a Neubauer counting chamber and resuspended in the same buffer at final density of 2×10^7 cells mL⁻¹.

Cells were treated with 4NQO at exposure concentrations from 0 to 0.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (v/v), with NDEA at the concentration range from 0 to 500 mM, with varying amounts of H_2O_2 (0-5 mM) and t-BOOH at exposure concentrations from 0-5 mM, for in phosphate buffer (PBS 0.067M pH 7.0) for 2 h in a rotatory shaker at 30 °C

After treatments, the suspensions were serially diluted to 2×10^3 cells mL^{-1} , plated on solid medium and incubated at 30 °C for 3 d. The number of colonies was counted to measure a survival rate.

Determination of yeast respiratory deficient colonies (*petites*)

The yeast *petites* colonies were examined for their ability to reduce TTC. For this assay, the suspensions were serially diluted to 2×10^3 cells mL^{-1} , plated on solid medium YPG and incubated at 30 °C for 3 d. Then, 0.5% (w/v) TTC was dissolved in premelted agar [1.2% (w/v)] at 48 °C and overlaid on the yeast colonies. Reduction of TTC (colorless) requires the activity of the respiratory chain and leads to production of an insoluble red pigment (Ogur *et al.*, 1957).

Preparation of yeast cell-free extracts

Crude yeast extracts were prepared by glass bead lysis as follows: cells were suspended in lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 7.2) with an equal volume of acid-washed 425-600 μm glass beads and PMSF, vortexed for 10-15 cycles (30 s each), followed by 30 s of cooling. The mixture was then microcentrifuged for 5 min at 6,000 g to remove the cellular debris and glass beads (Longo *et al.*, 1996). The supernatant was kept on ice for immediate use. Protein concentration was determined by the Bradford assay (Bradford, 1976).

Antioxidant enzyme activities estimations

Total superoxide dismutase (SOD) activity was assessed by quantifying the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation by spectrophotometry at 480 nm, as previously described Misra & Fridovich (1972). The results of SOD were expressed as U SOD/mg protein. Catalase (CAT) activity was assayed by measuring the decreasing rate of H₂O₂ absorbance at 240 nm (Aebi, 1984). The results of CAT activity were expressed as U CAT/mg protein. Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined by measuring the rate of NAD(P)H oxidation at 340 nm, as described by Flohé & Günzler (1984). The results of GPx were expressed as mM NADPH/min/mg protein. Total glutathione (GSH plus GSSG) was measured by photometric determination of 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB), which was produced from DTNB in a kinetic assay, according to Akerboom & Sies (1981). The results were expressed as % GSH in relation the WT.

Determination of yeast intracellular ROS production

Intracellular ROS production was determined by the 2',7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA -based real-time assay using intact living cells, as described by Wang & Joseph (1999). The procedure for intracellular superoxide production as done by NBT reduction as described by Nabi & Islam (2001). Briefly, 6×10^4 cells mL⁻¹ suspensions were incubated for 30 min with 100 μ M DCFH-DA dissolved in PBS to allow cellular incorporation or incubated for 30 min at 30 °C and aliquots of NBT was added into the cells and incubated for 1 h at 30 °C. Then, cells were centrifuged, and pellet was resuspended in PBS containing the drugs to be tested. The cells were centrifuged, and pellet was resuspended in PBS containing the drugs to be tested. The DCFH-DA oxidation and NBT reduction was monitored with 5 min interval at 30 °C from

the fluorescence emission intensity in a 96-well plate fluorescence reader with an emission wavelength set at 535 nm and 560 nm, respectively. Fluorescence values were expressed as units arbitrary.

Thiobarbituric acid reactive species (TBARS)

As an index of ROS production we used the formation of a thiobarbituric acid malondialdehyde (TBA-MDA) complex during an acid-heating reaction, which is widely adopted as a sensitive method for measurement of lipid peroxidation, as previously described (Draper & Hadley, 1990). Briefly, the supernatants of crude extracts were precipitated with 10% (w/v) TCA centrifuged for 5 min at 1,000 g. The 300 μL supernatants were mixed with 100 μL of 10% TCA and 600 μL of 0.67% TBA, and then heated in a boiling water bath for 15 min. TBARS were determined by the absorbance in a spectrophotometer at 532 nm. Results are expressed as nmol TBARS/mg protein.

Yeast drop assay for 1,6-DNP sensitivity

The 1,6-DNP sensitivity of yeast strains was determined by the drop test standard technique. Briefly, yeast cultures in an early stationary phase of growth (1×10^8 cells mL^{-1}) were obtained after 2 d of growth in YPD media at 30°C. The yeast cultures were serially diluted (1:10 at each step) in phosphate buffer and 10 μL of each suspension was plated on SynCo media supplemented with 1,6-DNP at concentrations range 0-700 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (v/v). Negative controls were done on media without 1,6-DNP. Plates were photographed after 2 d of growth at 30 °C.

Statistical analysis

All assays were performed three independent times, each carried out in triplicate. The statistical analyses of the data were performed using one-way analysis of variance (ANOVA)–Tukey’s multiple comparison tests. P-values under 0.05 were considered significant. Data were expressed as means \pm SD values.

Results

The nitroreductases Frm2p and Hbn1p are involved in the defense against oxidative stress

With the purpose to analyse the role of Frm2p and Hbn1p against oxidative stress, we exposed the stationary cultures of yeast strains WT, *frm2 Δ* , *hbn1 Δ* and *frm2 Δ hbn1 Δ* to increasing concentrations of 4-NQO, NDEA, H₂O₂ and *t*-BOOH. The survival data showed that the single mutant *frm2 Δ* is sensitive to the nitrocompounds 4-NQO (Fig. 1A) and NDEA (Fig. 1B). Being tolerant to the inorganic and organic peroxides tested (Fig. 1C and D). On the other hand, *hbn1 Δ* mutant is sensitive to nitrocompounds (Fig. 1A and B) and displays the same WT phenotype against H₂O₂ and *t*-BOOH (Fig. 1C and D). The double mutant *frm2 Δ hbn1 Δ* shows an increased sensitivity FOR 4-NQO and NDEA (Fig. 1A and 1B) when compared to the single mutants, while it shown the same response peroxides cytotoxicity (Fig. 1C and 1D).

The *frm2 Δ* and *hbn1 Δ* mutants are defective in respiratory competence

The ability of yeast cells to reduce TCC is an important indicative of competence respiratory, which is a parameter that changes in the mutant cells when they present disturbances in the homeostase redox cellular. In this sense, it was possible verify that the

single and double mutants strains have an increase in the formation of *petites* when compared to WT (Fig. 2), indicating total or partial loss of respiratory capacity.

Yeast mutants for Frm2p and Hbn1p shows altered antioxidant enzymes activity and reduced GSH levels

In order to determine the possible mechanisms that can contribute to the phenotypic response for oxidative agents of *frm2Δ*, *hbn1Δ* and *frm2Δ hbn1Δ* strains, we measured the basal enzymatic activity of SOD, CAT, GPx and the content of GSH. Interestingly, it was possible to observe that the all mutant strains shown a diminished basal activity of SOD when compared to wt cells with a following decreasing order WT > *frm2Δ* > *hbn1Δ* > *frm2Δ hbn1Δ* (Fig. 3A). By its turn, the activities of CAT (Fig. 3B) and GPx (Fig. 3C), as well as the contents of GSH (Fig. 3D) are increased on the mutants *frm2Δ* and *frm2Δ hbn1Δ*.

ROS generation and lipid peroxidation shows different profiles in single and double mutants challenged against oxidative-generating agents

To determine the alteration on production of ROS and oxidative damage in mutant strains compared to WT, it was measured the production of the ROS by DCFH-DA and superoxide by NBT assays, as well as the index of the lipid peroxidation by TBARS (Fig. 4A to 4D). DCFH-DA is known to enter the cells and react predominantly with highly oxidizing species of ROS such as hydroxyl radicals (HO[•]), hydroperoxides or reaction of H₂O₂ with peroxidase, cytochrome c, or Fe²⁺ thus producing the fluorophore dichlorofluorescein (DCF) (Rothe & Valet, 1990; LeBel *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1993; Royall JA & Ischiropoulos, 1993). Firstly, in response the treatment with 4-NQO (Fig. 4A)

and NDEA (Fig. 4B), the single and double mutant *frm2Δ*, *hbn1Δ* and *frm2Δ hbn1Δ* generate ROS in major intensity that isogenic WT. The double mutant displayed an increased level of ROS compared to single mutants when exposed these oxidants (Fig. 4A and 4B). In response to H₂O₂ and *t*-BOOH (Fig. 4C and 4D), the single mutant *frm2Δ* and the double mutant exhibited a low production of ROS, while the single mutant *hbn1Δ* have the same pattern of WT strain.

The DCFH-DA method is not recommended to measure formation superoxide in cells because this radical is unable to oxidize DCFH directly and the oxidation of this compound leads to the formation of superoxide, leading to an error in superoxide determination (Rota *et al.*, 1999). In this sense the generation of superoxide was evaluated using the NBT reduction assay (FIG. 5). The mutant strains showed an increase level of superoxide in relation to WT while exposed for 4-NQO and NDEA, being the major levels observed on mutant *frm2Δ hbn1Δ*. However in exposure the H₂O₂ and *t*-BOOH there was no alteration in relation to basal levels (Fig. 5C and 5D).

In relation to the lipid peroxidation, a higher level of TBARS was shown by the single and double mutant strains when exposed to 4-NQO and NDEA (Fig. 6A and 6B). It should be noted that the level of ROS and TBARS appears to be dose- and strain-dependent. However, when the cells were exposed to H₂O₂ and *t*-BOOH the level of TBARS is diminished in both single and double mutant *frm2Δ* (Fig. 6).

In none of the tests observed difference among the levels basal of strains, for ROS production and lipid peroxidation (Fig. 4; 5 and 6).

Evaluation of nitrocompounds reduction by yeast strains proficient and deficient for Frm2p and Hbn1p

To evaluate the roles of Frm2p and Hbn1p nitroreductases in the reduction of nitrocompounds, the yeast strains were treated with 1,6-DNP. Nitropyrenes are, in general, activated by bacterium nitroreductases (Carroll *et al.*, 2002; Salamanca-Pinzón *et al.*, 2006) generating cytotoxic compounds. In this sense, all strains tested did not shown sensitivity to 1,6-DNP (Fig. 7), strongly suggesting that there was no activation of this chemical agent.

Discussion

A peculiar feature of the nitroreductase family is our lack of knowledge about the biological function of protein members. It has been postulated that NfsB may also be able to reduce the 3-nitrotyrosine (3-NT) residues in proteins (Liochev *et al.*, 1999). However, a study performed by Lightfoot *et al.* (2000) indicated that both NfsA and NfsB do not reduce 3-NT. Some works suggests a possible involvement from the nitroreductases in response the stress oxidative (Liochev *et al.*, 1999; Paterson *et al.*, 2002; Streker *et al.*, 2005). For example the *nfsA* gene of *E. coli*, which codify for a nitroreductases type I, is part of the *SoxRS* regulon and is strongly induced by paraquat (Liochev *et al.*, 1999; Paterson *et al.* 2002), a known superoxide generator (Hassan & Fridovich, 1978; Bagley *et al.*, 1986). In addition, the *snrA* in *Salmonella typhimurium* and *nprA* in *Rhodobacter capsulatos* are also inducible by paraquat (Nokhbeh *et al.* 2002; Pérez-Reinado *et al.*, 2005), while some NfsA-like proteins from *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* helps to keeps the cellular thiol-dissulfide balance (Sterker *et al.*, 2005). Taking into account these data, and considering the phylogenetic position of Frm2p and Hbn1p as

described by de Oliveira *et al.* (2007), it was verified an possible action of both proteins in oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*.

For is purpose, it was used 4-NQO and NDEA, both superoxide generating compounds that divert electrons from NADPH to O₂ to generate a flux of superoxide (Nunoshiba & Demple, 1993; Aiub *et al.*, 2006). It was also tested H₂O₂ and *t*-BOOH, as peroxide-generating substances. In a first moment the sensitivity of the strains to superoxide and peroxide was evaluated by survival assay. The mutants showed a higher sensitivity to the oxidant agents 4-NQO and NDEA (Fig. 1A and 1B). Interestingly a higher sensitivity of these strains to other oxidants like 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and pentachlorophenol (PCP) and also to methyl methane sulfonate (MMS) were also verified (data not show). This different sensitivity can be partially explained by the reduced SOD activity level in mutants (Fig. 3A). This can be reinforced by the fact that mutants SOD have showed a higher sensitivity in several biological models to 4-NQO, PCP, CDNB and MMS (Hassan & Fridovich, 1978; Gralla & Kosman, 1992; Nunoshiba & Demple, 1993; Huang *et al.*, 1997; Mutoh *et al.*, 2005). Interestingly, Gaudu *et al.* (1994) show witch *E. coli* strain deficient for the Fre protein nitroreductase-*like* has a slightly but significantly diminished basal level of *sodA* gene expression.

It is well characterized the higher sensitivity of SOD mutants to superoxide and consequently to drugs that can generate this radical by redox cycle, in diverse biological models (Hassan & Fridovich, 1978). The superoxide increase can generate others ROS like HO₂[•], H₂O₂ and HO[•] that can initiate autocatalytic lipid peroxidation (Levine, 2002; Temple *et al.*, 2005; Halliwell & Gutteridge, 2007). This fact can partially explain the increase of ROS (Fig. 4A and 4B; 5A and 5B) and TBARS (Fig. 6A and 6B) found in the nitroreductase mutant cells when exposed to 4-NQO and NDEA. Consistently, yeast cells

deficient for *sods* have increased levels of ROS and peroxidation lipid during oxidative stress conditions (Freitas *et al.*, 2000; Srinivasan *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2003).

The importance of nitroreductases Frm2p and Hbn1p for respiration was also determined. During respiration, mitochondria are the major sources of the superoxide in the cell (Boveris & Chance, 1973; Liu 1997) and it was possible to observe that yeast cells defective for Frm2p and Hbn1p have a high induction of petite colonies (Fig. 2), probably due to the reduced SOD activity. Indeed, it has already been shown mutants *sod* present increased induction petites (Longo *et al.*, 1994). With respect to the second type oxidative stress generator used in this study, peroxides, H₂O₂ and *t*-BOOH, a different pattern of action was observed. The mutants *frm2Δ* and *frm2Δ hbn1Δ*, showed a higher level of CAT, GPx enzymes activities and the GSH content (Fig. 3B, 3C and 3D), leading a reduction in the level ROS (Fig. 4C and 4D) and lipid peroxidation (Fig. 6C and 6D) in these strains when exposed to peroxides. These results give support to the survival experiments (Fig. 1). Thus, the absence of Frm2p may be the event responsible for an alteration in the increasing CAT, GPx activity and GSH basal levels. Curiously, Manfredini *et al.* (2004) found increased GPx activity in double mutant *sod1Δ sod2Δ*, and also an increase in the GSH level in mutant *sod1Δ*, while CAT remained not altered. Unfortunately, the results obtained in this work cannot be explained through a compensatory mechanism among antioxidant enzymes, considering that the strain *hbn1Δ* shows a lower SOD activity, but have normal levels of the other enzymes and GSH.

Another interesting aspect is that all strains tested did not show difference in the level of basal production of ROS and peroxidation, suggesting that the alterations in the enzymatic activities do not affect the ROS level in physiologic conditions. On the other hand, the yeast nitroreductase-*like* appears important in oxidant situations or when the cell

activates the mechanisms needed to maintain the intracellular redox balance in such conditions. Manfredini *et al.* (2004) found higher lipid peroxidation levels in single mutant *sod1Δ* and *sod2Δ*, but in double mutant the level remains the same.

These Frm2p and Hbn1p action is not dependent of the metabolic condition and have shown the same sensitivity response pattern in both stationary and exponential growth conditions, and in fermentative and respiratory metabolism (data not shown). These data indicate that the gene expression of these nitroreductases might be constitutive and not dependent of the physiological state of the cell.

The data also suggests that the yeast nitroreductases are not involved in the reduction of nitrocompounds, which can be observed in the drop test assay in culture medium containing 1,6-DNP (Fig. 7). Consistently, McCoy *et al.* (1984) also noticed *S. cerevisiae* incapacity to reduce 1-nitropyrene because it lacks a nitroreductase with such capacity. Considering the role of bacterium nitroreductases in nitropyrenes, 4NQO and NDEA activation (Mermelstein *et al.*, 1981; Fann *et al.*, 1999; Metosh-Dickey *et al.*, 1999; Aiub *et al.*, 2006; Salamanca-Pinzón *et al.*, 2006), it is expected that all mutant strains showed a higher resistance to 1,6DNP, 4-NQO and NDEA when compared to WT strain, a phenomenon not observed in this work. Thus, nitroreductases Frm2p and Hbn1p seems to be functionally distinct from the bacterium nitroreductases already well characterized. Theses results are consistent with the ones found in filogenetic analysis, that pointed theses proteins as belonging to the new bacterial and fungal Frm2p/Hbn1p nitroreductase-like family still not characterized (de Oliveira *et al.*, 2007).

It was reported recently that the *FRM2* gene promoter contains a Yap2p binding site (Azevedo *et al.*, 2007), a transcriptional factor associated with Cd²⁺ and drug resistance (Lesuisse & Labbe, 1995; Miyahara *et al.*, 1996). The yeast cells mutated for

FRM2 gene are sensitive to cadmium ion (Cd^{2+}) and arachidonic acid (Azevedo *et al.*, 2007; McHale *et al.*, 1996), In this sense, the metabolism of polyunsaturated fatty acids and Cd^{2+} generate large amounts of reactive species (Balazy & Poff, 2004; Valko *et al.*, 2005). It is interesting to emphasize that mutants *sod* are more sensitive to Cd^{2+} (Brennan & Schiestl, 1996). Kim *et al.* (2007) have identified by bidimensional eletroforesis (2-d) proteins that increase their expression in response to menadione, which include Hbn1p. These data supports the hypothesis that Frm2p and Hbn1p have a role in oxidative stress response.

Based on our results, we showed the influence of nitroreductases Frm1p and Hbn1p in response to oxidative stress in *S. cerevisiae* yeast by modulation of antioxidant enzymes activities, such as SOD, CAT, GPx and GSH content. However, more experiments are necessaries in order to elucidate the molecular mechanism for which the Frm2p and Hbn1p acts on modulation these enzymes activities. Additionally also was showed as the nitroreductases Frm2p and Hbn1p probably no taking part on activation of nitrocompounds.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) and GENOTOX/ROYAL (Laboratório de Genotoxicidade/Instituto Royal - UFRGS).

References

- Ackerley DF, Gonzalez CF, Keyhan M, Blake II R & Matin A (2004) Mechanism of chromate reduction by the *Escherichia coli* protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction. *Environ Microbiol* **6**: 851-860.
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Meth Enzymol* **105**:121–126.
- Aiub CA, Mazzei JL, Pinto LF & Felzenszwalb I (2006) Evaluation of nitroreductase and acetyltransferase participation in N-nitrosodiethylamine genotoxicity. *Chem - Biol Interact* **161**: 146–154.
- Angermaier L & Simon H (1983) On nitroaryl reductase activities in several *Clostridia*. *H-S Z Physiol Chem* **364**: 1653–1663.
- Akerboom TP & Sies H (1981) Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Meth Enzymol* **77**: 373-382.
- Azevedo D, Nascimento L, Labarre J, Toledano MB & Rodrigues-Pousada C (2007) The *S. cerevisiae* Yap1 and Yap2 transcription factors share a common cadmium-sensing domain. *FEBS Lett* **581**: 187-195.
- Balazy M & Poff CD (2004) Biological nitration of arachidonic acid. *Curr Vasc Pharmacol* **2**: 81-93.
- Boveris A & Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* **134**: 707–716.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

- Brennan RJ & Schiestl RH (1996) Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast *Mutat Res* **356**: 171-178.
- Bryant C & DeLuca M (1991) Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes, F. Muller (Ed), vol II. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Caballero A, Lázaro JJ, Ramos JL & Esteve-Núñez A (2005) PnrA, a new nitroreductase-family enzyme in the TNT-degrading strain *Pseudomonas putida* JLR11. *Environ Microbiol* **7**: 1211–1219.
- Carroll CC, Warnakulasuriyarachchi D, Nokhbeh MR & Lambert IB (2002) *Salmonella typhimurium* mutagenicity tester strains that overexpress oxygen-insensitive nitroreductases *nfsA* and *nfsB*. *Mutat Res* **501**: 79–98.
- DeMarini DM, Shelton ML & Bell DA (1996) Mutation spectra of chemical fractions of a complex mixture: role of nitroarenes in the mutagenic specificity of municipal waste incinerator emissions. *Mutat Res* **349**: 1–20.
- de Oliveira IM, Henriques JA & Bonatto D (2007) *In silico* identification of a new group of specific bacterial and fungal nitroreductases-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **355**: 919-925.
- Draper HH & Hadley M (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol* **186**:421–431.
- Fann YC, Metosh-Dickey CA, Winston GW, Sygula A, Rao DN, Kadiiska MB & Mason RP (1999) Enzymatic and nonenzymatic production of free radicals from the carcinogens 4-Nitroquinoline N-Oxide and 4-Hydroxylaminoquinoline N-Oxide. *Chem Res Toxicol* **12**: 450-458.

- Freitas JM, Liba A, Meneghini R, Valentinie JS & Gralla EB (2000). Yeast lacking superoxide dismutase show altered iron homeostasis. Role of oxidative stress in iron metabolism. *J Biol Chem* **275**: 11645-11649.
- Flohé L & Günzler WA (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Meth Enzymol* **105**:114–121.
- Gaudu P, Touati D, Nivière V & Fontecave M (1994) The NAD(P)H:flavin oxidoreductase from *Escherichia coli* as a source of superoxide radicals. *J Biol Chem* **269**: 8182-8188.
- Gietz RD & Sugino A (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**: 527-534.
- Gralla EB & Kosman DJ (1992) Molecular genetics of superoxide dismutases in yeasts and related fungi. *Adv Genet* **30**: 251-319.
- Haack T, Erdinger L & Boche G (2001) Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 of nitroso and respective hydroxylamine compounds. *Mutat Res* **491**: 183–193.
- Han F, Liu S, Ho B, Yan Z & Yan X (2007) Alterations in *rdxA* and *frxA* genes and their upstream regions in metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* isolates *Res Microbiol* **158**: 38-44.
- Hannink N, Rosser SJ, French CE, Basran A, Murray JA, Nicklin S & Bruce NC (2001) Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase. *Nat Biotechnol* **19**: 1168-1172.
- Hassan HM & Fridovich I (1978) Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **253**: 8143-8148.

- Haynes CA, Koder RL, Miller AF & Rodgers DW (2002) Structures of nitroreductase in three states. Effects of inhibitor binding and reduction. *J Biol Chem* **277**: 11513–11520.
- Halliwell B & Gutteridge JM (2007) Free radicals in biology and medicine, 4rd edn. Oxford University Press, Oxford, pp 267–273.
- Homma-Takeda S, Hiraku Y, Ohkuma Y, Oikawa S, Murata M, Ogawa K, Iwamuro T, Li S, Sun GF, Kumagai Y, Shimojo N & Kawanishi S (2002) 2,4,6-trinitrotoluene induced reproductive toxicity via oxidative DNA damage by its metabolite. *Free Radic Res* **36**: 555–566.
- Huang TT, Yasunami M, Carlson EJ, Gillespie AM, Reaume AG, Hoffman EK, Chan PH, Scott RW & Epstein CJ (1997) Superoxide-mediated cytotoxicity in superoxide dismutase-deficient fetal fibroblasts *Arch Biochem Biophys* **344**: 424–432.
- Huang X, Frenkel K, Klein CB & Costa M (1993) Nickel induces increased oxidants in intact cultured mammalian cells as detected by dichlorofluorescein fluorescence. *Toxicol Appl Pharmacol* **120**: 29–36.
- Kadiyala V, Nadeau LJ & Spain JC (2003) Construction of *Escherichia coli* strains for conversion of nitroacetophenones to ortho-aminophenols. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6520-6526.
- Kim IS, Yun HS, Kwak SH & Jin IN (2007) The Physiological Role of CPR1 in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 against Menadione Stress by Proteomics. *J Microbiol* **45**: 326-332.
- Kitts CL, Green CE, Otley RA, Alvarez MA & Unkefer PJ (2000) Type I nitroreductases in soil enterobacteria reduce TNT (2,4,6,-trinitrotoluene) and RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine). *Can J Microbiol* **46**: 278-282.

- Kobori T, Sasaki H, Lee WC, Zenno S, Saigo K, Murphy ME & Tanokura M (2001) Structure and site-directed mutagenesis of a flavoprotein from *Escherichia coli* that reduces nitrocompounds: alteration of pyridine nucleotide binding by a single amino acid substitution. *J Biol Chem* **276**: 2816-2823.
- Kwak YH, Lee DS & Kim HB (2003) *Vibrio Harvey* nitroreductase is also a chromate reductase. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4390–4395.
- LeBel CP, Ischiropoulos H & Bondy SC (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* **5**: 227–231.
- Lesuisse E & Labbe P (1995) Effects of cadmium and of *YAP1* and *CAD1/YAP2* genes on iron metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiol* **141**: 2937-2943.
- Levine RL (2002) Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* **32**: 790–796.
- Lightfoot RT, Shuman D & Ischiropoulos H (2000) Oxygen-insensitive nitroreductases of *Escherichia coli* do not reduce 3-nitrotyrosine. *Free Radic Biol Med* **28**: 1132-1136.
- Liochev SI, Hausladen A & Fridovich I (1999) Nitroreductase A is regulated as a member of the *soxRS* regulon of *Escherichia col*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 3537-3539.
- Liu SS (1997) Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. *Biosci Rep* **17**: 259–272.
- Longo VD, Gralla EB & Valentine JS (1996) Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**: 12275-12280.
- Manfredini V, Roehrs R, Peralba MC, Henriques JA, Saffi J, Ramos AL & Benfato MS (2004) Glutathione peroxidase induction protects *Saccharomyces cerevisiae* *sod1Δsod2Δ* double mutants against oxidative damage. *J Med Biol Res* **37**: 159-165.

- McCalla DR, Kaiser C & Green MHL (1978) Genetics of nitrofurazone resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **133**: 10-16.
- McCoy EC, Anders M, McCartney M, Howard PC, Beland FA & Rosenkranz HS (1984) The recombinogenic inactivity of 1-nitropyrene for yeast is due to a deficiency in a functional nitroreductase. *Mutat Res* **139**: 115-118.
- McHale MW, Kroening KD & Bernlohr DA (1996) Identification of a class of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in fatty acid repression of gene transcription and analysis of the *frm2* gene. *Yeast* **12**: 319-331.
- Mermelstein R, Kiriazides, DK, Butler M, McCoy EC & Rosenkranz HS (1981) The extraordinary mutagenicity of nitropyrenes in bacteria. *Mutat Res* **89**: 187–196.
- Metosh-Dickey CA, Mason RP & Winston GW (1999) Nitroarene Reduction and generation of free radicals by cell-free extracts of wild-type, and nitroreductase-deficient and –enriched *Salmonella typhimurium* strains used in the *umu* gene induction assay. *Toxicol Appl Pharmacol* **154**: 126–134.
- Misra HP & Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* **247**:3170–3175.
- Miyahara K, Hirata D & Miyakawa T (1996) yAP-1- and yAP-2-mediated, heat shock-induced transcriptional activation of the multidrug resistance ABC transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **29**: 103-105.
- Möller L, Lax I & Eriksson LC (1993) Nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons: a risk assessment for the urban citizen. *Environ. Health Perspect.* **101**: 309–315.
- Mutoh N, Kawabata M & Kitajima S (2005) Effects of four oxidants, menadione, 1 chloro-2,4-dinitrobenzene, hydrogen peroxide and cumene hydroperoxide, on fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biochem* **138**: 797–804.

- Nabi AH & Islam LN (2001) Study of the functions of human neutrophils in response to *Klebsiella pneumoniae* LPS. *J Biol Sci* **10**: 59-68.
- Nokhbeh MR, Boroumandi S, Pokorny N, Koziarz P, Paterson ES & Lambert IB (2002) Identification and characterization of SnrA, and inducible oxygen insensitive nitroreductase in *Salmonella enterica serovar Typhimurium* TA1535. *Mutat Res* **508**: 59–70.
- Nunoshiba T & Demple P (1993) Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-NQO. *Cancer Res* **53**: 3250–3252.
- Ogur M, John St & Nagai S (1957) Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast. *Science* **125**: 928–929.
- Padda RS, Wang C, Hughes JB, Kutty R & Bennett GN (2003) Mutagenicity of nitroaromatic degradation compounds. *Environ Toxicol Chem* **22**: 2293-2297.
- Pereira MD, Herdeiro RS, Fernandes PN, Eleutherio EC & Panek AD (2003) Targets of oxidative stress in yeast sod mutants *Biochim Biophys Acta* **1620**: 245– 251.
- Pérez-Reinado E, Blasco R, Castillo F, Moreno-Vivián C & Roldán RD (2005) Regulation and characterization of two nitroreductase genes, *nprA* and *nprB*, of *Rhodobacter capsulatus* *Appl Environ Microbiol* **71**: 7643–7649.
- Paterson ES, Boucher SE & Lambert IB (2002) Regulation of the *nfsA* gene in *Escherichia coli* by SoxS. *J Bacteriol* **184**: 51–58.
- Peterson FJ, Mason RP, Hovespian J & Holtzman JL (1979) Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. *J Biol Chem* **254**:4009–4014.
- Rota C, Chignell CF & Mason RP (1999) Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'- dichlorofluorescein

- by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements
Free Radic. Biol. Med **27**: 873–881.
- Rothe G & Valet G (1990) Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescin. *J Leukoc Biol* **47**: 440–448.
- Rothstein RJ (1983) One-step gene disruption in yeast. *Meth Enzymol* **101**: 202–211.
- Royall JA & Ischiropoulos H (1993) Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescin and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* **302**: 348–355.
- Salamanca-Pinzón SG, Camacho-Carranza R, Hernández-Ojeda SL & Aguirre JJ (2006) Nitrocompound activation by cell-free extracts of nitroreductase-proficient *Salmonella typhimurium* strains. *Mutagenesis* **21**: 369–374.
- Sarlauskas J, Nemeikaite-Ceniene A, Anusevicius Z, Miseviciene L, Julvez MM & Medina M, Gómez-Moreno C & Cenas N (2004) Flavoenzyme-catalyzed redox cycling of hydroxylamino and amino metabolites of 2,4,6-trinitrotoluene: implications for their cytotoxicity. *Arch Biochem Biophys* **425**: 184–192.
- Searle PF, Chen MJ, Hu L, Race PR, Lovering AL, Grove JI, Guise C, Jaberipour, M, James ND, Mautner V, Young LS, Kerr DJ, Mountain A, White SA & Hyde EI (2004) Nitroreductase: a prodrug-activating enzyme for cancer gene therapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **31**: 811-816.
- Sies H & de Groot H (1992) Role of reactive oxygen species in cell toxicity. *Toxicol Lett* **64-65**: 547-551.
- Spain JC (1995) Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annu Rev Microbiol* **49**: 523–555.

- Srinivasan C, Liba A, Imlay JA, Valentine JS & Gralla EB (2000). Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of “free iron” by whole cell electron paramagnetic resonance. *J Biol Chem* **275**: 29187-29192.
- Streker K, Freiberg C, Labischinski H, Hacker J & Ohlsen K (2005) *Staphylococcus aureus* NfrA (SA0367) is a flavin mononucleotide-dependent NADPH oxidase involved in oxidative stress response. *J Bacteriol* **187**: 2249-2256.
- Tazima Y, Kada T & Murakami A (1975) Mutagenicity of nitrofuranyl derivatives, including furylfuramide, a food preservative. *Mutat Res* **32**: 55–80.
- Temple MD, Perrone GG & Dawes IW (2005) Complex cellular responses to reactive oxygen species. *TRENDS Cell Biol* **15**: 319-326.
- Valko M, Morris H & Cronin MT (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* **12**: 1161-1208.
- Wang H & Joseph JA (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* **27**: 612–616.
- Watanabe M, Ishidate M Jr & Nohmi T (1990) Nucleotide sequence of *Salmonella typhimurium* nitroreductase gene. *Nucleic Acids Res* **18**: 1059.
- Whiteway J, Koziarz P, Veall J, Sandhu N, Kumar P, Hoecher B & Lamber IB (1998) Oxygen-insensitive nitroreductases: analysis of the roles of *nfsA* and *nfsB* in development of resistance to 5-nitrofuranyl derivatives in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**: 5529-5539.
- Zenno S, Koike H, Kumar AN, Jayaraman R, Tanokura M & Saigo K (1996a) Biochemical characterization of NfsA, the *Escherichia coli* major nitroreductase exhibiting a high amino acid homology to Frp, a *Vibrio fischeri* flavin oxidoreductase. *J Bacteriol* **178**: 4508-4514.

Zenno S, Koike H, Tanokura M & Saigo K (1996b) Gene cloning, purification, and characterization of NfsB, a minor oxygen-insensitive nitroreductase from *Escherichia coli*, similar in biochemical properties to FRase I, the major flavin reductase in *Vibrio fischeri*. *J Biochem* **120**: 736-744.

Tables

Table 1. *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study.

Strains	Genotypes	Sources
BY4741 (WT)	wild-type, WT; <i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i>	Euroscarf
<i>frm2Δ</i>	<i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>frm2::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>hbn1Δ</i>	<i>MATa</i> <i>his3Δ1</i> <i>leu2Δ0</i> <i>met15Δ0</i> ; <i>hbn1::URA3</i>	This study
<i>frm2Δ hbn1Δ</i>	<i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>frm2::kanMX4</i> ; <i>hbn1::URA3</i>	This study

* European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional analysis (EUROSCARF; Johan Wolfgang Goethe-University, Frankfurt - GERMANY)

Figure legends

Figure 1. Sensitivity of yeast mutant strains against different oxidants in the stationary growth phase. **Panel A:** 4-NQO; **Panel B:** NDEA; **Panel C:** H₂O₂; **Panel D:** *t*-BOOH. Isogenic wild type (■), *frm2Δ* (●) *hbn1Δ* (Δ) *frm2Δ hbn1Δ* (○). Cells were treated for 2h at 30°C. The data represent an average of three independent experiments. Data are expressed as mean ± S.D.

Figure 2. Induction of respiratory deficient petites colonies in WT and mutant yeast strains during metabolism respiratory growth. Data are expressed as mean ± S.D. Values shown are the mean of at least three determinations. (***) P < 0.001 indicate significant increase in *petite* percentage (ANOVA, Tukey test).

Figure 3. Basal level de SOD (A), CAT (B), and GPx activity (C) and quantification of GSH (D) in *S. cerevisiae* strains proficient and deficient Frm2p and Hbn1p. Data are expressed as mean ± S.D. Values shown are the mean of at least three determinations. (**) P < 0.01 and (***) P < 0.001 indicate difference significant (ANOVA, Tukey test).

Figure 4. Production of intracellular reactive species in *S. cerevisiae* strains proficient and deficient in nitroreductases evaluated by the DCFH-DA real-time fluorescence assay. **Panel A:** 4-NQO; **Panel B:** NDEA; **Panel C:** H₂O₂; **Panel D:** *t*-BOOH. Data are expressed as mean ± S.D. Values shown are the mean of at least three determinations. (*) P < 0.05; (***) P < 0.01; (***) P < 0.001 indicate difference significant (ANOVA, Tukey test).

Figure 5. Production of intracellular superoxide in yeast strains proficient and deficient in Frm2p and Hbn1p evaluated by the NBT real-time fluorescence assay. **Panel A:** 4-NQO; **Panel B:** NDEA; **Panel C:** H₂O₂; **Panel D:** *t*-BOOH. Data are expressed as mean ± S.D. Values shown are the mean of at least three determinations. (*) P < 0.05; (***) P < 0.01; (***) P < 0.001 indicate difference significant (ANOVA, Tukey test).

Figure 6. Determination of TBARS in yeast strains proficient and deficient in nitroreductases treated and no treated with oxidants. **Panel A:** 4-NQO; **Panel B:** NDEA; **Panel C:** H₂O₂; **Panel D:** *t*-BOOH. Data are expressed as mean ± S.D. Values shown are the mean of at least three determinations. (*) P < 0.05; (***) P < 0.01; (****) P < 0.001 indicate difference significant (ANOVA, Tukey test).

Figure 7. Assessment from capacity of nitroreduction by sensitivity of *S. cerevisiae* exposure to 1,6-dinitropyrene (1,6-DNP) in solid medium. The number of cells per mL used in the drop test varied from 10⁸ to 10³.

Fig. 1.

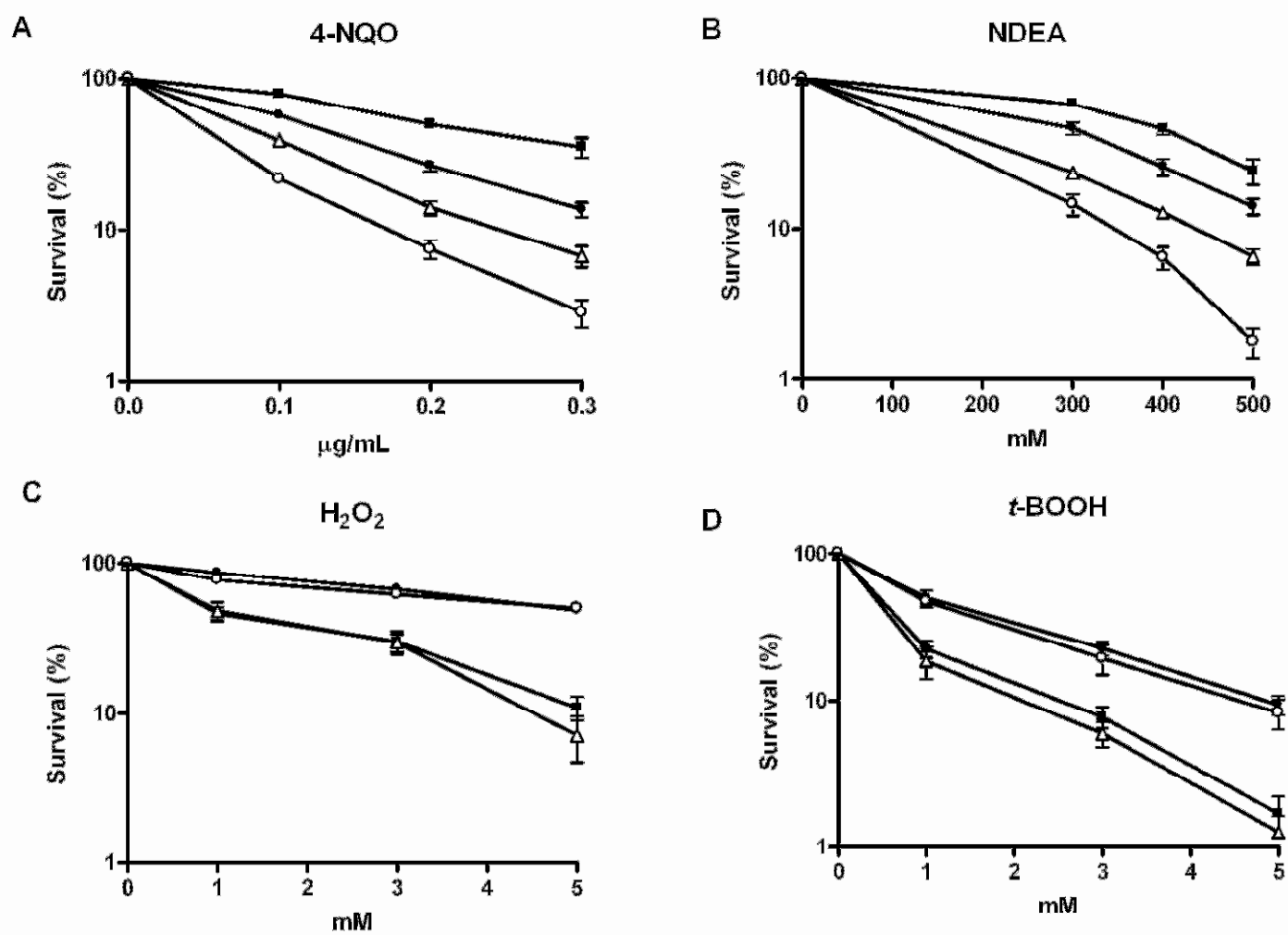


Fig. 2.

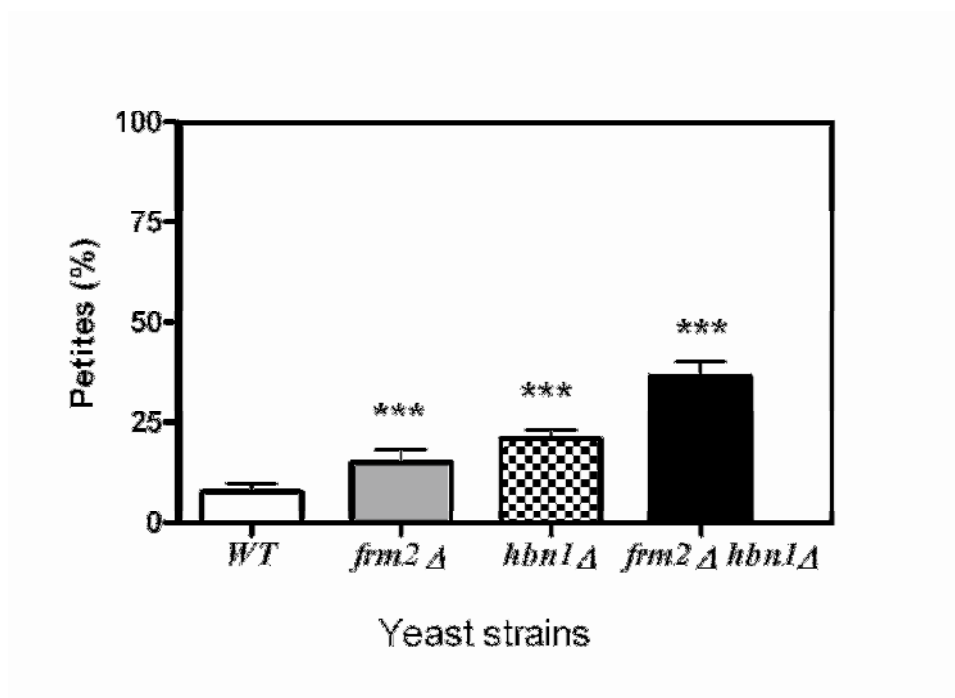


Fig. 3.

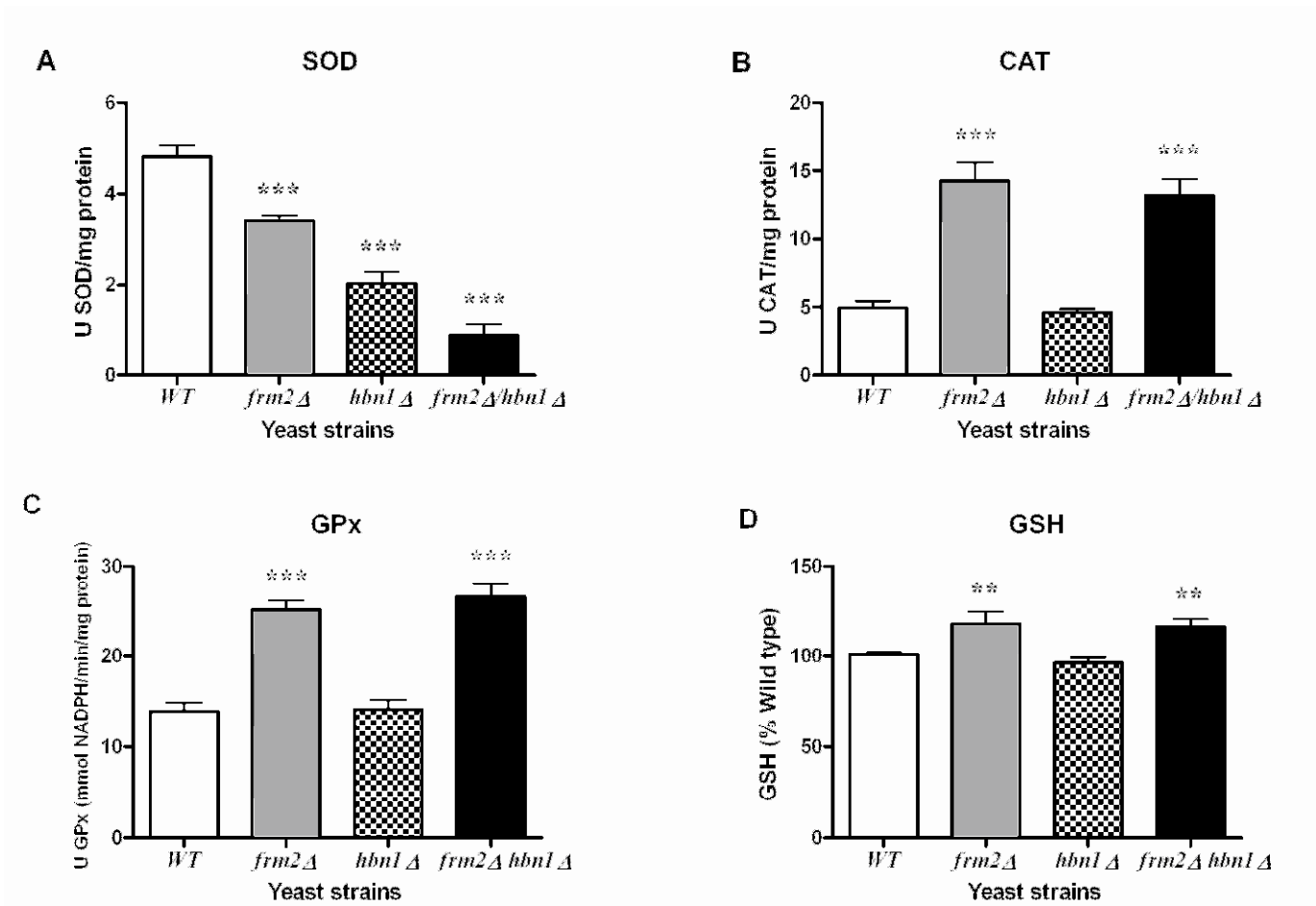


Fig. 4.

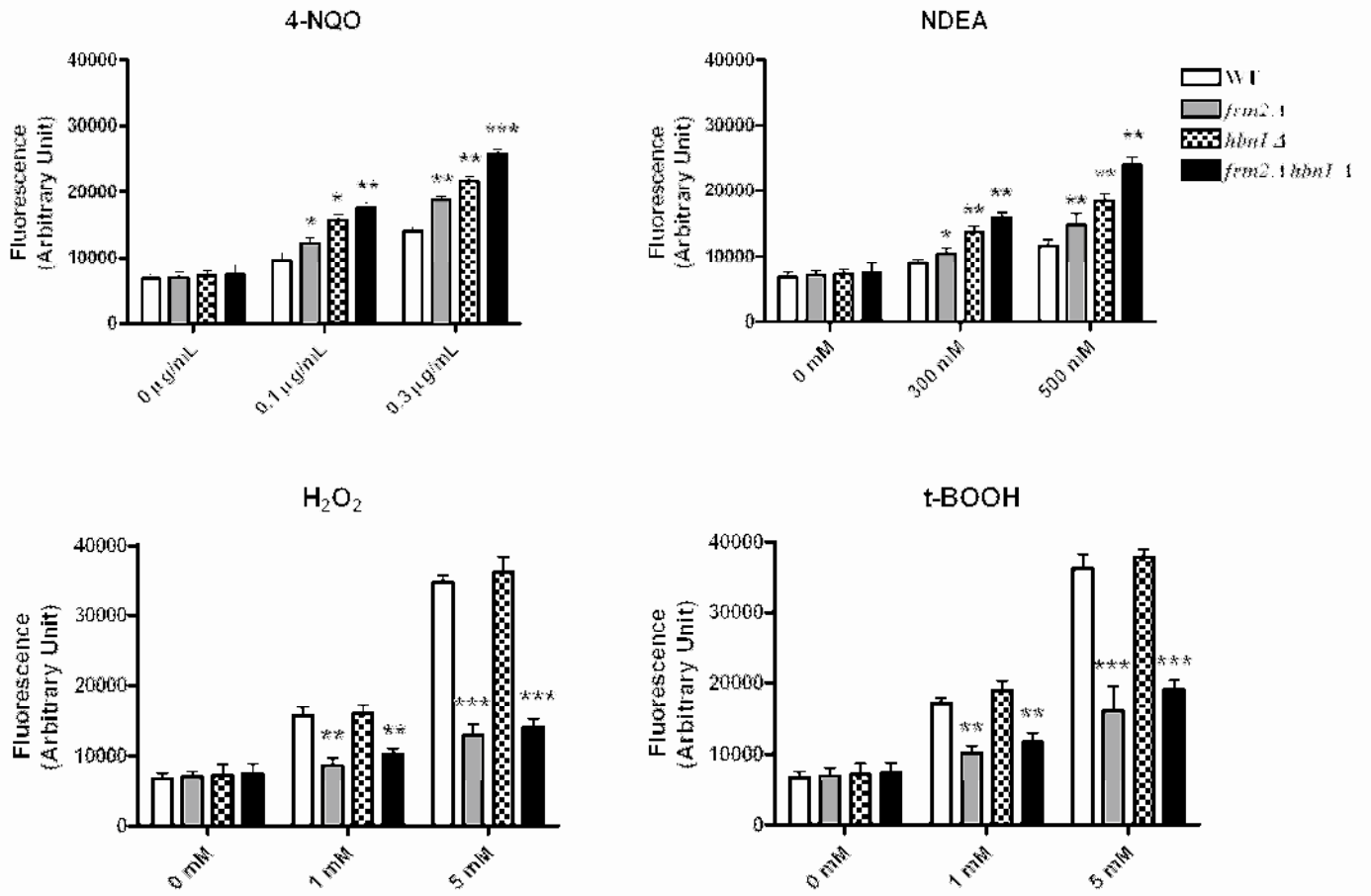


Fig. 5.

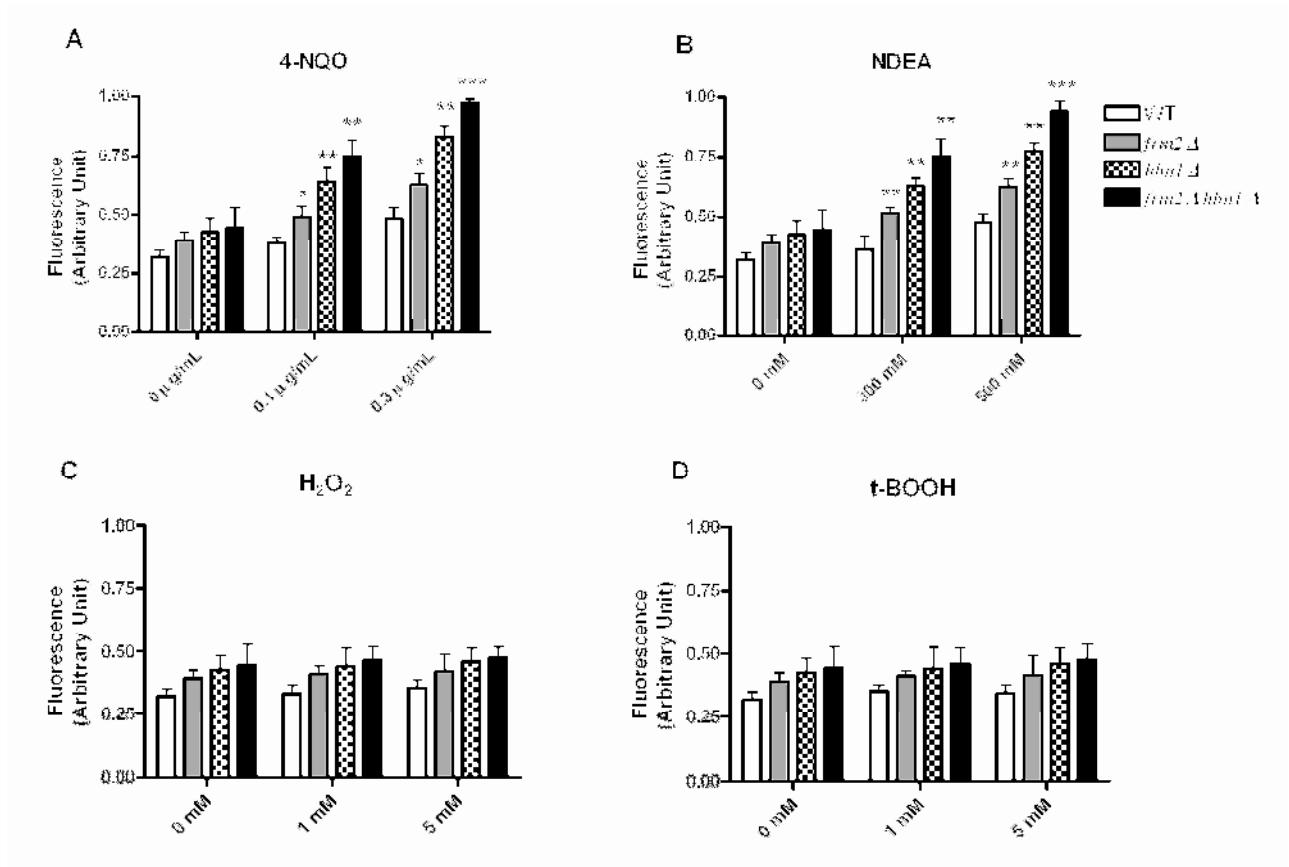


Fig. 6.

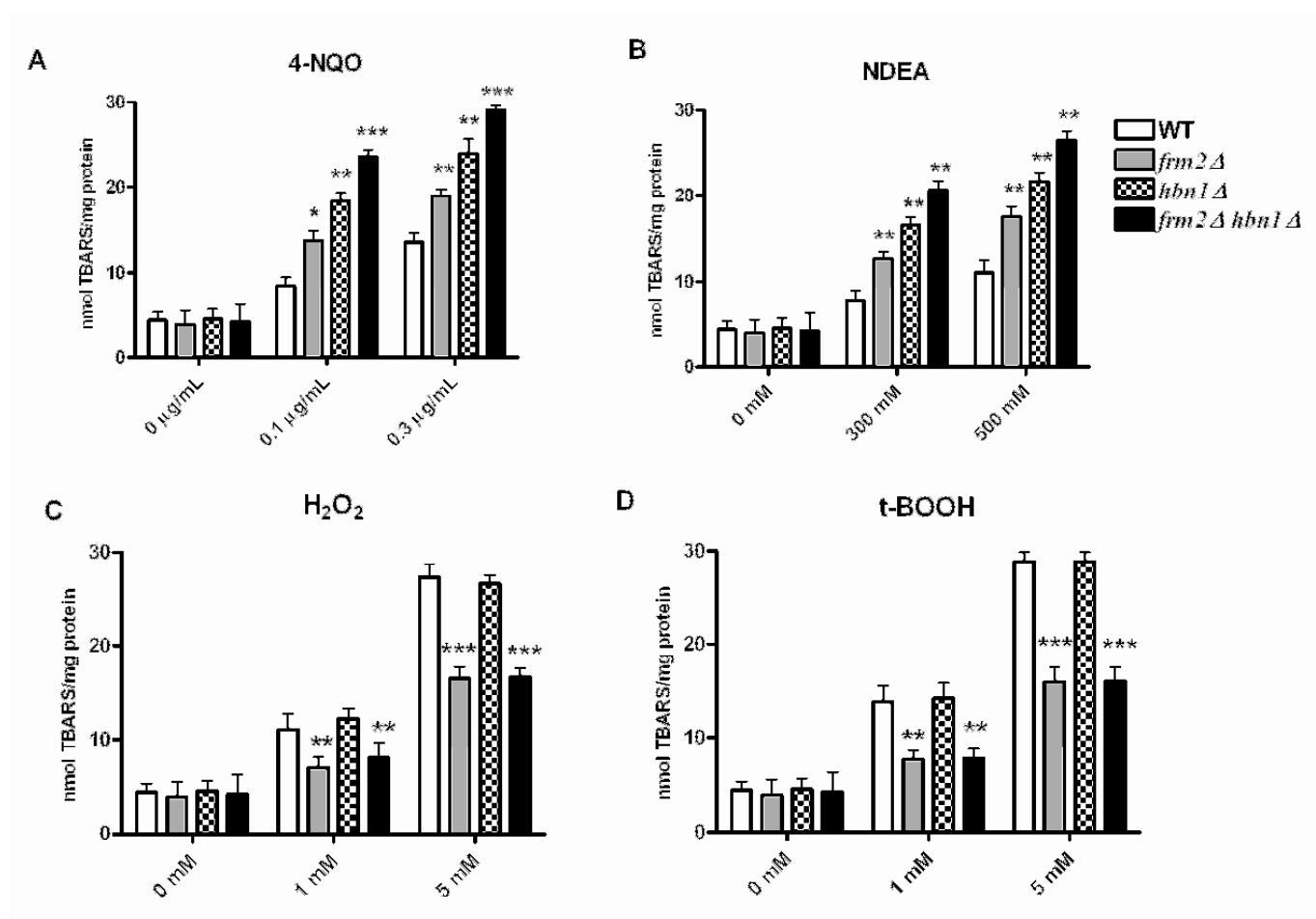
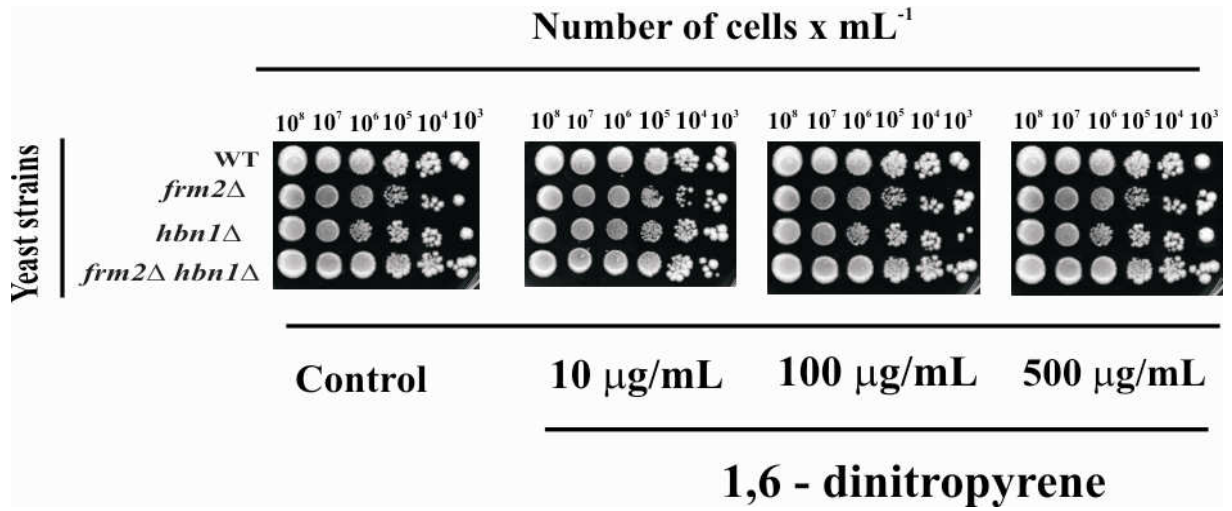


Fig. 7.





Discussão

DISCUSSÃO

Atualmente o estudo das nitrorredutases tem despertado um grande interesse, pois essas enzimas atuam na metabolização de nitrocompostos, exercendo uma influência direta na ativação da toxicidade destes, bem como possuem aplicação biotecnológica e no tratamento anti-câncer, tendo um reflexo direto na saúde humana e no meio ambiente (Spain 1995; Padda *et al.*, 2003; Searle *et al.*, 2004).

As nitrorredutases são largamente distribuídas em eubactérias, sendo sua presença em eucariotos bastante restrita (Bryant & DeLuca, 1991). Foram identificados neste trabalho dois genes chamados *FRM2* (YCL026c-A) e *HBN1* (YCL026c-B) que codificam duas prováveis nitrorredutases em *Saccharomyces cerevisiae*. A posição filogenética de ambas as proteínas Frm2 e Hbn1 é pouco conhecida, bem como a ocorrência dessas proteínas em outros organismos procaríotos e eucariotos. Desta forma, o Capítulo I constitui-se de uma identificação e caracterização *in silico*, de maneira a estabelecer a posição filogenética das proteínas Frm2 e Hbn1, bem como a sua ocorrência em outros organismos.

Um aspecto interessante das nitrorredutases é a falta de estudos e de informações com respeito a sua função biológica. Alguns estudos relacionam as nitrorredutases com uma possível resposta a estresse oxidativo (Benov & Fridovich, 2002; Liochev *et al.*, 1999; Paterson *et al.*, 2002; Streker *et al.*, 2005). Neste sentido, visando preencher esta lacuna, no Capítulo II procurou-se explorar a função biológica das proteínas Frm2 e Hbn1, abordando uma possível participação destas na resposta ao estresse oxidativo e a atuação de ambas as proteínas Frm2 e Hbn1 na ativação de nitrocompostos.

No Capítulo I foi estabelecida uma análise filogenética *in silico* das proteínas Frm2 e Hbn1, para tanto, foram realizadas buscas por seqüências similares nos bancos de

dados utilizando métodos sensíveis de análise filogenética como o BLAST (*Basic Alignment Search Tools*) e o PSI-BLAST (*Position-Specific Iterated-BLAST*) (Altschul *et al.*, 1997). Os resultados mostraram que essas proteínas pertencem a uma nova família de nitrorredutases ainda não caracterizada, apresentando uma ocorrência apenas em bactérias e fungos (Fig. 1, Capítulo I). No entanto, foram também encontradas duas seqüências de nitrorredutases bacterianas em protozoário *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei* (Tab. 1, Capítulo I) possivelmente devido à transferência lateral, fato já descrito por Nixon *et al.* (2002). Suportando este fato, ainda pode-se citar a existência de uma provável nitrorredutase tipo I em *Giardia lamblia* (Nixon *et al.*, 2002). Foi também constatada a presença marcante de seqüências parálogas de nitrorredutases no gênero *Aspergillus*, indicando um possível papel importante dessas proteínas dentro deste grupo (Fig. 1, Capítulo I).

No entanto, deve ser salientado que estes métodos de alinhamento, apesar de seu poder analítico, não são capazes de inferir as relações estruturais e/ou evolutivas existentes entre duas seqüências quando as mesmas possuem um índice de similaridade abaixo de 25% (Gaboriaud *et al.*, 1987). Assim outro método para o estudo de seqüências, a análise de agrupamentos hidrofóbicos, a qual permite combinar a detecção de homologies entre estruturas primárias com análise de estruturas secundárias de proteínas mesmo quando estas possuem um índice baixo de similaridade (Gaboriaud *et al.*, 1987). Portanto, para refinar a análise filogenética foi empregada a análise de agrupamentos hidrofóbicos (HCA), bem como a análise da estrutura tridimensional dessas nitrorredutases.

O HCA apontou um alto nível de similaridade das estruturas secundárias entre nitrorredutases bacterianas e de fungos. São proteínas compostas em grande extensão por α hélices ($\alpha 1$ - $\alpha 8$) apresentando dois subdomínios bem característicos (Fig. 2, Capítulo I).

Por outro lado a modelagem confirmou os resultados obtidos no HCA, na conservação estrutural das nitrorredutases, bem como apontou um sítio FMN, característico de todas as proteínas pertencentes à família das nitrorredutases (Fig. 3, Capítulo I). Provavelmente, as nitrorredutases Frm2p e Hbn1p sejam proteínas homodiméricas, concordando com o as estruturas das nitrorredutases já conhecidas.

Embora as nitrorredutases sejam muito estudadas atualmente, a sua função biológica ainda necessita ser elucidada. Diversos artigos apontam para um possível envolvimento na resposta a estresse oxidativo, como a maior indução do gene *nfsA* em *E. coli* e do gene *nprA* em *Rhodobacter capsulatus* (Amábile-Cuevas & Demple, 1991; Pomposiello & Demple, 2001; Martin & Rosner, 2003; Nokhbeh *et al.* 2002; Pérez-Reinado *et al.*, 2005). As funções das proteínas Frm2 e Hbn1 ainda são muito pouco entendidas. Entretanto, a proteína Frm2 foi identificada primeiramente como estando envolvida na via de sinalização lipídica, uma vez que os mutantes não eram capazes de reprimir a expressão do gene *OLE1* na presença de ácido araquidônico (McHale *et al.*, 1996).

Neste sentido, Capítulo II consistiu em explorar a possível participação das proteínas Frm2 e Hbn1 na resposta ao estresse oxidativo. Para isso, foi realizada uma caracterização fenotípica das linhagens mutantes quanto à sensibilidade a agentes oxidantes e competência respiratória. Buscando uma abordagem bioquímica para explicar os dados observados, foram realizados ensaios para avaliar defesas antioxidantes, bem como a produção intracelular de EROs e peroxidação lipídica.

Para este propósito, foram realizadas exposições das linhagens *frm2Δ*, *hbn1Δ* e *frm2Δ hbn1Δ* a oxidantes conhecidamente geradores de $O_2^{\bullet-}$, como 4-NQO e NDEA, que produzem este radical pela transferência de elétrons do NADPH para o O_2 formando um

fluxo de O_2^{\bullet} (Nunoshiba & Demple, 1993; Aiub *et al.*, 2006). Além disso, as linhagens também foram expostas a H_2O_2 e *t*-BOOH, como compostos geradores de peróxidos.

Os resultados apresentados no Capítulo II definem claramente a participação das proteínas Frm2 e Hbn1 na resistência aos oxidantes 4-NQO e NDEA, fato constatado pela alta sensibilidade observada nas linhagens mutantes expostas a estes agentes (Fig. 1A e 1B, Capítulo II). Esses resultados podem ser explicados pela menor atividade basal de SOD encontrada (Fig. 3A, Capítulo II). Neste contexto, Gaudu *et al.* (1994) mostraram que linhagens de *E. coli* deficiente na proteína Fre, uma provável nitrorredutase, tem o nível basal de expressão de *sodA* altamente reduzido. Consistente com estes resultados, Nunoshiba & Demple (1993) e Mutoh *et al.* (2005) mostraram que mutantes de SOD são extremamente sensíveis a 4-NQO e a NDEA em vários modelos biológicos. Adicionalmente, para reforçar estes resultados, outros agentes como pentaclorofenol (PCP) e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e metil metano sulfonato (MMS) também foram testados, uma vez que é conhecida a maior sensibilidade de mutantes SOD a estes compostos (Hassan & Fridovich, 1978; Gralla & Kosman, 1992; Huang *et al.*, 1997). Da mesma forma, as mutantes *frm2* Δ , *hbn1* Δ e *frm2* Δ *hbn1* Δ , se mostraram mais sensíveis a esses agentes (dados não mostrados).

Com objetivo de avaliar a situação do estado redox celular após tratamento com os oxidantes, realizou-se a medida dos níveis de produção intracelular de EROs e de peroxidação lipídica pela determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

A determinação de EROs foi realizada por dois métodos fluorescentes, utilizando a sonda DCFH-DA (2', 7'-diclorofluoresceína diacetato) e determinada a produção de superóxido com NBT (*nitroblue tetrazolium*). A sonda DCFH-DA penetra na célula sendo,

então, hidrolisada por esterases e liberando a molécula DCFH que, então, é oxidada como resultado da reação de peróxidos com peroxidases ou ainda da ação do citocromo c ou do íon Fe^{+2} e produzindo o fluoróforo diclorofluoresceína (DCF). No entanto, esta sonda não é recomendada para determinar a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$, já que este radical não reage com esta sonda diretamente e a oxidação desta leva a geração de $\text{O}_2^{\bullet-}$, acarretando um erro na estimativa (Rota *et al.*, 1999). Por este motivo, para determinação de superóxido foi utilizada a redução de NBT. Um aspecto positivo de ambas as metodologias é o monitoramento da produção EROs em tempo real, utilizando células vivas (Wang & Joseph, 1999).

As linhagens mutantes deficientes nas nitrorredutases Frm2p e Hbn1p apresentaram maior produção intracelular de EROs quando expostas a 4-NQO e NDEA, visto pelos métodos tanto de oxidação de DCFH-DA (Fig. 4A e 4B, Capítulo II) como pelo método de redução de NBT (Fig. 5A e 5B, Capítulo II). Essas alterações podem ser explicadas pela redução na atividade de SOD levando conseqüentemente a uma maior produção de EROs pelas linhagens mutantes quando expostas aos agentes oxidantes. Sendo suportado pelos resultados que mostram uma grande produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$, por estes nitrocompostos (Fig. 5A e 5B, Capítulo II).

O outro marcador do estatus redox celular foi a determinação de MDA, que é um dos principais produtos da peroxidação lipídica. A maioria dos ensaios de determinação de MDA foi desenvolvida com base na sua derivatização com ácido tiobarbitúrico, em razão da condensação das duas moléculas produzirem um aduto de alta absorvidade molar, permitindo um ensaio espectrofotométrico. Todavia, a especificidade da reação é baixa, uma vez que o ácido tiobarbitúrico pode reagir com vários compostos derivados de oxidação, além do MDA (Dotan *et al.* 2004; Hwang & Kim 2007).

Os resultados da dosagem da produção intracelular de EROs e da determinação da peroxidação lipídica, suportam as curvas de sobrevivência sugerindo fortemente que a maior sensibilidade das mutantes seja pelo aumento da formação de EROs e conseqüentemente de danos oxidativos como peroxidação lipídica, durante a exposição aos agentes 4-NQO e NDEA, possivelmente devido a menor atividade de SOD nestas linhagens mutantes.

A importância das nitrorredutases Frm2p e Hbn1p na capacidade respiratória também foi determinada. Desta maneira, verificou-se que as mutantes para Frm2p e Hbn1p apresentam uma alta indução de *petites* (Fig. 2, Capítulo II). Essa elevada indução de mutantes citoplasmáticos poderia sugerir uma possível participação da Frm2p e Hbn1p na mitocôndria. A seqüência da nitrorredutases de *Magnaporthea grisea* filogeneticamente relacionada à Frm2p e Hbn1p apresenta sinal mitocondrial, indicando um possível papel desta proteína na organela. Entretanto as nitrorredutases estudadas não apresentam esta seqüência sinal, verificado na análise *in silico*. Isso não impede que as proteínas Frm2 e Hbn1 não desempenhem um papel mesmo que indireto no funcionamento da mitocôndria via outras proteínas ou rotas metabólicas importantes como, por exemplo, a regulação do metabolismo redox. Portanto, esse fato seja provavelmente devido às reduzidas atividades de SOD, de maneira que a célula não consegue eliminar o superóxido produzido durante o metabolismo respiratório, uma vez que durante este metabolismo, a mitocôndria é a maior fonte de $O_2^{\bullet-}$, sendo o complexo III responsável por cerca de 80% da produção deste radical (Boveris & Chance, 1973; Liu 1997). Também é bem conhecido que os mutantes *sods* de leveduras têm crescimento muito reduzido em condições respiratórias com maior formação de *petites* (Longo *et al.*, 1994). Isso pode ser devida à oxidação que o $O_2^{\bullet-}$ causa nos agrupamentos [2Fe-2S], com conseqüente inativação de enzimas importantes, seguido

à liberação do íon Fe^{+2} e aumento da ocorrência da reação de Fenton e produção de HO^\bullet bem como outros radicais como H_2O_2 e HO_2^\bullet causando diversos danos oxidativos e por consequência o fenótipo *petite* (Longo *et al.*, 1994).

Na exposição aos peróxidos H_2O_2 e *t*-BOOH um padrão diferente de resposta foi encontrado em relação ao obtido no tratamento com agentes geradores de O_2^\bullet . As mutantes *frm2* Δ e *frm2* Δ *hbn1* Δ apresentam níveis aumentados na atividade das enzimas CAT, GPx e no conteúdo de GSH (Fig. 3B, 3C e 3D, Capítulo II). Isso é refletido na menor produção de EROs (Fig. 4C e 4D Capítulo II) e de TBARS (Fig. 6C e 6D, Capítulo II) quando essas linhagens foram expostas a peróxidos. Consistentemente, a sobrevivência foi aumentada nessas linhagens quando expostas a estes agentes. Entretanto, não foi vista diferença na sensibilidade do mutante *hbn1* Δ a estes peróxidos em relação à linhagem selvagem (Fig. 1C e 1D, Capítulo II). Suportando este fato, as linhagens mutantes *frm2* Δ e *frm2* Δ *hbn1* Δ apresentaram menor produção intracelular de EROs quando expostas a H_2O_2 e *t*-BOOH e conseqüentemente menor peroxidação lipídica.

Interessantemente foi constatado que algumas proteínas *NfsA-like* de *Bacillus subtilis* and *NfrA* de *Staphylococcus aureus* podem estar atuando no balanço tiólico celular (Sterker *et al.*, 2005). Outro aspecto interessante é que Manfredini *et al.* (2004) constaram que duplo mutantes *sod1* Δ *sod2* Δ de *S. cerevisiae* apresentam maior atividade de GPx e um aumento no conteúdo de GSH em mutantes *sod1* Δ . Entretanto, a atividade de CAT permaneceu inalterada. Os resultados obtidos neste trabalho, não podem ser explicados por um possível mecanismo compensatório entre as enzimas antioxidantes, considerando o fato que a mutante *hbn1* Δ possui uma reduzida atividade de SOD, bem como as demais mutantes, mas apresenta níveis normais na atividade das demais enzimas e de GSH.

Os níveis basais de produção de EROs e de TBARS não apresentaram diferenças significativas, sugerindo que as alterações nas atividades enzimáticas não influenciam no balanço redox em condições fisiológicas. Outra possibilidade é que a célula tenha mecanismos compensatórios de maneira a manter os níveis basais de EROs e por consequência de TBARS, já que níveis controlados de EROs são importantes fisiologicamente, uma vez que estas desempenham diversas funções celulares (Rhee *et al.*, 2005; Cimen, 2008).

Outro aspecto interessante é que a ação dessas nitrorredutases não é dependente da condição metabólica, não apresentando diferenças no padrão de resposta, no que diz respeito à sensibilidade aos agentes oxidantes. Portanto, apresentam esse mesmo padrão na fase estacionária e exponencial e em metabolismo fermentativo e respiratório (dados não mostrados).

Considerando que tanto o metabolismo de ácidos graxos polinsaturados e metais como Cd^{+2} geram níveis elevados de EROs, (Balazy & Poff, 2004; Valko *et al.*, 2005), pode-se citar o fato de que as células mutantes *frm2Δ* são sensíveis a íons Cd^{+2} e a ácido araquidônico (Azevedo *et al.*, 2007; McHale *et al.*, 1996). Nesse sentido, já foi mostrado que mutantes *sod* são mais sensíveis a Cd^{+2} (Brennan & Schiestl, 1996). Ainda suportando os resultados obtidos neste trabalho, já foi constatado a aumento da expressão da proteína Hbn1p em resposta a menadiona, um conhecido agente gerador de superóxido (Kim *et al.*, 2007).

Azevedo *et al.* (2007) demonstraram que o gene *FRM2* possui um sítio de ligação a Yap2p, um fator de transcrição envolvido na resposta a Cd^{+2} e a drogas, como 1,10-fenantrolina, o qual é um quelador de ferro. Portanto, a expressão de *FRM2* é dependente de Yap2p. Análises de microarranjos de DNA também indicaram que Yap2p

estaria envolvido na expressão de um conjunto de genes envolvidos na estabilização de proteínas, embora estas análises ainda não tenham sido devidamente validadas (Cohen *et al.*, 2002). Foi mostrado que Yap2 interage com a cinase Rck1 sob condições de estresse oxidativo, embora, a natureza e a relevância fisiológica desta interação não seja clara (Bilsland *et al.*, 2004).

Podem ser considerados outros aspectos como o fato de que a mutante *frm2Δ*, não é capaz de reprimir a expressão de *OLE1*, sendo que já foi demonstrada a redução na expressão desse gene como resposta adaptativa ao ácido 2,4-diclorofenoxiacético, um herbicida pro-oxidante (Viegas *et al.*, 2005) e conseqüentemente redução de ácidos graxos insaturados na célula. Sendo assim, é possível sugerir que um dos mecanismos pelo quais as nitrorredutases Frm2p e Hbn1p possam exercer seu papel protetor seja, em parte, pelo controle da expressão de *OLE1*.

Ainda em relação ao metabolismo de lipídios podemos citar ainda a existência de uma interação física proteína-proteína da Frm2p com Are1p (<http://www.yeastgenome.org>) que é uma acil-CoA: esterol aciltransferase envolvida nas sínteses de esterol esters e de triacilglicerol (TAG) (Zweytick *et al.*, 2000; Sorger *et al.*, 2004). Os mutantes *are1Δ* são extremamente sensíveis a 4-NQO, CDNB, NDEA e PCP (trabalho em andamento), possivelmente por uma alteração no perfil lipídico da célula.

Adicionalmente, pode-se considerar uma possível participação das proteínas Frm2 e Hbn1 em uma regulação transcricional por estabilidade de RNA, que desenvolve um importante papel no controle da qualidade e quantidade da expressão gênica, já que Frm2p apresenta uma interação proteína-proteína com Ski8p (<http://www.yeastgenome.org>), a qual faz parte do complexo protéico do exossomo responsável pela degradação de RNA no sentido 3'-5' mRNA (Madrona & Wilson, 2007;

Wang *et al.*, 2007). Os mutantes *ski8Δ* apresentam o mesmo perfil de sensibilidade a 4-NQO, NDEA, H₂O₂ e *t*-BOOH, e as atividades enzimáticas de SOD, CAT, GPx e conteúdo de GSH, de EROs e TBARS, apresentado pelas mutantes *frm2Δ*, sugerindo que esta interação possa ser importante no balanço redox exercido por estas nitrorredutases (trabalho em andamento).

Neste sentido, ainda pode ser citado um envolvimento na transcrição pela interação física com Sua7p (TFIIB) (<http://www.yeastgenome.org>), um fator de transcrição que já foi mostrado ser aparentemente necessário para a expressão de um conjunto de genes que codificam proteínas participantes na atividade mitocondrial, bem como na resposta a ambientes oxidativos (Hoopes *et al.*, 2000; Farias & Fernandes, 2006).

No Capítulo II mostrou-se que as nitrorredutases estudadas não estão envolvidas na redução de nitrocompostos, como pode de ser visto pela aparente não ativação de 1,6-DNP, uma vez que não foi observada uma resposta tóxica desta substância (Fig. 7, Capítulo II). Este resultado está de acordo com o encontrado por McCoy *et al.* (1984) que avaliando o potencial recombinogênico de 1-nitropireno, constataram que este nitrocomposto era convertido em quantidades muito baixas para sua forma tóxica, de maneira que não foi constatado aumento da taxa de recombinação nas células de leveduras, nem atividade tóxica do composto. O mesmo estudo detectou alta atividade mutagênica em células de *Salmonella* pelo Teste de Ames, relacionando a presença de nitrorredutases do tipo I nestas bactérias e portanto capazes de ativar o 1-nitropireno convertendo para sua forma tóxica, de maneira contrária a não toxicidade nas células de *S. cerevisiae* seugere a ausência de uma nitrorredutase com esta capacidade.

Considerando o papel das nitrorredutases bacterianas na ativação de nitropirenos, 4NQO e NDEA (Mermelstein *et al.*, 1981; Fann *et al.*, 1999; Metosh-Dickey *et al.*, 1999;

Aiub *et al.*, 2006; Salamanca-Pinzón *et al.*, 2006), era esperado que as linhagens mutantes apresentassem uma maior resistência a 1,6-DNP, a 4-NQO e a NDEA em relação à linhagem selvagem, fato não foi observado neste trabalho. Então as nitrorredutases Frm2p e Hbn1p parecem ser funcionalmente distintas das nitrorredutases bacterianas já caracterizadas.

Em resumo, neste trabalho foi mostrada a influência das nitrorredutases Frm2 e Hbn1 na resposta ao estresse oxidativo em *S. cerevisiae*, pela modulação da atividade das enzimas antioxidantes, SOD, CAT e GPx, bem como do conteúdo de GSH (Fig. 12). Entretanto, mais experimentos são necessários para elucidar o mecanismo molecular que Frm2p e Hbn1p atuam na modulação dessas enzimas. Adicionalmente também foi mostrado que as nitrorredutases Frm2p e Hbn1p provavelmente não atuam na ativação de nitrocompostos. Estes resultados são consistentes com os dados encontrados na análise filogenética, que apontam estas proteínas como constituindo uma nova família de prováveis nitrorredutases ainda não caracterizada, encontrada em bactérias e fungos.

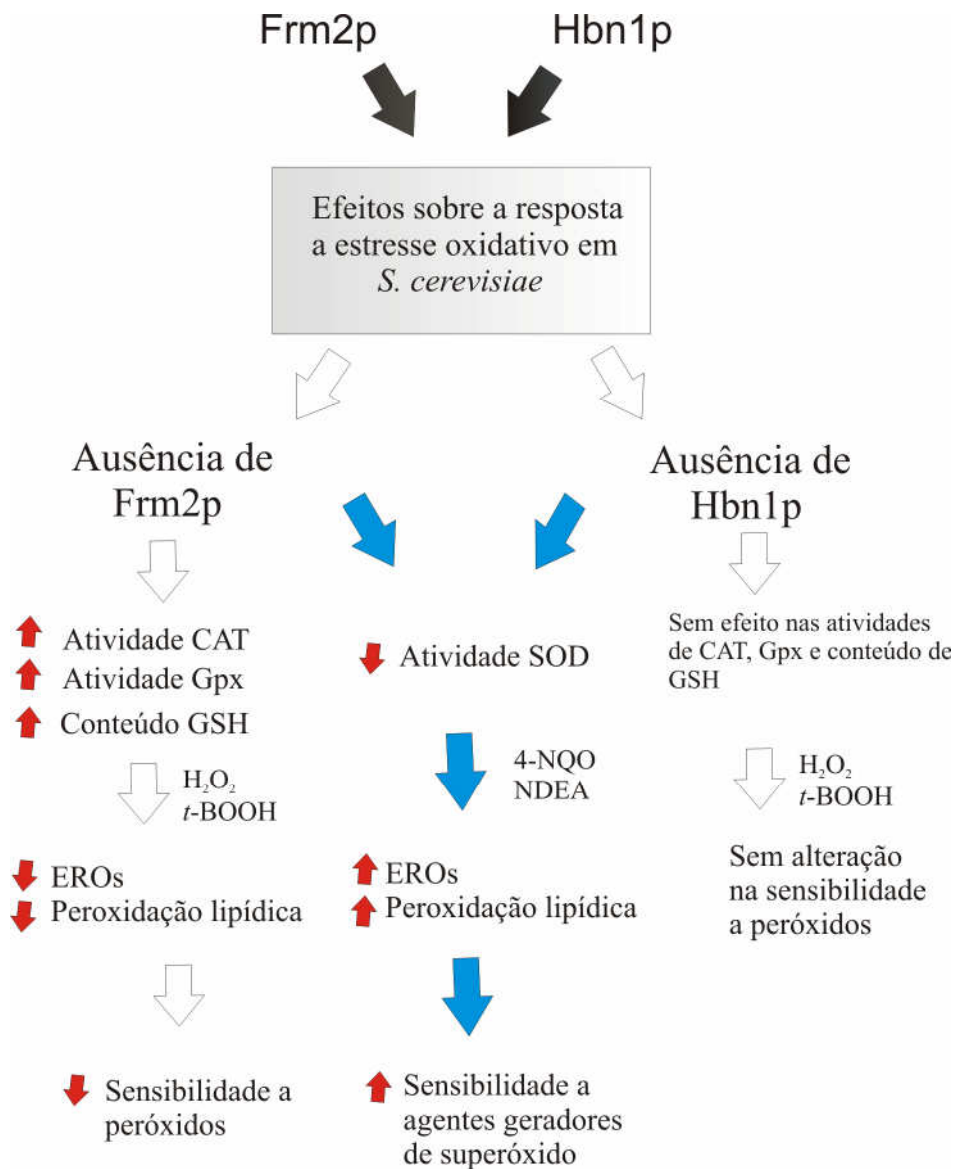


Figura 12: Esquema simplificado mostrando o efeito da ausência das proteínas Frm2 e Hbn1 exerce na modulação da resposta a estresse oxidativo em *S. cerevisiae*. Pode-se observar que as proteínas Frm2 e Hbn1 exercem influência na atividade antioxidante levando a uma alteração na produção intracelular de EROs e na peroxidação lipídica e consequentemente na sensibilidade quando as linhagens mutantes são expostas a oxidantes.



Conclusões

CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

Esse trabalho mostrou a existência de duas novas nitrorredutases, Frm2p e Hbn1p, de *Saccharomyces cerevisiae*, constituindo as primeiras evidências a respeito do papel destas duas proteínas na manutenção da homeostase redox neste organismo. Nesse contexto, as conclusões desse estudo são:

Capítulo I

- Dados *in silico* apontam que Frm2p e Hbn1p fazem parte de um novo grupo de nitrorredutases, filogeneticamente e funcionalmente distintos daquelas já caracterizadas;
- Nitrorredutases bacterianas e de fungos apresentam um ancestral comum universal
- Foram encontradas duas seqüências de “Frm2p-like” em protozoários *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei*;
- A presença de seqüências parálogas de nitrorredutases “Frm2p-like” em *Aspergillus* indicam que estas proteínas podem ter uma importante função dentro deste gênero
- Apresentam propriedades físico-químicas relativamente conservadas;
- Análise de HCA indica um alto nível de similaridade das estruturas secundárias entre as nitrorredutases bacterianas e de fungos, apresentando dois subdomínios e sendo compostas numa grande extensão por α -hélices ($\alpha 1$ - $\alpha 8$);
- A seqüência de *Magnaporthea grisea* possui sinal mitocondrial indicando um possível papel desta proteína na organela, entretanto as seqüências da Frm2p e Hbn1p não apresentam este sinal;

- Resultados da modelagem confirmam os dados obtidos no HCA e mostra um sítio de FMN na Hbn1p. Provavelmente Frm2p/Hbn1p sejam proteínas homodiméricas.

Capítulo II

- As linhagens mutantes *frm2Δ*, *hbn1Δ* e *frm2Δ hbn1Δ* apresentaram maior sensibilidade, comparado com a linhagem selvagem, na exposição a 4-NQO e NDEA, que geram grandes quantidades de superóxido por ciclo redox. Entretanto, as mutantes *frm2Δ* e *frm2Δ hbn1Δ* mostraram uma maior resistência a peróxidos, H₂O₂ e *t*-BOOH;
- Há uma maior indução na formação de mutantes citoplasmáticos “petites” nas linhagens mutantes em relação à selvagem;
- Há uma reduzida atividade basal de superóxido dismutase nas linhagens *frm2Δ*, *hbn1Δ* e *frm2Δ hbn1Δ*.
- As linhagens *frm2Δ* e *frm2Δ hbn1Δ* apresentaram uma maior atividade basal de catalase, glutathione peroxidase e conteúdo de glutathione, mas a mutante *hbn1Δ* mostrou níveis similares aos encontrados na selvagem;
- Houve uma maior produção de intracelular de EROs e peroxidação lipídica nas linhagens mutantes quando expostas a 4-NQO e NDEA. No entanto, as mutantes *frm2Δ* e *frm2Δ hbn1Δ* apresentaram uma menor produção intracelular de EROs e TBARS quando expostas a peróxidos;
- Aparentemente as nitrorredutases Frm2p e Hbn1p não estão envolvidas com a ativação de nitrocompostos, uma vez que as linhagens mutantes *frm2Δ*, *hbn1Δ* e

frm2Δ hbn1Δ sensibilidade a 1,6-DNP, bem como maior sensibilidade das mutantes a 4-NQO e NDEA.

CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho foi mostrado com uma abordagem filogenética *in silico* a existências de duas prováveis nitrorredutases em *S. cerevisiae*, as proteínas Frm2 e Hbn1, constituindo uma nova família de nitrorredutases ainda não caracterizada, estando presentes em fungos e bactérias. Os resultados indicaram que estas proteínas participam na resposta ao estresse oxidativo em *S. cerevisiae*, pela modulação da atividade das enzimas antioxidantes, SOD, CAT e GPx, bem como do conteúdo de GSH. Por fim, verificou-se que aparentemente as nitrorredutases Frm2p/Hbn1p não participam na ativação de nitrocompostos, sendo, portanto, filogeneticamente e funcionalmente distintas das nitrorredutases já caracterizadas.



Perspectivas

PERSPECTIVAS

Seria de importância para a continuação do trabalho, complementação dos resultados e progresso do conhecimento a respeito das proteínas Frm2 e Hbn1, buscar o entendimento dos mecanismos moleculares de como essas proteínas estão atuando na modulação das atividades das enzimas antioxidantes, bem como explorar outras possíveis vias do metabolismo em que essas proteínas possam estar envolvidas na resposta ao estresse oxidativo. Para tanto, as seguintes abordagens experimentais serão empregadas:

- Construir linhagens duplos e triplos mutantes de *S. cerevisiae* disruptas nos loci *OLE1*, *YAP2*, *SKI8*, *ARE1*, *SRP1* e *SUA7* com os loci *FRM2* e *HBN1* para avaliar a resposta, em termos de sobrevivência, capacidade respiratória e mutagênese, à exposição a diversos mutágenos oxidativos.
- Realizar a determinação da atividade das principais enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase) e glutatona nas linhagens mutantes, bem como o nível de peroxidação lipídica pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e pelo conteúdo de espécies reativas de oxigênio gerado nas linhagens selvagens e mutantes sob condições normais e de estresse oxidativo
- Analisar a expressão dos genes *FRM2*, *HBN1*, *SKI8*, *ARE1*, *YAP2*, *OLE1*, *SRP1*, *SUA7*, *SOD1*, *SOD2*, *CTT1*, *CTA1*, *GPX3*, *GSH1*, sob condições normais e em condições de estresse oxidativo por RT-PCR em tempo real quantitativo

- Determinar o parentesco filogenético da proteína Ski8p bem como a conservação evolutiva de estruturas primária, secundária e terciária usando ferramentas de bioinformática
- Investigar a relação das nitrorredutases com outras proteínas que tenham interação física e/ou de expressão já descritas nos bancos de dados, bem como investigar possíveis participações em processos celulares por meio de abordagens de bioinformática



Referências

Referências

- Ackerley DF, Gonzalez CF, Keyhan M, Blake R & Matin A (2004) Mechanism of chromate reduction by the *Escherichia coli* protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction. *Environ Microbiol.* 6: 851-860
- Aiub CA, Pinto LF & Felzenszwalb I (2003) N-Nitrosodiethylamine mutagenicity at low concentrations. *Toxicol Lett* 145: 36-45
- Alic N, Felder T, Temple MD, Gloeckner C, Higgins VJ, Briza P & Dawes IW (2004) Genome-wide transcriptional responses to a lipid hydroperoxide: adaptation occurs without induction of oxidant defenses. *Free Radic Biol Med* 37: 23-35
- Altmann M & Trachsel H (1994) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* system: a powerful tool to study the mechanism of protein synthesis initiation in eukaryotes. *Biochimie* 76: 853-861
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402
- Amábile-Cuevas CF & Demple B (1991) Molecular characterization of the *soxRS* genes of *Escherichia coli*: two genes control a superoxide stress regulon. *Nucleic Acids Res* 25: 4479-4484
- Anderson D (1996) Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mut Res* 350: 103-108
- Angermaier L & Simon H (1983) On the reduction of aliphatic and aromatic nitro compounds by *Clostridia*, the role of ferredoxin and its stabilization. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 364: 961-975
- Arima Y, Nishigori C, Takeuchi T, Oka S, Morimoto K, Utani A & Miyachi Y (2006) 4-Nitroquinoline 1-oxide forms 8-hydroxydeoxyguanosine in human fibroblasts through reactive oxygen species. *Toxicol Sci* 91: 382-392
- Avery AM, Willetts SA & Avery SV (2004) Genetic dissection of the phospholipids hydroperoxidase activity of yeast Gpx3 reveals its functional importance. *J Biol Chem* 279: 46652-46658
- Azevedo D, Nascimento L, Labarre J, Toledano MB & Rodrigues-Pousada C (2007) The *S. cerevisiae* Yap1 and Yap2 transcription factors share a common cadmium-sensing domain. *FEBS Lett* 581:187-195
- Baker M & He S (1991) Elaboration of cellular DNA breaks by hydroperoxides. *Free Radic Biol Med* 11: 563-572

- Balazy M & Poff CD (2004) Biological nitration of arachidonic acid. *Curr Vasc Pharmacol* 2: 81-93
- Bansal AK, Bansal M, Soni G & Bhatnagar D (2005) Protective role of vitamin E pre-treatment on N-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver *Chemi-Biol Interact* 156: 101–111
- Basu U, Southron JL, Stephens JL & Taylor GJ (2004) Reverse genetic analysis of the glutathione metabolic pathway suggests a novel role of PHGPX and URE2 genes in aluminium resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genomics* 271: 627–637
- Benov L & Fridovich I (2002) Induction of the *soxRS* regulon of *Escherichia coli* by glycolaldehyde. *Arch Biochem Biophys* 407: 45-48
- Bilsland E, Molin C, Swaminathan S, Ramne A & Sunnerhagen P (2004) Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Mol Microbiol* 53: 1743–1756
- Blanco M, Urios A & Martinez A (1998) New *Escherichia coli* WP2 tester strains highly sensitive to reversion by oxidative mutagens. *Mutat Res* 413: 95–101
- Blokhina O, Virolainen E & Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)* 91: 179-94
- Boiteux S, Gellon L & Guibourt N (2002) Repair of 8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*: interplay of DNA repair and replication mechanisms. *Free Radic Biol Med* 12: 1244–1253
- Boitier E, Merad-Boudia M, Guguem-Guillouzo C, Defer N, Ceballos-picot I, Leroux JP & Marsac C (1995) Impairment of the mitochondrial respiratory chain activity in diethylnitrosamine-induced rat hepatomas: possible involvement of oxygen free radicals. *Cancer Res* 55: 3028-3035
- Bonatto D (2005) A família PSO2/SNM1 e suas possíveis funções na reparação de DNA e na manutenção genômica de eucariotos. Porto Alegre, Departamento de Biotecnologia, UFRGS 251p. (Tese de Biologia Molecular e Celular)
- Bonatto D (2007) A systems biology analysis of protein-protein interactions between yeast superoxide dismutases and DNA repair pathways. *Free Radic Biol Med* 43: 557-67
- Boveris A & Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134: 707–716
- Boveris A (1998) Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina: Buenos Aires* 58: 350-356
- Breen AP & Murphy JA (1995) Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Rad Biol Med* 18: 1033–1077

- Brennan RJ & Schiestl RH (1996) Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast
Mutat Res 356: 171-178
- Brendel M, Grey M, Maris AF, Hietkamp J, Fesus Z, Pich CT, Dafré AL, Schmidt M, Eckardt-Schupp F & Henriques JA. Low glutathione pools in the original *pso3* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* are responsible for its pleiotropic sensitivity phenotype. *Curr Genet* (1998) 33: 4-9
- Brombacher K, Fischer BB, Rüfenacht K & Eggen RI (2006) The role of Yap1p and Skn7p-mediated oxidative stress response in the defence of *Saccharomyces cerevisiae* against singlet oxygen. *Yeast* 23: 741-750
- Brozmanova J, Dudas A & Henriques JAP (2001) Repair of oxidative DNA damage – an important factor reducing cancer risk. *Neoplasms* 48: 85-93
- Bryant C & DeLuca M (1991) *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, F. Muller (Ed), vol II. CRC Press, Boca Raton, Fla
- Bryant C, Hubbard L & McElroy WD (1991) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the nitroreductase gene from *Enterobacter cloacae*. *J Biol Chem* 266: 4126-4130
- Caballero A, Lázaro JJ, Ramos JL & Esteve-Núñez A (2005) PnrA, a new nitroreductase-family enzyme in the TNT-degrading strain *Pseudomonas putida* JLR11. *Environ Microbiol* 8: 1211-1219
- Cabiscol E, Piulats E, Echave P, Herrero E & Ros J (2000) Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275: 27393–27398
- Cadenas E (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann Ver Biochem* 58: 79-110
- Cadet J, Berger M, Douki T & Ravanat JL (1997) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 131: 1-87
- Cadete J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget PG, Ravanat JL & Sauvaigo S (1999) Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res* 424: 9-21
- Camier S, Ma E, Leroy C, Pruvost A, Toledano M & Marsolier-Kergoat MC (2007) Visualization of ribonucleotide reductase catalytic oxidation establishes thioredoxins as its major reductants in yeast. *Free Rad Biol Med* 42: 1008–1016
- Cappellini MD & Fiorelli G (2008) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* 371: 64-74
- Carroll CC, Warnakulasuriyarachchi D, Nokhbeh MR & Lambert IB (2002) *Salmonella typhimurium* mutagenicity tester strains that overexpress oxygen-insensitive nitroreductases *nfsA* and *nfsB*. *Mutat Res* 501: 79–98

- Cheng NH, Liu JZ, Brock A, Nelson RS & Hirschi KD (2006) AtGRXcp, an Arabidopsis chloroplastic/plastidic glutaredoxin is critical for protection against protein oxidative damage. *J Biol Chem* 281: 26280–26288
- Cimen MY (2008) Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta* In press
- Coenjaerts FE, Hoepelman AI, Scharringa J, Aarts M, Ellerbroek PM, Bevaart L, van Strijp JA & Janbon G (2006) The Skn7 response regulator of *Cryptococcus neoformans* is involved in oxidative stress signalling and augments intracellular survival in endothelium. *FEMS Yeast Res* 6: 652–661
- Cohen BA, Pilpel Y, Mitra RD & Church GM (2002) Discrimination between paralogs using microarray analysis: application to the Yap1p and Yap2p transcriptional networks. *Mol Biol Cell* 13: 1608–1614
- Costa V & Ferreira PM (2001) Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol Aspec Med* 22: 217-246
- Croteau DL & Bohr VA (1997) Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J Biol Chem* 272: 25409-25412
- Culotta VC, Yang M & O'Halloran TV (2006) Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta* 1763: 747–758
- Dalton TP, Shertzer HG & Puga A (1999) Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 67-101
- de Grey AD (2002) HO₂*: the forgotten radical. *DNA Cell Biol* 21: 251-257
- Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J & Toledano MB (2002) A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111: 471–481
- DeMarini DM, Shelton ML & Bell DA (1996) Mutation spectra of chemical fractions of a complex mixture: role of nitroarenes in the mutagenic specificity of municipal waste incinerator emissions. *Mutat Res* 349: 1–20
- Denny WA (2002) Nitroreductase-based GDEPT. *Curr Pharm Des* 8: 1349-1361
- de Vries S & Marres CA (1988) The mitochondrial respiratory chain of yeast structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochem Biophys Acta* 895: 205-239
- Dickinson RJ & Schweizer M (1999) The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. T.J. International Ltd: Padstow, UK
- Dizdaroglu M (1992) Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res* 275: 331–342

- Djuric Z, Fifer EK, Howard PC & Beland FA (1986) Oxidative microsomal metabolism of 1-nitropyrene and DNA-binding of oxidized metabolites following nitroreduction. *Carcinogenesis* 7: 1073-1079
- Dormer UH, Westwater J, Stephen DW & Jamieson DJ (2002) Oxidant regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* GSH1 gene. *Biochim Biophys Acta* 1576: 23-9
- Dotan Y, Lichtenberg D & Pinchuk I (2004) Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 43: 200-227
- Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95
- Drzyzga O, Schmidt A & Blotevogel K-H (1995) Reduction of nitrated diphenylamine derivatives under anaerobic conditions. *Appl Environ Microbiol* 61: 3282-3287
- Engelhardt JF (1999) Redox mediated gene therapies for environmental injury: approaches and concepts. *Antioxid Redox Signal* 1: 5-27
- Fann YC, Metosh-Dickey CA, Winston GW, Sygula A, Rao DN, Kadiiska MB & Mason RP (1999) Enzymatic and nonenzymatic production of free radicals from the carcinogens 4-Nitroquinoline N-Oxide and 4-Hydroxylaminoquinoline N-Oxide. *Chem Res Toxicol* 12: 450-458
- Faria JP, Fernandes L (2006) Protection against oxidative stress through SUA7/TFIIB regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med* 41: 1684-1693
- Fei W, Alfaro G, Muthusamy BP, Klaassen Z, Graham TR, Yang H & Beh CT (2008) Genome-wide analysis of sterol-lipid storage and trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 7: 401-14
- Forsburg SL (2001) The art and design of genetic screens: yeast. *Nat Rev Genet* 2: 659-668
- Foury F (1997) Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene* 195: 1-10
- Freitas JM, Liba A, Meneghini R, Valentine JS & Gralla EB (2000) Yeast lacking Cu-Zn superoxide dismutase show altered iron homeostasis. Role of oxidative stress in iron metabolism. *J Biol Chem* 275: 11645-11649
- Fridovich I (1998) Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 201:1203-1209
- Friedberg EC (2006) *DNA repair*. Ron Newcomer & associates: San Francisco
- Friedlos F, Jarman M, Davies LC, Boland MP & Knox RJ (1992) Identification of novel reduced pyridinium derivatives as synthetic co-factors for the enzyme DT diaphorase (NAD(P)H dehydrogenase (quinone), EC 1.6.99.2). *Biochem Pharmacol* 44: 25-31

- Friedman JE, Watson JA, Lam DW & Rokita SE (2006) Iodotyrosine deiodinase is the first mammalian member of the NADH oxidase/flavin reductase superfamily. *J Biol Chem* 281:2812–2819
- Fuge EF & Werner-Washburne M Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Hohmann S and Mager, WH (eds) (1997) *Yeast stress responses*. New York: Springer
- Gaboriaud C, Bissey V, Benchetrit T & Mornon J-P (1987) Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *FEBS Lett* 224: 149-155
- Gaudu P, Touati D, Nivière V & Fontecave M (1994) The NAD(P)H:flavin oxidoreductase from *Escherichia coli* as a source of superoxide radicals. *J Biol Chem* 269: 8182-8188
- Goodwin A, Kersulyte D, Sisson G, Van Zanten SJO, Berg DE & Hoffman PS (1998) Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitrorreductases. *Mol Microbiol* 28: 383-393
- Goto Y, Matsuda T, Ito K, Huh NH, Thomale J, Rajewsky MF, Hayatsu H & Negishi T (1999) Mutagenicities of N-nitrosodiethylamine and N-nitrosodiethylamine in *Drosophila* and their relationship to the levels of O-alkyl adducts in DNA. *Mutat Res* 425: 125-134
- Goya L, Delgado-Andrade C, Rufián-Henares JA, Bravo L & Morales FJ (2007) Effect of coffee melanoidin on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Mol Nutr Food Res* 51: 536-545
- Gralla EB & Kosman DJ (1992) Molecular genetics of superoxide dismutase. *Adv Genet* 30: 251-319
- Grant CM (2001) Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol. Microbiol* 39: 533–541
- Grant CM (2008) Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. *J Biol In Press*
- Haack T, Erdinger L & Boche G (2001) Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 of nitroso and respective hydroxylamine compounds. *Mutat Res* 491: 183–193
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141: 312–322
- Halliwell B & Gutteridge JM (2007) *Free Radical in Biology and Medicine* (4rd edn). Oxford: Oxford University Press

- Han F, Liu S, Ho B, Yan Z & Yan X (2007) Alterations in *rdxA* and *frxA* genes and their upstream regions in metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* isolates. *Res Microbiol* 158: 38-44
- Hannink N, Rosser SJ, French CE, Basran A, Murray JA, Nicklin S & Bruce NC (2001) Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase. *Nat Biotechnol* 19: 1168-1172
- Hassan HM & Fridovich I (1978) Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 253: 8143-8148
- Haynes CA, Koder RL, Miller AF & Rodgers DW (2002) Structures of nitroreductases in three states. Effects of inhibitor binding and reduction. *J Biol Chem* 277: 11513-11520
- Henriques JA, Dafré AL, Picada JN, Maris AF & Salvador M (2001) Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: Serafini LA, de Barros NM & Azevedo JL (Eds.), *Biotecnologia na agricultura e na indústria*. Guaíça: Agropecuária, p. 227-256
- Herrero E & Torre-Ruiz MA (2007) Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions. *Cell Mol Life Sci* 64: 1518–1530
- Herrero E, Ros J, Bellí G & Cabisco E (2008) Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochem Biophys Acta* In Press
- Hiltunen JK, Mursula AM, Rottensteiner H, Wierenga RK, Kastaniotis AJ & Gurvitz A (2003) The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 27: 35–64
- Holt NE, Zigmantas D, Valkunas L, Li XP, Niyogi KK & Fleming GR (2005) Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting. *Science* 307: 433–436
- Hohmann S & Mager WH (1997) *Yeast Stress Response*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany
- Homma-Takeda S, Hiraku Y, Ohkuma Y, Oikawa S, Murata M, Ogawa K, Iwamuro T, Li S, Sun GF, Kumagai Y, Shimojo N & Kawanishi S (2002) 2,4,6-trinitrotoluene induced reproductive toxicity via oxidative DNA damage by its metabolite. *Free Radic Res* 36: 555–566
- Hoopes BC, Bowers GD & DiVisconte MJ (2000) The two *Saccharomyces cerevisiae* SUA7 (TFIIB) transcripts differ at the 3'-end and respond differently to stress. *Nucleic Acids Res* 28: 4435-4443
- Huang TT, Yasunami M, Carlson EJ, Gillespie AM, Reaume AG, Hoffman EK, Chan PH, Scott RW & Epstein CJ (1997) Superoxide-mediated cytotoxicity in superoxide dismutase-deficient fetal fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 344: 424–432

- Hwang ES & Kim GH (2007) Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. *Toxicology* 229: 1-10
- Imlay JA (2006) Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol Microbiol.* 59: 1073-1082
- Imlay JA (2008) Cellular Defenses Against Superoxide and Hydrogen Peroxide *Annu Rev Biochem* In press
- Inoue Y, Sugiyama K, Izawa S & Kimura A (1998) Molecular identification of glutathione synthetase (GSH2) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1395: 315-20
- Izawa S, Inoue Y & Kimura A (1996) Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasemic *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem.* 320: 61–67
- Jaruga PW, Rodriguez H & Dizdaroglu M (2001) Measurement of 8-hydroxy- 2-deoxyadenosine in DNA by liquid chromatography/mass spectrometry. *Free Rad Biol Med* 31: 336–344
- Jensen LT, Sanchez RJ, Srinivasan C, Valentine JS & Culotta VC (2004) Mutations in *Saccharomyces cerevisiae* iron–sulfur cluster assembly genes and oxidative stress relevant to Cu,Zn superoxide dismutase. *J Biol Chem* 279: 29938–29943
- Jeansonne NE (1994) Yeast as a model system for mammalian seven-transmembrane segment receptors. *Proc Soc Exp Biol Med* 206: 35-44
- Jones GM, Stalker J, Humphray S, West A, Cox T, Rogers J, Dunham I & Prelich G (2008) A systematic library for comprehensive overexpression screens in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Methods* In press
- Joseph PD, Gruz P & Nohmi T (1997) Recent advances in the construction of bacterial genotoxicity assays. *Mutat. Res.* 386: 1–23.
- Kadiyala V, Nadeau LJ & Spain JC (2003) Construction of *Escherichia coli* strains for conversion of nitroacetophenones to ortho-aminophenols. *Appl Environ Microbiol* 69: 6520-6526
- Kakhlon O & Cabantchik ZI (2002). The labile iron pool: Characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic Biol Med* 33: 1037-1046
- Kanazawa A, Sawa T, Akaike T & Maeda H (2002) Dietary lipid peroxidation products and DNA damage in colon carcinogenesis. *Eur J Lipid Sci Technol* 104: 439–447
- Kanupriya C, Prasad D, Sai Ram M, Sawhney RC, Ilavazhagan G & Banerjee PK (2007) Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced cytotoxicity in U-937 macrophages by

- alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Toxicol In Vitro* 21: 846-854
- Kho CW, Lee PY, Bae KH, Cho S, Lee ZW, Park BC, Kang S, Lee DH & Park SG (2006) Glutathione peroxidase 3 of *Saccharomyces cerevisiae* regulates the activity of methionine sulfoxide reductase in a redoxdependent way. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 25–35
- Kim IS, Yun HS, Kwak SH & Jin IN (2007) The physiological role of CPR1 in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 against menadione stress by proteomics. *J Microbiol* 45: 326-332
- Kitamura E, Tanaka K, Kitamura Y & Tanaka TU (2007) Kinetochore microtubule interaction during S phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 21: 3319-3330
- Kitts CL, Green CE, Otle RA, Alvarez MA & Unkefer PJ (2000) Type I nitroreductases in soil enterobacteria reduce TNT (2,4,6,-trinitrotoluene) and RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine). *Can J Microbiol* 46: 278-282
- Knox RJ, Burke J, Chen S & Kerr DJ (2003) CB 1954: from the Walker tumor to NQO2 and VDEPT. *Curr Pharm Des* 9: 2091-2104
- Kobori T, Sasaki H, Lee WC, Zenno S, Saigo K, Murphy ME & Tanokura M (2001) Structure and site-directed mutagenesis of a flavoprotein from *Escherichia coli* that reduces nitrocompounds: alteration of pyridine nucleotide binding by a single amino acid substitution. *J Biol Chem* 276: 2816-2823
- Koc A, Mathews CK, Wheeler LJ, Gross MK & Merrill GF (2006) Thioredoxin is required for deoxyribonucleotide pool maintenance during S phase. *J Biol Chem* 281: 15058–15063
- Koder RL & Miller A.-F (1998) Steady-state kinetic mechanism, stereospecificity, substrate and inhibitor specificity of *Enterobacter cloacae* nitroreductases. *Biochim Biophys Acta* 1387: 395-405
- Kuge S & Jones N (1994) YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J* 13: 655-64
- Kutty R & Benett GN (2005) Biochemical characterization of trinitrotoluene transforming oxygen-insensitive nitroreductases from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Arch Microbiol* 184: 158-167
- Kwak YH, Lee DS & Kim HB (2003) *Vibrio Harvey* nitroreductase is also a chromate reductase. *Appl Environ Microbiol* 69: 4390–4395
- Kwon DH, Kato M, El-Zaatari FAK, Osato MS & Graham DY (2000) Frame-shift mutations in NAD(P)H flavin oxidoreductase encoding gene (*frxA*) from metronidazole

- resistant *Helicobacter pylori* ATCC43504 and its involvement in metronidazole resistance. FEMS Microbiol Lett 188: 197-202
- Lafon A, Chang CS, Scott EM, Jacobson SJ & Pillus L (2007) MYST opportunities for growth control: yeast genes illuminate human cancer gene functions. Oncogene 26: 5373-5384
- Landis GN & Tower J (2005) Superoxide dismutase evolution and life span regulation, Mech. Ageing Dev 126: 365–379
- Lau AT, Wang Y & Chiu JF (2008) Reactive oxygen species: Current knowledge and applications in cancer research and therapeutic. J Cell Biochem In Press
- Lecrenier N, Van Der Bruggen P & Foury F (1997) Mitochondrial DNA polymerases from yeast to man: a new family of polymerases. Gene 185: 147-152
- Lei B, Liu M, Huang S & Tu SC (1994) *Vibrio harveyi* NADPH-flavin oxidoreductase: cloning, sequencing and overexpression of the gene and purification and characterization of the cloned enzyme. J Bacteriol 176: 3552-3558
- Leonard SS, Harris GK & Shi XL (2004) Metal-induced oxidative stress and signal transduction. Free Rad Biol Med 37: 1921–1942
- Levine R & Stadtman ER (2001) Oxidative modification of proteins during aging. Exp Gerontol 36: 1495–1502
- Levine RL (2002) Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. Free Radic Biol Med 32: 790–796
- Lightfoot RT, Shuman D & Ischiropoulos H (2000) Oxygen-insensitive nitroreductases of *Escherichia coli* does not reduce 3-nitrotyrosine. Free Radic Biol Med 28: 1132-1136
- Liochev SI & Fridovich I (2002) The Haber-Weiss cycle — 70 years later: an alternative view. Redox report 7: 55–57
- Liochev S, Hausladen A & Fridovich I (1999) Nitroreductase A is regulated as a member of the *soxRS* regulon of *Escherichia coli*. Biochemistry 96: 3537-3539
- Lisowsky T (1993) A high copy number of yeast gamma-glutamylcysteine synthetase suppresses a nuclear mutation affecting mitochondrial translation. Curr Genet 23: 408-13
- Liu SS (1997) Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. Biosci Rep 17: 259–272
- Longo VD, Gralla EB & Valentine JS (1996) Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 271: 12275-12280.

- Lushchak VI (2006) Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes. *Acta Biochim Pol* 53: 679-684
- Madrona AY & Wilson DK (2004) The structure of Ski8p, a protein regulating mRNA degradation: Implications for WD protein structure. *Protein Sci* 13: 1557-1565
- Manfredini V, Roehrs R, Peralba MC, Henriques JA, Saffi J, Ramos AL & Benfato MS (2004) Glutathione peroxidase induction protects *Saccharomyces cerevisiae sod1Δsod2Δ* double mutants against oxidative damage. *J Med Biol Res* 37: 159-165
- Margaret AJ, Trend MA, Hazell SL & Mendz GL (2001) Potential involvement of several nitroreductases in metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Archem biochem biophysics* 392: 180-191
- Maris AF, Kern AL, Picada JN, Boccardi F, Brendel M & Henriques JA (2000) Glutathione, but not transcription factor Yap1, is required for carbon source-dependent resistance to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 37: 175-182
- Marnett LJ (1999) Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde. *Mut Res* 42: 483 - 495
- Martin RG & Rosner JL (2003) Analysis of microarray data for the *marA*, *soxS*, and *rob* regulons of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 370: 278-280
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C & Giovannini C (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 16: 577-586
- Masuda M, Mower HF, Pignatelli B, Celan I, Friesen MD & Nishino H (2000) Formation of N-nitrosamines and N-nitramines by the reaction of secondary amines with peroxy nitrite and other reactive nitrogen species: comparison with nitrotyrosine formation. *Chem Res Toxicol* 13: 301-308
- Maya D, Quintero MJ, de la Cruz Muñoz-Centeno M & Chávez S (2008) Systems for applied gene control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* In Press
- McCalla DR, Kaiser C & Green MHL (1978) Genetics of nitrofurazone resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 133: 10-16
- McCoy EC, Anders M, McCartney M, Howard PC, Beland FA and Rosenkranz HS (1984) The recombinogenic inactivity of 1-nitropyrene for yeast is due to a deficiency in a functional nitroreductase. *Mutat Res* 139: 115-118
- McHale MW, Kroening KD & Bernlohr DA (1996) Identification of a class of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in fatty acid repression of gene transcription and analysis of the *FRM2* gene. *Yeast* 12: 319-331
- Meister A (1995) Glutathione metabolism. *Methods Enzymol* 251: 3-7

- Menacho-Marquez M & Murguia JR (2007) Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. *Clin Transl Oncol* 9: 221-228
- Mermelstein R, Kiriazides, DK, Butler M, McCoy EC & Rosenkranz HS (1981) The extraordinary mutagenicity of nitroarenes in bacteria. *Mutat Res* 89: 187–196
- Metosh-Dickey CA, Mason RP & Winston GW (1999) Nitroarene Reduction and generation of free radicals by cell-free extracts of wild-type, and nitroreductase-deficient and –enriched *Salmonella typhimurium* strains used in the *umu* gene induction assay. *Toxicol Appl Pharmacol* 154: 126–134
- Minic J, Sautel M, Salesse R & Pajot-Augy E (2005) Yeast system as a screening tool for pharmacological assessment of G protein coupled receptors. *Curr Med Chem* 12: 961-969
- Missall TA & Lodge JK (2005) Thioredoxin reductase is essential for viability in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 4: 487-9
- Mittal G, Brar AP & Soni G (2008) N-nitrosodiethylamine-induced toxicity in relation to oxidative stress and development of atherosclerosis in hypercholesterolemic diet-fed rabbits. *Exp Toxicol Pathol* In press
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M & Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9: 490-498
- Moch C, Schrogel O & Allmansberger R (1998) The dependent transcription of the *ywcG* gene from *Bacillus subtilis* is dependent on an excess of glucose and glutamate. *Mol Microbiol* 27: 889-898
- Molin M, Renault JP, Lagniel G, Pin S, Toledano MB & Labarre L (2007) Ionizing radiation induces a Yap1-dependent peroxide stress response in yeast. *Free Rad Biol Med* 43: 136–144
- Möller L, Lax I & Eriksson LC (1993) Nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons: a risk assessment for the urban citizen. *Environ Health Perspect* 101: 309–315
- Morgan BA, Banks GR, Toone WM, Raitt D, Kuge S & Johnston LH (1997) The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 16: 1035-1044
- Mutoh N, Kawabata M & Kitajima, S (2005) Effects of Four Oxidants, Menadione, 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene, Hydrogen Peroxide and Cumene Hydroperoxide, on Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biochem* 138: 797-804
- Nixon JE, Wang A, Field J, Morrison HG, McArthur AG, Sogin ML, Loftus BJ & Samuelson J (2002) Evidence for lateral transfer of genes encoding ferredoxins, nitroreductases, NADH oxidase, and alcohol dehydrogenase 3 from anaerobic prokaryotes to *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell* 1: 181–190

- Nokhbeh MR, Boroumandi S, Pokorny N, Koziarz P, Paterson ES & Lambert IB (2002) Identification and characterization of SnrA, an inducible oxygen-insensitive nitroreductases in *Salmonella enterica serovar typhimurium* TA1535. *Mutat Res* 508: 59-70
- Nordberg, J & Årner, ES (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxins system. *Free Rad Biol Med* 31: 1287-1312
- Nunoshiba T & Demple P (1993) Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-NQO. *Cancer Res* 53: 3250–3252
- Ohuigin C, Macconell DJ, Kelly JM & Van Der Putten WJ (1987) Methylene blue photosensitized strand cleavage of DNA: effects of dye binding and oxygen. *Nucleic Acids Res* 15: 7411-7427
- Ojeda L, Keller G, Mühlhoff U, Rutherford JC, Lill R & Winge DR (2006) Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron-regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281: 17661–17669
- Orna MV & Mason RP (1989) Correlation of kinetic parameters of nitroreductase enzymes with redox properties of nitroaromatic compounds. *J Biol Chem* 264: 12379-12384
- Osorio H, Carvalho E, del Valle M, Gunther Sillero MA, Moradas-Ferreira P & Sillero A (2003) H₂O₂, but not menadione, provokes a decrease in the ATP and an increase in the inosine levels in *Saccharomyces cerevisiae*. An experimental and theoretical approach. *Eur J Biochem* 270: 1578–1589
- Padda RS, Wang C, Hughes JB, Kutty R & Bennett GN (2003) Mutagenicity of nitroaromatic degradation compounds. *Environ Toxicol Chem* 22: 2293-2297
- Park HJ, Kreutzer R, Reiser CO & Spinzl M (1993) Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding a H₂O₂-forming NADH oxidase from the extreme thermophilic *Thermus thermophilus* HB8 and its expression *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 211: 905-909
- Parkinson GN, Skelly JV & Neidle S (2000) Crystal Structure of FMN-Dependent Nitroreductase from *Escherichia coli* B: A Prodrug-Activating Enzyme. *J Med Chem* 43: 3624-3631
- Pastore A, Federici G, Bertini E & Piemonte F (2003). Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 333: 19–39
- Paterson ES, Boucher SE & Lambert IB (2002) Regulation of the *nfsA* gene in *Escherichia coli* by *SoxS*. *J Bacteriol* 184: 51–58
- Pena-Castillo L & Hughes TR (2007) Why are there still over 1000 uncharacterized yeast genes? *Genetics* 176: 7-14

- Peterson FJ, Mason RP, Hovespian J & Holtzman JL (1979) Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. *J Biol Chem* 254: 4009–4014
- Pérez-Reinado E, Blasco R, Castillo F, Moreno-Vivián C & Roldán RD (2005) Regulation and characterization of two nitroreductase genes, *nprA* and *nprB*, of *Rhodobacter capsulatus*. *Appl Environ Microbiol* 71: 7643–7649
- Plazar J, Zegura B, Lah TT & Filipic M (2007) Protective effects of xanthohumol against the genotoxicity of benzo(a)pyrene(BaP), 2-amino 3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and tert-butyl hydroperoxide(t-BOOH) in HepG2 human hepatoma cells. *Mutat Res* 632: 1-8
- Pomposiello PJ & Demple B (2001) Redox-operated genetic switches: the *SoxR* and *OxyR* transcription factors. *Trends Biotechnol* 19: 109-114
- Porter NA (1986) Mechanisms for the autooxidation of polyunsaturated lipids. *Acc Chem Res* 19: 262–268
- Raha S & Robinson BH (2000) Mitochondria, oxygen free radicals, disease and Ageing. *Trends Biochem Sci* 25: 502–508.
- Rhee SG, Chae HZ & Kim K (2005) Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 38: 1543–1552
- Rodrigues-Pousada CA, Nevitti T, Menezes R, Azevedo D, Pereira J & Amaral C (2004) Yeast activator proteins and stress response: an overview. *FEBS Lett* 567: 80-85
- Rota C, Chignell CF & Mason RP (1999) Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'- dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements *Free Radic Biol Med* 27: 873–881
- Salamanca-Pinzón SG, Camacho-Carranza R, Hernández-Ojeda SL & Aguirre JJ (2006) Nitrocompound activation by cell-free extracts of nitroreductase-proficient *Salmonella typhimurium* strains. *Mutagenesis* 21: 369–374
- Salwisnk L (2004) The Database of Interacting Proteins: 2004 update. *Nucleic Acids Res* 32: D449-D451
- Samuelson J (1999) Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. *Antimicrob Agents Chemoter* 43: 1533-1541
- Sarlauskas J, Nemeikaite-Ceniene A, Anusevicius Z, Miseviciene L, Julvez MM, Medina M, Gómez-Moreno C & Cenas N (2004) Flavoenzyme-catalyzed redox cycling of hydroxylaminoand amino metabolites of 2,4,6-trinitrotoluene: implications for their cytotoxicity. *Arch Biochem Biophys* 425: 184–192

- Scandalios, JG (2002) The rise of ROS. *Trends Biochem Sciences*. 27: 483-486
- Schafer FQ, Qian SY & Buettner GR (2000) Iron and free radical oxidations in cell membranes. *Cell Mol Biol* 46: 657-662
- Scherens B & Goffeau A (2004) The uses of genome-wide mutant collections. *Genome Biol* 5: 229
- Schuster S, Pfeiffer T & Fell DA (2008) Is maximization of molar yield in metabolic networks favoured by evolution? *J Theor Biol* In press
- Searle PF, Chen MJ, Hu L, Race PR, Lovering AL, Grove JI, Guise C, Jaberipour, M, James ND, Mautner V, Young LS, Kerr DJ, Mountain A, White SA & Hyde EI (2004) Nitroreductase: a prodrug-activating enzyme for cancer gene therapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31: 811-816
- Sen CK & Packer L (1996) Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 10: 709-20
- Sies H & de Groot H (1992) Role of reactive oxygen species in cell toxicity. *Toxicol Lett* 64-65: 547-551
- Simon JA & Bedalov A (2004) Yeast as a model system for anticancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* 4: 481-492
- Smardova J (1999) FASAY: a simple functional assay in yeast for identification of p53 mutation in tumors. *Neoplasma* 46: 80-88
- Smith MC, Sumner ER & Avery SV (2007) Glutathione and Gts1p drive beneficial variability in the cadmium resistances of individual yeast cells. *Mol Microbiol* 66: 699-712
- Somerville CC, Nishino SF & Spain JC (1995) Purification and Characterization of Nitrobenzene Nitroreductase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *J Bacteriol* 177: 3837-3842
- Sorger D, Athenstaedt K, Hrastnik C & Daum G (2004) A yeast strain lacking lipid particles bears a defect in ergosterol formation. *J Biol Chem* 279: 31190-31196
- Spain JC (1995) Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annu Rev Microbiol* 49: 523-555
- Srinivasan P, Sabitha KE & Shyamaladevi CS (2007) Attenuation of 4-nitroquinoline 1-oxide induced in vitro lipid peroxidation by green tea polyphenols. *Life Sci* 80: 1080-1086
- Stadtman ER (2001) Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann. New York Acad. Sci.* 928: 22-38

- Steinmetz LM & Scharfe C (2002) Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat Genet* 31: 400-404
- Streker K, Freiberg C, Labischinski H, Hacker J & Ohlsen K (2005) *Staphylococcus aureus* NfrA (SA 0367) Is a Flavin Mononucleotide-Dependent NADPH Oxidase Involved in Oxidative Stress Response. *J Bacteriol* 187: 2249-2256
- Stuart D (2008) The meiotic differentiation program uncouples S-phase from cell size control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Cycle* In Press
- Sturgeon CM, Kemmer D, Anderson HJ & Roberge M (2006) Yeast as a tool to uncover the cellular targets of drugs. *Biotechnol J* 1: 289-298
- Takeda K, Lizuka M, Watanabe T, Nakagawa J, Kawasaki S & Nimura Y (2006). *Synechocystis* DrgA protein functioning as nitroreductase and ferric reductase is capable of catalyzing the Fenton reaction. *FEBS Lett* 274:1318–1327
- Tanaka T, Izawa S & Inoue Y (2005) GPX2, encoding a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homologue, codes for an atypical 2-Cys peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280: 42078–42087
- Tang DG, La EH, Kern J & Kehrer JP (2002) Fatty acid oxidation and signaling in apoptosis. *Biol Chem* 383: 425–442
- Tazima Y, Kada T & Murakami A (1975) Mutagenicity of nitrofurantoin derivatives, including furylfuramide, a food preservative. *Mutat Res* 32: 55–80
- Thannickal VJ & Fanburg BL (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol* 279: L1005–L1028
- Toledano MB, Delaunay A, Biteau B, Spector D & Azevedo D (2003) Oxidative Stress Responses in Yeast. *Top Curr Gen* 1: 241–303
- Topinka J, Schwarz LR, Wiebel FJ, Cerna M & Wolff T (2000) Genotoxicity of urban air pollutants in the Czech Republic Part II. DNA adduct formation in mammalian cells by extractable organic matter. *Mutat Res* 469: 83-93
- Trotter EW & Grant CM (2005) Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 4: 392–400
- Usaitė R, Wohlschlegel J, Venable JD, Park SK, Nielsen J, Olsson L & Yates III JR (2008) Characterization of Global Yeast Quantitative Proteome Data Generated from the Wild-Type and Glucose Repression *Saccharomyces cerevisiae* Strains: The Comparison of Two Quantitative Methods. *J Proteome Res* 7: 266-75
- Valko M, Morris H & Cronin MT (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12: 1161-1208

- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ & Telser J (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266: 37-56
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M & Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160: 1-40
- Van Loon AP, Pesold-Hurt B & Schatz G (1986) A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 3820–3824
- Viegas CA, Cabral MG, Teixeira MC, Neumann G, Heipieper HJ & Sá-Correia I (2005) Yeast adaptation to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid involves increased membrane fatty acid saturation degree and decreased *OLE1* transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 330: 271–278
- Vorbach C, Harrison R & Capecchi MR (2003) Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends Immunol* 24: 512–517
- Vranová E, Inzé D & Van Breusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* 372: 1227-1236
- Wang H & Joseph JA (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 27: 612–616
- Wang L, Lewis MS & Johnson AW (2005) Domain interactions within the Ski2/3/8 complex and between the Ski complex and Ski7p. *RNA* 11: 1291-1302
- Watanabe M, Ishidate Jr & Nohmi, T (1990) Nucleotide sequence of *Salmonella typhimurium* nitroreductases gene. *Nucleic Acids Res* 18: 1059
- Whiteway J, Koziarz P, Veall J, Sandhu N, Kumar P, Hoecher B & Lamber IB (1998) Oxygen-insensitive nitroreductases: analysis of the roles of *nfsA* and *nfsB* in development of resistance to 5-nitrofur derivatives in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180: 5529-5539
- Wills C (1990) Regulation of sugar and ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Vrit Ver Biochem Mol Biol* 25: 245-280
- Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, Bangham R, Benito R, Boeke JD, Bussey H, Chu AM, Connely C, Davis K, Dietrich F, Dow SW, El Bakkoury M, Foury F, Friend SH, Gentalen E, Giaever, G, Hegemann JH, Jones T, Laub M, Liao H & Daves RW (2001) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285: 901-906
- Wood MJ, Storz G & Tjandra N (2004) Structural basis for redox regulation of Yap1 transcription factor localization. *Nature* 430: 917–921

- Wu AL & Moye-Rowley WS (1994) GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol Cell Biol* 14: 5832-5839
- Zenno S, Saigo K, Kanoh H & Inouye S (1994) Identification of the gene encoding the major NAD(P)H-flavin oxidoreductase of the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri* ATCC 7744. *J Bacteriol* 176:3536–3543
- Zenno S, Koike H, Kumar AN, Jayaraman R, Tanokura M & Saigo K (1996a) Biochemical characterization of NfsA, the *Escherichia coli* major nitroreductase exhibiting a high amino acid homology to Frp, a *Vibrio fischeri* flavin oxidoreductase. *J Bacteriol* 178: 4508-4514
- Zenno S, Koike H, Tanokura M & Saigo K (1996b) Gene cloning, purification, and characterization of NfsB, a minor oxygen-insensitive nitroreductase from *Escherichia coli*, similar in biochemical properties to FRase I, the major flavin reductase in *Vibrio fischeri*. *J Biochem* 120: 736-744
- Zenno S, Kobori T, Tanokura M & Saigo K (1998) Conversion of NfsA, the major *Escherichia coli* nitroreductase, to a flavin reductase with na activity similar to that of Frp, a flavin reductase in *Vibrio harveyi*, by a single amino acid substitution. *J Bacteriol* 180: 422-425
- Zimmermann FK, Von Borstel RC, Von Halle ES, Parry JM, Siebert D, Zetterberg G, Barale R & Loprieno N (1984) Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*: a report of the U.S. Protection agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 133: 1999-244
- Zweytick D, Leitner E, Kohlwein SD, Yu C, Rothblatt J & Daum G (2000) Contribution of Are1p and Are2p to steryl ester synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 267: 1075-1082