

## Ischemia and Reperfusion Metabolite Signature

Succinate accumulation is a metabolic signature of ischemia. The heart is highly energy demanding and capable of utilizing a variety of substrates, including free fatty acids, glucose, lactate, and amino acids, for the production of ATP. The heart is also highly dependent on the constant delivery of oxygen, and disruption of this process, for example during ischemia or hypoxia, causes profound disturbances in myocardial metabolism. During ischemia, the lack of blood flow results in the loss of ATP, lactate accumulation, and the build-up of metabolites including those within the Krebs Cycle (CAC), purine nucleotide degradation pathways, and those involved in fatty acid and amino acid metabolisms. Despite metabolic adaptations to both myocardial hypoxia and ischemia being studied at length, the potential link to the generation of deleterious Reactive Oxygen Species (ROS) during ischemia and reperfusion (IR) injury has been for the most part overlooked. Comparative metabolomics recently revealed that across multiple tissues three metabolites demonstrated conserved accumulation during ischemia. Of these, two were components of the purine degradation pathway, hypoxanthine and xanthine. While both hypoxanthine and xanthine contribute to xanthine oxidase derived generation of hydrogen peroxide, they interact with xanthine oxidase at the plasma membrane and do not contribute to mitochondrial ROS production. The third metabolite and sole mitochondrial component to show significant accumulation was the CAC intermediate and complex II substrate, succinate. Elucidation of the phenomenon of succinate accumulation is certainly not new. A group first demonstrated elevations in succinate during anaerobiosis in their work on diving mammals in 1975. Since then, ischemic succinate build-up has been observed in hypoxic rabbit papillary muscles, hypoxic isolated rat cardiomyocytes, and in the isolated mouse heart. Succinate accumulation can therefore be considered a universal signature of ischemia and an attractive candidate for a potential electron source for ROS production at reperfusion. The exact role of ischemic succinate, however, and the physiological basis behind its striking accumulation remain to be fully elucidated. Original propositions as to its function included forming part of an extra-glycolytic source for energy in situations of low nutrient and oxygen availability, therefore increasing tolerance to long-term anaerobiosis. Importantly, a group of scientists hypothesized that the production

of succinate improved cytosolic redox state and thus was somehow beneficial during hypoxia. Indeed, improvements in cardiac function during hypoxia have been reported in the isolated rat hearts perfused with potential precursors of succinate formation. In recent years, the role of succinate has also expanded well beyond its action within the CAC and the electron transport chain with new roles discovered in inflammation and G protein-coupled receptor stress signaling. How these functions relate to the accumulation of succinate in anaerobic conditions remains to be investigated. Importantly, succinate can also drive the highest rate of mitochondrial ROS production in isolated mitochondria in a process known as reverse electron transport (RET). Succinate is rapidly oxidized at reperfusion. As the burst of mitochondrial ROS production occurs within the first few minutes of reperfusion, it follows that ischemic metabolites fueling ROS production should also be oxidized rapidly over a similar time frame. Consistent with this hypothesis, succinate is abruptly lost from the tissue upon reperfusion, returning to pre-ischemic levels after only a few minutes. This is likely due to the rapid oxidation of succinate to fumarate by Complex II in the mitochondrial matrix, making succinate a highly attractive candidate for driving reperfusion mediated ROS production. It should be noted that succinate in the mitochondria rapidly equilibrates with that in the cytosol via the mitochondrial dicarboxylate carrier (DIC) and may also be lost from the cell as a result of cell membrane disruption. Despite this, it remains likely that a significant proportion of ischemic succinate is available to supply Complex II-mediated oxidation upon reperfusion, and a recent work in which the inhibition of Complex II slowed myocardial succinate loss at reperfusion now supports this.

### **Succinate at Reperfusion**

At reperfusion, the large burst of mitochondrial superoxide that occurs appears to originate largely from mitochondrial Complex I. While there are a number of ROS sources that may contribute to IR injury, including NADPH oxidases and xanthine oxidase, activation of these processes is thought to occur later in pathology. Complex I can produce superoxide via two potential mechanisms. The first occurs in the presence of a high matrix NADH/NAD<sup>+</sup> ratio in which a reduced flavin mononucleotide site reacts with oxygen to produce

superoxide. This process occurs during conventional forward electron transport and is promoted by the Complex I CoQ site inhibitor rotenone. Given that rotenone has been shown to be protective against oxidative damage during IR, it is unlikely that superoxide produced via this mechanism contributes significantly to reperfusion induced ROS production. The second mechanism occurs via RET in which a highly reduced CoQ pool in conjunction with a maximal Mitochondrial membrane potential and a low rate of ATP synthesis forces electrons from the reduced CoQ pool back through Complex I. Notably, this phenomenon has been observed in isolated mitochondria respiring on high concentrations of succinate and is associated with the greatest rate of mitochondrial ROS production known to occur. Despite RET being observed in the brain, liver, and heart mitochondria, it has generally been assumed to be solely an in vitro phenomenon of unknown physiological significance with the concentration of succinate in tissues being significantly lower than what is commonly used in in vitro experiments to evoke RET-mediated ROS (5–10 mM). However, a recent work has shown that conditions at reperfusion are in fact sufficient to support RET with evidence of increased levels of ischemic succinate and accelerated repolarization of Mitochondrial membrane potential at reperfusion. In support of this, mitochondrial ROS was tracked in a primary isolated rat cardiomyocyte model of simulated ischemia and reperfusion using the fluorescent probe dihydroethidium (DHE). Upon reperfusion, DHE was rapidly oxidized consistent with increased superoxide production following the re-introduction of oxygenated buffer. Inhibiting Complex II during ischemia with dimethyl malonate reduced reperfusion-mediated DHE oxidation. In contrast, the addition of dimethyl succinate, a cell-permeant derivative of succinate, to cardiomyocytes to artificially increase ischemic succinate levels significantly enhanced DHE oxidation at reperfusion. Critically, the selective inhibition of Complex I with rotenone abolished both endogenous and exogenous succinate-driven ROS production. These results are in accordance with a previous work in which Complex II inhibitors, including (dimethyl) malonate, diazoxide, and atpenin A5 (AA5), have all been shown to reduce ROS production in vitro when administered prior to ischemia. Inhibiting succinate accumulation in vivo with dimethyl malonate similarly abolished mitochondrial ROS production, as determined by the mass spectrometry ROS probe MitoB, and superoxide-mediated oxidative damage at

reperfusion. These data therefore indicate that ischaemic succinate levels control the extent of reperfusion ROS through Complex I during IR injury both in vitro and in vivo.

**1. Qual é a relação entre a acumulação de succinato durante isquemia, a reperfusão, e os mamíferos mergulhadores, conforme discutido no texto?**

a) A acumulação de succinato ocorre apenas em mamíferos mergulhadores, o que os torna mais resistentes à isquemia e reperfusão.

**b) A pesquisa original sobre acumulação de succinato durante anaerobiose foi realizada em mamíferos mergulhadores, sugerindo que esse acúmulo pode ser uma assinatura universal da isquemia.**

c) Mamíferos mergulhadores não apresentam acúmulo de succinato durante isquemia, diferentemente de outros mamíferos.

d) A acumulação de succinato não tem relação com a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) durante reperfusão no coração de mamíferos mergulhadores.

e) O acúmulo de succinato durante a isquemia em mamíferos mergulhadores indica que eles são menos propensos a danos causados por reperfusão.

Explicação:

Alternativa b:

Esta é a resposta correta. O texto afirma: "A group first demonstrated elevations in succinate during anaerobiosis in their work on diving mammals in 1975. Since then, ischemic succinate build-up has been observed...". Isso indica que a pesquisa inicial sobre a acumulação de succinato durante a anaerobiose foi feita em mamíferos mergulhadores, e essa acumulação é considerada uma assinatura universal da isquemia.

Alternativa a:

Está incorreta porque, apesar de a pesquisa inicial sobre succinato ter sido feita em mamíferos mergulhadores, o texto não diz que a acumulação de succinato ocorre exclusivamente nesses animais. Pelo contrário, o acúmulo foi observado em várias espécies e é considerado uma assinatura universal da isquemia.

Alternativa c:

Está incorreta porque o texto não sugere que os mamíferos mergulhadores não acumulam succinato durante a isquemia. Pelo contrário, foi observado que o acúmulo de succinato é uma resposta comum em várias espécies, incluindo os mamíferos mergulhadores.

Alternativa d:

Está incorreta porque o texto menciona que o succinato é um "attractive candidate for a potential electron source for ROS production at reperfusion", ou seja, ele pode estar envolvido na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante a reperfusão, o que sugere uma ligação entre o acúmulo de succinato e a produção de ROS.

Alternativa e:

Está incorreta porque o texto não sugere que o acúmulo de succinato indica uma menor propensão a danos causados por reperfusão em mamíferos mergulhadores. Pelo contrário, o papel exato do succinato durante a isquemia e reperfusão ainda não foi totalmente elucidado, conforme mencionado no texto: "The exact role of ischemic succinate, however, and the physiological basis behind its striking accumulation remain to be fully elucidated."

**2. O succinato é usado durante os primeiros minutos de reperfusão, qual a relação entre os níveis de succinato e a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) neste período?**

**a) A diminuição rápida dos níveis de succinato usado pela succinato desidrogenase durante a reperfusão sugere que essa reação está envolvida na rápida e intensa produção de ROS .**

b) A rápida oxidação de succinato a fumarato sugere que os níveis de ROS permanecem estáveis durante toda a reperfusão.

c) A oxidação de succinato a fumarato diminui a produção de ROS durante a reperfusão.

d) O succinato não é um contribuinte significativo para a produção de ROS durante a reperfusão, pois é rapidamente perdido do tecido.

e) A produção de ROS não está relacionada aos níveis de succinato, já que ele é rapidamente oxidado.

Resposta correta:

Explicação:

Alternativa a:

Esta é a resposta correta. O texto menciona que "the burst of mitochondrial ROS production occurs within the first few minutes of reperfusion" e que "succinate is abruptly lost from the tissue upon reperfusion." Isso sugere que a rápida oxidação do succinato pela succinato desidrogenase (parte do Complexo II) está diretamente ligada à rápida e intensa produção de ROS durante esse período.

Alternativa b:

Está incorreta porque o texto não sugere que os níveis de ROS permanecem estáveis. Pelo contrário, a produção de ROS é descrita como um "burst" (explosão), o que implica um aumento rápido e significativo, não estabilidade.

Alternativa c:

Está incorreta porque a oxidação de succinato a fumarato não diminui a produção de ROS. Na verdade, o texto sugere que essa oxidação está relacionada à produção rápida e intensa de ROS.

Alternativa d:

Está incorreta porque o succinato é descrito como um "highly attractive candidate for driving reperfusion mediated ROS production," indicando que ele é um contribuinte significativo para a produção de ROS durante a reperfusão.

Alternativa e:

Está incorreta porque o texto claramente indica uma relação entre os níveis de succinato e a produção de ROS. A produção de ROS está ligada à rápida oxidação do succinato, e não há evidência de que a produção de ROS não esteja relacionada aos níveis de succinato.

**3. Considerando os mecanismos pelos quais o Complexo I pode produzir superóxido, baseado no texto qual das seguintes afirmações é logicamente correta sobre a contribuição do Complexo I para a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) durante a reperfusão?**

a) A produção de superóxido via transporte direto de elétrons no Complexo I é a principal fonte de ROS durante a reperfusão.

b) A inibição do Complexo I durante a reperfusão diminui a produção de superóxido pela NADPH oxidase por transporte reverso.

c) A produção de ROS por outras fontes, como NADPH oxidases e xantina oxidase, são as principais causas de danos durante a reperfusão, não há o envolvimento do Complexo I.

**d) O mecanismo de produção de superóxido que envolve o transporte reverso de elétrons (RET) contribui significativamente para a produção de ROS na reperfusão, pois o uso de rotenona, protege contra o dano oxidativo.**

e) O transporte reverso de elétrons (RET) no Complexo I não contribui significativamente para a produção de ROS durante a reperfusão, pois ocorre em um ambiente com baixa razão NADH/NAD<sup>+</sup>.

Explicação:

Alternativa d:

Está correta porque a inibição do Complexo I com rotenona, na verdade, reduz a produção de ROS por RET. O texto indica que a inibição do transporte direto de elétrons pelo Complexo I não contribui significativamente para a produção de ROS. Porém, a inibição diminui a produção de superóxido via RET.

Alternativa a:

Está incorreta porque o texto sugere que o transporte direto de elétrons, promovido pelo Complexo I, não é a principal fonte de ROS durante a reperfusão, uma vez que a inibição desse complexo com rotenona protege contra o dano oxidativo.

Alternativa b:

Esta é a resposta correta. O texto menciona que "Given that rotenone has been shown to be protective against oxidative damage during IR, it is unlikely that superoxide produced via this mechanism [direct electron transport] contributes

significantly to reperfusion induced ROS production." Isso indica que a produção de superóxido via RET, e não via transporte direto de elétrons, é mais provável de contribuir significativamente para a produção de ROS durante a reperfusão. Além disso a inibição do complexo I não tem nada a ver com a ação da NADPH oxidases.

Alternativa c:

Está incorreta porque, embora outras fontes de ROS, como NADPH oxidases e xantina oxidase, possam contribuir para os danos, o texto sugere que o Complexo I é uma fonte inicial e significativa de ROS durante a reperfusão. Essas outras fontes de ROS são ativadas mais tarde na patologia.

Alternativa e:

Está incorreta porque o texto sugere que o transporte reverso de elétrons (RET) no Complexo I é, sim, um contribuidor significativo para a produção de ROS durante a reperfusão. A razão NADH/NAD<sup>+</sup> elevada não é necessária para a ocorrência do RET, mas sim uma pool de CoQ altamente reduzida e um potencial de membrana mitocondrial elevado.

**4. Com base no texto, qual é o efeito de dimetil malonato, dimetil Succinato, rotenona, dihidroetídio e diazóxido na produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) mitocondriais durante a reperfusão em cardiomiócitos de ratos?**

a) Dimetil malonato aumenta a oxidação de DHE e, conseqüentemente, a produção de ROS durante a reperfusão.

**b) Rotenona inibe a produção de ROS induzida pelo succinato durante a reperfusão, bloqueando a oxidação de DHE.**

c) Dihidroetídio (DHE) reduz a produção de ROS ao inibir o Complexo I durante a reperfusão.

d) Diazóxido aumenta a produção de ROS durante a reperfusão, promovendo a oxidação de DHE.

e) A administração de dimetil succinato durante a isquemia inibe a oxidação de DHE durante a reperfusão, reduzindo a produção de ROS.

Explicação:



Alternativa b:

Esta é a resposta correta. O texto afirma que "the selective inhibition of Complex I with rotenone abolished both endogenous and exogenous succinate-driven ROS production." Isso significa que a rotenona, ao inibir o Complexo I, bloqueia a produção de ROS induzida pelo succinato, impedindo a oxidação do DHE durante a reperfusão.

Alternativa a:

Está incorreta porque o texto menciona que o dimetil malonato, que inibe o Complexo II, "reduced reperfusion-mediated DHE oxidation," ou seja, diminuiu a oxidação do DHE e, conseqüentemente, a produção de ROS, em vez de aumentá-la.

Alternativa c:

Está incorreta porque o dihidroetídio (DHE) é usado como uma sonda fluorescente para rastrear a produção de ROS, e não para inibir o Complexo I. O texto diz que o DHE é oxidado, indicando aumento na produção de ROS, e não que ele inibe a produção de ROS.

Alternativa d:

Está incorreta porque o texto menciona que o diazóxido é um inibidor do Complexo II, e "have all been shown to reduce ROS production in vitro when administered prior to ischemia." Portanto, o diazóxido reduz a produção de ROS, em vez de aumentá-la.

Alternativa e:

Está incorreta porque o texto afirma que "the addition of dimethyl succinate... significantly enhanced DHE oxidation at reperfusion," indicando que o dimetil succinato aumenta, e não inibe, a oxidação de DHE e, conseqüentemente, a produção de ROS durante a reperfusão.

## Texto 2

Bacteria encounter numerous environmental stresses during their life cycle and need to respond quickly and efficiently to survive. There are several stress signaling pathways that enable bacterial adaptation, including some that rely on small nucleotide messengers. The stringent response is a ubiquitous stress signaling pathway that enables bacteria to respond to nutrient starvation. During the stringent response, there is an accumulation of the alarmone guanosine tetraphosphate (ppGpp) and guanosine pentaphosphate (pppGpp –

also referred as (p)ppGpp). These nucleotides are produced by members of the RSH (RelA/ SpoT homologue) protein superfamily and are formed from GDP and GTP, respectively. More recently, the presence of a third member of this family, guanosine 5'-monophosphate 3'-diphosphate (pGpp), was confirmed in numerous studies. pppGpp has many intracellular targets, including protein and RNA molecules, which enables several aspects of bacterial metabolism and physiology to be activated or inhibited during the stringent response. Some pppGpp-binding targets are common across the Bacteria, whereas others are specific to the lifestyle and niche of a species. As pppGpp is such a widespread signalling nucleotide, it has been the focus of intense study in recent years.

The discovery of phosphorylated nucleotides is by no means recent, with both (p)ppGpp and (p)ppApp discovered more than 50 years ago. In the case of (p)ppGpp, work by Cashel and Gallant identified two unusual phosphorylated compounds after *Escherichia coli* was deprived of amino acids. These nucleotides controlled a decrease in synthesis of stable RNAs, such as tRNA and ribosomal RNA (rRNA), during starvation, commencing research into the stringent response. It is now well known that enzymes from the RSH superfamily are responsible for the synthesis and hydrolysis of pppGpp. Synthesis requires the transfer of a pyrophosphate group from ATP to the 3'-OH group of the ribose moiety of GTP, GDP or GMP, achieved by nucleophilic attack of the  $\beta$ -phosphate of ATP by the 3'-OH of GTP, GDP or GMP. RSH enzymes with catalytically active hydrolase domains (HD domains) are also able to hydrolyse pppGpp by removing a pyrophosphate group to produce GTP, GDP or GMP. The RSH superfamily is divided into three groups: long RSH enzymes, small alarmone synthetases (SASs) and small alarmone hydrolases (SAHs).

Several interaction partners have been shown to regulate the enzymatic activity of long RSH proteins. For example, SpoT from *E. coli* interacts with the uncharged acyl carrier protein (ACP) and YtfK to respond to fatty acid starvation, as well as the *E. coli*  $\sigma$ 70-binding protein Rsd to sense carbon starvation, whereas RelA are regulated by stalled ribosomes. The way in which RelA sense starved ribosomes has long been disputed, with theories suggesting that RelA from *E. coli* could 'hop' between different ribosomes to sense the charged status of tRNAs, or that (p)ppGpp was produced following dissociation of active RelA

from the ribosome, as opposed to only when bound. In recent years, much of how long RSH enzymes sense amino acid starvation was clarified, with publications of biochemical studies and a number of cryo-electron microscopy structures of RelA from *E. coli* in complex with the stalled ribosome. When not bound to the ribosome, RelA adopts a closed conformation that favours (p)ppGpp hydrolysis. Cryo-electron microscopy structures revealed that on ribosome binding, RelA adopts an open conformation that favours (p)ppGpp synthesis. Uncharged tRNA is not required for this initial RelA or Rel binding event, but it does stabilize the interaction and promotes synthesis. When bound, the TGS, ACT/RNA recognition motif and zinc-finger/conserved cysteine domains of the C-terminal region of RelA interact with the A-site finger element and the uncharged tRNA, while the enzymatic region extends away from the ribosome, producing (p)ppGpp. (p)ppGpp can also allosterically bind to the N-terminal domain of RelA and positively influence its own synthesis, ensuring that production is fully induced in response to amino acid starvation.

**5. Qual é o papel da resposta rígida (stringent response) nas bactérias durante a falta de nutrientes, e quais moléculas são acumuladas como resultado desse processo?**

a) A resposta rígida permite que as bactérias se adaptem a condições de abundância de nutrientes, acumulando nucleotídeos como ATP e ADP.

b) Durante a resposta rígida, as bactérias aumentam a produção de proteínas para compensar a falta de nutrientes, acumulando nucleotídeos como cAMP e cGMP.

**c) A resposta rígida é um mecanismo que permite às bactérias responder à falta de nutrientes, resultando na acumulação dos alarmones ppGpp e pppGpp.**

d) As bactérias utilizam a resposta rígida para aumentar a disponibilidade de nutrientes, acumulando moléculas de GDP e GTP.

e) Durante a resposta rígida, as bactérias degradam os nucleotídeos ppGpp e pppGpp para gerar energia durante a escassez de nutrientes.

### **Alternativa c:**

Esta é a resposta correta. O texto afirma que "The stringent response is a ubiquitous stress signaling pathway that enables bacteria to respond to nutrient starvation" e que durante esse processo ocorre a "accumulation of the alarmones guanosine tetraphosphate (ppGpp) and guanosine pentaphosphate (pppGpp)." Portanto, a resposta rígida permite que as bactérias respondam à falta de nutrientes acumulando essas moléculas específicas.

### Alternativa a:

Está incorreta porque a resposta rígida é um mecanismo de resposta à falta de nutrientes, não à abundância. Além disso, o texto não menciona a acumulação de ATP e ADP durante esse processo.

### Alternativa b:

Está incorreta porque o texto não menciona um aumento na produção de proteínas como resposta à falta de nutrientes, nem a acumulação de cAMP e cGMP. Os nucleotídeos acumulados são ppGpp e pppGpp, não cAMP e cGMP.

### Alternativa d:

Está incorreta porque, embora ppGpp e pppGpp sejam derivados de GDP e GTP, o texto indica que durante a resposta rígida, esses nucleotídeos (ppGpp e pppGpp) são acumulados, e não GDP e GTP.

### Alternativa e:

Está incorreta porque o texto menciona que os nucleotídeos ppGpp e pppGpp são acumulados, não degradados, durante a resposta rígida em resposta à fome de nutrientes. A função da resposta rígida é permitir que as bactérias respondam ao estresse, e não gerar energia através da degradação desses nucleotídeos.

**6. Qual é o papel dos nucleotídeos pppGpp e ppGpp durante a resposta rígida nas bactérias, e como eles afetam diferentes aspectos do metabolismo e da fisiologia bacteriana?**

- a) Os nucleotídeos pppGpp e ppGpp inibem exclusivamente a síntese de proteínas durante a resposta rígida, sem afetar outros processos celulares.
- b) Durante a resposta rígida, pppGpp e ppGpp se ligam apenas a moléculas de RNA, inibindo a transcrição gênica em todas as bactérias.
- c) Os nucleotídeos pppGpp e ppGpp têm como alvos várias moléculas intracelulares, permitindo que diferentes aspectos do metabolismo e da fisiologia bacteriana sejam ativados ou inibidos.**
- d) A função de pppGpp e ppGpp é exclusivamente ativar processos metabólicos, sem inibir qualquer aspecto da fisiologia bacteriana.
- e) Os alvos de pppGpp e ppGpp são idênticos em todas as espécies bacterianas, independentemente do estilo de vida ou nicho ecológico.

Alternativa c:

Esta é a resposta correta. O texto afirma que "pppGpp or ppGpp has many intracellular targets, including protein and RNA molecules, which enables several aspects of bacterial metabolism and physiology to be activated or inhibited during the stringent response." Isso significa que pppGpp e ppGpp se ligam a vários alvos intracelulares, como proteínas e RNA, permitindo a ativação ou inibição de diferentes processos metabólicos e fisiológicos durante a resposta rígida.

Alternativa a:

Está incorreta porque o texto menciona que pppGpp e ppGpp têm muitos alvos intracelulares, incluindo proteínas e RNA, e não apenas inibem a síntese de proteínas. Eles também podem ativar ou inibir outros processos celulares.

Alternativa b:

Está incorreta porque o texto diz que pppGpp e ppGpp se ligam a várias moléculas intracelulares, não apenas a RNA. Além disso, esses nucleotídeos

têm alvos diferentes e não inibem universalmente a transcrição gênica em todas as bactérias.

Alternativa d:

Está incorreta porque o texto claramente afirma que pppGpp e ppGpp podem tanto ativar quanto inibir aspectos do metabolismo e da fisiologia bacteriana, não apenas ativar processos metabólicos.

Alternativa e:

Está incorreta porque o texto afirma que "Some pppGpp-binding targets are common across the Bacteria, whereas others are specific to the lifestyle and niche of a species," indicando que os alvos de pppGpp e ppGpp podem variar entre diferentes espécies bacterianas, dependendo de seu estilo de vida e nicho ecológico.

7. Como ocorre a síntese de pppGpp, e qual é o papel do ATP nesse processo?

a) A síntese de pppGpp requer a transferência de um grupo fosfato do GTP para o ATP, usando o 3'-OH do ATP como nucleófilo.

b) O ATP fornece energia para a síntese de pppGpp, mas não participa diretamente na transferência de grupos fosfato.

**c) A síntese de pppGpp envolve a transferência de um grupo pirofosfato do ATP para o 3'-OH do GTP, GDP ou GMP, através do ataque nucleofílico do 3'-OH ao  $\beta$ -fosfato do ATP.**

d) Durante a síntese de pppGpp, o 3'-OH do ATP ataca o GTP, GDP ou GMP, transferindo um grupo pirofosfato para esses nucleotídeos.

e) A transferência de um grupo pirofosfato durante a síntese de pppGpp ocorre entre dois ATPs, sem a participação de GTP, GDP ou GMP.

Alternativa c:

Esta é a resposta correta. O texto afirma que "Synthesis of pppGpp requires the transfer of a pyrophosphate group from ATP to the 3'-OH group of the ribose moiety of GTP, GDP or GMP, achieved by nucleophilic attack of the  $\beta$ -phosphate of ATP by the 3'-OH of GTP, GDP or GMP." Isso significa que a síntese de pppGpp envolve a transferência de um grupo pirofosfato do ATP para o 3'-OH do GTP, GDP ou GMP, onde o ataque nucleofílico ocorre a partir do 3'-OH desses nucleotídeos ao  $\beta$ -fosfato do ATP.

Alternativa a:

Está incorreta porque o texto especifica que o ATP transfere um grupo pirofosfato para o GTP, GDP ou GMP, não o contrário. Além disso, o nucleófilo é o 3'-OH do GTP, GDP ou GMP, não do ATP.

Alternativa b:

Está incorreta porque, além de fornecer energia, o ATP participa diretamente na transferência do grupo pirofosfato para o 3'-OH do GTP, GDP ou GMP, o que é um ponto essencial mencionado no texto.

Alternativa d:

Está incorreta porque o ataque nucleofílico é feito pelo 3'-OH do GTP, GDP ou GMP, não pelo 3'-OH do ATP. O texto claramente descreve que é o GTP, GDP ou GMP que ataca o ATP, e não o contrário.

Alternativa e:

Está incorreta porque o texto afirma que a síntese de pppGpp envolve a participação de GTP, GDP ou GMP na transferência do grupo pirofosfato, não dois ATPs.

8. Qual é a função das enzimas RSH com domínios hidrolase ativos (HD domains), e como a superfamília RSH é classificada?

a) As enzimas RSH com domínios hidrolase ativos (HD domains) sintetizam pppGpp e a superfamília RSH é dividida em duas classes principais: SASs e SAHs.

**b) As enzimas RSH com domínios hidrolase ativos (HD domains) hidrolisam pppGpp, removendo um grupo pirofosfato e produzindo GTP, GDP ou GMP. A superfamília RSH é dividida em três grupos: long RSH, SASs e SAHs.**

c) As enzimas RSH com domínios hidrolase ativos (HD domains) removem um grupo fosfato do GTP, GDP ou GMP, produzindo pppGpp. A superfamília RSH é dividida em long RSH e SASs.

d) As enzimas RSH com domínios hidrolase ativos (HD domains) hidrolisam pppGpp para formar ATP, e a superfamília RSH é dividida em três grupos: long RSH, SASs e SAHs.

e) As enzimas RSH com domínios hidrolase ativos (HD domains) convertem pppGpp em cAMP, e a superfamília RSH é dividida em duas classes principais: SASs e SAHs.

Explicação:

Alternativa b:

Esta é a resposta correta. O texto afirma que "RSH enzymes with catalytically active hydrolase domains (HD domains) are also able to hydrolyse pppGpp by removing a pyrophosphate group to produce GTP, GDP or GMP" e que "The RSH superfamily is divided into three groups: long RSH enzymes, small alarmone synthetases (SASs) and small alarmone hydrolases (SAHs)." Portanto, as enzimas RSH com domínios hidrolase ativos hidrolisam pppGpp para produzir GTP, GDP ou GMP e a superfamília RSH é classificada em três grupos.



Alternativa a:

Está incorreta porque o texto menciona que as enzimas RSH com domínios hidrolase ativos hidrolisam pppGpp, não o sintetizam. Além disso, a superfamília RSH é dividida em três grupos (long RSH, SASs e SAHs), não dois.

Alternativa c:

Está incorreta porque o texto afirma que as enzimas RSH com domínios hidrolase removem um grupo pirofosfato de pppGpp para formar GTP, GDP ou GMP, e não o contrário.

Alternativa d:

Está incorreta porque o texto não menciona que as enzimas RSH hidrolisam pppGpp para formar ATP. As enzimas hidrolisam pppGpp para produzir GTP, GDP ou GMP.

Alternativa e:

Está incorreta porque o texto não menciona a conversão de pppGpp em cAMP pelas enzimas RSH. Além disso, a superfamília RSH é dividida em três grupos, não dois.

**9. Como a atividade enzimática das proteínas RSH longas é regulada, e quais são os parceiros de interação que controlam essa atividade em resposta à privação de nutrientes em E. coli?**

a) As proteínas RSH longas em E. coli são reguladas exclusivamente pela interação com ribossomos, que respondem à privação de ácidos graxos e carbono.

b) SpoT em E. coli interage com o ACP carregado e com o YtfK para responder à privação de ácidos graxos.

**c) SpoT em E. coli interage com o ACP descarregado e com o YtfK para responder à privação de ácidos graxos.**

d) RelA é regulada pela interação com a proteína Rsd em resposta à privação de carbono e ácidos graxos em E. coli.

e) As proteínas RSH longas não têm parceiros de interação específicos e são reguladas de maneira independente de outros fatores.

Alternativa c:

Esta é a resposta correta. O texto afirma que "SpoT from *E. coli* interacts with the uncharged acyl carrier protein (ACP) and YtfK to respond to fatty acid starvation, as well as the *E. coli*  $\sigma$ 70-binding protein Rsd to sense carbon starvation." Isso significa que SpoT interage com o ACP descarregado e YtfK em resposta à privação de ácidos graxos.

Alternativa a:

Está incorreta porque, embora as proteínas RSH longas possam ser reguladas por ribossomos, o texto especifica que SpoT responde à privação de ácidos graxos e carbono através de interações com outros parceiros, como ACP, YtfK e Rsd, não exclusivamente com ribossomos.

Alternativa b:

Está incorreta porque o texto afirma que SpoT interage com o ACP descarregado, não carregado, para responder à privação de ácidos graxos.

Alternativa d:

Está incorreta porque o texto não menciona que RelA é regulada pela proteína Rsd. RelA é regulada por ribossomos parados, enquanto a proteína Rsd regula a resposta à privação de carbono através de sua interação com  $\sigma$ 70.

Alternativa e:

Está incorreta porque o texto claramente menciona que a atividade enzimática das proteínas RSH longas é regulada por vários parceiros de interação específicos, como ACP, YtfK, Rsd, e ribossomos.

**10. Qual das afirmações a seguir está correta sobre a conformação e a atividade da RelA em relação à síntese e hidrólise de (p)ppGpp?**

- a) RelA adota uma conformação aberta que favorece a hidrólise de (p)ppGpp quando não está ligada ao ribossomo.
- b) A ligação da tRNA descarregado ao ribossomo é necessária para que RelA se ligue ao ribossomo e inicie a síntese de (p)ppGpp.
- c) Quando ligada ao ribossomo, RelA adota uma conformação fechada que favorece a síntese de (p)ppGpp.
- d) A conformação de RelA não é afetada pela ligação ao ribossomo e permanece a mesma tanto para a síntese quanto para a hidrólise de (p)ppGpp.
- e) RelA adota uma conformação aberta ao se ligar ao ribossomo, o que favorece a síntese de (p)ppGpp, enquanto a conformação fechada (não ligada ao ribossomo) favorece a hidrólise de (p)ppGpp.**

Alternativa e:

Esta é a resposta correta. O texto afirma que "RelA adopts a closed conformation that favours (p)ppGpp hydrolysis" quando não está ligada ao ribossomo, e que "on ribosome binding, RelA adopts an open conformation that favours (p)ppGpp synthesis." Portanto, a conformação fechada favorece a hidrólise, enquanto a conformação aberta, que ocorre quando RelA está ligada ao ribossomo, favorece a síntese de (p)ppGpp.

Alternativa a:

Está incorreta porque o texto afirma que a conformação fechada favorece a hidrólise de (p)ppGpp quando RelA não está ligada ao ribossomo, não a conformação aberta.

Alternativa b:

Está incorreta porque o texto diz que a tRNA descarregada não é necessária para a ligação inicial de RelA ao ribossomo, mas que estabiliza essa interação e promove a síntese de (p)ppGpp.

Alternativa c:

Está incorreta porque, de acordo com o texto, quando RelA se liga ao ribossomo, ela adota uma conformação aberta, não fechada, que favorece a síntese de (p)ppGpp.

Alternativa d:

Está incorreta porque o texto claramente descreve que a conformação de RelA muda dependendo de sua ligação ao ribossomo: a conformação fechada favorece a hidrólise e a aberta favorece a síntese de (p)ppGpp.