



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE CIENCIAS**

Tesina de graduación para optar al título de Licenciado en Bioquímica

**MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE LA  
PEROXIRREDOXINA 6 HUMANA: CONSECUENCIAS DE SU  
FOSFORILACIÓN Y GLICACIÓN**

**BACH. SANTIAGO SASTRE BARRIOS**

**Tutora:** Dra. Laura Coitiño

**Co-tutora:** Lic. Stephanie Portillo

Laboratorio de Química Teórica y Computacional,  
Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias.

Montevideo, Uruguay

Abril de 2018

Todo comenzó en 2014 y termina aquí. Un largo proceso, con muchas idas y vueltas, que no hubiera sido posible de no ser por numerosas personas que contribuyeron de diversas maneras.

En primer lugar, a mis padres y mi hermana, que siempre estuvieron ahí, desde el principio de **todo**, apoyando, colaborando, queriendo.

En segundo lugar, a mis tutoras, pues nada de esto se hubiera realizado de no ser por la paciencia, colaboración, eterno aguante y saber de ellas. No tengo palabras de **agradecimiento** para ellas.

El tercer lugar pertenece tanto a mí tía Carmen como a mi abuela Gladys. **Siempre** mimando, atendiendo, cuidando.

El cuarto lugar lo **ocupa** el resto de la familia Sastre y Barrios. Mi abuelo Saúl, mi tía Mary, mi tío Leo, mi tío Gustavo, mi tío Daniel y mi tía Rosana. Y obviamente a mis primos; Bruno, Brenda, Lore y Rodri.

El quinto lugar se lo lleva sin duda mi querida secta; Tato, Nachin, Juani, Agus, Vicky. Llevo arrastrando con esta gente desde el principio de secundaria, **infinitas** risas y compañerismo. Mis eternos camaradas.

Dejar el sexto lugar a mis mejores amigas, Pau y Veru, es algo más que natural. Son cinco años de numerosas historias, vivencias, **sonrisas**, de compañerismo y amistad. De no ser por ellas no hubiera pasado ni un tercio de los exámenes.

El séptimo lugar se lo lleva ese hermoso grupo que formé cuando ingresé a facultad. Pensar **en** la facultad sin ellos es como pensar en la playa sin el mar. Sencillamente no se puede. Gracias por tanto: Alejin, Pedrito, Adriancho, Joaco, Mati, Joaquito, Cata, Marcio, Guille, Marcos, Lu, Ana, Cami, Ali, Juli, Jime, Flo, Sofi, Clari y Tania.

El octavo agradecimiento es para mis compañeros en **el** laboratorio, que hacen del LQTC un mejor lugar. Luci, Saira, Flor y Alex.

El último, lejos de ser el menos importante, va para Jenner y Alicia, que me acompañaron día a día en el laboratorio, tener que aguantar mis incoherencias y siempre al firme cuando los necesitaba con todo su **corazón**.

## RESUMEN

La peroxirredoxina 6 humana (hPrdx6) es una enzima perteneciente a la familia de las peroxirredoxinas y cumple diversas funciones claves en el organismo tales como la detoxificación de hidroperóxidos orgánicos (ROOH) y la reparación de membranas peroxidadas a través de una triple acción enzimática que incluye las actividades peroxidática, fosfolipasa *sn*-2 independiente de  $\text{Ca}^{+2}$  (iPLA<sub>2</sub>) y acil-transferasa (LPCAT). Esta proteína experimenta diversas modificaciones post-traduccionales que pueden llegar a modular una o más de sus funciones catalíticas. Por ejemplo, la sobreoxidación de la cisteína catalítica C47 (también denominada C<sub>P</sub>) lleva a la inactivación de la función peroxidática. Por otro lado, la fosforilación del residuo T177 induce un aumento significativo en la función iPLA<sub>2</sub>. También se ha detectado que la modificación con metilglioxal (MGO) en residuos arginina inhibe la actividad peroxidasa.

En esta tesina de grado se propuso como objetivo central estudiar *in silico* dos modificaciones post-traduccionales de hPrdx6, trabajando con el dímero de la proteína: la fosforilación en la T177 y la glicación por MGO en el residuo R132, buscando encontrar explicaciones a nivel de cambios en la estructura atómica y/o electrónica de la macromolécula para el aumento en la actividad iPLA<sub>2</sub> observado al fosforilar y para la inhibición de la actividad peroxidasa por glicación.

Respecto a la fosforilación, se realizaron simulaciones de dinámica molecular convencional (MD) y acelerada (aMD) en escala de sub-microsegundos para obtener estructuras representativas de la proteína modificada bajo condiciones quasi-fisiológicas y explorar la posibilidad de cambios conformacionales locales que permitieran entender el aumento de la actividad iPLA<sub>2</sub>. Se estudió también el modo de unión a dipalmitoílfosocolina (DPPC), ligando natural de la enzima, no hallándose evidencia de base estructural que explique el aumento marcado de la actividad iPLA<sub>2</sub> asociado a la fosforilación.

Para estudiar la glicación sobre R132, tras parametrizar el residuo argipirimidina se simularon 200 ns por MD para seleccionar una estructura representativa sobre la que se analizó la estructura electrónica a nivel QM/MM, evaluando la reactividad intrínseca del residuo C47. En tanto la glicación de R132 lleva a un aumento en la reactividad intrínseca de C<sub>P</sub>, el sitio activo pierde la disposición activa necesaria para la actividad peroxidasa. Por otro lado, mediante simulaciones de MD a pH constante (cpHMD) se tituló el pK<sub>a</sub> de C<sub>P</sub> determinando que cuando R132 se encuentra glicada por MGO el pK<sub>a</sub> de C<sub>P</sub> se aproxima al valor característico para tioles libres en solución.

**Palabras claves:** Peroxirredoxina 6; peroxidasa; iPLA<sub>2</sub>; glicación; fosforilación; simulaciones de dinámica molecular; ONIOM QM/MM.

## **TABLA DE SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS**

**Prdx** – Abreviatura referida a la familia de las peroxirredoxinas.

**C<sub>P</sub>** – Cisteína peroxidática.

**C<sub>R</sub>** – Cisteína resolutive.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrógeno.

**ONOOH** – Ácido peroxinitroso.

**ROOH** – Hidroperóxido orgánico.

**NADH** – Nicotinamida adenina dinucleótido.

**NADPH** – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

**AhpC** – Alquil hidroperóxido reductasa C.

**oxyR** – Operón bacteriano que regula los genes relacionados al estrés oxidativo.

**ASK1** – Quinasa reguladora de señal de apoptosis 1.

**PTP** – Proteín tirosin fosfatasa.

**PTEN** – Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa.

**TXNPX** – Triparredoxina peroxidasa.

**hPrdx5** – Peroxirredoxina 5 humana.

**hPrdx6** – Peroxirredoxina 6 humana.

**rPrdx6** – Peroxirredoxina 6 de rata.

**K<sub>M</sub>** – Constante de Michaelis-Menten.

**iPLA<sub>2</sub>** – Actividad enzimática fosfolipasa sn-2 de forma independiente de Ca<sup>+2</sup>

**LCAT** – Actividad enzimática liso-acil transferasa.

**GSH** – Glutatión.

**πGST** – Glutatión π transferasa.

**PTM** – Modificación post-traducciona.

**Prdx6-SOH** – Peroxirredoxina 6 humana con la C<sub>P</sub> oxidada a sulfénico.

**Prdx6-S<sup>-</sup>** – Peroxirredoxina 6 humana con la C<sub>P</sub> reducida en estado de tiolato con la R132 nativa.

**gPrdx6-S<sup>-</sup>** – Peroxirredoxina 6 humana con la C<sub>P</sub> reducida en estado de tiolato, y con la R132 como argpirimidina.

**gPrdx6-SH** – Peroxirredoxina 6 humana con la C<sub>P</sub> reducida en estado de tiol, y con la R132 como argpirimidina.

**HOMO** – Orbital de frontera ocupado de mayor energía.

**LUMO** – Orbital de frontera virtual de menor energía.

**cMD** – Dinámica molecular convencional.

**aMD** – Dinámica molecular acelerada.

**cpHMD** – Dinámica molecular a pH constante.

**PCA** – Análisis de componentes principales.

**R<sub>g</sub>** – Radio de giro.

**SASA** – Área superficial accesible al solvente.

**pK<sub>a</sub>** – Medida de la fuerza de un ácido. Definido matemáticamente como  $-\log K_a$

**DFT** – Teoría del funcional de la densidad.

|  |    |
|--|----|
| 1 INTRODUCCIÓN.....  | 01 |
| 1.1 Generalidades de las peroxirredoxinas .....  | 02 |
| 1.2 Estructura y oligomerización de las peroxirredoxinas .....   | 03 |
| 1.3 Sitio activo y mecanismos de las peroxirredoxinas.....   | 05 |
| 1.4 Características estructurales y funcionales de hPrdx6 .....  | 07 |
| 1.5 Modificaciones post-traduccionales de hPrdx6 y sus efectos<br>moduladores.....                                     | 11 |
| 2 OBJETIVOS.....   | 13 |
| 2.1 Objetivo general.....  | 14 |
| 2.2 Objetivos específicos.....   | 14 |
| 2.2.1 Analizar cambios en la estructura y dinámica de hPrdx6 por<br>fosforilación.....                                 | 14 |
| 2.2.1 Analizar cambios en la estructura y dinámica de hPrdx6 y<br>propiedades de la C <sub>P</sub> por glicación ..... | 14 |
| 3 METODOLOGÍA .....  | 15 |
| 3.1 Simulaciones de dinámica molecular convencional y acelerada.....   | 16 |
| 3.2 Descriptores estructurales del estado molten globule .....   | 18 |
| 3.2.1 Radio de giro.....   | 18 |
| 3.2.2 Superficie expuesta al solvente.....   | 19 |
| 3.2.3 Porcentaje de $\alpha$ -hélice.....  | 19 |
| 3.3 Análisis de trayectoria por componentes principales para aMD .....   | 19 |
| 3.4 Energía de unión ligando-proteína con MM/PB(GB)SA .....  | 20 |
| 3.5 pK <sub>a</sub> de la C <sub>P</sub> en hPrdx6 con R132/R*132 por MD a pH constante .....                          | 20 |
| 3.6 Determinación de la reactividad y nucleofilia de C <sub>P</sub> con ONIOM: QM/MM<br>.....                          | 21 |
| 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....  | 23 |
| 4.1 Estructura representativa de Prdx6-SOH en solución .....   | 24 |
| 4.2 Caracterización de la estructura tipo <i>molten globule</i> de pPrdx6-SOH ..                                       | 30 |
| 4.3 Análisis estructural entre pPrdx6-SOH y Prdx6-SOH.....   | 38 |
| 4.4 Complejo Prdx6-DPPC: análisis estructural y cálculo de $\Delta G$ de unión .                                       | 43 |
| 4.5 Estudio y dinámica en solución de Prdx6-S <sup>-</sup> y gPrdx6S <sup>-</sup> .....                                | 45 |
| 4.6 Análisis de la reactividad de gPrdx6-S <sup>-</sup> con el método QM/MM ONIOM                                      | 53 |
| 5 CONCLUSIÓN .....   | 56 |
| 5.1 Conclusiones .....   | 57 |
| 6 BIBLIOGRAFÍA.....  | 59 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>7 ANEXO</b> .....  | <b>69</b> |
| <b>7.1 Parámetros del residuo modificado argpirimidina</b> .....                          | <b>70</b> |
| <b>7.2 Fundamento teórico del análisis de componentes principales</b> .....               | <b>70</b> |
| <b>7.3 Estructura secundaria de los motivos de plegamiento tipo tiorredoxina</b><br>..... | <b>72</b> |
| <b>7.4 Superposición de estructuras representativas de gPrdx6-S<sup>-</sup></b> .....     | <b>72</b> |
| <b>7.5 pK<sub>a</sub> de la C92 en hPrdx6 con R132/R*132</b> .....                        | <b>73</b> |
| <b>7.6 Superposición de estructuras representativas de gPrdx6-SH</b> .....                | <b>74</b> |
| <b>7.7 Orbitales HOMO de KS de Prdx6-S<sup>-</sup> y gPrdx6-S<sup>-</sup></b> .....       | <b>74</b> |

## **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1 Generalidades de las peroxirredoxinas

Las peroxirredoxinas (EC 1.11.1.15), son una familia de enzimas antioxidantes que cumplen un rol fundamental en la detoxificación de hidroperóxidos<sup>1</sup>. Se encuentran presentes en todos los dominios de la vida, y presentan una localización subcelular variada: dentro de organelos, en el citosol, asociada a membranas o incluso en el exterior celular<sup>2</sup>. En la catálisis utilizan un sistema tiol-dependiente, donde la cisteína peroxidática ( $C_P$ ) en forma de tiolato, se oxida por un hidroperóxido a ácido sulfénico ( $C_P$ -SOH)<sup>3</sup>. Posteriormente este sulfénico es resuelto por una segunda cisteína (denominada cisteína resolutive,  $C_R$ ) o puede reducirse por un reductor fisiológico<sup>1,3</sup>. En cuanto a la abreviatura utilizada para hacer referencia a las peroxirredoxinas, en la bibliografía se manejan las siglas Prx o Prdx<sup>4</sup>, siendo esta última preferida por Fisher (uno de los investigadores que más ha contribuido al estudio de la peroxirredoxina 6, centro de esta tesis) debido al uso anterior de la sigla PRX para identificar a los genes que codifican las proteínas de la familia *paired-related homeobox*<sup>5</sup>.

Uno de los principales roles fisiológicos de las peroxirredoxinas es el de actuar como sistema antioxidante, evitando así el daño a macromoléculas funcionales de la célula. Se han realizado numerosos estudios que vinculan su rol con un efecto citoprotector y preventivo de la apoptosis por daño oxidativo<sup>6-8</sup>. Esta función es de gran relevancia en patógenos intracelulares, como micobacterias o protozoos del tipo tripanosomátidos, ya que una de las primeras respuestas del hospedero es la liberación de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno por los macrófagos<sup>9</sup>. La eficiencia de las Prdx en la detoxificación del ácido peroxinitroso (ONOOH)<sup>10,11</sup>, un poderoso agente nitrante y oxidante producido durante condiciones de estrés oxidativo, ayuda a la sobrevivencia de los parásitos<sup>9</sup>. La mayoría de las bacterias reducen peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) e hidroperóxidos orgánicos (-ROOH) a expensas de NADH o NADPH mediante el sistema disulfuro reductasa FAD-dependiente (AhpF) y peroxidasa tipo peroxirredoxina (AhpC). En bacterias ambos genes se encuentran controlados bajo el operón oxyR<sup>12</sup>, encargado de la respuesta al estrés oxidativo. En algunos organismos, como *Micobacterium tuberculosis*, que no contiene el operón oxyR, AhpC se expresa de forma constitutiva en baja cantidad, y de esta forma, cuando la catalasa falla en la detoxificación de peróxido, AhpC puede permitir la sobrevivencia de la bacteria.

En muchos sistemas eucariotas el  $H_2O_2$  tiene un rol clave en diversos procesos biológicos, como la proliferación celular, la diferenciación, la migración o la apoptosis<sup>13</sup>, actuando como segundo mensajero mediante la oxidación de factores de transcripción (ASK1)<sup>3,14</sup>. Las Prdx tienen un rol relevante en la regulación de estas vías, debido a su alta eficiencia en la reducción de  $H_2O_2$ . De hecho, la respuesta celular frente al  $H_2O_2$  varía según la cantidad, actividad y concentraciones de los antioxidantes que se encuentren presentes, así como su distribución<sup>13</sup>. El  $H_2O_2$  actúa oxidando diversas proteínas, como las proteínas tirosin fosfatasa (PTPs)<sup>15</sup> y fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN)<sup>14</sup>. Debido a que la velocidad de la reacción es mucho menor que la de Prdx<sup>16</sup>, estas deben inhibirse transitoriamente para que el  $H_2O_2$  pueda reaccionar<sup>17</sup>.

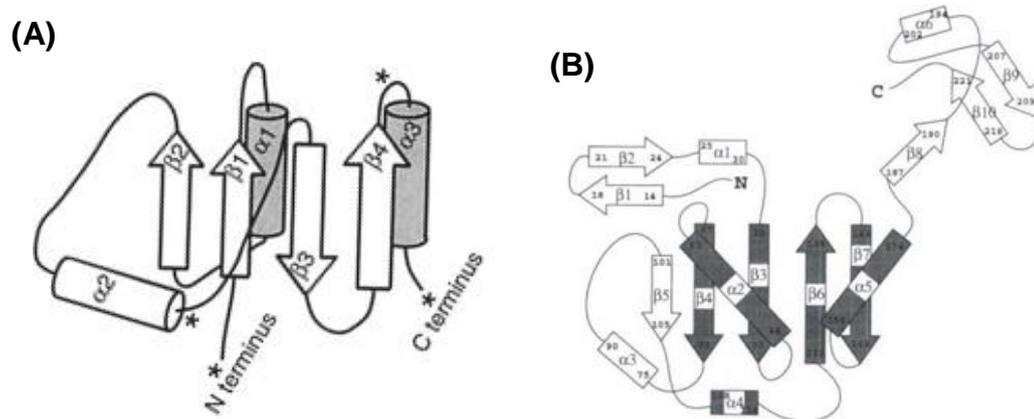
Las Prdx son blanco de modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación, la cual las inactiva frente a determinada señal externa<sup>18,19</sup>. Otra forma de inactivar su actividad peroxidasa es mediante la sobreoxidación de la  $C_P$ , donde la  $C_P$ -SOH se vuelve a oxidar a  $C_P$ -SO<sub>2</sub>(H) o  $C_P$ -SO<sub>3</sub>(H) en lugar de formar un enlace disulfuro<sup>20</sup> con la  $C_R$ . La sobreoxidación para algunos tipos de peroxirredoxinas es un

proceso reversible mediante la enzima sulfirredoxina dependiente de ATP, restaurando la actividad de la enzima<sup>21</sup>.

Existen varios criterios para clasificar las peroxirredoxinas. Se pueden clasificar según el número de cisteínas conservadas involucradas en la catálisis y a su vez según la ubicación  $C_P$  y  $C_R$ , cuando la segunda está presente, existiendo así 3 grupos: las Prdx 1-Cys, las Prdx 2-Cys típicas y las Prdx 2-Cys atípicas. Las *Prdx 1-Cys* presentan una única cisteína conservada en el ciclo catalítico. La distinción entre *Prdx 2-Cys típicas* o *atípicas*, que presentan dos cisteínas conservadas en el ciclo catalítico, radica en la ubicación de la  $C_R$ , según se encuentre en diferentes monómeros o en el mismo respectivamente<sup>1,22,23</sup>. Más adelante, en la sección 1.3, se detallarán otras diferencias entre el ciclo catalítico de estos tipos de Prdx. Otro criterio para clasificar las peroxirredoxinas se basa en utilizar herramientas bioinformáticas para analizar fragmentos de secuencia funcionalmente relevantes en el entorno de los residuos claves requeridos para la actividad de la proteína<sup>4,24</sup>, distinguiéndose 6 diferentes subfamilias de Prdx: AhpC-Prdx1, BCP-PrdxQ, Tpx, Prdx5, Prdx6 y AhpE<sup>24</sup>.

## 1.2. Estructura y oligomerización de las peroxirredoxinas

Las peroxirredoxinas comparten el plegamiento tipo tiorredoxina<sup>25-27</sup>, común en enzimas que catalizan la formación e isomerización de enlaces disulfuro. Este plegamiento está constituido por una lámina  $\beta$  formada a partir de cuatro hojas  $\beta$  centrales ordenadas de forma antiparalela, rodeada por 3  $\alpha$ -hélices. Este tipo de plegamiento se puede dividir en un motivo N-terminal  $\beta\alpha\beta$  y uno C-terminal  $\beta\beta\alpha$ , unidos por una tercera  $\alpha$ -hélice.  $\beta_1$  y  $\beta_2$  del motivo N-terminal se pliegan de forma paralela, mientras que  $\beta_3$  y  $\beta_4$  lo hacen de forma antiparalela. Las hélices  $\alpha_1$  y  $\alpha_3$  se alinean en un lado de las hojas  $\beta$ <sup>28</sup>. En la *figura 1 (A)* se representa este plegamiento.

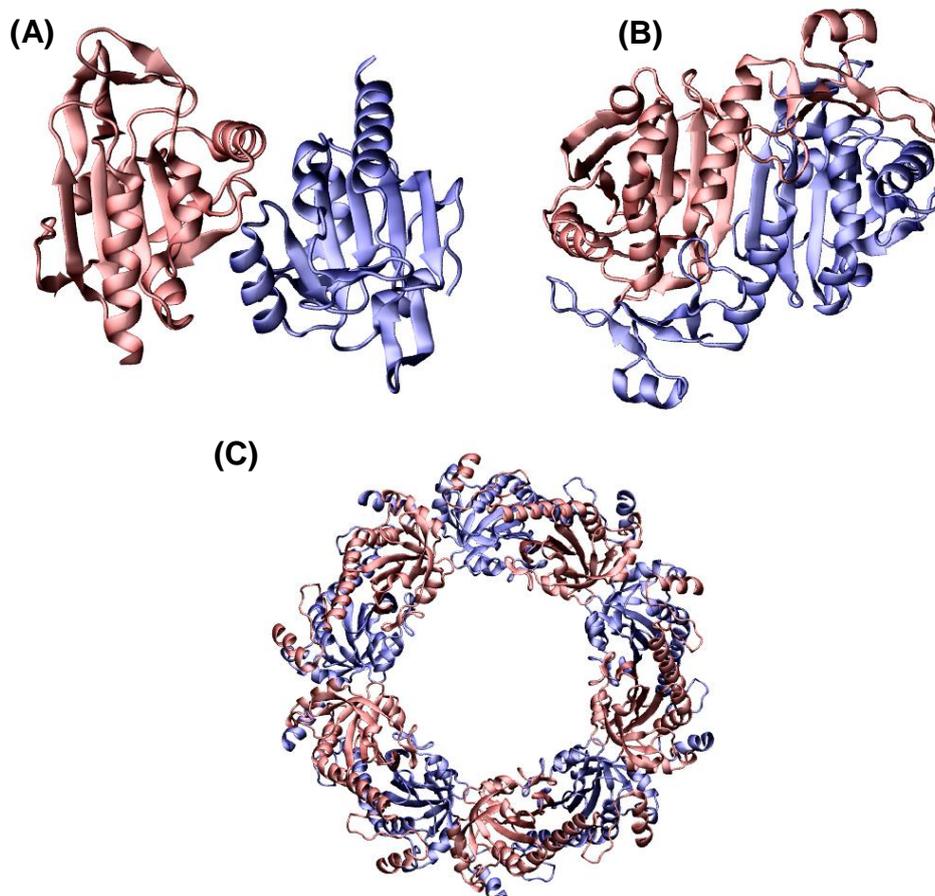


**Figura 1.** Tipos de plegamiento conservados. **(A)** Plegamiento conservado tipo tiorredoxina. Los asteriscos representan los puntos donde se insertan residuos adicionales al pliegue. Adaptado de Copley et al.<sup>28</sup> **(B)** Plegamiento típico de las peroxirredoxinas. Adaptado de Choi et al.<sup>27</sup>

A partir de la primera estructura cristalográfica de una peroxirredoxina<sup>27</sup> y las que vinieron a continuación, se determinó que esta familia de proteínas presenta estructuras secundarias adicionales al plegamiento básico tipo tiorredoxina, constituido por un core de 80 residuos<sup>28</sup>. Presenta dos dominios, uno extenso N-terminal (174 residuos) y uno corto C-terminal (50 residuos). El primer dominio contiene cuatro hojas  $\beta$  ( $\beta_3$ ,  $\beta_4$ ,  $\beta_6$  y  $\beta_7$ ) y 3  $\alpha$ -hélices ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_4$  y  $\alpha_5$ ). A su vez, adicionales al plegamiento tipo tiorredoxina, la estructura presenta tres hojas  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_5$ ), una pequeña  $\alpha$ -hélice ( $\alpha_1$ ) y otra larga ( $\alpha_3$ ). El motivo  $\beta\alpha\beta$  está constituido por  $\beta_3$ - $\alpha_2$ - $\beta_4$  como se

muestra en la *figura 1(B)*. El segundo dominio presenta dos hojas  $\beta$  ( $\beta 6$  y  $\beta 7$ ) y una  $\alpha$ -hélice ( $\alpha 5$ ) conectado con el dominio N-terminal a través de un *loop* que contiene a  $\alpha 4$ .  $\beta 6$ - $\beta 7$ - $\alpha 5$  constituyen el motivo  $\beta\beta\alpha$  del plegamiento tipo tiorredoxina. Presenta también varias estructuras adicionales, 3 hojas  $\beta$  ( $\beta 8$ ,  $\beta 9$  y  $\beta 10$ ) y una  $\alpha$ -hélice ( $\alpha 6$ ).

Las peroxirredoxinas se pueden encontrar en diversos estados de oligomerización: monómeros, dímeros o decámeros, según factores del ambiente en el que se encuentran, como el pH, la fuerza iónica o la presencia de iones divalentes<sup>22</sup>. Los dímeros se pueden clasificar según las interacciones establecidas entre los diferentes monómeros que los forman y la orientación de la hoja  $\beta$  central<sup>29</sup>, pudiendo ésta ser paralela o perpendicular<sup>30</sup>. Dentro de los dímeros con orientación paralela se distinguen de *tipo A* (por ejemplo, PrxQ<sup>31</sup>, *figura 2(A)*), que interaccionan a través de la  $\alpha 3$  de un monómero y la  $\alpha 5$  del otro; de *tipo B*, por ejemplo, hPrdx6<sup>27</sup>, *figura 2(B)*, donde los monómeros interaccionan a través de una de sus láminas  $\beta$  antiparalelas formando una lámina  $\beta$  extendida. La asociación de 5 *dímeros B* lleva a la formación de una estructura decamérica, por ejemplo, Prdx2<sup>32</sup>, *figura 2(C)*.



**Figura 2.** Estructura tridimensional de los diferentes estados de oligomerización de las peroxirredoxinas. Cada monómero se representa con un color diferente. **(A)** Dímero tipo A de PrxQ (PDB ID=4GQF) **(B)** Dímero tipo B de hPrdx6 (PDB ID=1PRX) **(C)** Decamero de Prdx2 (PDB ID=1QMV).

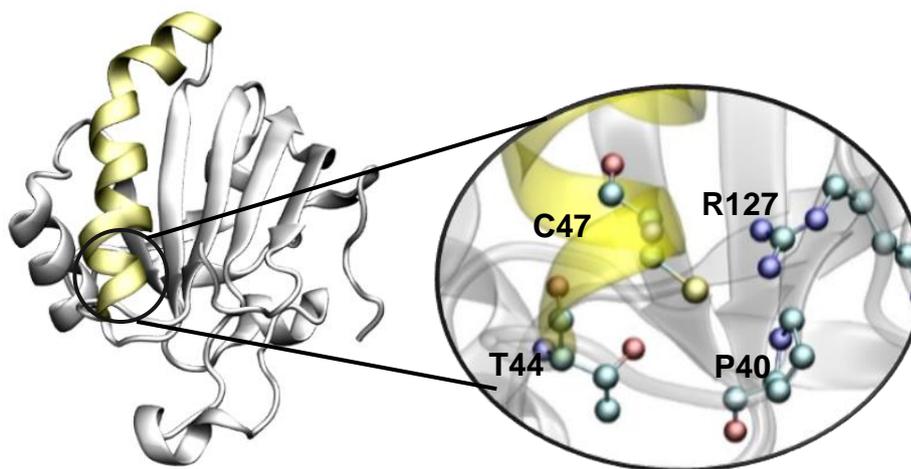
La oxidación de la  $C_P$  en cualquiera de sus formas desestabiliza el estado oligomérico, promoviendo en caso de ser un decámero la formación de dímeros y para éstos en monómeros<sup>33</sup>, actuando como un interruptor redox del estado de oligomerización de la proteína<sup>34</sup>. En Prdx 2-Cys típicas, los dímeros en estado

reducido e hiperoxidado presentan una fuerte tendencia a formar dodecámeros<sup>22,33</sup>, mientras que la forma oxidada forma preferentemente dímeros<sup>33</sup>. Las Prdx 1-Cys pueden presentar estados de oligomerización diversos, desde dímeros hasta hexadecámeros con conformaciones toroidales<sup>35</sup>. Por otra parte, se reportó que la glutationilación en la C<sub>P</sub> de una Prdx homodimérica de un tipo diferente a los ya mencionados (tipo D no mostrado) induce una transición entre la forma dimérica y la monomérica, generando un interruptor redox similar al encontrado para el pasaje decámero/dímero observado en las Prdx 2-Cys típicas<sup>36</sup>.

El estado de oligomerización de las peroxirredoxinas se puede ver también influenciado por otros factores estructurales ajenos al estado redox de la C<sub>P</sub>. A través de estudios de mutagénesis dirigida en la Prdx tipo 2-Cys típica AhpC, se observó que las variantes T77I y T77D tienen un efecto inhibitor en la formación de la estructura decamérica, mientras que la variante T77V la estabiliza<sup>37</sup>. Para otra Prdx 2-Cys típica, la proteína antioxidante específica de tiol 2 (TSA2), se reportó que la mutación de una treonina altamente conservada cercana a la C<sub>P</sub> podría tener un rol en la estabilización del decámero en su forma reducida y sobre la desestabilización del mismo en la forma oxidada<sup>38</sup>.

### 1.3 Sitio activo y mecanismos de las peroxirredoxinas

El sitio activo peroxidasa (*figura 3*) se encuentra sobre el extremo N-terminal de la hélice  $\alpha 2$  en el fondo de un estrecho bolsillo del subdominio  $\beta\alpha\beta$ . Éste se encuentra altamente conservado en la familia de las peroxirredoxinas, presentando una secuencia homóloga PXXTXXC<sup>26</sup> en todas las Prdx conocidas. Estos residuos se encuentran insertos en la hélice  $\alpha 2$ , lo cual indicaría que su disposición espacial es clave para el correcto funcionamiento de la enzima. Otro residuo conservado en la familia de las peroxirredoxinas, que presenta proximidad espacial con la C<sub>P</sub>, es una arginina localizada en el entorno de la posición 130, ubicada en la hoja  $\beta 4$ .



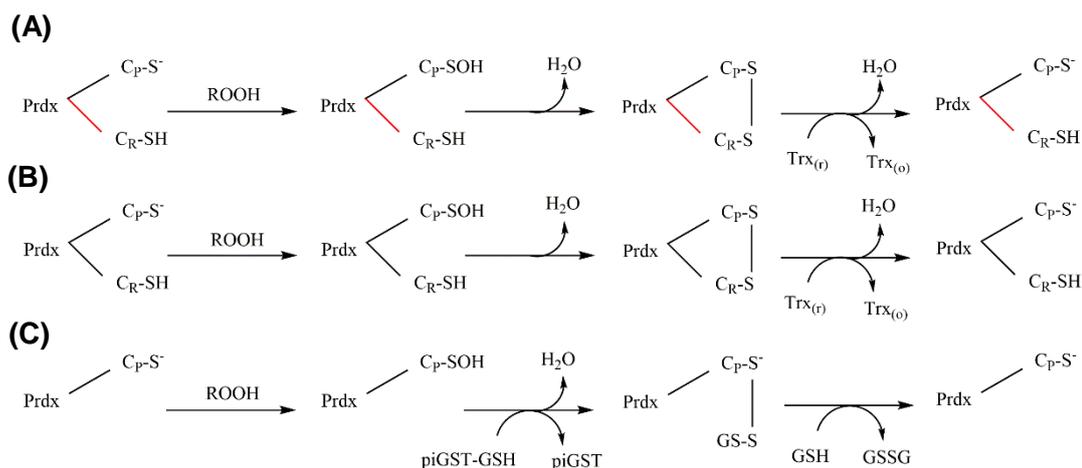
**Figura 3.** Estructura de hPrdx5 y su sitio activo. La hélice  $\alpha 2$  se representa en amarillo y el resto de la proteína en plateado. Para los residuos conservados se usa una representación de bolas y varillas. (PDB ID= 1OC3).

La treonina y la arginina conservadas en el sitio activo cumplen un rol fundamental en la catálisis de la enzima<sup>39-41</sup>. Por ejemplo, la proteína mutante R128D de triparredoxina peroxidasa (TXNPx) presenta una pérdida completa de actividad<sup>42</sup>. En otro estudio<sup>40</sup>, al cambiar la R128 de Prdx5 humana (hPrdx5) por un aminoácido polar sin carga, como la glutamina, la actividad de la enzima también se ve

significativamente alterada. La presencia de esa carga positiva es fundamental para que ocurra la catálisis, por lo que se propuso que el rol para la arginina conservada es el de estabilizar el estado de transición aniónico formado durante el primer paso del ciclo catalítico<sup>40,41</sup>. Esta arginina tiene también la función de mantener el  $pK_a$  de la  $C_P$  en el entorno de 5 (cuando en una cisteína libre en solución se encuentra en el entorno de 8<sup>43</sup>), al estabilizar el tiolato mediante un doble enlace de hidrógeno con su grupo guanidinio<sup>39-41,44</sup>.

En cuanto al rol que cumple la treonina conservada, en estudios con hPrdx5 se observó que la misma mantiene la nucleofilia de la  $C_P$  baja, a través de un fuerte enlace de hidrógeno con su tiolato<sup>40</sup>. Esta interacción se debilita al formarse una nueva red de enlaces de hidrógeno con el sustrato, donde la treonina es la encargada de posicionarlo desde su entrada al sitio activo hasta el posicionamiento adecuado para la reacción con  $C_P$ <sup>40</sup>. Este doble efecto de la treonina induce un aumento de la nucleofilia de la  $C_P$ , y permite que pueda reaccionar con uno de los oxígenos del hidroperóxido<sup>40</sup>. En las mutantes donde se sustituye la treonina por una valina la actividad enzimática se pierde, mientras que la sustitución de la treonina por una serina mantiene su actividad. La treonina y la serina son dos aminoácidos muy similares, diferenciándose únicamente en que la treonina presenta un grupo metilo adicional, por lo que el rol que cumplen depende en gran medida del grupo OH de estos residuos. En consonancia con esto, se observa que en algunas peroxirredoxinas la treonina conservada se encuentra sustituida por serina<sup>45</sup>.

Finalmente el rol que presenta la prolina conservada parecería ser estructural, protegiendo al sulfénico formado luego del primer paso del ciclo catalítico<sup>30</sup>. En los 3 tipos de peroxirredoxinas el ciclo catalítico es similar, y consta esencialmente de 3 pasos (*figura 4*): la peroxidación, la resolución y el reciclaje de la enzima. En el primero, la cisteína peroxidática realiza un ataque nucleofílico sobre el sustrato oxidándose a ácido cisteín sulfénico (Cys-SOH)<sup>45</sup>. El mecanismo consensuado para la reacción<sup>40,41</sup> es de tipo  $S_N2$ , actuando el tiolato como nucleófilo que ataca a uno de los átomos de oxígenos del peróxido, el cual se rompe de forma heterolítica y libera  $OH^-$  como grupo saliente. Este paso es en principio el mismo en los tres tipos de peroxirredoxinas, sabiéndose que para Prdx 2-Cys atípicas<sup>40</sup> y típicas<sup>41</sup> se observa una o más transferencias protónicas posteriores al estado de transición de esta etapa. El segundo paso involucra la reducción del ácido cisteín sulfénico para formar un disulfuro -S-S- con la  $C_R$  o con un reductor externo. El paso final de reciclaje consiste en la reducción del disulfuro previamente obtenido para recuperar la enzima original reducida con participación de un dador externo de electrones, como la Trx en el caso de las 2-Cys típicas/atípicas o por un sistema reductor fisiológico (por ejemplo, para algunas de estas proteínas se ha reportado que puede ser GSH- $\pi$ GST<sup>5</sup>) o ascorbato<sup>46</sup> en el caso de las 1-Cys.



**Figura 4.** Ciclo catalítico de las peroxirredoxinas. En negro se representa un monómero y en rojo se representa el otro. **(A)** 2-Cys típicas. **(B)** 2-Cys atípicas. **(C)** 1-Cys.

En 2-Cys típicas y atípicas el paso de resolución requiere de cambios conformacionales locales que aproximen el par C<sub>p</sub>/C<sub>R</sub> reaccionante para formar el disulfuro. Este cambio conformacional implica el movimiento en la hélice  $\alpha$ 2, dónde se desenrolla el extremo de ella, adoptando una conformación denominada LU (del inglés 'locally unfolded'). De esta forma, el ácido cisteín sulfénico formado se encuentra menos protegido para el ataque nucleofílico<sup>47</sup> por parte del tiolato, y forma el enlace disulfuro que se expone al solvente y es reducido por la Trx<sup>47</sup>. Así la proteína vuelve al estado reducido y se restablece la conformación inicial, identificada como FF (del inglés 'fully folded') y su actividad catalítica normal. En las Prdx6 1-Cys no hay una etapa de resolución genuina, por lo que la transición FF→LU no ocurre. Luego de la oxidación de la C<sub>p</sub> viene la fase de reciclaje por un reductor de bajo peso molecular.

#### 1.4 Características estructurales y funcionales de hPrdx6

La peroxirredoxina 6 humana (hPrdx6) fue la última Prdx descubierta en mamíferos<sup>27</sup>. Presenta un único residuo conservado de cisteína, C47, por lo que pertenece a la subfamilia de las Prdx 1-Cys. Una característica importante en su ciclo catalítico es que, a diferencia de las otras peroxirredoxinas, la tiorredoxina no forma parte de su ciclo catalítico<sup>27,48</sup>, haciendo que la denominación original de tiorredoxina peroxidasa cambiara a peroxirredoxina luego de su descubrimiento<sup>49,50</sup>. hPrdx6 es una proteína de 224 aminoácidos (25 kDa), que presenta, al igual que las otras peroxirredoxinas, la capacidad de reducir diferentes tipos de hidropéroxidos<sup>1,48,49</sup>.

Si bien no se dispone de información para la constante de velocidad de hPrdx6 con sus sustratos, sí se conoce para su análoga de rata. La actividad específica (AE) de peroxirredoxina 6 de rata (rPrdx6) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es de 6  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  y presenta una constante de velocidad de  $3.4 \pm 0.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a pH=7.4 y 25<sup>52</sup>. El pK<sub>a</sub> de la C<sub>p</sub> de rPrdx6 es de 5.2<sup>52</sup>, por lo cual la fracción de la forma tiolato presente será cercana al 100% a pH fisiológico<sup>44</sup>. De esta forma, la C<sub>p</sub> siempre estará disponible para reaccionar en presencia de sustrato. En principio se propuso que el reductor fisiológico implicado en su reciclado era GSH, previa formación de un heterodímero con una  $\pi$ GSH-transferasa<sup>53,54</sup> (figura 4C) aunque se reportó que el ácido ascórbico en la forma de ascorbato puede actuar como reductor fisiológico de otras Prdx 1-Cys de levadura<sup>46</sup>, rompiendo el paradigma de que solo los compuestos con grupos tiol pueden reducir a las peroxirredoxinas.

hPrdx6 también puede actuar reduciendo fosfolípidos peroxidados (PLOOH), siendo su principal ligando los peróxidos de fosfatidilcolina (PCOOH)<sup>48,55,56</sup>, con una AE de  $\sim 6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  y una  $K_M$  de 120-150  $\mu\text{M}$ <sup>51,56</sup>. Esta función, según se reportó para otras peroxirredoxinas 1-Cys que también presentan la capacidad de reducir PLOOH, ayudaría a la reparación de las membranas celulares dañadas<sup>50</sup> por un fuerte estrés oxidativo. Por ejemplo, la generación de *knockout* de hPrdx6 hace que la reparación de membranas peroxidadas disminuya en un 96%<sup>57</sup>.

La secuencia de la proteína (*figura 5*) presenta varios motivos conservados, no solo aquellos referentes al plegamiento tipo tiorredoxina.

```

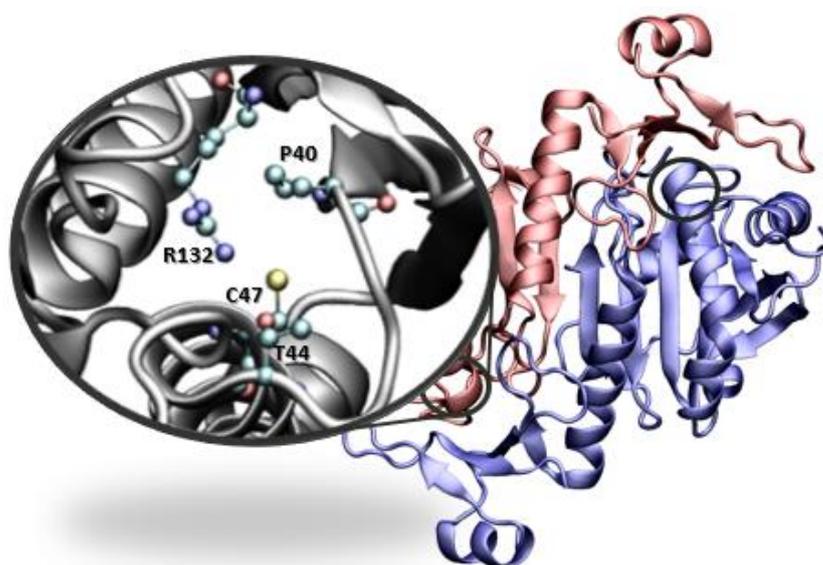
1           11           21           31           41
MPGGLLLGDE APNFEANTTI GRIRF HDFLG DSWGILFSHP RDF TPVCTTE
LGRAAKLAPE FAKRNVKLIA LSIDSVEDHL AWSKDINAYN GETPTEKLPF
PIIDDKGRDL AILLGMLDPV EKDANNMPVT ARVVFIFGPD KKLKLSILYP
ATTGRNFDEI LRWVDSLQLT GTKPVA TPVD WKKGESVMWV PTLSEEEAKQ
CFPKGVTKE  LPSGKKYLRV TPQP

```

**Figura 5.** Secuencia de hPrdx6 con motivos y residuos conservados destacados. En azul se representa el motivo peroxidasa TPVCTTE (recuadro), y los residuos conservados. En marrón se muestra el motivo lipasa GX SXG (recuadro) y la triada catalítica, y en verde el motivo lisofosfatidilcolina acil transferasa. El residuo en rojo representa un punto de fosforilación.

El motivo peroxidasa de hPrdx6 (recuadro azul, *figura 5*) es homólogo al típico de otras peroxirredoxinas, así como la función de estos residuos es análoga. Sin embargo, la subfamilia 1-Cys una histidina conservada adicional (H39 en hPrdx6) que se propone podría tener un rol clave en la catálisis cuando participa ascorbato como reductor<sup>46</sup>. La presencia de este residuo cargado positivamente podría ayudar a estabilizar el C<sub>P</sub>-SOH, reduciendo la repulsión electroestática con el ascorbato<sup>46</sup>.

Se ha reportado que hPrdx6 se encuentra en solución como un homodímero *tipo B*<sup>58</sup>, cuya dimerización involucra la formación de una interfaz hidrofóbica entre 7 hojas  $\beta$  de cada monómero, resultando en la formación de una lámina extendida de 10 hojas  $\beta$ . Los residuos que ayudan en la estabilización de esta interfaz son L145, I147, L148 y P150<sup>27,59,60</sup>, pues se ha reportado que la mutación de estos residuos desestabiliza completamente la forma dimérica<sup>60</sup>. La estructura de la proteína en solución, hasta el momento, no se ha determinado. Cuando ésta se encuentra cristalizada también forma un homodímero de *tipo B*, de forma independiente al estado redox de la C<sub>P</sub><sup>27,59</sup>. Sin embargo, los estudios que se realizaron en solución con hPrdx6 en condiciones tales que la C<sub>P</sub> se encontraba reducida, mostraron que la proteína presenta diferencias significativas con la estructura cristalografía de hPrdx6 con la C<sub>P</sub> oxidada a -SOH.



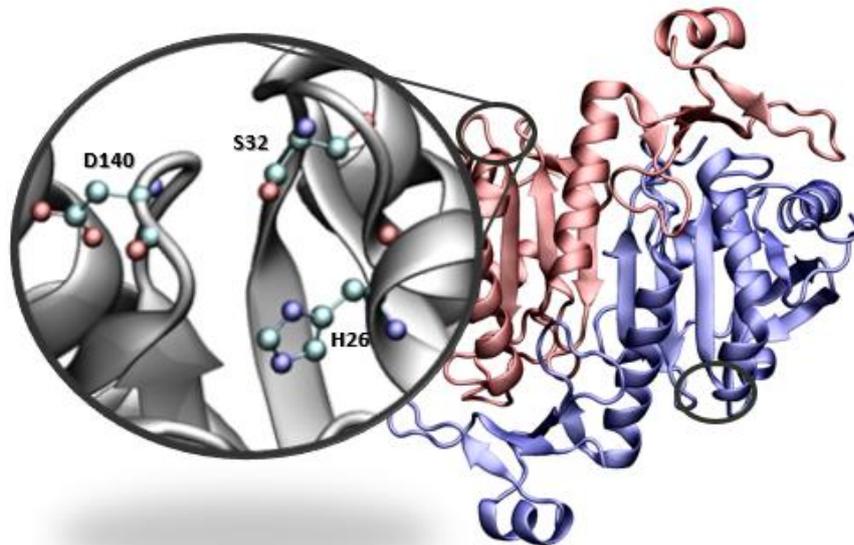
**Figura 6.** Estructura tridimensional del dímer hPrdx6 y su sitio activo peroxidasa. Los residuos conservados se representan en bolas y varillas. (PDB ID=5B6M).

El estado redox de la C47 actúa como un interruptor en la oligomerización en las 1-Cys Prdx, ya que su oxidación promueve la desestabilización del homodímero. No está claro si esta desestabilización ocurre por la glutationilación<sup>36</sup>, como se mencionó en la sección 1.2, o por la oxidación a  $-SOH$ , la cual facilitaría la reacción con la  $\pi$ GSH-transferasa<sup>60</sup>. Existen varias isoformas (A, B, C y D) de la  $\pi$ GSH-transferasa, factor que podría modular su afinidad a hPrdx6. Las isoformas A y C presentan un valor de  $K_d \sim 50$  nM, mientras que las isoformas B y D presentan una afinidad 2 veces menor<sup>61</sup>. Por lo tanto, la presencia de una determinada isoforma en un contexto celular dado permitiría regular la velocidad del ciclo catalítico de esta proteína.

Además de la actividad peroxidasa, hPrdx6 presenta actividad fosfolipasa independiente de calcio (iPLA<sub>2</sub>), que consiste en la hidrólisis de un fosfolípido en la posición *sn*-2, cuyo mecanismo catalítico es hasta el momento desconocido. Esta actividad fue descubierta a partir de la presencia de un motivo lipasa GX SXG<sup>62,63</sup> en su secuencia (figura 5), siendo la única peroxirredoxina descrita hasta el momento que presenta este tipo de actividad. Su AE con el dipalmitoilfosfolina (DPPC) como sustrato en liposomas es de  $\sim 100$  nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, y presenta un valor de  $K_M$  de  $\sim 350$   $\mu$ M<sup>64</sup>. Esta actividad es máxima bajo condiciones de pH 4<sup>65</sup>, aunque se determinó que en condiciones citosólicas la proteína presenta la capacidad para unir fosfolípidos. Esto podría relacionarse con su rol de reducir fosfolípidos hidroperoxidados, así como con su capacidad de reparar membranas biológicas dañadas<sup>50</sup>, mostrando una sinergia entre sus actividades catalíticas. No se conoce si el fosfolípido peroxidado se une al sitio iPLA<sub>2</sub> de un monómero y al sitio peroxidasa del otro, o si se une a ambos sitios localizados en el mismo monómero, pero si hay evidencia de que la actividad iPLA<sub>2</sub> está presente en el monómero y no requiere la dimerización<sup>60</sup>.

La tríada catalítica de la actividad iPLA<sub>2</sub>, representada en la figura 7, está compuesta por los residuos H26-S32-D140<sup>66</sup>, presente en varias lipasas conocidas<sup>67</sup>. Esta tríada fue propuesta en base a experimentos de mutagénesis dirigida, que permitieron determinar que la H26 cumple un rol importante en la unión de la proteína

tanto al ligando como a micelas<sup>51,66</sup>, mientras que la S32 y la D140 están involucrados directamente en la catálisis<sup>51,66</sup>. hPrdx6 presenta también la capacidad de unirse a liposomas tanto en condiciones de pH neutro como ácido<sup>51,66</sup>.



**Figura 7.** Representación del sitio activo iPLA<sub>2</sub> de hPrdx6. Imagen realizada a partir de la cristalografía de hPrdx6. (PDB ID=5B6M).

La función iPLA<sub>2</sub> se asoció con la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ <sup>68</sup> en el epitelio bronquial. También se reportó que esta actividad se encuentra asociada con la activación de la NADPH oxidasa, debido a la inflamación en el pulmonar<sup>69</sup>, y que ésta también induce la activación de astrocitos seguida de un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias<sup>70</sup>. Todas estas evidencias muestran que la actividad iPLA<sub>2</sub> de hPrdx6 permite generar potentes señales proinflamatorias<sup>71-73</sup>. En estudios recientes debido a la actividad iPLA<sub>2</sub> se le atribuyó a hPrdx6 un rol importante en el daño cerebral por inflamación, por lo que su inhibición podría ser considerada un tipo de terapia génica para diversas patologías<sup>74</sup>.

hPrdx6 presenta también una tercera actividad enzimática, la capacidad de acilar lisofosfatidilcolina con un ácido graso libre. Dicha actividad es denominada lisofosfolina-acil transferasa (LPCAT)<sup>75</sup>, y fue identificada gracias a otro de sus motivos estructurales, HxxxxD, característico de esta función<sup>76,77</sup>. Este motivo LPCAT se encuentra solapado con el motivo lipasa GX SXG, siendo el residuo D31 parte de ambos. El hecho que presente actividad iPLA<sub>2</sub> y LPCAT, permite a la enzima la capacidad de hidrolizar fosfolípidos dañados y luego acilarlos una vez restaurados, mediante sus funciones iPLA<sub>2</sub> y LPCAT. Si bien la acción iPLA<sub>2</sub> solo ve favorecida mediante fosfolípidos de fosfolina (PC), la actividad LPCAT muestra cierta preferencia por el palmitoil-CoA como sustrato<sup>75</sup>.

Esta triple acción potencia la función de hPrdx6 en la reparar membranas, y explica por qué organismos *knockout* de esta enzima se ven tan perjudicados<sup>50,75</sup>.

## 1.5 Modificaciones post-traduccionales de hPrdx6 y sus efectos moduladores

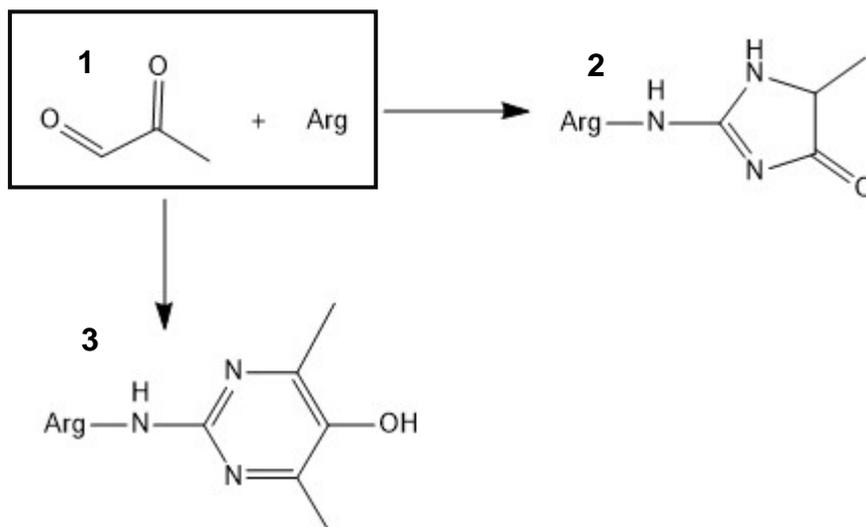
La proteína es blanco de diversas modificaciones post-traduccionales. Algunas de ellas son parte de su ciclo catalítico; otras presentan una función reguladora sobre alguna de sus actividades bajo condiciones fisiológicas o en condiciones patológicas.

La oxidación en la C47 es parte del ciclo catalítico peroxidasa<sup>1,27</sup>, siendo blanco de una diversa variedad de agentes oxidantes, desde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta PLOOH<sup>1,55,56</sup>. La sobreoxidación de la C47 a derivados del ácido sulfínico (-SO<sub>2</sub>H o sulfónico (-SO<sub>3</sub>H) tiene un papel inhibitorio sobre la actividad peroxidasa<sup>20,78</sup>, al que para otras peroxirredoxinas. También se reportó que induce un aumento en la actividad iPLA<sub>2</sub><sup>78</sup>, haciendo que la sobreoxidación a nivel fisiológico tenga un rol más complejo que la sobreoxidación de otras peroxirredoxinas.

La glutationilación en la C47 también es parte del ciclo catalítico<sup>1</sup>. Como se mencionó anteriormente, la oxidación en la C47 ya sea por la formación de -SOH o de -S-S-, actúa como un interruptor redox regulando el grado de oligomerización de la proteína.

Se ha reportado que la fosforilación en la T177 de hPrdx6 por las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK)<sup>79</sup> induce un aumento de actividad de más de 10 veces de su actividad iPLA<sub>2</sub><sup>79</sup>. Esto se atribuye a que la proteína sufre un importante cambio conformacional<sup>80,81</sup>, adoptando una conformación de tipo *molten globule*<sup>81</sup> o glóbulo fundido, un intermediario en el plegamiento proteico<sup>82</sup>. Entre los cambios estructurales identificados en la estructura post-fosforilación se encuentra una pérdida de  $\alpha$ -hélices y una disminución en la intensidad de fluorescencia intrínseca, así como una mayor afinidad a liposomas<sup>81</sup>. Como se mencionó anteriormente, la actividad iPLA<sub>2</sub> es necesaria para la completa activación de la NADPH oxidasa en diferentes tipos celulares<sup>69</sup>. El completo ensamblado de esta enzima requiere que hPrdx6 transloque por la membrana celular<sup>83</sup>, y para que esto ocurra, debe encontrarse fosforilada en la T177<sup>84</sup>.

Otra importante modificación post-traduccional reportada es la glicación por metilglioxal (MGO) sobre residuos de arginina de hPrdx6 ( ver *figura 5*), que induce la inhibición de la actividad peroxidasa de la enzima<sup>85</sup>. El MGO tiene la capacidad de reaccionar con residuos básicos de diferentes proteínas o ácidos nucleicos, generando productos avanzados de glicación (AGE)<sup>86,87</sup>, que afectan de forma significativa el rol fisiológico de estos residuos en la proteína y su estructura. Son numerosos los productos avanzados de glicación conocidos de arginina, dos de ellos de los que se ha observado la formación en hPrdx6<sup>85,88</sup> se muestran en la siguiente figura.



**Figura 8.** Diferentes AGEs producidos por MGO sobre arginina (1). La estructura **2** corresponde al AGE metilglioxal hidroimidazolona (MGH-1), y el **3** al AGE argpirimidina.

En situaciones patológicas como *diabetes mellitus* tipo 2, el MGO, intermediario de la glucólisis tales condiciones, se encuentra en exceso y se ha postulado que su efecto como agente glicante de hPrdx6 podría estar relacionado con la dificultad para cicatrizar úlceras gástricas en condiciones de diabetes, por lo que la inhibición de esta modificación podría ser relevante en el tratamiento de estas úlceras<sup>85</sup>.

A través de estudios de *western blot* se comprobó la presencia del AGE-argpirimidina<sup>85</sup>, sin determinar con precisión sobre qué residuo se formaba dicho aducto. En experimentos posteriores, se verificó por espectrometría de masas la formación del producto avanzado de glicación MG-H1 en R132, con una consecuente inhibición de la actividad peroxidasa<sup>88</sup>.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1 Objetivo general

En esta tesina de graduación se plantea el estudio *in silico* de los efectos de la fosforilación en la T177 (T\*177) y de la glicación por MGO en la R132 por para formar argpirimidina (R\*132), tanto sobre la estructura proteica y propiedades de la C<sub>P</sub> de Prdx6.

## 2.2 Objetivos específicos

### 2.2.1 Analizar cambios en la estructura y dinámica de hPrdx6 por fosforilación

Como se mencionó en la sección 1.5, la fosforilación en la T177 se encuentra relacionada con un aumento de la actividad iPLA<sub>2</sub>. Para estudiar cambios estructurales que se vinculen con esto es necesario en primer lugar:

- Estudiar la dinámica del homodímero de hPrdx6 en solución con la C<sub>P</sub> oxidada a sulfénico, con T177/T\*177.
- Caracterizar el estado *molten globule* mediante descriptores estructurales, y obtener estructuras representativas de hPrdx6-SOH con T177/T\*177.
- Realizar una comparación de la estructura y dinámica de hPrdx6-SOH con T177/T\*177.
- Generar un complejo ligando-proteína en solución entre el DPPC-hPrdx6-SOH con T177/T\*177, y estudiar el modo y energía de unión.

### 2.2.2 Analizar cambios en la estructura y dinámica de hPrdx6 y propiedades de la C<sub>P</sub> por glicación

Como se plantea en la sección 1.5, la glicación por MGO en la R132 se relaciona con una inhibición de la actividad peroxidasa. Para encontrar indicios del origen de dicha inhibición se busca estudiar cambios en la estructura atómica y/o electrónica de la proteína y de la C<sub>P</sub>. Para ello se plantea:

- Estudiar la dinámica del homodímero de hPrdx6 en solución con la C<sub>P</sub> reducida, en forma de tiolato, con R132/R\*132.
- Obtener una estructura representativa para todos los sistemas, y realizar una comparación estructural de las mismas.
- Determinar el pK<sub>a</sub> de la C<sub>P</sub> de hPrdx6 utilizando simulaciones MD a pH constante.
- Calcular la estructura electrónica de la C<sub>P</sub>, y posterior análisis con los indicadores cuánticos de nucleofilia y reactividad.

### **3. METODOLOGÍA**

### 3.1 Simulaciones de dinámica molecular convencional y acelerada

Para obtener estructuras representativas del homodímero de hPrdx6 en sus diferentes estados (C<sub>P</sub>-S/SH/SOH) y tras las modificaciones post-traducción en condiciones quasi-fisiológicas se realizaron simulaciones de dinámica molecular clásica con el campo de fuerza amber-*ff99SB*<sup>89</sup>, partiendo de estructuras cristalográficas obtenidas del *Protein Data Bank*<sup>27,59</sup>.

Como punto de partida para los estudios sobre los efectos de la fosforilación se consideró la estructura PDB ID = 1PRX<sup>27</sup> (C<sub>P</sub> oxidada a -SOH, de aquí en más también representada como C\*47). Debido a que en los diferentes estudios *in vitro*<sup>80,81,90</sup> disponibles sobre la fosforilación no se reporta haber realizado una etapa previa de reducción de la C<sub>P</sub>, es esperable que la misma se encuentre en estado oxidado a -SOH, de ahí el motivo de elegir esta estructura como referencia. Los parámetros de la cisteína modificada a ácido sulfénico no disponibles en el campo de fuerza utilizado fueron obtenidos a partir de datos bibliográficos<sup>91</sup>. Para el residuo de treonina fosforilado se usaron parámetros específicos<sup>92</sup> desarrollados en forma compatible con el campo *ff99SB*.

También se estudió el efecto de la fosforilación sobre la interacción de la proteína con el ligando DPPC. Para ello fue necesario determinar las estructuras de los complejos<sup>1</sup> formado con la proteína oxidada con T177/T\*177, describiendo al ligando con parámetros extraídos del campo de fuerza *gafflipid*<sup>93</sup>.

En los estudios sobre los efectos de la glicación contemplando que la actividad peroxidasa requiere que la C<sub>P</sub> este reducida, se tomó como estructura de partida la cristalografía de la proteína reducida (PDB ID=5B6M)<sup>59</sup>. El AGE elegido fue la argpirimidina, debido a que los resultados de espectrometría de masas de la R132 como MG-H1 nunca fueron publicados contrario a la detección de argpirimidina, aunque sin determinar en qué posición se forma el aducto. Esto podría ser un sesgo respecto a lo observado experimentalmente. Para las simulaciones con R\*132 fue necesario parametrizar el residuo modificado de la siguiente forma:

1. La geometría de la argpirimidina terminada en los extremos N y C con grupos N-metilamida y acetilo (ACE-APY-NME) se optimizó a nivel PM6<sup>94</sup> en vacío con el paquete Gaussian 09<sup>95</sup>.
2. Se calcularon las cargas atómicas basadas en el potencial electrostático Merz-Singh-Kollman<sup>96,97</sup> con un cálculo *single point* a nivel HF/6-31G(d)<sup>98,99</sup>, y se utilizó el procedimiento RESP<sup>100</sup> módulo antechamber del paquete AMBER16<sup>101</sup>.
3. El resto de los parámetros se obtuvieron a partir del campo de fuerza generalizado de amber (*gaff*)<sup>102</sup>.

los parámetros generados para el residuo modificado se encuentran disponibles en la sección 7.1 del anexo.

---

<sup>1</sup> Se construyó una primera aproximación con docking molecular del DPPC con la estructura hPrdx6-SOH con T177/T\*177 utilizando AutoDock4.2<sup>135</sup> y AutoDockTools<sup>135</sup>. Se usó una grilla de 20x20x20 puntos con un espaciado de 0.375 Å, centrada en el oxígeno catalítico del D140 del sitio iPLA<sub>2</sub>. Se utilizó el algoritmo Lamarckiano<sup>136</sup> utilizado una población de 150 individuos y un número máximo de evaluaciones de 2.5x10<sup>6</sup>.

Para preparar cada sistema se utilizó el programa *tleap* de AMBER16<sup>101</sup>. Se agregaron átomos de hidrógenos faltantes y se consideró el estado de protonación de los residuos ionizables según su estado habitual a pH 7.4. Se agregaron iones K<sup>+</sup> para neutralizar la carga del sistema y se solató con una caja octaédrica truncada de moléculas de agua TIP3P<sup>103</sup> extendida a hasta una distancia de 12 Å desde la proteína.

El protocolo de simulación de dinámica molecular convencional (cMD) aplicado fue el siguiente:

1. Relajación de las moléculas de agua y iones con 2500 pasos [500 utilizando el algoritmo *steepest descent* (SD) y 2000 pasos con gradiente conjugado (CG)] manteniendo la proteína restringida con una constante de fuerza de 500 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup>. Para el cálculo de las interacciones electrostáticas de largo alcance se utilizó un cutoff de 8 Å y el método de particle-mesh Ewald<sup>104</sup>.
2. Relajación del sistema completo con 5000 pasos SD y 15000 CG.
3. Calentamiento gradual del sistema de 0 a 310 K por 100 ps en un ensemble NVT utilizando el termostato de Langevin<sup>105</sup> y una frecuencia de colisión de 5 ps<sup>-1</sup>.
4. Equilibración de la densidad con una simulación de 4 ns en ensemble NPT ( $P = 1 \text{ atm}$ ;  $T = 310 \text{ K}$ ). Los enlaces que involucran átomos de hidrógeno se restringieron con el algoritmo SHAKE<sup>106</sup>, permitiendo el uso de un tamaño de paso de 2 fs para la integración de las ecuaciones de movimiento.
5. La etapa de producción se usó en un ensemble NVT utilizando el baróstato de Berendsen<sup>107</sup>, con tiempos variables según el sistema, a saber: 100 ns para el sistema hPrdx6-SOH con T177 y para los complejos de hPrdx6-DPPC - aplicando en este último caso una restricción de 200 kcal mol<sup>-2</sup> Å<sup>-2</sup> a la distancia entre los átomos O de S32 en la proteína y P en el ligando- y 200 ns para hPrdx6-SOH con T\*177, hPrdx6-S<sup>-</sup> con R132/R\*132 y hPrdx6-SH.

Para caracterizar los cambios conformacionales post-fosforilación observados en hPrdx6 (ver sección 1.5) se realizaron simulaciones de dinámica molecular acelerada (aMD)<sup>108</sup>, técnica desarrollada para explorar el espacio conformacional que consiste en la adición de un potencial de impulso no negativo  $\Delta V(r)$  al potencial real cuando es menor a una energía umbral, resultando en la disminución de barreras locales y permitiendo una evolución más rápida del sistema<sup>108</sup>.

A continuación, se muestra la ecuación que describe la forma del potencial sesgado  $\Delta V(r)$  cuando se utiliza el algoritmo *dual boost*, aplicando un impulso tanto al potencial global de la proteína ( $E_{pot}^{tot}$ ) como al potencial de los diedros ( $E_{died}^{tot}$ )<sup>108</sup>.

$$\Delta V(r) = \frac{(E_{pot} - V(r))^2}{\alpha_{pot} + E_{pot} - V(r)} + \frac{(E_{died} - V_{died}(r))^2}{\alpha_{died} + E_{died} - V_{died}(r)} \quad (1)$$

Los términos energéticos  $E_{pot}$  y  $E_{died}$  se describen según:

$$E_{pot}^{tot} = \langle E_{pot} \rangle + \alpha_{pot}, \text{ con } \alpha_{pot} = a1 * N_{atoms} \quad (2)$$

$$E_{died}^{tot} = \langle E_{died} \rangle + N_{resd} * b1 + \alpha_{died}, \text{ con } \alpha_{died} = \frac{b1 * \lambda * N_{resd}}{5} \quad (3)$$

donde  $\langle E_{pot} \rangle$  y  $\langle E_{died} \rangle$  son las energías potenciales total y de diedro promedio, obtenidas a partir de las simulaciones convencionales,  $N_{resd}$  y  $N_{atoms}$  son los números de residuos y átomos, y  $\lambda$  el factor de aceleración. Para este estudio se eligieron valores estándar de  $a1 = 0.2 \text{ kcal mol}^{-1}$  y  $b1 = 3.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Se realizaron corridas de 300 ns utilizando como punto de partida las coordenadas finales de la simulación cMD.

Como descriptor de convergencia de las simulaciones se utilizó el **RMSD** de los C $\alpha$  (del inglés '*root mean square deviation*') adoptando el criterio de que oscilaciones menores a 1 Å corresponden a una simulación convergida.

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_i^N \delta_i^2}{N}} \quad (4)$$

El RMSD se calcula respecto a una estructura de referencia que en todas las simulaciones de esta tesina correspondió a las coordenadas finales de la simulación.

### 3.2 Descriptores estructurales del estado molten globule

Buscando caracterizar el cambio conformacional a *molten globule* experimentado tras la fosforilación de hPrdx6 (ver sección 1.5), se manejaron las siguientes características estructurales de dicho estado<sup>109</sup>.

- mantiene la mayor parte de la estructura secundaria
- ausencia de estructura terciaria similar a la de la proteína nativa
- estructura compacta y globular
- sin desnaturalización térmica cooperativa.

En base a estas características, se utilizaron diversos descriptores estructurales generales que se presentan a continuación.

#### 3.2.1 Radio de giro

Como primer descriptor del estado *molten globule* se puede utilizar el radio de giro ( $R_g$ ), un descriptor del estado de compactación de la proteína. Se sabe que el  $R_g$  de la conformación nativa es entre 20-30% menor al que corresponde a la conformación *molten globule*<sup>110</sup>, aunque también se han reportado casos en los que la conformación *molten globule* implica cambios menores<sup>109,111</sup> pero significativamente diferentes al  $R_g$  de la proteína nativa. El  $R_g$  se calcula mediante la siguiente fórmula<sup>112</sup>:

$$R_g^2 = \sum_{i=1}^N \frac{(r_i - R_c)^2}{N} \quad (5)$$

donde  $R_c$  representa las coordenadas del centro de masa y  $N$  el número de átomos exceptuando los H. Al analizar una trayectoria de dinámica molecular, si la estructura no presenta cambios conformacionales, el  $R_g$  de la misma no varía significativamente durante la simulación.

### 3.2.2 Superficie accesible al solvente

Se estudió la evolución del área superficial accesible al solvente (SASA) calculada con el algoritmo LPCO implementado en el programa AMBER16<sup>113</sup>. Una conformación *molten globule* presenta un core menos expuesto<sup>114,115</sup>, pero un valor de SASA global igual o superior al que corresponde al estado nativo. Según estudios recientes<sup>80,81,90</sup>, la intensidad de fluorescencia de hPrdx6 en el estado *molten globule* disminuye, siendo este cambio atribuido a una mayor exposición al solvente de los residuos de triptófanos (W33, W82 y W181). Debido a esto, el SASA de estos residuos puede ser utilizado como un descriptor específico del estado *molten globule* de hPrdx6.

### 3.2.3 Porcentaje de $\alpha$ -hélice

La cuantificación de la estructura secundaria se realiza en base a criterios del **DSSP**<sup>16</sup> (del inglés *Dictionary of protein secondary structure*), desarrollado por Kabsh y Sander, que identifica características geométricas y patrones de enlaces de hidrógeno derivados de estructuras de cristalografía de rayos X.

Con este descriptor, es posible cuantificar el porcentaje total de  $\alpha$ -hélice u otro motivo secundario e identificar si hay o no una pérdida post-fosforilación. Para determinar el porcentaje total de  $\alpha$ -hélice en la proteína se aplica el descriptor *dssp* a toda la proteína, se suma el número de residuos identificados como pertenecientes a motivos  $\alpha$ -hélice y se lo divide por el número total.

### 3.3 Análisis de trayectoria por componentes principales para simulaciones aMD

Para obtener estructuras representativas a partir de las simulaciones realizadas por aMD se realizó un análisis de componentes principales, **PCA** (del inglés *principal component analysis*), que es útil para caracterizar cambios estructurales en la proteína.

La técnica busca reducir las dimensiones de un conjunto de variables observadas a otro más pequeño que logre retener toda la información de la variación presente en la muestra original<sup>117-119</sup>. Las nuevas variables, los componentes principales, representan una combinación lineal de las variables iniciales. El fundamento teórico de la técnica se describe en la sección 7.2 del anexo. En este caso las variables originales son las posiciones de los C $\alpha$  de la proteína en cada estructura de la simulación de interés, previa eliminación de los movimientos de rotación y traslación. Se extrajeron 30 vectores propios y los correspondientes valores propios que representan el peso estadístico de cada vector, determinando a partir de su suma la variación descrita con cada par de componentes principales. Se construyó un mapa de frecuencia (*heatmap*) del cual se extraen las estructuras representativas para las poblaciones de interés, a través de un método de *cluster*.

El PCA se llevó a cabo con el programa *cpptraj* del paquete AmberTools<sup>101</sup>.

### 3.4 Energía de unión ligando-proteína con MM/PB(GB)SA

El  $\Delta G_{\text{unión}}$  entre el DPPC y la proteína se calculó para los dos complejos utilizando los métodos MM/PB(GB)SA<sup>120,121</sup>, a través de la siguiente igualdad:

$$\Delta G_{\text{unión}} = \langle \Delta G_{\text{complejo}} \rangle - [\langle \Delta G_{\text{proteína}} \rangle + \langle \Delta G_{\text{ligando}} \rangle] \quad (6)$$

donde  $\langle \Delta G_{\text{complejo}} \rangle$ ,  $\langle \Delta G_{\text{proteína}} \rangle$  y  $\langle \Delta G_{\text{ligando}} \rangle$  representan la energía libre del complejo, la proteína y el ligando respectivamente promediadas sobre un conjunto de estructuras extraídas de las trayectorias de simulación para representar el conjunto de estados presentes a lo largo de las mismas. La energía libre  $G(X)$  para cada sistema  $X$  en cada una de las estructuras extraídas de la trayectoria se obtiene a partir de un ciclo termodinámico considerando a  $X$  en solución y en fase gaseosa, donde se evalúa la energía libre según la siguiente ecuación:

$$G(X) = V_{MM}(X) + G_{\text{sol}}(X) - TS(X) \quad (7)$$

donde  $V_{MM}(X)$  es la energía total clásica obtenida en fase gaseosa,  $G_{\text{sol}}(X)$  es la energía de solvatación total (términos electrostáticos y no electrostáticos) y  $S(X)$  es la entropía de la especie. La temperatura  $T$  coincide con la utilizada en la simulación.

Para cada cálculo de  $\Delta G_{\text{unión}}$  se evaluaron 200 estructuras tomadas cada 2 fs de los últimos 30 ns de producción de la simulación. A su vez para el cálculo se utilizó la aproximación de trayectoria simple<sup>121</sup>, asumiendo que no existen cambios estructurales en la proteína y el ligando al formar el complejo. Estos cálculos se llevaron a cabo con la utilidad MMPBSA.py del paquete AMBER16<sup>101</sup>, utilizando las constantes dieléctricas interior y exterior asignadas por defecto.

### 3.5 $pK_a$ de la $C_P$ en hPrdx6 con R132/R\*132 por MD a pH constante

Uno de los indicadores elegidos para determinar los cambios que induce la glicación de hPrdx6 por MGO en R132 sobre propiedades de la  $C_P$ , es su  $pK_a$  (ver secciones 1.3 y 1.5). Para ello se realizaron simulaciones a pH constante (cpHMD)<sup>122</sup> de hPrdx6 con R132/R\*132. Ambos sistemas se corrieron con el modelo implícito de solvente de Born generalizado (GB). El campo de fuerza utilizado fue amber-ff10 debido a que es compatible con este tipo de cálculos. Desde la preparación de la proteína en solución, pasando por la minimización hasta la equilibración se siguió el protocolo de la sección 3.1. El sistema fue equilibrado en un ensemble NVT durante 1 ns, en el pH de interés a correr. Cada simulación a diferente pH se realizó por 10 ns, intentando cambiar el estado de protonación de los residuos titulables cada 200 fs. De las diferentes simulaciones se obtiene la fracción de tiolato,  $f_{S^-}$ , según cuantos frames fue posible cambiar el estado de protonación de la cisteína. Una vez obtenidos los valores de fracción de tiolato, se ajusta a la siguiente ecuación para determinar el  $pK_a$  de la  $C_P$ :

$$f_{S^-} = \frac{1}{1 + 10^{(pK_a - pH)}} \quad (8)$$

Dado que se conoce que esta metodología predice correctamente el valor del  $pK_a$  de la cisteína en solución, pero tiene dificultades para proporcionar buenas estimaciones del valor absoluto del  $pK_a$ <sup>43</sup> de residuos cisteína en contexto proteico, se diseñó una estrategia para normalizar la predicción explotando la presencia de una

segunda cisteína (C92), la cual se encuentra completamente expuesta durante la simulación que también fue titulada en idénticas condiciones. Debido a que se simuló el homodímero de la proteína, el valor de  $pK_a$  de la C92 utilizado para ajustar el  $pK_a$  de la C47 fue el promedio de ambos monómeros. Una vez que se obtiene un factor de conversión, como cociente entre el  $pK_a$  de una cisteína libre y el  $pK_a$  medido para C92, se multiplica el  $pK_a$  de la C47 por dicho factor y se obtiene un valor más representativo de esta propiedad.

Los valores de pH simulados para hPrdx6 con R132 fueron 3, 5, 6, 7, 8, 11,12,13 y 14 mientras que para hPrdx6 con R\*132 fueron 2,5,7,8,11,12,13,14 y 17.

### 3.6 Determinación de la reactividad y nucleofilia de $C_P$ con ONIOM: QM/MM

Para calcular reactividad y la nucleofilia de la  $C_P$  a partir de la simulación cMD desarrollada según indicado en la sección 3.1, se extrajo una estructura representativa mediante análisis de cluster utilizando el algoritmo *hieragglo* y *averagelinkage* con la herramienta *cpptraj* de AMBER16<sup>101</sup>. La determinación de indicadores de reactividad se llevó a cabo a través de cálculos *single point* con el método ONIOM: QM/MM<sup>123</sup> utilizando un *embedding* electrónico según implementado en el programa Gaussian09<sup>95</sup>. La región cuántica fue descrita a nivel B3LYP<sup>124</sup>/6-31+G(d,p), las aguas que se encontraban a más de 12 Å de la  $C_P$  fueron eliminadas, y el resto del sistema se modeló a nivel clásico, utilizando el campo de fuerza *amber-ff96*<sup>125</sup> para la proteína y TIP3P<sup>103</sup> para las moléculas de agua como están implementados en el programa Gaussian09. Previo al cálculo se realizó una minimización del sistema de la misma forma que se indicó en el protocolo de la sección 3.1. En cuanto a la definición de la región cuántica se trabajó con dos alternativas: una más reducida incluyendo la cadena lateral de la  $C_P$  hasta el enlace  $C\alpha$ - $C\beta$ , y otra más amplia incluyendo también aquellos residuos y moléculas de agua que por inspección visual aparecían en interacción directa con ella. En todos los casos, para el recorte de las regiones cuánticas se calcularon cargas atómicas naturales (NPA)<sup>126</sup>.

La reactividad comparada de la  $C_P$  en hPrdx6 R132 vs R\*132 se caracterizó mediante descriptores globales y locales dentro del marco de la teoría de los funcionales de la densidad (DFT) conceptual<sup>127</sup>.

#### Descriptores globales:

- Dureza, ( $\eta$ ), como índice de reactividad de la especie.

$$\eta = \frac{1}{2} (E_{LUMO} - E_{HOMO}) \quad (9)$$

Para utilizar este descriptor se utiliza se hace uso del teorema de Koopman, el cual establece que para un sistema de capa cerrada la diferencia entre la energía del orbital ocupado de mayor energía (HOMO) y el orbital virtual de menor energía (LUMO) se aproxima a la primera energía de ionización.

- Nucleofilia asimilada en aproximación de orden cero a través de la energía del HOMO de  $C_P$ , ( $E_{HOMO}$ ).

### Descriptores locales:

- Función de Fukui nucleofílica condensada sobre el átomo de azufre ( $f_S^-$ )<sup>128</sup> como medida de la facilidad de reorganizar la densidad electrónica de  $C_P$  una vez que dona electrones al sustrato.

$$f_S^- = q_S(N) - q_S(N-1) \quad (10)$$

siendo  $q_S(N)$  y  $q_S(N-1)$  las cargas NPA del átomo de azufre del residuo de cisteína evaluadas antes y después de la pérdida de un electrón.

- Dureza local ( $\eta$ ), indicador de la dureza localizada sobre un átomo en particular (átomo de azufre en este caso).

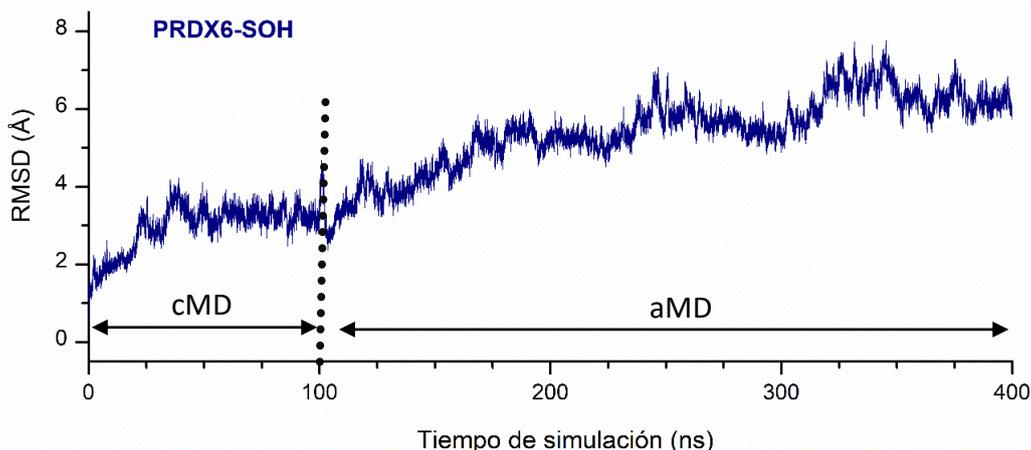
$$\eta = \eta * f \quad (11)$$

Todas las figuras fueron realizadas con los programas VMD 1.9.3<sup>129</sup> y GaussView<sup>130</sup>.

#### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### 4.1. Estructura representativa de Prdx6-SOH en solución

En línea con el primer objetivo de la sección 2.2.1, se simuló en primer lugar el homodímero de hPrdx6 con C<sub>P</sub>-SOH en ambos monómeros en solución (a partir de ahora denominada Prdx6-SOH). En la *figura 9* muestra la evolución del RMSD calculado sobre las posiciones de los C $\alpha$ . Los primeros 100 ns corresponden a la simulación cMD, mientras que los 300 ns finales corresponden a la aMD (siendo esta última la producción utilizada para hacer todos los análisis posteriores).

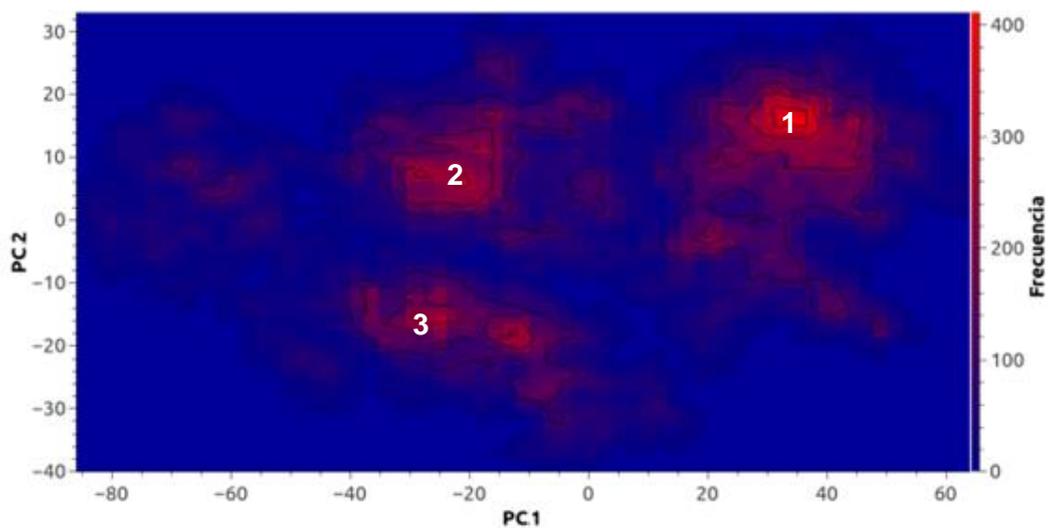


**Figura 9.** Evolución del RMSD de C $\alpha$  en el homodímero de Prdx6-SOH respecto al primer *frame*.

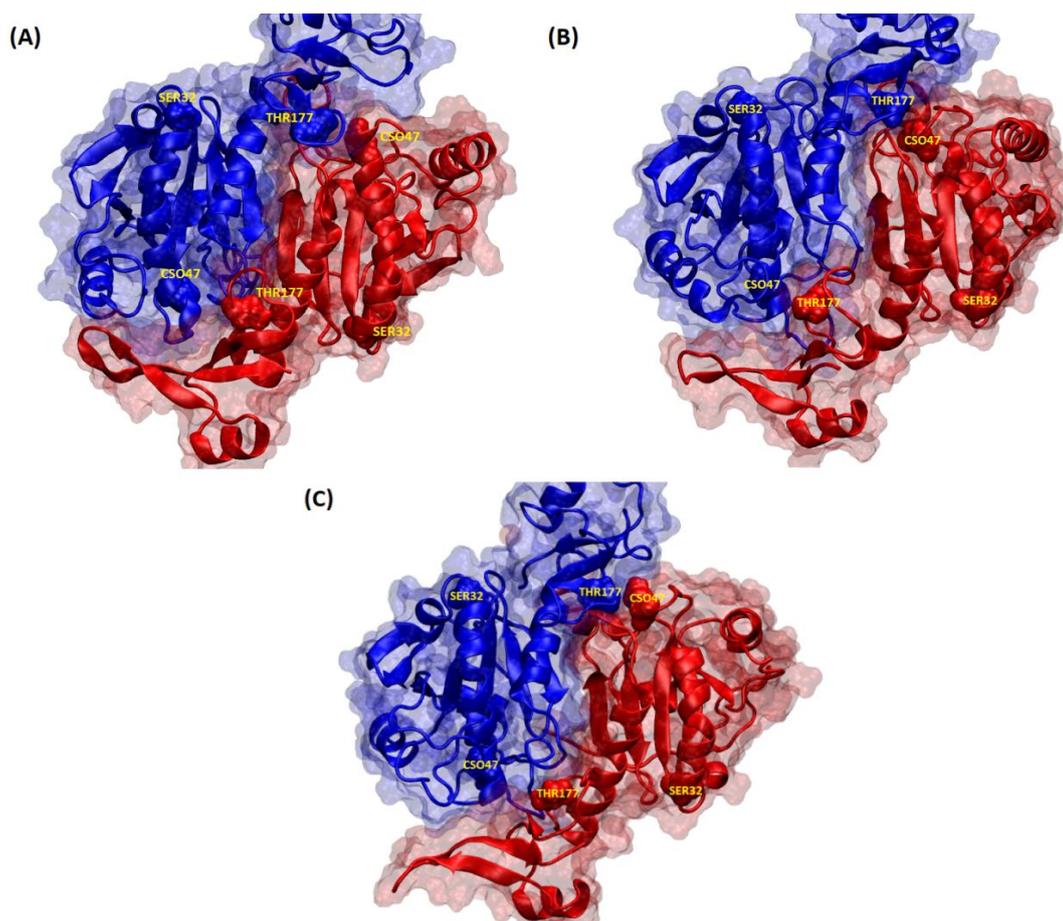
Un valor de RMSD alto indica que durante la simulación la estructura se aparta, en promedio, de forma considerable de la estructura de referencia. Es importante tener en cuenta que las simulaciones aMD suelen dar valores altos de RMSD debido al  $\Delta V(r)$  añadido a los diedros de la proteína, lo que aumenta la flexibilidad de las zonas que intrínsecamente son flexibles, como los *loops*. Utilizando el RMSD como descriptor de convergencia, como se describió en la *sección 3.1*, se observa que a partir de los 225 ns se alcanza la misma.

Para determinar si la proteína adopta diferentes conformaciones durante la simulación, se realizó el PCA según se indica en la *sección 3.3*. En la *figura 10* se muestran un mapa construido usando los dos primeros PC, que recuperan un 51% de la varianza original de la muestra. En el PCA se observan 3 poblaciones (identificadas en la *figura 10* con los números 1, 2 y 3), donde la población con mayor frecuencia es la n<sup>o</sup>1. Para visualizar las diferencias estructurales entre las tres poblaciones, se muestran en la *figura 11* las estructuras representativas correspondientes.

A primera vista, todas las estructuras representativas lucen similares, siendo la correspondiente a la población n<sup>o</sup>1 la más parecida a la cristalográfica, en forma consistente con la proyección de la cristalografía en esta población (coordenadas 42: -2 en el mapa de la *figura 10*). Sin embargo, un examen más detallado revela que hay dos cambios estructurales relevantes que se acentúan progresivamente al pasar de la población n<sup>o</sup>1 a la n<sup>o</sup>2 y a la n<sup>o</sup>3. El primero corresponde a una diferencia a nivel de la interfaz entre monómeros respecto a la estructura cristalográfica, donde se observa un giro que llega a  $\sim 90^\circ$  en la población n<sup>o</sup>3. El segundo corresponde a un desplegamiento de la hélice  $\alpha 2$  de un monómero.

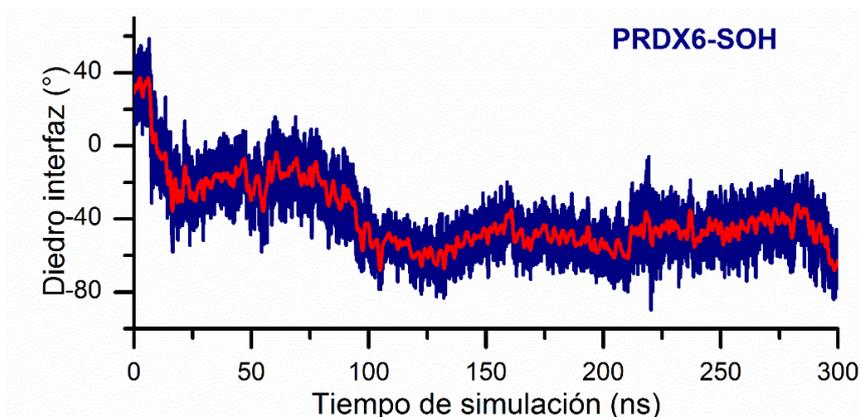


**Figura 10.** Mapa de frecuencia resultante del análisis de componentes principales PC1 vs PC2 de Prdx6-SOH. Los números 1, 2 y 3 sobre el mapa corresponden a las diferentes poblaciones observadas.



**Figura 11.** Estructuras representativas de las tres poblaciones localizadas en el mapa de la *figura 10*. En azul se representa el monómero n°1 y en rojo se representa el monómero n°2. (A) Población n°1. (B) Población n°2. (C) Población n°3.

Para realizar un seguimiento cuantitativo del giro en la interfaz entre los monómeros que diferencia las estructuras de las tres poblaciones, se midió la evolución del diedro formado por los C $\alpha$  de 4 residuos clave (L145 y L148 en cada monómero) de dicha interfaz que es hidrofóbica<sup>58</sup> (*figura 12*). En los primeros 10 ns de aMD hay un cambio marcado, del orden de 50° en este diedro, y después de los primeros 100 ns este cambio se acentúa hasta una diferencia de 90°. Se presume que un cambio de esta índole alteraría de forma significativa la estabilidad del dímero.

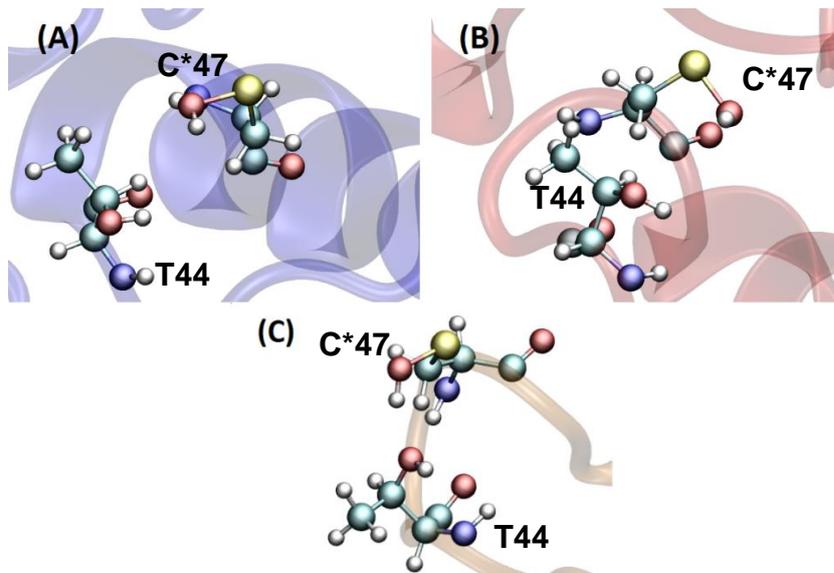


**Figura 12.** Fluctuación del diedro de los 4 residuos claves de la interfaz entre monómeros de la Prdx6-SOH. En azul evolución de los valores, y en rojo promedios calculados cada 1000 frames contiguos.

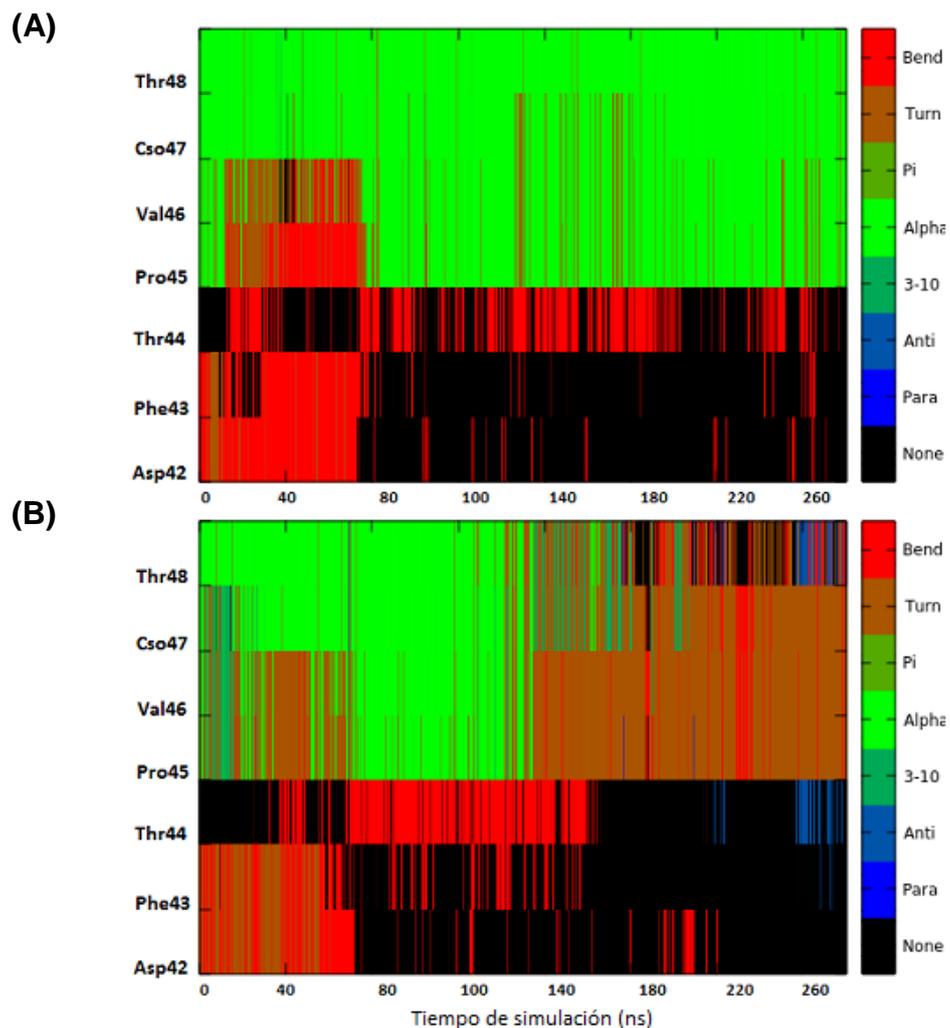
Según se mencionó en la sección 1.3 de este trabajo, la evidencia experimental parecería indicar que la glutationilación en la C<sub>P</sub> actuaría como interruptor del estado de oligomerización de las Prdx 1-Cys<sup>36</sup>. En el caso específico de hPrdx6 se plantea que la oxidación de la C<sub>P</sub> a -SOH sería quien activa este interruptor del estado de oligomerización favoreciendo la forma monomérica, lo que facilitaría a su vez la formación del heterodímero de hPrdx6 con  $\pi$ GST participante en el ciclo catalítico<sup>60</sup>. Debido a que se sabe el estado de oligomerización no afecta la actividad iPLA<sub>2</sub> de hPrdx6<sup>60</sup>, este giro de ~50° en la interfaz no afectaría la viabilidad del objetivo de estudiar el efecto de la fosforilación sobre dicha actividad.

En cuanto al segundo cambio estructural relevante entre las poblaciones n°2 y n°3 (el desplegamiento parcial de la hélice  $\alpha$ 2 de un monómero, región que contiene los residuos conservados del sitio activo peroxidasa, T44 y C\*47), el mismo se aprecia en la *figura 13* para las estructuras representativas de las tres poblaciones. Este cambio redunda en un acercamiento de la T177 de un monómero a la C\*47 del otro.

Para seguir este cambio se midió la evolución de estructura secundaria de los residuos conservados (H36, T44 y C47) utilizando la biblioteca de descriptores *dssp* como se observa en la *figura 14*.



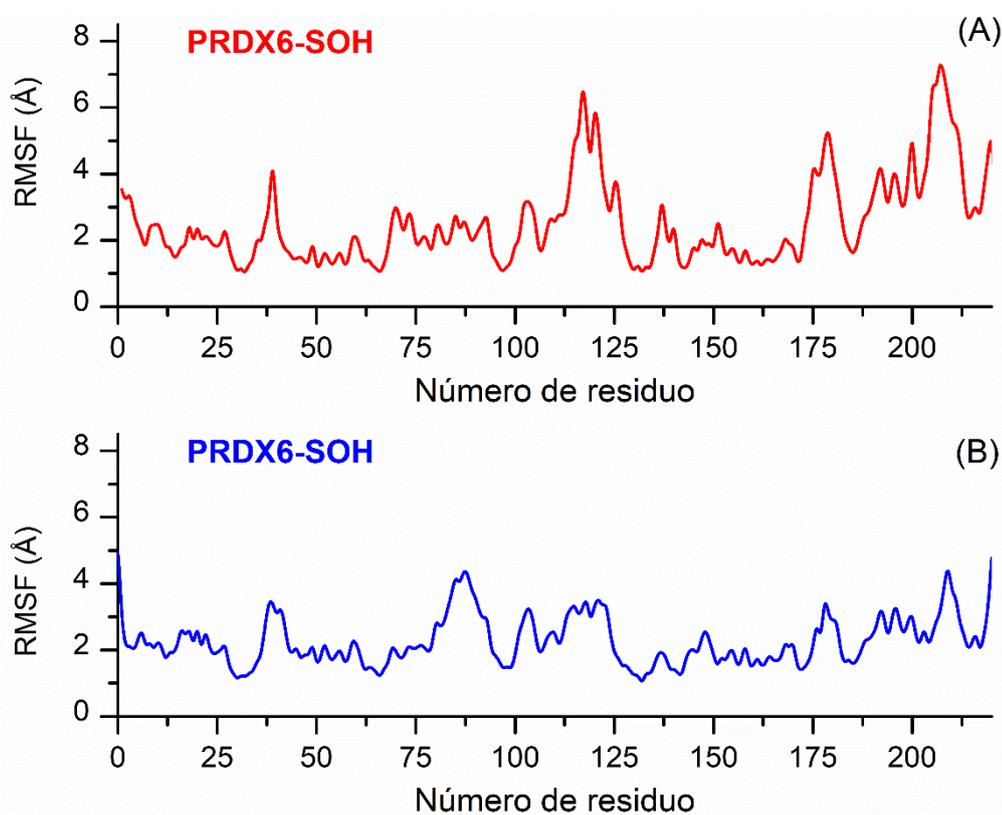
**Figura 13.** Estructura secundaria y terciaria y residuos conservados (representación en bolas y varillas) en el entorno del sitio peroxidasa del segundo monómero de las estructuras representativas de la figura 11. **(A)** Población n°1. **(B)** Población n°2. **(C)** Población n°3.



**Figura 14.** Evolución temporal a lo largo de 300 ns de aMD de la estructura secundaria en el entorno de la C<sub>P</sub>-SOH de cada monómero. **(A)** Monómero 1. **(B)** Monómero 2.

A partir de la *figura 14* se observa que el comportamiento entre los monómeros luego de 140 ns se diferencia. En particular, el monómero 2 (*figura 14(B)*) muestra el despliegue de la hélice  $\alpha_2$ , en forma similar a la transición FF  $\rightarrow$  LU reportada para Prdx 2-Cys. Sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado evidencia de que esta transición ocurra en las peroxirredoxinas 1-Cys. La disminución de barreras locales resultante de la aMD podría permitir que la simulación evolucione hacia estructuras sin un sentido fisiológico real. Teniendo en cuenta esto, para posterior análisis se considera aquí únicamente a la estructura representativa de la población n°1 obtenida a partir del PCA, que es la población con mayor frecuencia y conserva la hélice  $\alpha_2$  requerida para la acción fisiológica.

A partir del **RMSF** (del inglés *root mean square fluctuation*), un descriptor útil para identificar regiones de una proteína con mayor o menor flexibilidad, se analiza este atributo de cada uno de los monómeros para todas las estructuras que integran la población n°1.

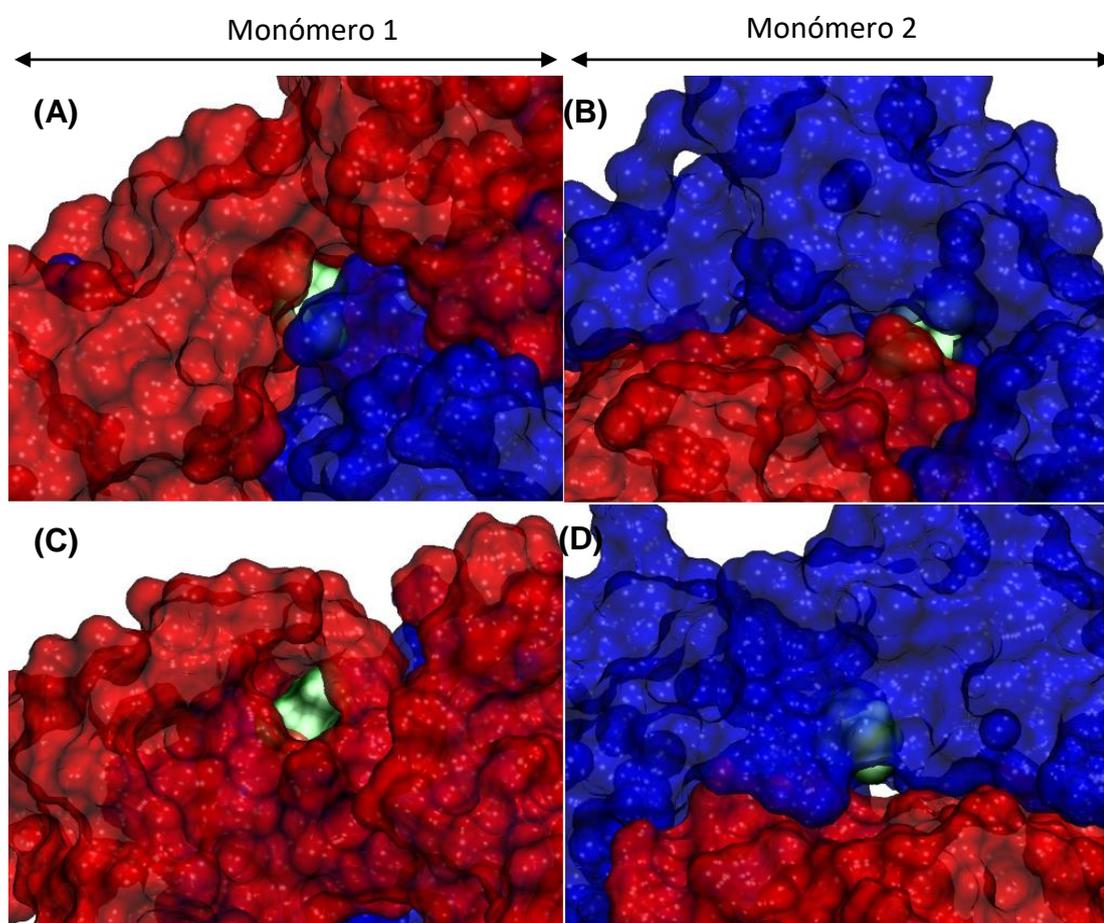


**Figura 15.** RMSF de la proteína nativa en estado oxidado. **(A)** Monómero 1. **(B)** Monómero 2.

De la *figura 15* se puede observar que la estructura en el entorno de los residuos de ambos sitios catalíticos (H26, S32 y D140 para el sitio iPLA<sub>2</sub> y H39, T44, C47 y R132 para el sitio peroxidasa) presentan baja flexibilidad, en el orden de 0.5 Å, lo cual es consistente con el hecho que los sitios catalíticos suelen ser estructurados.

La mayor flexibilidad se encuentra en la región C-terminal de la proteína donde se encuentra la T177, que aparece muy enterrada en la estructura cristalográfica de partida 1PRX. Esto coincide con cuanto se reportó a partir de estudios de la proteína reducida en solución abordados por medio de *zero-length chemical cross-linking*<sup>58</sup>, que sugieren que dicha región presenta grandes cambios respecto a la estructura cristalográfica y que la flexibilidad de la región C-terminal podría ayudar a la plasticidad

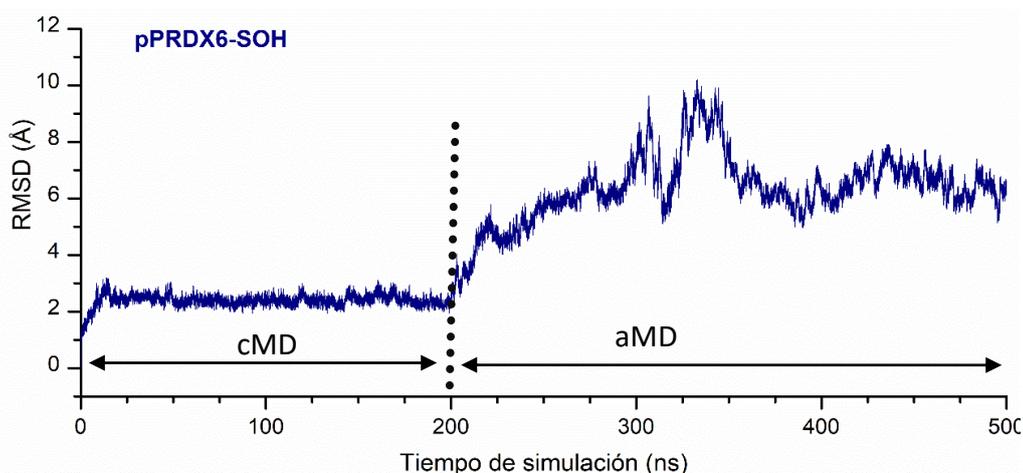
de la enzima. El residuo T177 está más expuesto en solución respecto a la cristalografía<sup>58</sup>, de esta forma puede fosforilarse por la MAPK, como se ha reportado *in vitro*<sup>81</sup>. Tal como se muestra en la *figura 16*, la exposición de la T177 en la estructura es superior, en consistencia con la evidencia experimental.



**Figura 16.** Comparación del grado de exposición de la T177 (en verde) por monómero en Prdx6-SOH: estructura cristalina (arriba) vs estructura extraída de la simulación aMD (abajo). (A) y (B) monómeros en el cristal 1PRX. (C) y (D) monómeros en la estructura representativa.

## 4.2. Caracterización de la estructura tipo molten-globule de pPrdx6-SOH

Continuando con los objetivos específicos planteados en la sección 2.2.1, se busca en esta sección caracterizar una estructura representativa de hPrdx6 fosforilada en T177 (T\*177), verificando con los diversos descriptores estructurales planteados en la sección 3.2 si adopta una conformación tipo *molten globule*. En la *figura 17* se muestra el RMSD de los C $\alpha$  de la simulación de la proteína fosforilada (a partir de ahora pPrdx6-SOH). Los primeros 200 ns corresponden a la simulación cMD, mientras que los 300 ns finales corresponden a la aMD (siendo esta última la producción utilizada para hacer todos los análisis posteriores).



**Figura 17.** Evolución del RMSD de C $\alpha$  en el homodímero de pPrdx6-SOH respecto al primer *frame*.

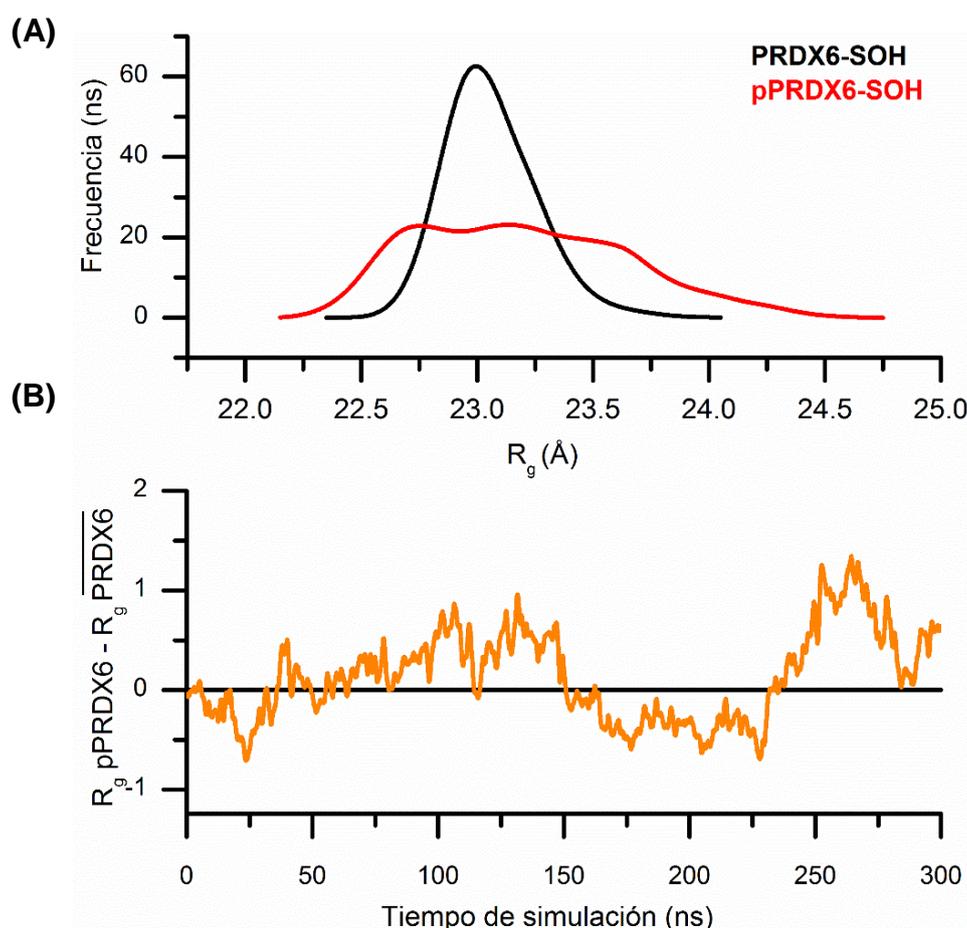
En forma análoga a lo observado para Prdx6-SOH en la *figura 9*, la aceleración induce un aumento en el valor neto de RMSD, aunque una vez fosforilada la proteína homodimérica presenta variaciones muy abruptas que podrían coincidir con la exploración de nuevas conformaciones. Utilizando el criterio de convergencia establecido en la sección 3.1, en la *figura 17* se observa que a partir de 350 ns la simulación converge. Una vez que se tiene la simulación convergida, es necesario verificar si la estructura de pPrdx6-SOH es tipo *molten globule*.

En la *figura 18* se compara la distribución de valores del radio de giro de la proteína ( $R_g$ ) en el estado nativo y fosforilado junto a la evolución temporal de la diferencia del  $R_g$  de la proteína fosforilada respecto a la media del  $R_g$  correspondiente a la nativa. Mientras que en la *figura 18(A)* se aprecia que Prdx6-SOH presenta un único máximo de  $R_g$  con un valor de  $\sim 23.0$  Å (similar al valor que presentan ambas proteínas previo a aplicar la aceleración), pPrdx6-SOH muestra una distribución mucho más dispersa que se extiende desde  $\sim 22.5$  Å hasta  $\sim 24.0$  Å. Esto indica que la proteína fosforilada no presenta un único estado de compactación, sino que a lo largo de la simulación pasó por estados de mayor y menor compactación.

A partir de la *figura 18(B)* se ve que el valor del  $R_g$  de pPrdx6-SOH es mayor durante  $\sim 70\%$  de la simulación. Existe un intervalo entre 150 ns y 225 ns en el que el grado de compactación de la proteína fosforilada resulta ser superior al de la nativa, volviendo luego a un estado más desplegado.

En suma, este comportamiento indicaría que pPrdx6-SOH presenta una estructura terciaria con mayor grado de desorden respecto a Prdx6-SOH ya que fluctúa entre diferentes estados de compactación. La pérdida significativa de estructura

terciaria es una de las características del estado *molten globule*<sup>109</sup>, por lo cual esta es una primera evidencia en el camino a confirmar que la fosforilación provoca ese tipo de cambio conformacional. El mayor valor de  $R_g$  se alcanza para la proteína fosforilada hacia el final de la simulación, representando un aumento de 4.4% respecto a Prdx6-SOH. Estos cambios significativos en el  $R_g$  post-fosforilación son consistentes con el aumento de  $R_g$  reportado para algunas estructuras caracterizadas como *molten globule* sin llegar al entorno del 20%<sup>109,111</sup>.

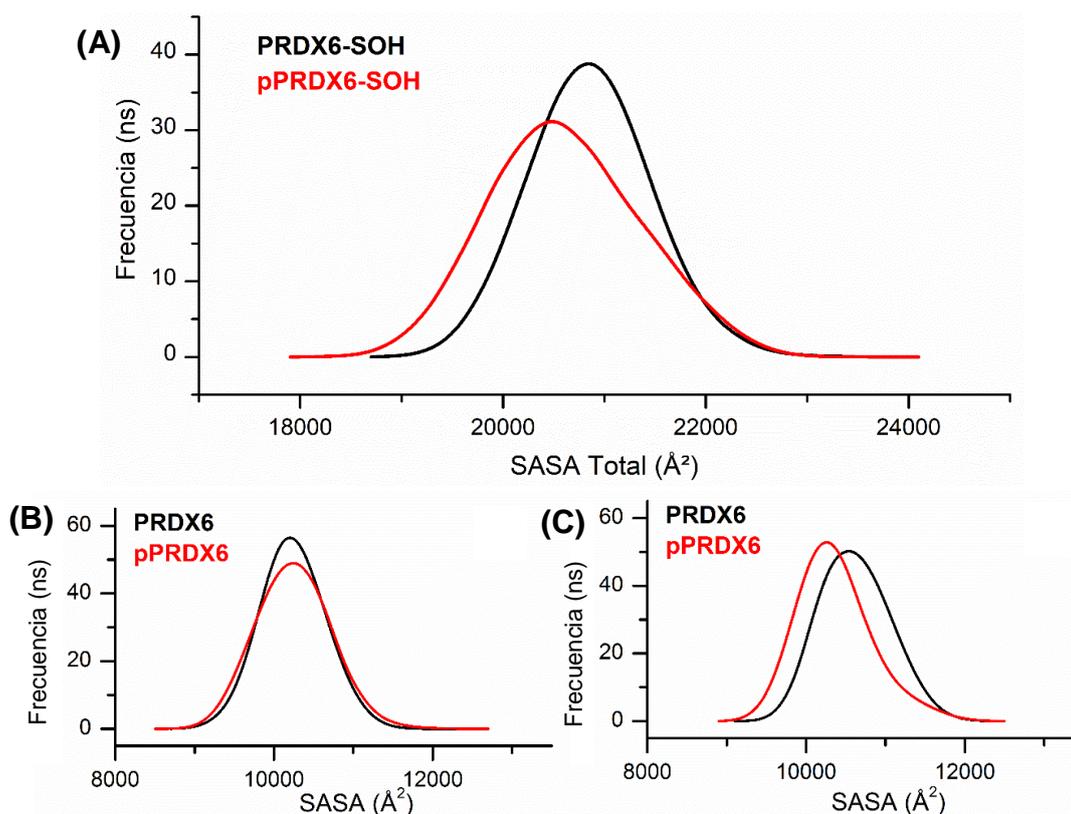


**Figura 18.** Radio de giro de la Prdx6-SOH. **(A)** Histograma de frecuencia del radio de giro a lo largo de la aMD. **(B)** Evolución del radio de giro de la pPrdx6-SOH normalizado por la media del radio de giro de Prdx6-SOH.

En la *figura 19*, se muestra la comparación del SASA total (arriba) y por monómero (abajo) antes y después de fosforilar, en negro y rojo respectivamente. De forma contraria a lo que se espera para proteínas que cambian a una conformación *molten globule*<sup>2</sup>, en el caso de pPrdx6-SOH se ve una ligera disminución en el área global del homodímero expuesta al solvente respecto a Prdx6-SOH.

Debido a que el SASA de la proteína cuantifica su superficie total, la estructura cuaternaria que adopta el homodímero juega un rol importante en su definición. En la *figura 19(B)* se muestra la variación de SASA de cada monómero por separado. Allí se ve que los residuos del segundo monómero se encuentran más expuestos que los del primero, y muestran mayor diferencia entre el estado nativo y fosforilado, donde se reduce el área expuesta.

<sup>2</sup> La pérdida parcial o total de estructura terciaria debería aumentar la superficie expuesta al solvente de los residuos internos de la proteína.

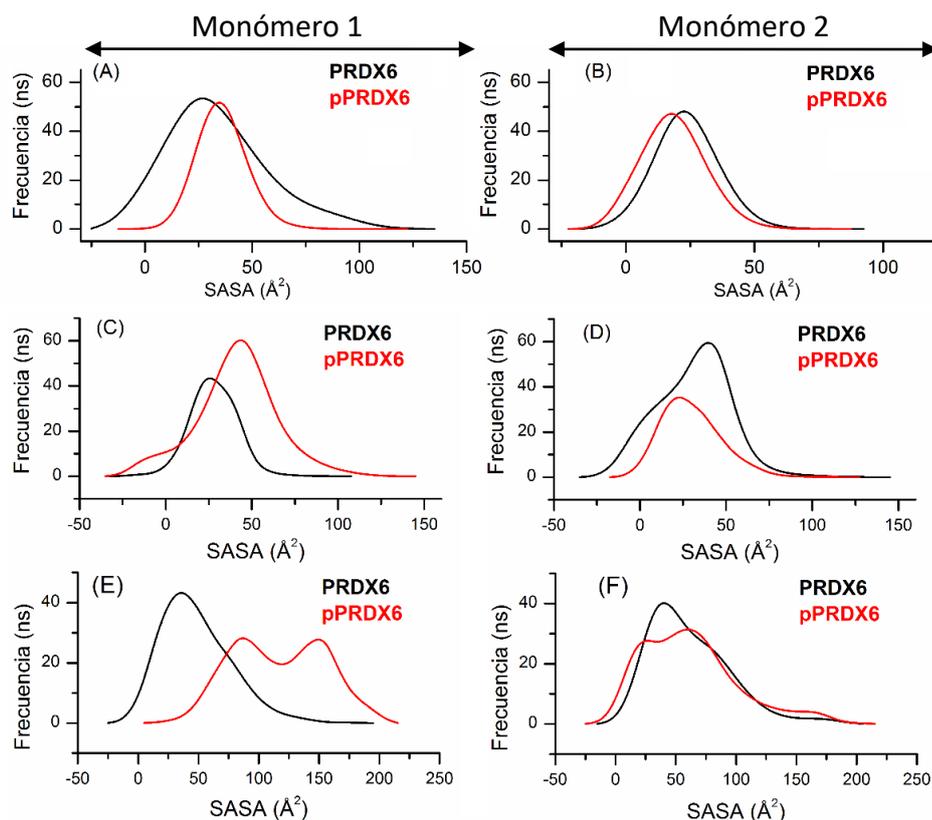


**Figura 19.** Comparación del SASA de Prdx6-SOH en su estado nativo y fosforilado global (A) y por monómero (B) y (C).

Este descriptor parecería indicar que como resultado de la fosforilación no hay en Prdx6-SOH un aumento del número de residuos internos expuestos al solvente. Teniendo en cuenta que previamente se observó un aumento significativo en el valor de  $R_g$  asociado a la fosforilación de esta proteína que no conlleva un aumento de SASA, se podría explicar estas observaciones hipotetizando que hay zonas de la proteína expuestas en el estado nativo que pierden su estructura secundaria y/o terciaria, induciendo un aumento del  $R_g$ , pero no del SASA global de la proteína.

Hasta aquí se verifica que la proteína sufre un cambio de conformación post-fosforilación. Para verificar si el mismo corresponde al tipo *molten globule* se utilizaron indicadores más específicos reportados para Prdx6-SOH<sup>80,81</sup>. Debido a que la disminución en la intensidad de fluorescencia intrínseca (IFI) de la proteína se asocia a una mayor exposición de los residuos triptófanos de su estructura, y se mencionó en la sección 1.5 que Prdx6-SOH disminuye su IFI al fosforilarse, se esperaba que el SASA de los tres residuos triptófanos de pPrdx6-SOH (W33, W82 y W181), mostrado en la *figura 20* por monómero y residuo, aumente.

Una primera conclusión que se extrae de dicha figura es que la exposición de W33, W82 y W181 es asimétrica entre monómeros, y dicha asimetría se acentúa tras fosforilar. Una correcta comparación entre la exposición de los diferentes triptófanos en la proteína nativa y fosforilada requiere usar el valor medio del SASA que los mismos presentan respecto a un valor de referencia (*Tabla 1*). Teniendo en cuenta que W33 y W82 se encuentran en una  $\alpha$ -hélice de hPrdx6 y W181 en un motivo *random coil*, se tomó como valores de referencia la exposición media al solvente de residuos triptófano extraídas de una base de datos<sup>131</sup> y presentes en diferentes estructuras secundarias representativas de las anteriores.



**Figura 20.** Exposición al solvente de los residuos triptófano. (A) y (B) W33 del monómero 1 y 2. (C) W82 del monómero 1. (D) W82 del monómero 2. (E) W181 del monómero 1. (F) W181 del monómero 2.

**Tabla 1.** Superficie expuesta al solvente (en Å<sup>2</sup>) de los residuos de triptófano (W).

| Residuo     | Prdx6-SOH<br>Mon1/Mon2 | pPrdx6-SOH<br>Mon1/Mon2 | Media<br>representativa |
|-------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>W33</b>  | 28 / 25                | 45 / 23                 | 25                      |
| <b>W82</b>  | 22 / 42                | 45 / 28                 | 25                      |
| <b>W181</b> | 36 / 41                | 85 + 150 / 39 + 43      | 41                      |

Nota: los valores en las columnas 2 y 3 son extraídos de los máximos de la figura 20; en el caso de W181 para cada monómero de la proteína fosforilada se hallaron dos máximos.

De los valores presentes en la *Tabla 1* se desprende que la fosforilación causa aumentos significativos en el valor de la SASA de los tres residuos de triptófano del monómero 1 y de W82 del monómero 2. En el experimento *in vitro*<sup>81</sup> no se determinó la contribución por monómero a la disminución en IFI sino el promedio entre ambos monómeros; por consistencia se estudió aquí el promedio de los máximos. En base a ello se determina que mientras Prdx6-SOH se aleja menos de los valores medios tabulados (6 % para W33/W181; 12 % para W82), pPrdx6-SOH lo hace en mayor medida (27 % para W33, 32 % para W82 y 48 % para W181). Por lo tanto, el cambio conformacional post-fosforilación seguido por simulaciones aMD es consistente con lo reportado (ver sección 1.5) en cuanto a la disminución de la IFI.

Siguiendo con los cambios mencionados en la sección 1.5, se estudia el efecto de la fosforilación sobre la estructura secundaria de la proteína usando descriptores *dssp*, descritos en la sección 3.3.2. El contenido de la *Tabla 2* muestra que la estructura secundaria de pPrdx6-SOH va en el mismo sentido que lo reportado experimentalmente, una pequeña pérdida que coincide con los cambios observados hacia una estructura *molten globule*, caracterizada por una pérdida de estructura terciaria.

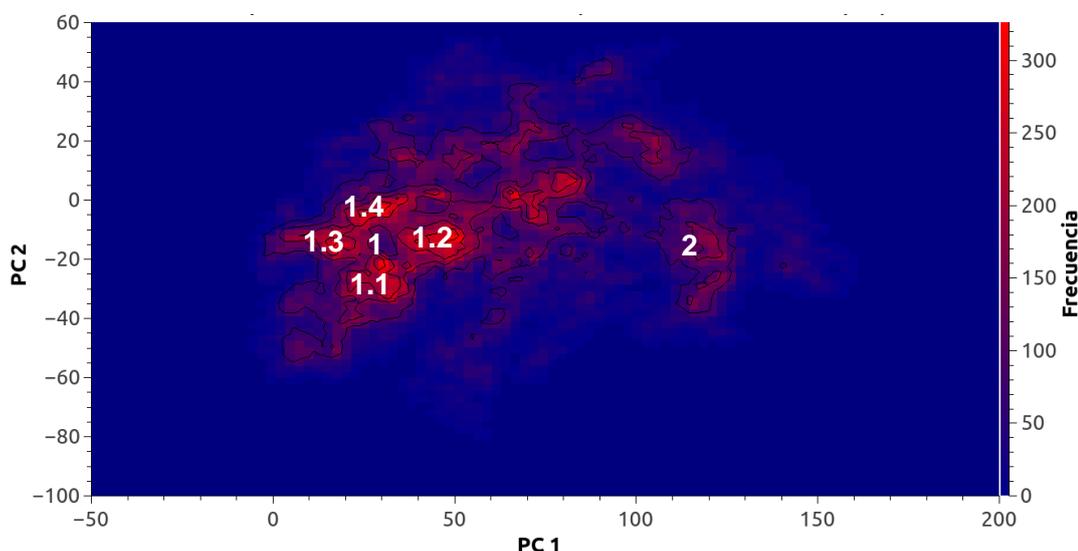
**Tabla 2.** Efecto de la fosforilación sobre el porcentaje de  $\alpha$ -hélice en la estructura experimental y simulada

|                           | Prdx6-SOH | pPrdx6-SOH |
|---------------------------|-----------|------------|
| <b>Valor experimental</b> | 28.9      | 21.7       |
| <b>Simulación aMD</b>     | 28.8      | 25.6       |

El valor de porcentaje de  $\alpha$ -hélice presente en la estructura secundaria de Prdx6-SOH es próximo al valor de referencia, apartándose tan solo en 0.1 %. En la sección 4.1 se vio que la interfaz de la proteína oxidada en solución se ve alterada de forma significativa respecto a la cristalografía (*figuras 11 y 12*), sin embargo, la estructura secundaria de Prdx6-SOH no se altera durante la simulación. Esto es consistente con la hipótesis de que la oxidación en la C<sub>P</sub> lleva a la disociación del dímero sin pérdida del plegamiento tipo tiorredoxina.

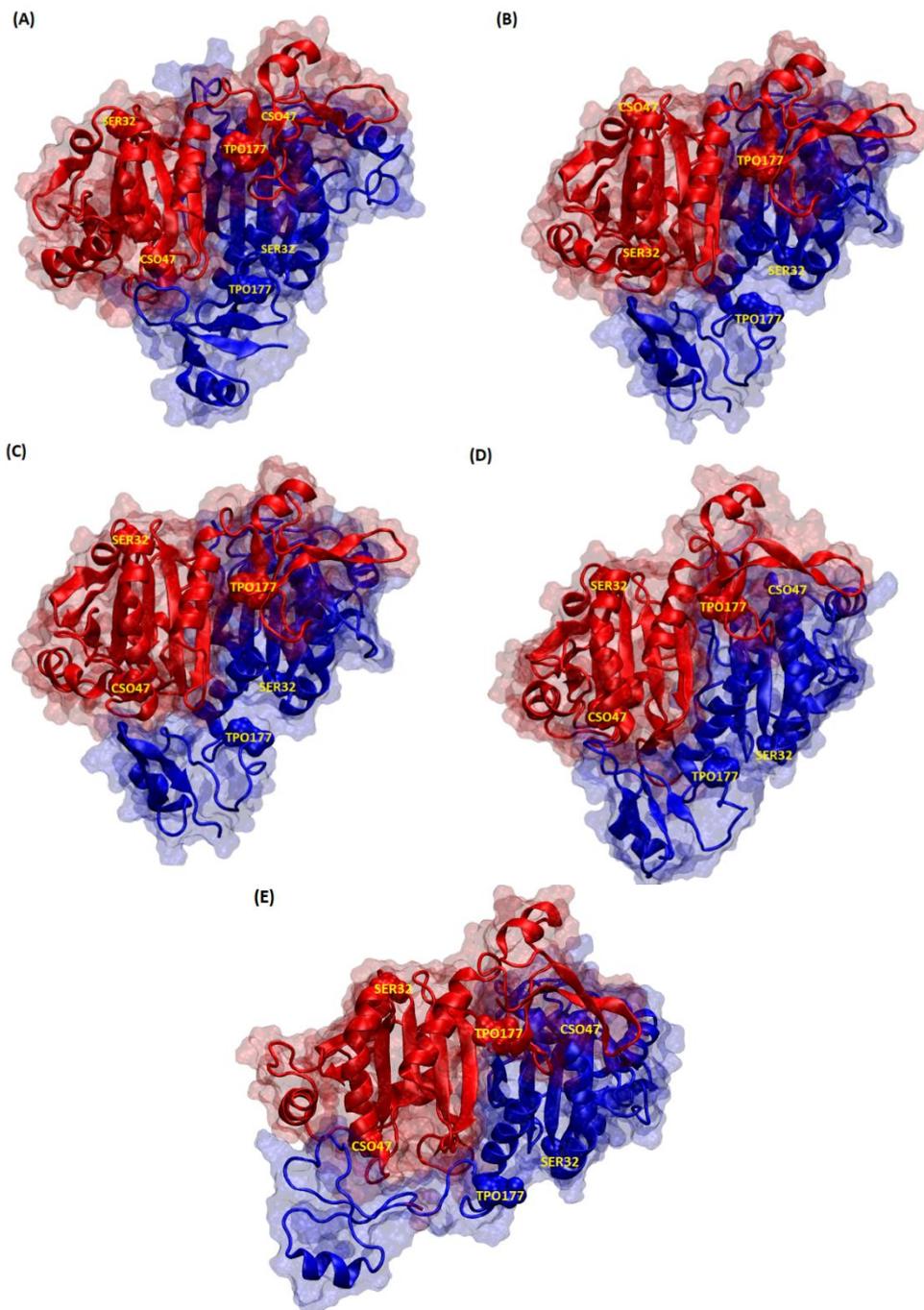
En base a la serie de descriptores usada, la estructura estable obtenida en solución para la proteína fosforilada presenta cambios estructurales que se condicen con cuanto se ha reportado experimentalmente y a su vez con la hipótesis de que la fosforilación de la proteína induce la transición a una conformación tipo *molten globule*.

Para determinar los cambios asociados a esta PTM respecto a la proteína en estado nativo en solución, se obtuvo una estructura representativa de pPrdx6-SOH mediante un análisis PCA siguiendo un procedimiento análogo al usado en la sección 4.1. En la *figura 21* se observa el mapa de frecuencia generado a partir de los dos primeros PC (PC1 y PC2), que recuperan 56% de la varianza de la muestra original.



**Figura 21.** Mapa de frecuencia resultante del análisis de componentes principales PC1 vs PC2 de pPrdx6-SOH. Las etiquetas 1 (1.1, 1.2, 1.3, 1.4) y 2 regiones más pobladas del mapa corresponden a las diferentes poblaciones observadas.

A partir del PCA se determina que existen dos poblaciones principales bien diferenciadas en su localización sobre el eje horizontal correspondiente a PC1. La primera población engloba a su vez cuatro estados diferentes, identificados en la *figura 21* como 1.1, 1.2, 1.3 y 1.4. Para apreciar las diferencias estructurales existentes entre esas cinco poblaciones, en la *figura 23* se muestran estructuras representativas de cada una de ellas.

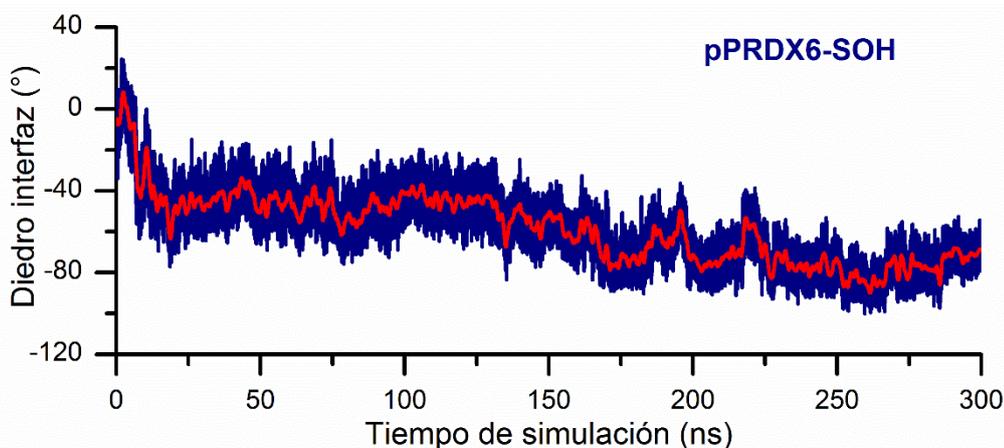


**Figura 22.** Estructuras representativas de las cinco poblaciones localizadas en el mapa de la *figura 21*. En azul y rojo se representan los monómeros 1 y 2, respectivamente. **(A)** Población 1.1 **(B)** Población 1.2 **(C)** Población 1.3. **(D)** Población 1.4 **(E)** Población 2.

La estructura representativa de la población 2, mostrada en la *figura 24(E)* se diferencia de las cuatro variantes de la población 1 (y también de la estructura cristalográfica) en su región C-terminal, que se altera en forma significativa, perdiendo casi por completo su estructura secundaria y terciaria.

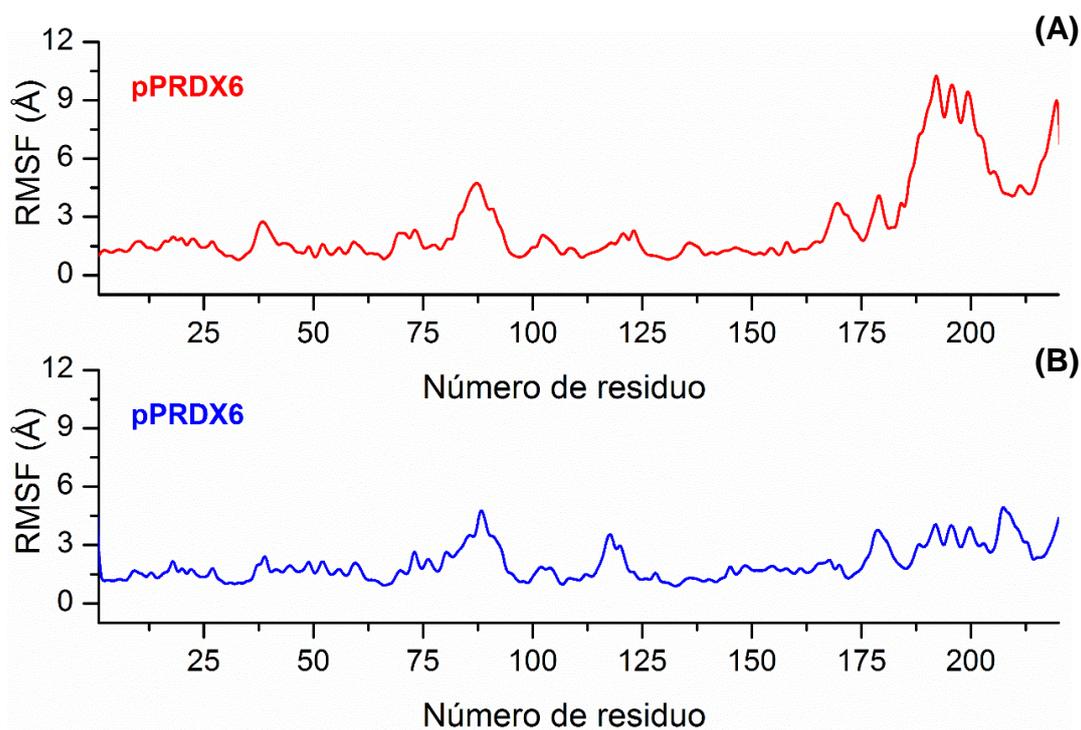
Entre los cuatro estados diferentes de la población 1 se engloba la evolución de la estructura durante la simulación aMD hasta alcanzar la conformación *molten globule*. Las estructuras de la población 1.1 son más semejantes a la estructura cristalográfica, que se proyecta dentro de dicha población (PC1: 17; PC2: -19).

Los cambios observados en la simulación de la dinámica de la proteína, desde la estructura cristalográfica hasta la conformación *molten globule*, ocurren de forma paulatina. En primera instancia cambia la orientación del dominio C-terminal del monómero 1, representado en rojo en las *figuras 23(A-E)*. En simultáneo ocurre el giro en la interfaz del dímero, cuya evolución se sigue en forma cuantitativa (*figura 24*) a través del ángulo diedro formado por los C $\alpha$  de los residuos L145 y L148 de cada uno de los monómeros, al igual que se realizó en la sección 4.1 para la proteína sin fosforilar. Este cambio se encuentra relacionado al estado redox de la cisteína catalítica (C47), tal como se discutió previamente. Una vez transcurrido el giro de la interfaz del dímero, la región C-terminal del primer monómero comienza a desordenarse de forma masiva. La región C-terminal del segundo monómero, representado en azul en las *figuras 23(A-E)*, también se ve alterada. En ninguna estructura se observa el desplegamiento parcial de la hélice  $\alpha_2$ , que fuera observado para la proteína nativa en solución de referencia.



**Figura 23.** Evolución temporal del ángulo diedro definido por los C $\alpha$  de los 4 residuos clave de la interfaz entre monómeros para la pPrdx6-SOH. En azul se aprecia la fluctuación valor a valor; en rojo los promedios calculados cada 1000 *frames* contiguos.

De acuerdo con estas estructuras representativas, la población 2 del PCA recoge los estados que presentan mayores cambios en estructura secundaria y terciaria de la proteína, representando el estado *molten globule* de pPrdx6-SOH. Una vez que identificada la población que corresponde a este estado, se determinó su flexibilidad por residuo a través del RMSF (*figura 24*), de la misma forma que se realizó en la sección anterior para la proteína sin fosforilar.

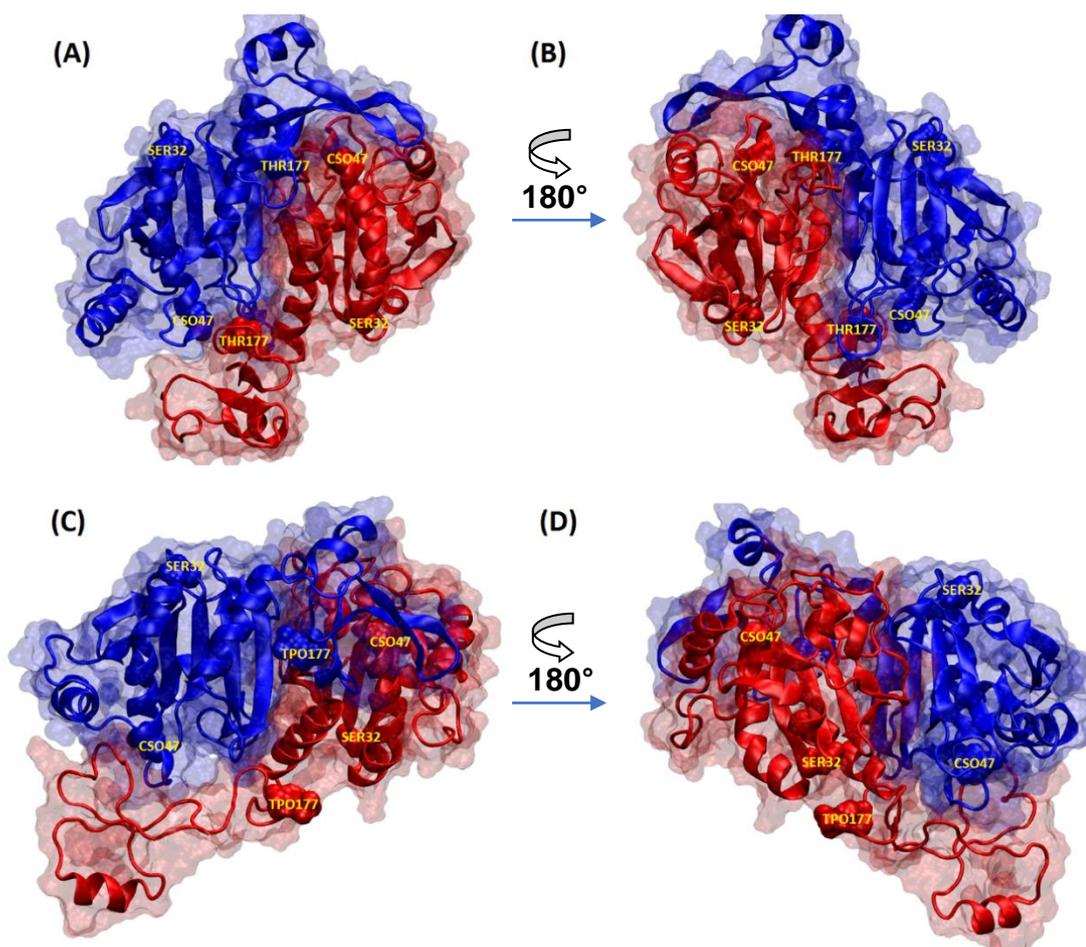


**Figura 24.** RMSF por residuo de la proteína nativa en estado oxidado con la T\*177 fosforilada. **(A)** Monómero 1. **(B)** Monómero 2.

Tras introducir la PTM por fosforilación, fuera de la región C-terminal, la proteína parece tener sus residuos dispuestos en forma muy poco flexible, contrariamente a lo que se esperaría para una conformación *molten globule*. A lo largo de la sección 4.1 y 4.2 se determinó que la fosforilación y la disociación del homodímero influyen sobre la estructura secundaria y cuaternaria de la proteína, respectivamente, pero en ningún momento se evidencia una pérdida significativa del plegamiento tipo tiorredoxina característico de las Prdx. Por ejemplo, la hoja  $\beta_6$  (donde se encuentra el residuo conservado de arginina, ver sección 1.4) se mantiene estructurada durante 84% y 87% de la simulación aMD para Prdx6-SOH y pPrdx6-SOH, respectivamente. No hay un aumento importante en la flexibilidad global de la proteína, exceptuando la región C-terminal, señal de que la proteína mantiene el plegamiento estructurado requerido para su función peroxidasa. En la sección 7.3 del Anexo se presentan datos de evolución del porcentaje de presencia de los motivos de estructura secundaria del plegamiento tiorredoxina a lo largo de la simulación.

### 4.3. Comparación estructural entre pPrdx6-SOH y Prdx6-SOH

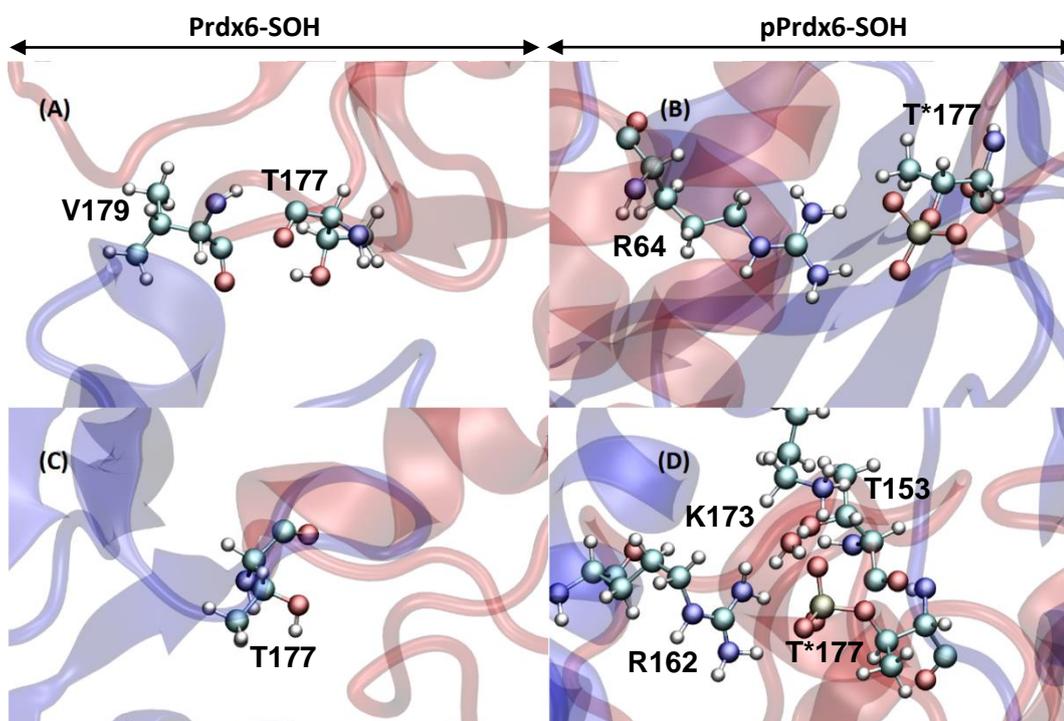
En la sección 4.1 y 4.2 se obtuvieron estructuras representativas de Prdx6-SOH en solución en su estado nativo y fosforilado, respectivamente, caracterizando la evolución hacia un estado *molten globule*. Para el análisis comparativo que sigue, se consideraron todas las estructuras extraídas de los PCA. En la *figura 25* se aprecian las características estructurales globales de ambos homodímeros, recordando que se intenta vincular el aumento de actividad iPLA<sub>2</sub> observado tras la fosforilación con cambios en la estructura proteica y su dinámica, detalladas a nivel atómico.



**Figura 25.** Dos vistas de la estructura representativa de Prdx6-SOH en su estado nativo (arriba, (A) y (B)) y fosforilado (abajo, (C) y (D)).

Las diferencias más significativas entre ambas estructuras ocurren a nivel de la región C-terminal de ambos monómeros. En el primer monómero de la proteína fosforilada, representado en rojo en la *figura 25* (C-D), hay una pérdida de estructura secundaria en las hojas  $\beta 9$  y  $\beta 10$  y una disminución en la hélice  $\alpha 6$ . Estas estructuras secundarias son adicionales al pliegue tipo tiorredoxina<sup>27,28</sup> (el cual se mantiene en ambas estructuras, como se mencionó en la sección anterior) por lo que pese a su pérdida, la enzima podría seguir funcionando como una peroxidasa. En el segundo monómero, representado en azul en la *figura 25* (C-D), también hay una reducción de estos motivos, aunque no desaparecen completamente. Estos cambios podrían explicarse por modificaciones drásticas en el entorno de la T177 cuando la misma se encuentra fosforilada. Para comprobarlo se examinó en mayor detalle el microentorno

de este residuo en la proteína nativa y tras su modificación PTM por fosforilación (figura 26).



**Figura 26.** Estructura secundaria y terciaria y residuos que interaccionan con la T177 (representación en bolas y varillas) de ambos monómeros en la proteína nativa (izquierda) y fosforilada (derecha). (A) y (B) corresponden al primer monómero; (C) y (D) al segundo monómero.

Un análisis de la persistencia (ocupación) de las interacciones en la red de enlace de hidrógeno (EdH) de T177 durante la simulación aMD de cada sistema muestra que en la proteína nativa T177 actúa como donante de H hacia residuos diferentes<sup>3</sup> durante ~35% de la simulación en el primer monómero y ~37% en el segundo, por lo que la red de EdH en dicha región no presenta diferencias significativas entre monómeros.

Una vez fosforilada, la T\*177 se transforma en aceptora de EdH mediante el grupo fosfato, preferentemente en interacción con residuos cargados positivamente, presentando además interacciones puramente electrostáticas. En la figura 26 y en la Tabla 3 se aprecian y cuantifican características de las interacciones de T\*177 en ambos monómeros que ponen en evidencia que la red de EdH que estabiliza al grupo fosfato incorporado varía entre monómeros.

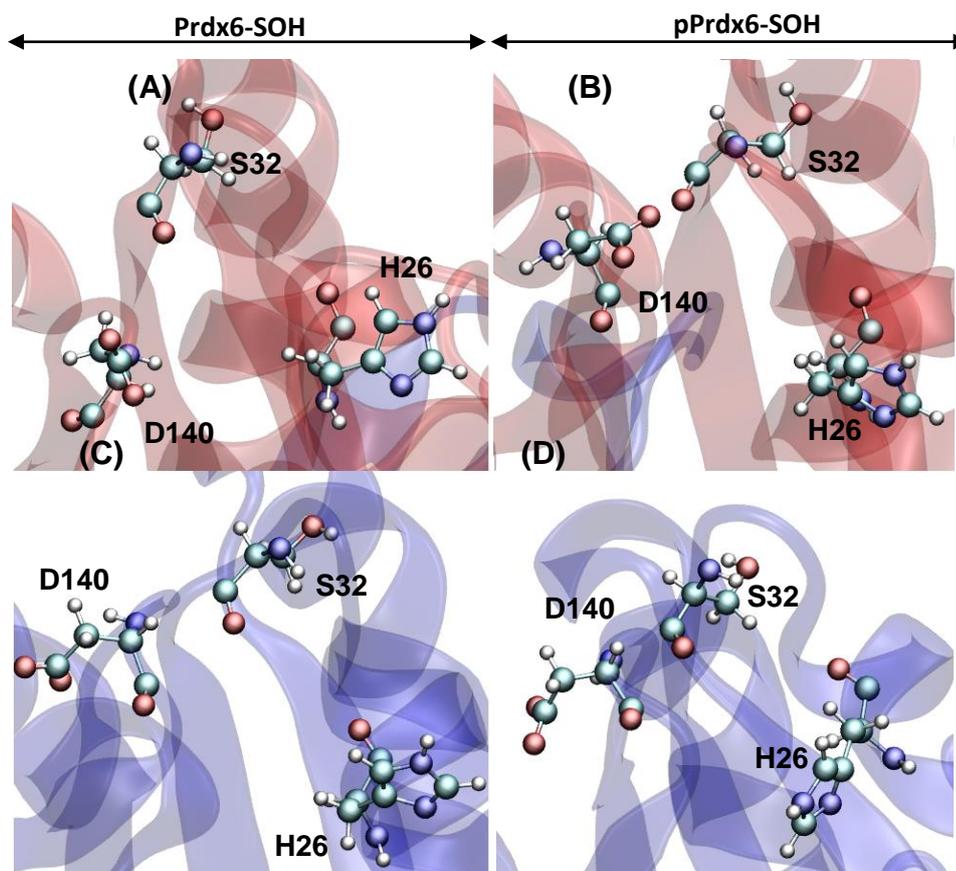
**Tabla 3.** Porcentaje de ocupación de EdH en el entorno de T\*177 en pPrdx6-SOH.

| Monómero | R64 | T152 | T153 | R162 | K174 | V176 |
|----------|-----|------|------|------|------|------|
| Mon1     | 100 | 0    | 0    | 1    | 11   | 3    |
| Mon2     | 0   | 58   | 66   | 84   | 76   | 0    |

<sup>3</sup> En la figura 26 la T177 del monómero 1 de la proteína nativa se muestra cercana a la V179, aunque el análisis de ocupación de enlace de hidrógeno señala que la interacción no es significativa, ya que está presente en ~1% de la simulación.

En el caso del monómero 1 de pPrdx6-SOH, tal como se aprecia en la *figura 26(B)* y en la Tabla 3, la interacción de EdH con mayor ocupación durante la simulación ocurre entre la R64 y el grupo fosfato de la T\*177. En el monómero 2, son otros cuatro los residuos con capacidad de estabilizar a T177-PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Estos 5 residuos (R64, T152, T153, R162 y K174) pueden estabilizar a la T\*177 con diferente fuerza, reflejada en el porcentaje de ocupación de EdH durante la simulación, siendo por lejos la interacción con la R64 la de mayor persistencia y, por tanto, la de mayor fuerza. Tanto R162 como K174 pueden formar puentes salinos con T\*177, relevantes en la estabilización de grupos fosfato en proteínas<sup>132</sup>. En la estructura cristalográfica 1PRX el residuo R64 se encuentra bastante alejado de la T177 (distancia entre sus C $\alpha$  de ~15 Å), mientras que los otros cuatro residuos se encuentran próximos. Para que la R64 pueda interactuar con la T177 se requiere que la región C-terminal pierda su estructura, ya que entre estos dos residuos se encuentra la hélice  $\alpha$ 5 que impide su interacción.

La necesidad de estabilizar al fosfato incorporado podría ser responsable de los cambios estructurales que se observan en la proteína post-fosforilación. También es importante analizar cómo se ve afectado el sitio activo iPLA<sub>2</sub> en la variante fosforilada respecto a la forma nativa para encontrar, de ser posible, indicios que permitan correlacionar los cambios estructurales y dinámicos que esta PTM introduce con el aumento reportado sobre la AE iPLA<sub>2</sub>. En la *figura 27* se observa el detalle del sitio iPLA<sub>2</sub> de cada monómero para la proteína nativa y fosforilada.

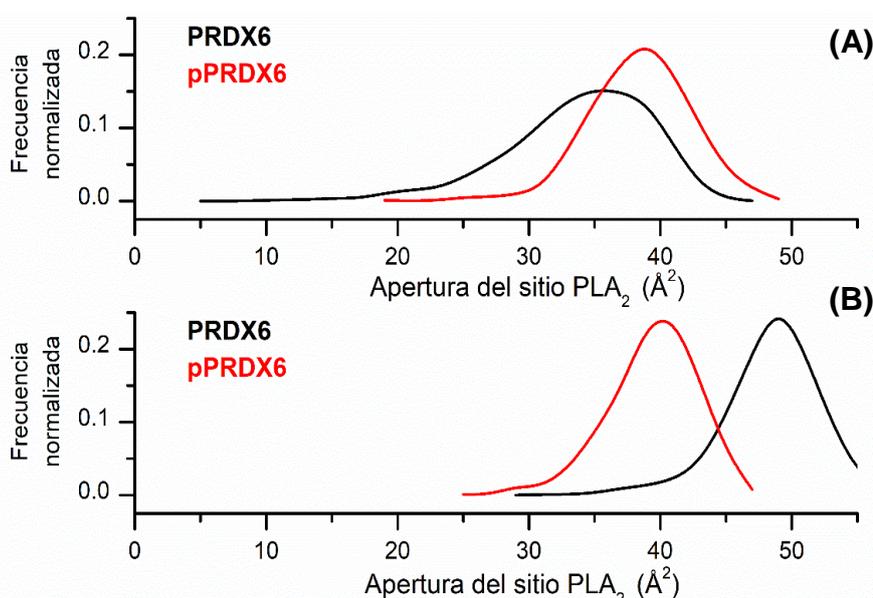


**Figura 27.** Estructura secundaria y terciaria y residuos conservados (representación en bolas y varillas) en el entorno del sitio iPLA<sub>2</sub> de ambos monómeros en la proteína nativa y fosforilada. (A) y (B) corresponden al primer monómero. (C) y (D) al segundo monómero.

El posicionamiento de los residuos catalíticos en el sitio activo iPLA<sub>2</sub> no presenta diferencias significativas entre Prdx6-SOH y pPrdx6-SOH (figura 27). Para determinar si existen cambios a nivel de la dinámica del sitio activo se analizó la evolución de su superficie a lo largo de la simulación aMD. Como el sitio se encuentra muy expuesto, se tomó el área entre los C $\alpha$  de los residuos de la triada catalítica iPLA<sub>2</sub> como descriptor (ver antecedentes en la sección 1.4): H26-S32-D140 calculada a través de la fórmula de Herón:

$$\text{Área} = \sqrt{s(s-a)(s-b)(s-c)} \quad (25)$$

donde  $s$  representa el semi-perímetro del triángulo definido por las posiciones de los C $\alpha$  de los residuos y  $a$ ,  $b$  y  $c$  las distancias entre ellos. En la figura 28 se ve que el área de apertura del sitio iPLA<sub>2</sub> vale  $\sim 40 \text{ \AA}^2$  en ambos monómeros de la proteína fosforilada, mientras que en la proteína nativa difiere entre monómeros, valiendo  $\sim 35 \text{ \AA}^2$  y  $50 \text{ \AA}^2$ , respectivamente. Estos valores son superiores a los observados en otras fosfolipasas, en las que el mismo parámetro se halla en el entorno de  $16 \text{ \AA}^2$  <sup>133,134</sup>.



**Figura 28.** Apertura del sitio iPLA<sub>2</sub> para Prdx6 nativa (en negro) y fosforilada (en rojo).  
(A) Monómero 1. (B) Monómero 2.

Así, se podría considerar que la fosforilación lleva a igualar la apertura en los monómeros a un valor cercano al de la apertura del primer monómero de Prdx6-SOH. Uno de los principales sustratos de la Prdx6 es el fosfolípido DPPC, ligando grande, cuyo canal de entrada al sitio activo debería satisfacer un compromiso en el grado de apertura tal que sea suficientemente grande para permitir el ingreso al sitio activo y a la vez suficientemente pequeño para mantener el sitio activo estructurado en la arquitectura proteica requerida para que ocurra la catálisis.

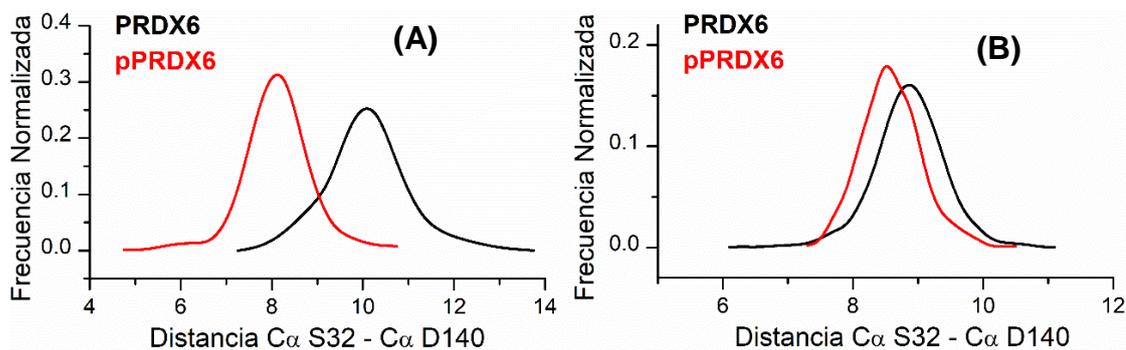
Por otra parte, los cambios estructurales asociados a la fosforilación podrían repercutir individualmente sobre los residuos centrales para la catálisis. Por ejemplo, se ha reportado que el residuo H26 es clave para la unión del DPPC al sitio activo<sup>66</sup>, detectar cambios en su exposición al solvente podría contribuir a entender mejor el rol que este residuo cumple en la unión de la proteína a micelas y a DPPC y por qué su mutación lleva a la pérdida total de la actividad iPLA<sub>2</sub><sup>66</sup>.

Para evaluar el grado de exposición del residuo H26 se comparó su valor de SASA en cada monómero de la proteína con el correspondiente al residuo de histidina en el tripéptido G-H-G, donde se lo considera completamente expuesto al solvente<sup>131</sup>. Con porcentajes de exposición en el intervalo 0-25% se considera al residuo interno, entre 25-50% se considera intermedio y entre 50-100% externo. Los valores recogidos en la Tabla 4 muestran que la fosforilación lleva a igualar la exposición de H26 entre monómero, que en todos los casos se encuentra en un estado de exposición intermedio. Este nivel de exposición podría facilitar la unión inicial del DPPC desde el solvente y una vez que unido como ligando a la proteína, podría internalizarse y estabilizar dicha unión.

**Tabla 4.** Porcentaje de exposición al solvente de la H26 en cada monómero de hPrdx6 nativa y fosforilada.

| Monómero | Prdx6-SOH | pPrdx6-SOH |
|----------|-----------|------------|
| Mon1     | 41        | 31         |
| Mon2     | 29        | 31         |

Se analizó también la distribución de la distancia entre los C $\alpha$  de los residuos catalíticos<sup>66</sup> S32 y D140 (*figura 29*) como tercer descriptor de posibles efectos estructurales de la fosforilación sobre del sitio iPLA<sub>2</sub>, ante la hipótesis que un acortamiento en su separación podría tener incidencia sobre la eficacia de la catálisis.



**Figura 29.** Distancia de los residuos catalíticos S32 y D140 para Prdx6 nativa (en negro) y fosforilada (en rojo). Monómeros 1 (A) y 2 (B).

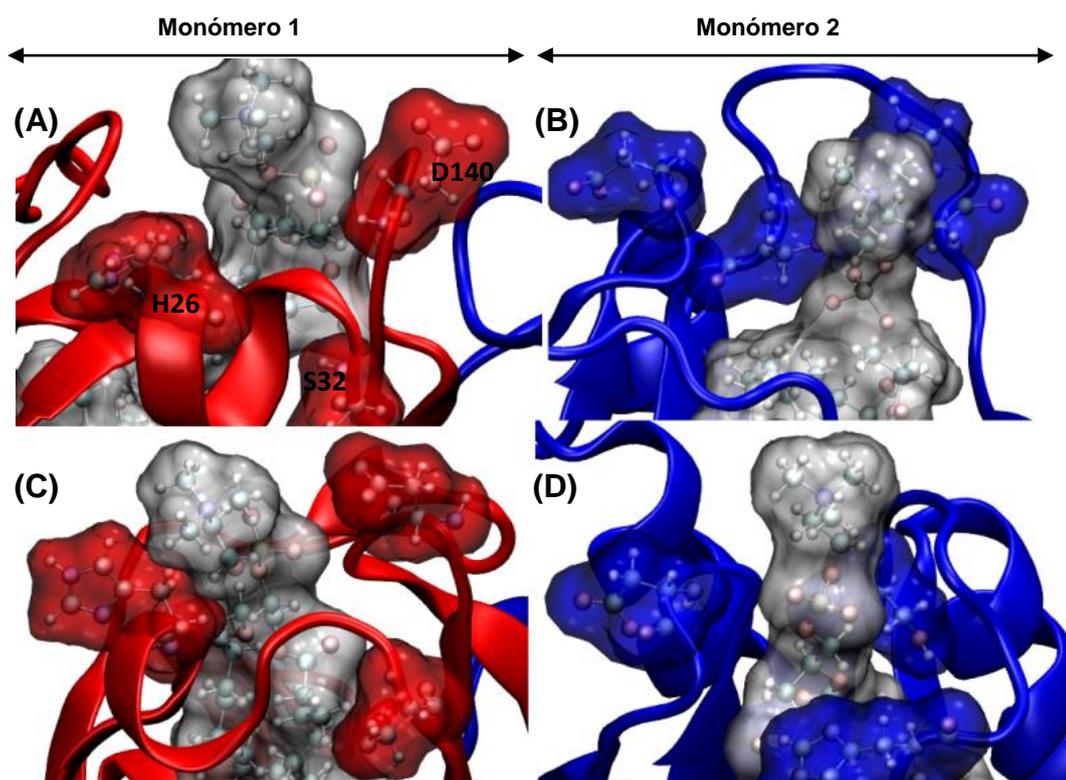
Se aprecia que la fosforilación causa un acercamiento de  $\sim 4$  Å para el primer monómero, mientras que para el segundo monómero la disminución de la distancia es mucho menos pronunciada. Debido a que aún se desconoce el mecanismo catalítico, es difícil determinar si este acercamiento alcanzaría a tener reflejo en un aumento en la actividad iPLA<sub>2</sub>. La orientación relativa entre estos dos residuos tampoco parece ser adecuada para la catálisis, sin embargo, la unión del ligando podría promover determinados cambios en el sitio activo que permitiera que ocurra la catálisis.

#### 4.4. Complejos Prdx6-DPPC: análisis estructural y cálculo de $\Delta G$ de unión

Entre los antecedentes disponibles en la bibliografía del campo se ha documentado que cuando Prdx6a se fosforila, aumenta su afinidad hacia liposomas, disminuyendo por consiguiente la constante de disociación correspondiente ( $Kd$ ) que pasa de un valor  $Kd = 24.9 \pm 4.5 \mu\text{M}$  a  $Kd = 5.6 \pm 1.2 \mu\text{M}$ <sup>81</sup>. A partir de la relación existente entre la energía libre de unión ligando-proteína ( $\Delta G_{\text{unión}}$ ) y la  $Kd$  que se muestra en la expresión (12)

$$\Delta G = RT \ln(Kd) \quad (12)$$

es posible derivar el valor de  $\Delta G_{\text{unión}}$  y calcular el  $\Delta(\Delta G_{\text{unión}})$  como diferencia entre la proteína en estado nativo y fosforilado. Una disminución en el valor de la  $Kd$  lleva a la disminución del valor de  $\Delta G_{\text{unión}}$ , sin embargo, siendo la relación entre ambas magnitudes logarítmica, un cambio en la  $Kd$  de un orden de magnitud se traduce bajo idénticas condiciones de trabajo en un cambio en el valor de  $\Delta G_{\text{unión}}$  de una unidad. Así, se espera que la variación observada en la  $Kd$  de unión de DPPC a hPrdx6 como resultado de su fosforilación, no se traduzca en grandes cambios en la termodinámica de unión.



**Figura 30.** Sitio catalítico y residuos conservados responsables de la actividad iPLA<sub>2</sub> en el complejo formado entre el ligando DPPC (representado en bolas y varillas con envoltorio gris) y la proteína hPrdx6 en sus forma nativa (arriba; (A) y (B)) y variante fosforilada (abajo; (C) y (D)). Los monómeros 1 y 2 se representan respectivamente en rojo y azul para hPrdx6-SOH y pPrdx6-SOH.

Para estudiar el modo de unión del DPPC a la proteína (figura 30) se generaron estructuras representativas a partir de simulaciones de dinámica molecular convencional (cMD) siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.1 y analizaron en base a criterios geométricos las interacciones de enlace de hidrógeno (EdH) que se

forman directamente con los residuos del sitio iPLA<sub>2</sub>, incluyendo aquellas mediadas por una o más moléculas de agua.

La única interacción directa que se establece entre DPPC y Prdx6-SOH ocurre con el *backbone* del residuo D140 en el monómero 1 (*figura 30(A)*) y acaba perdiéndose tras la fosforilación, siendo reemplazada en pPrdx6-SOH por una red más extendida de EdH mediados por moléculas de agua, que involucra un número mayor de residuos proteicos (*figura 30(C)-(D)*) y tienen ocupaciones más altas (Tabla 5). Entre los diferentes residuos de la proteína que interaccionan por EdH con el ligando a través de puentes de moléculas de agua, el único que aparece tanto en Prdx6-SOH como en pPrdx6-SOH y en ambos monómeros es la K141. Este residuo interacciona con el DPPC desde un 5% hasta un 40% del tiempo de la simulación. Esto podría sugerir un rol estructural para K141 en la unión del DPPC.

**Tabla 5.** Porcentaje de ocupación de los EdH entre el ligando DPPC y la proteína mediado por moléculas de agua.

|        | A11<br>M1/M2 | N13<br>M1/M2 | H26<br>M1/M2 | D27<br>M1/M2 | D31<br>M1/M2 | S32<br>M1/M2 | K141<br>M1/M2 |
|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| Prdx6  | - / 22       | - / -        | - / -        | - / 6        | - / -        | - / -        | 4 / 17        |
| pPrdx6 | - / 26       | 5 / -        | 6 / -        | - / -        | 3 / 6        | - / 27       | 41 / 8        |

La presencia en el complejo DPPC: pPrdx6-SOH de un número mayor de interacciones ligando-proteína mediadas por moléculas de agua podría explicar por qué el área de la superficie delimitada por los C $\alpha$  de los residuos que integran la tríada catalítica iPLA<sub>2</sub> es tan amplia respecto a otras fosfolipasas (*ver figura 28*). Por otra parte, la intensificación de la red de enlaces de hidrógeno post-fosforilación con mediación por moléculas de agua en el sitio activo, podría vincularse al aumento de la actividad iPLA<sub>2</sub> que ocurre al fosforilar, en caso de que la catálisis sea asistida por una o más moléculas de agua que se sitúen en posiciones más favorables para ese rol a través de esa red de EdH extendida, aspecto no abordado en esta tesina de grado, pero que se plantea modelar a futuro con metodología QM/MM.

Se ha reportado que las mutantes S32A y H26A de Prdx6 carecen de la capacidad de unirse a liposomas<sup>66</sup>. Sin embargo, el estudio de la red de EdH del ligando en el sitio activo iPLA<sub>2</sub> indicaría que estos residuos no tienen un papel clave en la unión del DPPC a la proteína. Otros estudios *in vitro* mostraron que Prdx6-SOH carece de capacidad de unirse a un liposoma reducido a pH fisiológico, mientras que pPrdx6 puede unirse a liposomas oxidados y reducidos en esas condiciones<sup>51</sup>. La caracterización del modo de unión del DPPC a Prdx6 aquí presentada no se condice con esos hallazgos, algo que podría deberse a la restricción utilizada para ubicar al DPPC en el sitio activo.

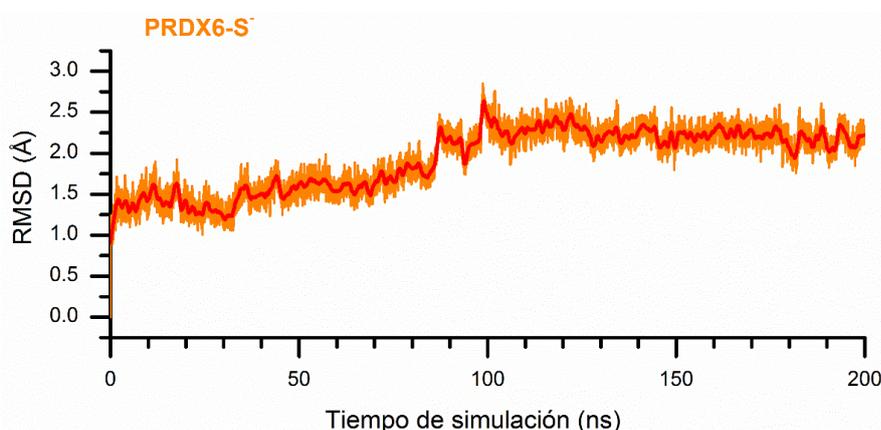
Con respecto al  $\Delta G_{\text{unión}}$  (Tabla 6), no se observan diferencias significativas entre Prdx6-SOH y pPrdx6-SOH. El valor diferencial  $\Delta(\Delta G_{\text{unión}})$  tiene errores absolutos y relativos asociados muy elevados, por lo que no es posible extraer conclusiones de ellos.

**Tabla 6.**  $\Delta G_{\text{unión}}$  ligando-proteína (en kcal mol<sup>-1</sup>) determinados con MM/PB(GB)SA.

|         |      | Prdx6       | pPrdx6      | $\Delta(\Delta G_{\text{unión}})$ |
|---------|------|-------------|-------------|-----------------------------------|
| MM/GBSA | Mon1 | -73.2 ± 3.8 | -73.3 ± 5.0 | 0.1 ± 8.9                         |
|         | Mon2 | -65.2 ± 5.6 | -72.9 ± 4.4 | 7.7 ± 10.0                        |
| MM/PBSA | Mon1 | -70.6 ± 4.2 | -61.1 ± 5.4 | -9.5 ± 9.6                        |
|         | Mon2 | -54.1 ± 5.5 | -56.8 ± 5.5 | 2.7 ± 10.1                        |

#### 4.5. Estructura y dinámica en solución de Prdx6-S<sup>-</sup> y gPrdx6S<sup>-</sup>

En línea con los objetivos planteados en la sección 2.2.2, se realizó una simulación de la proteína homodimérica nativa con la C<sub>P</sub> en su forma reducida tiolato (a partir de ahora denominada Prdx6-S<sup>-</sup>). En la *figura 31* se muestra la evolución del RMSD calculado sobre las posiciones de los C $\alpha$ . Dicha simulación se encuentra convergida a partir de 80 ns.



**Figura 31.** RMSD de los C $\alpha$  de Prdx6-S<sup>-</sup> simulados por cMD.

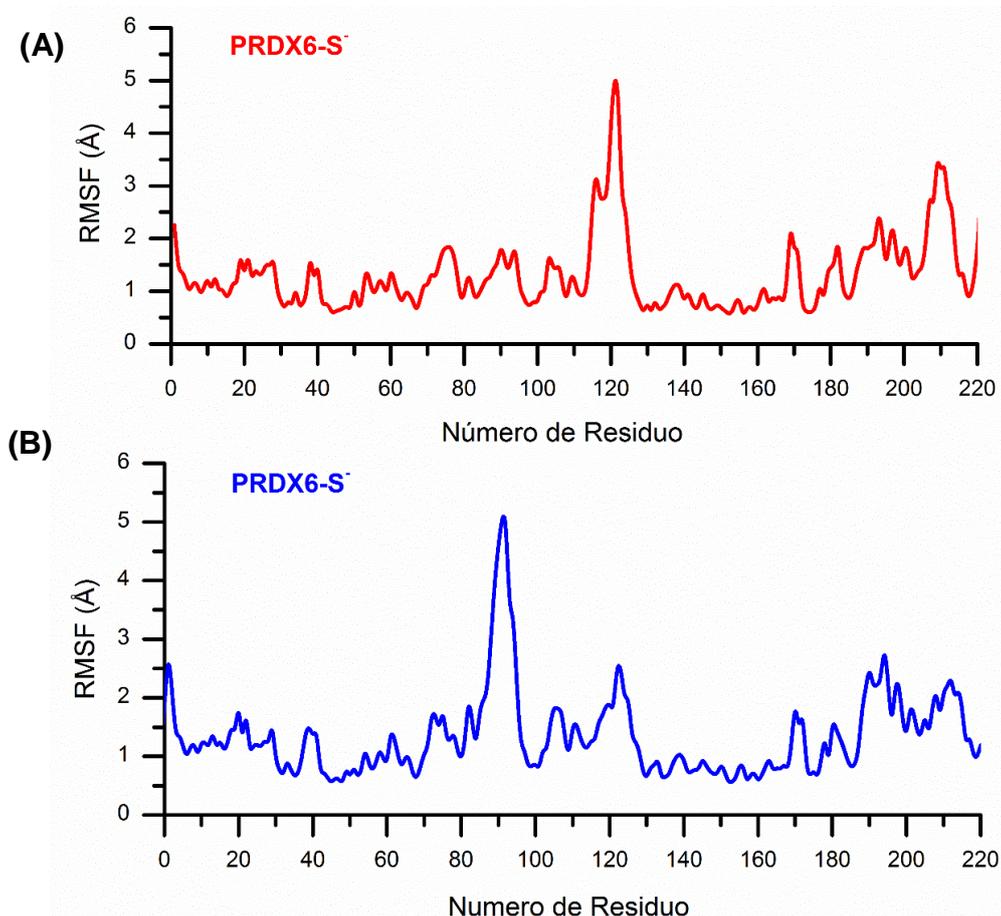
La flexibilidad de los residuos se analizó a partir del RMSF, mostrado en la *figura 32*, tal como se hizo para la proteína oxidada nativa y fosforilada en las secciones anteriores. En el primer monómero, *figura 32(A)*, los residuos cercanos a la posición 120 presentan valores de RMSF 3 Å mayores que el resto de la proteína, mostrando así mayor flexibilidad. Los residuos de esa región corresponden al *loop* que conecta la hoja  $\beta_6$  y la hélice  $\alpha_4$ , al que experimentalmente se atribuyó alta movilidad, basado en sus valores de *B-factor*<sup>4</sup> elevados<sup>59</sup>. En el segundo monómero, *figura 32(B)*, se observa un comportamiento similar en el *loop* que contiene los residuos 82-102.

Para corroborar la importancia de la flexibilidad en estas regiones se agruparon todas las estructuras muestreadas en cinco *cluster*. La superposición de la estructura representativa de cada *cluster* (*figura 33*) condice con lo observado con el RMSF, ya que las diferencias entre ellas está en la posición de los *loops*.

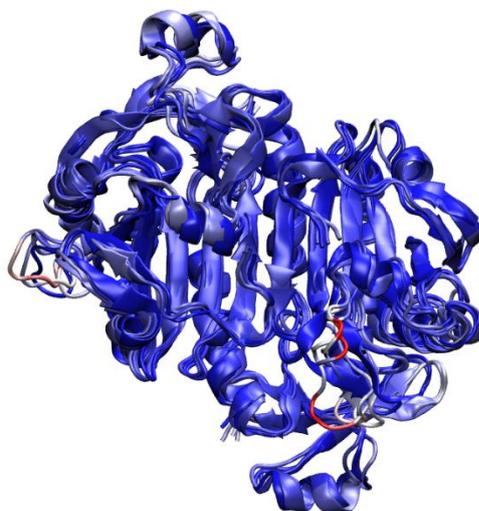
La hoja  $\beta_6$  contiene a la R132, uno de los residuos del sitio activo peroxidasa. Durante la simulación, la estructura secundaria de la hoja  $\beta$  que contiene este residuo se ve afectada (48% y 91% en los monómeros 1 y 2, respectivamente). Uno de los roles principales de este residuo es la interacción que presenta con el tiolato de la C<sub>P</sub>,

<sup>4</sup> El B-factor, o factor de temperatura, es una medida de la movilidad de un átomo o grupo en una estructura cristalográfica.

estabilizando al tiolato en ausencia del sustrato y luego al estado de transición aniónico de la reacción de peroxidación. Como se verá más adelante, estos cambios no son suficientes para desestabilizar la interacción cisteína-arginina.

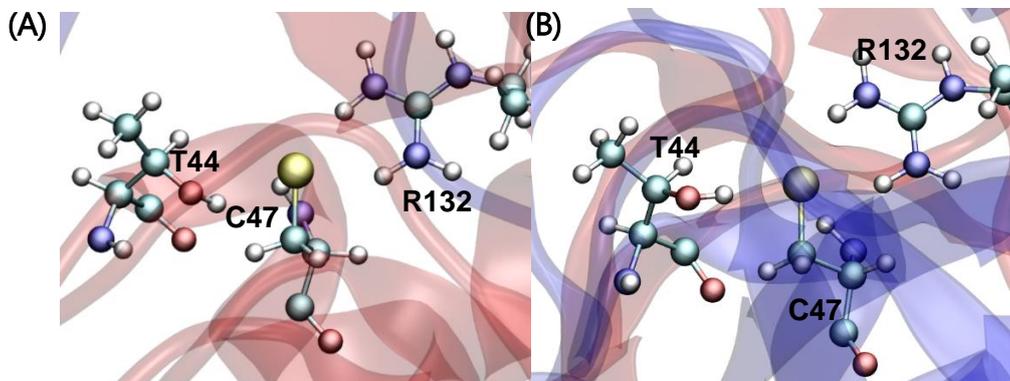


**Figura 32.** RMSF de Prdx6-S<sup>-</sup> en solución. (A) Monómero 1. (B) Monómero 2.



**Figura 33.** Superposición de las estructuras representativas de los clusters de la simulación de Prdx6-S<sup>-</sup>, coloreados por RMSD. La escala de colores va de Rojo-Blanco-Azul en orden decreciente de RMSD.

Para estudiar la arquitectura que presenta el sitio activo peroxidasa (*figura 34*), se realizó un estudio de la red de enlaces de hidrógeno del sitio para cuantificar las diferentes interacciones que se establecen entre la  $C_P$  y los residuos de su entorno.



**Figura 34.** Estructura secundaria y terciaria y residuos conservados (representación en bolas y varillas) en el entorno del sitio peroxidasa de Prdx6-S<sup>-</sup>. **(A)** Monómero 1. **(B)** Monómero 2.

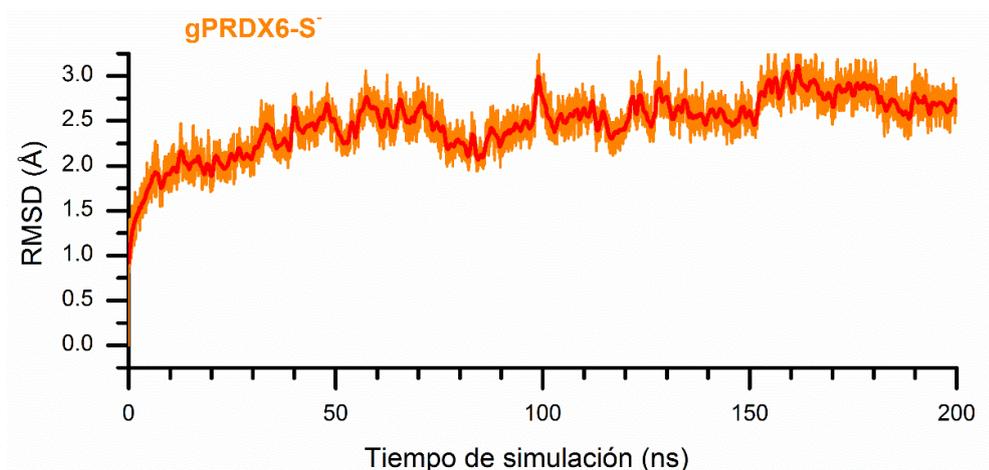
La estabilización del tiolato en el sitio activo está dada por varios residuos conservados en la familia de las peroxirredoxinas, como R132 y T44 en la *figura 34*. En la Tabla 7 se muestra el porcentaje de ocupación de la red que existe entre los diferentes residuos conservados del sitio activo y el tiolato de la  $C_P$ .

**Tabla 7.** Porcentaje de ocupación de la red de enlaces de hidrogeno de la  $C_P$

|                   | T44 | R132 |
|-------------------|-----|------|
| <b>Monómero 1</b> | 66  | 46   |
| <b>Monómero 2</b> | 55  | 42   |

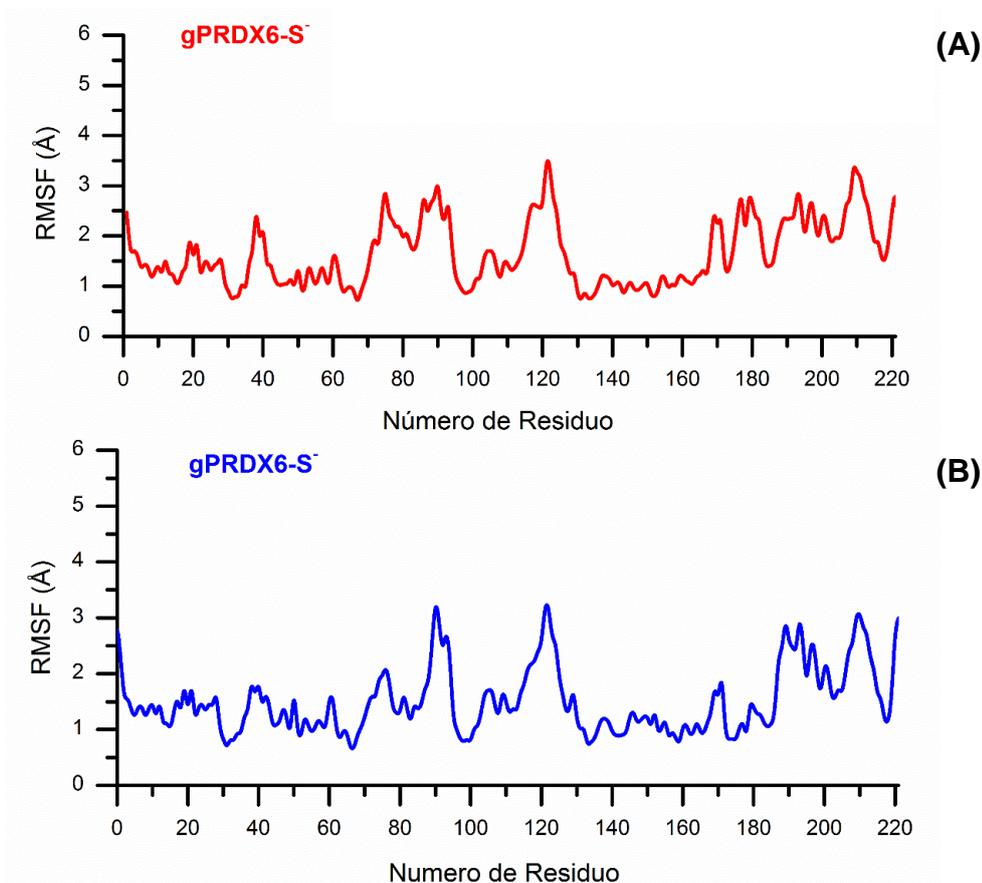
Al analizar los porcentajes de ocupación, no se observan diferencias entre los monómeros. En ambos casos la  $C_P$  se encuentra fuertemente estabilizada por los residuos mencionados anteriormente. Estas interacciones son importantes para estabilizar el estado de transición, unir el sustrato, regular la especificidad de la enzima y regular el  $pK_a$  de la  $C_P$ . De esta forma la  $C_P$  se encuentre siempre lista para reaccionar en presencia de los diferentes sustratos. La posible alteración o desaparición de esta red de EdH podría dar una primera explicación acerca de la inhibición de la actividad peroxidasa debido a la glicación por MGO en la R132, elemento que se discutirá más adelante en esta sección.

Una vez simulada la dinámica en solución y obtenida una estructura representativa de Prdx6-S<sup>-</sup>, se buscó hacer lo mismo para la proteína glicada en la R132 con la  $C_P$  en su forma reactiva (a partir de ahora gPrdx6-S<sup>-</sup>). En la *figura 35* se muestra el RMSD de los  $C\alpha$  de la simulación, observándose una convergencia a partir de 35 ns.



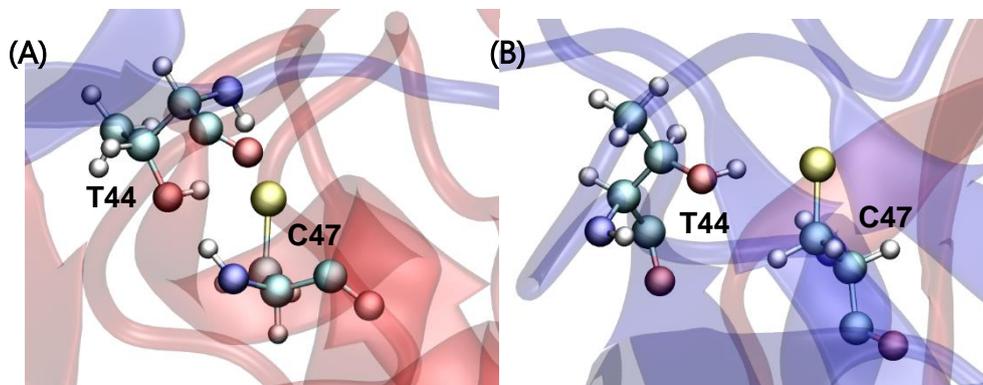
**Figura 35.** RMSD de los Ca de gPrdx6-S<sup>-</sup> en los 200 ns de cMD.

Una vez convergida la simulación, se estudió el RMSF de gPrdx6-S<sup>-</sup>, *figura 36*, buscando diferencias con el estado nativo. El residuo modificado argpirimidina presenta un tamaño mayor al de una arginina estándar, y elimina la carga positiva del sitio activo. No se observan diferencias significativas entre el RMSF de la proteína nativa (*figura 32(A-B)*) y glicada (*figura 36(A-B)*), por lo que se infiere que la glicación no afecta la flexibilidad de la proteína.



**Figura 36.** RMSF de gPrdx6-S<sup>-</sup> en solución. (A) Monómero 1. (B) Monómero 2.

Analizando el sitio activo de la proteína, se observa que la C<sub>P</sub> al estar la R132 glicada presenta un menor número de interacciones, como se observa en la *figura 37*. La estructura que se visualiza corresponde al cluster mayoritario de gPrdx6-S<sup>-</sup> (48% de ocupación)<sup>5</sup>.



**Figura 37.** Estructura secundaria y terciaria y residuos conservados (representación en bolas y varillas) en el entorno del sitio peroxidasa de Prdx6-S<sup>-</sup>. **(A)** Monómero 1. **(B)** Monómero 2.

Se estudió nuevamente la red de enlaces de hidrógeno del sitio activo con el tiolato de la C<sub>P</sub> (Tabla 8), para ver si ésta se encuentra disminuida en comparación a la red formada en la proteína nativa.

**Tabla 8.** Porcentaje de ocupación de la red de enlace de hidrógeno de la Cys peroxidática.

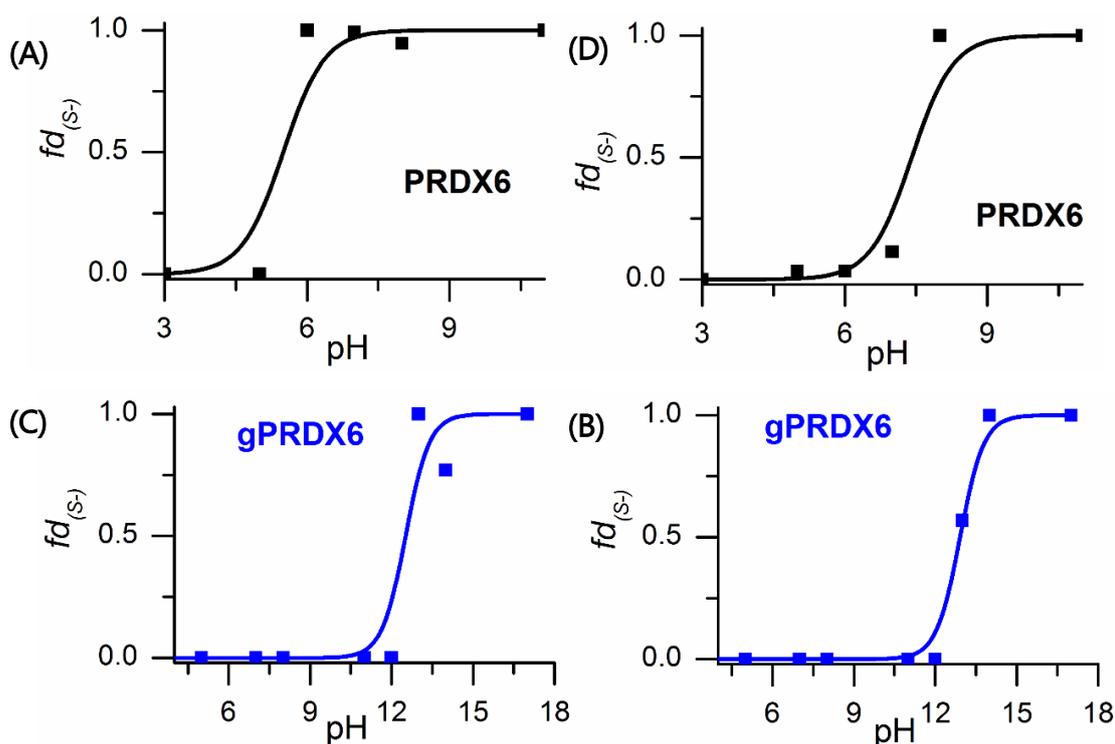
|                   | T44 | R*132 |
|-------------------|-----|-------|
| <b>Monómero 1</b> | 78  | 0     |
| <b>Monómero 2</b> | 49  | 4     |

La ausencia del grupo guanidinio afecta el resto de las interacciones que establecía la C<sub>P</sub> con los otros residuos conservados del sitio activo, disminuyendo la red de enlace de hidrógeno neta sobre la C<sub>P</sub>. Esta podría traducirse a que la forma tiolato sea menos estable, y debería verse reflejado en un aumento del pK<sub>a</sub> de la cisteína peroxidática. Para comprobar esto se realizaron titulaciones de la C<sub>P</sub> utilizando simulaciones a pH constante, como se describió en la *sección 3.5* de la metodología. Las curvas obtenidas a partir de la titulación se muestran en la *figura 38*. Como se menciona en metodología, el cálculo de pK<sub>a</sub> de una cisteína en un contexto proteico suele dar un valor absoluto sobreestimado, por lo que fue necesario corregirlos. Los valores de pK<sub>a</sub> de la C<sub>P</sub> extraídos a partir de estas curvas se encuentran en la Tabla 9, mientras que las curvas de titulación de la C92 y el pK<sub>a</sub> obtenido para esta cisteína se muestran en el la *sección 7.5* del anexo.

**Tabla 9.** pK<sub>a</sub> obtenido a partir de la titulación de la C<sub>P</sub> con cpHMD original y ajustado.

|                   | Prdx6     |           | gPrdx6     |           |
|-------------------|-----------|-----------|------------|-----------|
|                   | Original  | Ajustado  | Original   | Ajustado  |
| <b>Monómero 1</b> | 5.5 ± 0.3 | 4.1 ± 0.3 | 12.5 ± 0.2 | 9.2 ± 0.3 |
| <b>Monómero 2</b> | 7.4 ± 0.2 | 5.5 ± 0.2 | 12.9 ± 0.1 | 9.5 ± 0.2 |

<sup>5</sup> Al igual que para la proteína nativa, las diferencias estructurales que se observan son pequeñas, por lo que se utiliza como representativa la que corresponde al cluster mayoritario. La superposición de estructuras obtenidas del análisis de cluster se encuentra en la *sección 7.4* del anexo.



**Figura 38.** Curvas de titulación de la  $C_P$  de ambos monómeros de Prdx6 en su estado nativo y glicado. **(A)** Monómero 1 de Prdx6. **(B)** Monómero 2 de Prdx6. **(C)** Monómero 1 de gPrdx6. **(D)** Monómero 2 de gPrdx6.

El  $pK_a$  promedio de la  $C_P$  de ambos monómeros es de  $4.8 \pm 0.5$  mientras que el de la glicada es de  $9.3 \pm 0.5$ . El  $pK_a$  de la  $C_P$  en la proteína nativa se corresponde al determinado experimentalmente ( $5.2^{38,57}$ ), mientras que el  $pK_a$  de la  $C_P$  de gPrdx6- $S^-$  es comparable al residuo libre en solución (8.55). La glicación por MGO en la R132 hace que el  $pK_a$  de la C47 sea igual al del residuo en solución. La fracción del tiolato en la proteína a  $pH = 7.4$  baja de **0.997-0.999** en Prdx6- $S^-$  a **0.003-0.3** en gPrdx6- $S^-$ .

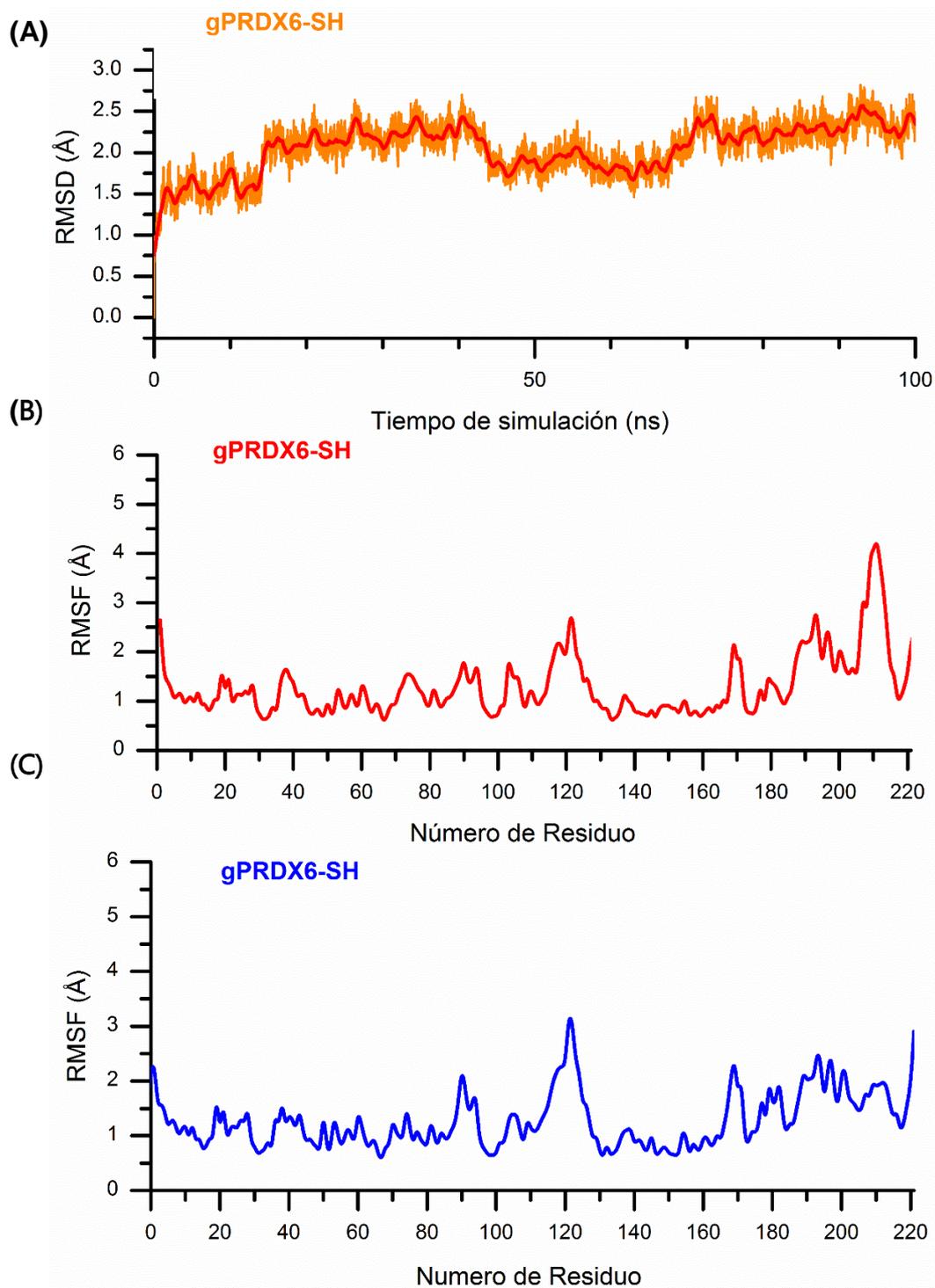
En base a los resultados obtenidos hasta el momento, la glicación parecería actuar sobre hPrdx6 debilitando la red de enlace de hidrógeno del sitio activo y alterando el  $pK_a$  de la  $C_P$  de forma significativa, haciendo que ésta no se encuentre en su forma activa para la reacción con peróxidos, también se espera que la pérdida de la carga positiva afecte todas las otras funciones que cumple este residuo, como se reportó con mutantes de hPrdx5 en la arginina análoga a R132<sup>40</sup>.

Como el  $pK_a$  es 9.3 a pH fisiológico, es esperable que la  $C_P$  se encuentre mayoritariamente en forma de tiol. Debido a esto, se realizaron simulaciones con la  $C_P$  en forma de tiol, a partir de ahora denominada gPrdx6-SH. La enzima podría mantener una actividad residual si existe algún residuo con la capacidad de desprotonar a la  $C_P$ , modulando de esta forma su acidez<sup>6</sup>.

En la *figura 39* se observa el RMSD de los  $C_\alpha$  de la proteína durante la simulación y el RMSF de ambos monómeros. A partir de 10 ns la simulación se

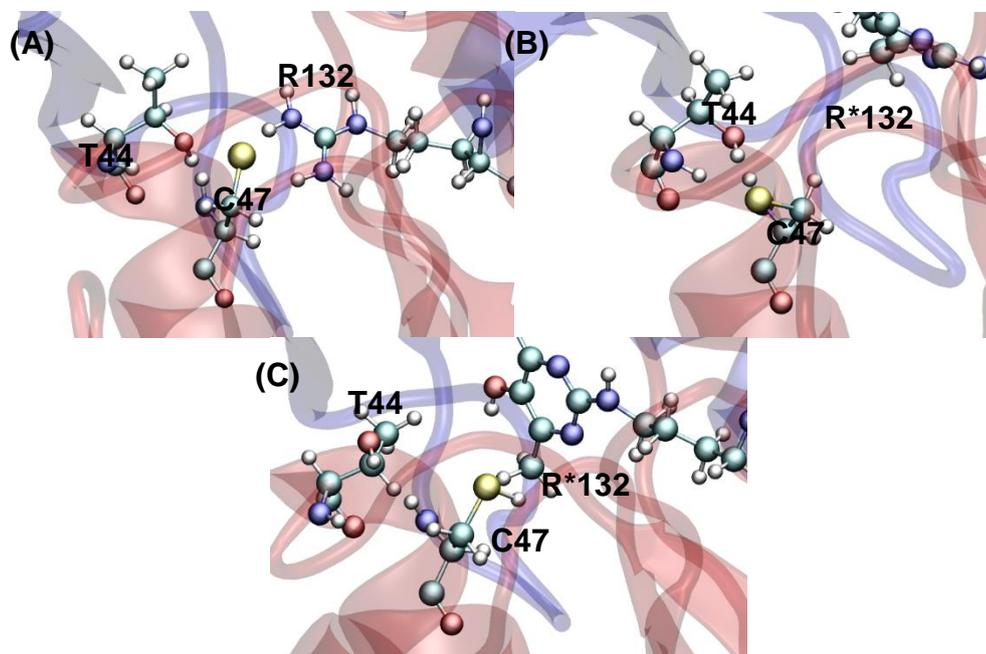
<sup>6</sup> Al analizar la red de enlaces de hidrógeno en el sitio activo peroxidasa, se encontró en el primer monómero una interacción con el residuo E50 durante ~20% de la simulación. Este residuo podría ser responsable de la desprotonación de la  $C_P$  y de esta forma la reacción podría ocurrir. Determinar esa posibilidad es un objetivo que se escapa a esta tesina de graduación.

encuentra convergida. El comportamiento del RMSF es análogo al observado en Prdx6-S<sup>-</sup> y gPrdx6-S<sup>-</sup>.



**Figura 39.** Estudio de la dinámica de gPrdx6-SH en solución. (A) RMSD de los Cα de la proteína. (B) RMSF del monómero 1 (C) RMSF del monómero 2.

Buscando visualizar las diferencias que introduce la glicación de la R132 en el microentorno de la C<sub>P</sub>, en la *figura 40* se realiza una comparación del sitio peroxidasa correspondiente al primer monómero de Prdx6-S<sup>-</sup>, gPrdx6-S<sup>-</sup> y gPrdx6-SH.



**Figura 40.** Sitio activo peroxidasa de la estructura correspondiente al cluster mayoritario de cada simulación. (A) Prdx6-S<sup>-</sup>. (B) gPrdx6-S<sup>-</sup>. (C) gPrdx6-SH.

En las tres estructuras la C<sub>P</sub> presenta una orientación diferente. En Prdx6-S<sup>-</sup>, debido a las diversas interacciones que establece la C<sub>P</sub> con R132 y T44 se encuentra en una posición fija. En gPrdx6-S<sup>-</sup> se observa que la C<sub>P</sub> se “internaliza”, intentando estabilizar el tiolato con el *backbone* de la T44 (no se muestra en la figura). Cuando la C<sub>P</sub> se encuentra en forma de tiol y la arginina conservada se encuentra glicada, el posicionamiento de la cisteína es similar al que presenta en la proteína nativa. Para determinar si la glicación en la R132 altera la exposición al solvente de la C<sub>P</sub>, se estudió su SASA comparándola con la del tripéptido G-C-G. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Promedio de la exposición al solvente del residuo C47 en ambos monómeros de la proteína sin glicar por MGO y glicada.

|                             | % de exposición<br>M1/M2 | Nivel de exposición<br>M1/M2 |
|-----------------------------|--------------------------|------------------------------|
| <b>Prdx6-S<sup>-</sup></b>  | 13.8/13.8                | Interno/Interno              |
| <b>gPrdx6-S<sup>-</sup></b> | 10.2/40.6                | Interno/Intermedio           |
| <b>gPrdx6-SH</b>            | 7.0/2.4                  | Interno/Interno              |

A partir de esta tabla se observa que la glicación de la R132 no afecta el nivel de exposición de la C<sub>P</sub>. Esto podría deberse a que el residuo argipirimidina es muy voluminoso, restringiendo el libre movimiento de los residuos vecinos en el sitio catalítico. Esto podría explicar por qué el RMSF de los residuos pertenecientes al sitio activo no aumentó.

A partir de este estudio se observó que la glicación altera el pK<sub>a</sub> de la C<sub>P</sub> de forma significativa, sin inducir grandes cambios estructurales en el sitio catalítico. El cambio de pK<sub>a</sub> podría explicarse por un debilitamiento en la red de enlace de

hidrógeno, aunque como el criterio que utiliza el programa AMBERTOOLS se basa en parámetros geométricos, es necesario recurrir a métodos cuánticos para verificar dichos enlaces y poder medir su fuerza. La glicación de la R132 no solo afecta el  $pK_a$  de la  $C_P$ , sino también la reactividad de esta, debido a la importancia de este residuo en el mecanismo catalítico.

#### 4.6. Análisis de la reactividad de $C_P$ en gPrdx6-S con el método ONIOM(QM/MM)

En la sección anterior se determinó que la glicación por MGO en la  $C_P$  altera la red de enlaces de hidrógeno en el sitio activo, así como el  $pK_a$  de ésta. Partiendo de las estructuras representativas obtenidas en dicha sección para la proteína nativa y glicada en forma de tiolato se procedió a hacer el análisis de las propiedades de reactividad intrínsecas de la  $C_P$ , mostradas en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Descriptores cuánticos de reactividad de la  $C_P$ .

| <b>Descriptor (eV)</b>     | <b>Prdx6</b> | <b>gPrdx6</b> |
|----------------------------|--------------|---------------|
| <b>Energía del HOMO KS</b> | -2.21/-1.66  | 0.05/-1.71    |
| $\eta$                     | 2.47/2.40    | 2.00/2.73     |

La energía del *orbital molecular HOMO* de Kohn-Sham nos brinda una primera aproximación sobre la nucleofilia de la  $C_P$ . Cuanto mayor es la nucleofilia de la misma, se espera que tenga un HOMO más inestable. Según los resultados reportados en la Tabla 11 se observa que la glicación no afecta de la misma forma la nucleofilia de la  $C_P$  de los distintos monómeros. En el primero se observa un aumento de la nucleofilia dado por un HOMO 2.26 eV mayor en la proteína glicada, mientras que en el segundo se observa una disminución de 0.05 eV. Esta asimetría entre monómeros podría deberse a la interacción que establece la R153 con la  $C_P$  en el segundo monómero<sup>7</sup> de la proteína glicada, haciendo que el entorno de la misma sea similar a la proteína en el estado nativo.

Cuanto mayor es la dureza global de un sistema, menor es su reactividad. Según este indicador, la reactividad de la  $C_P$  varía en cada monómero, así como en su estado nativo y glicado. El orden de reactividad sería, de mayor a menor, **gPrdx6-m1>Prdx6-m2>Prdx6-m1>gPrdx6-m2**. Los datos de dureza global se correlacionan con la energía del HOMO. El promedio de  $\eta$  entre ambos monómeros es de 2.435 y 2.365 para la proteína nativa y glicada respectivamente, observando que la glicación, contrario a lo esperado inicialmente, aumentaría la reactividad intrínseca de la  $C_P$ .

Una vez que se conoce como la reactividad y nucleofilia intrínseca de la  $C_P$  se afecta post-glicación, para entender como la red de enlaces de hidrógeno modula la reactividad de ésta, y si existe algún cambio a nivel de la estructura electrónica en la proteína nativa y glicada, se expandió la zona cuántica a aquellos residuos y moléculas de agua que estuvieran interaccionando con la  $C_P$ , y se realizó el mismo análisis. En el caso de Prdx6, la zona cuántica par ambos monómeros consistió en la cadena lateral de la C47, T44 y R132, así como las aguas del microambiente que parecían encontrarse interaccionando con ella. Para gPrdx6 el sistema cuántico fue

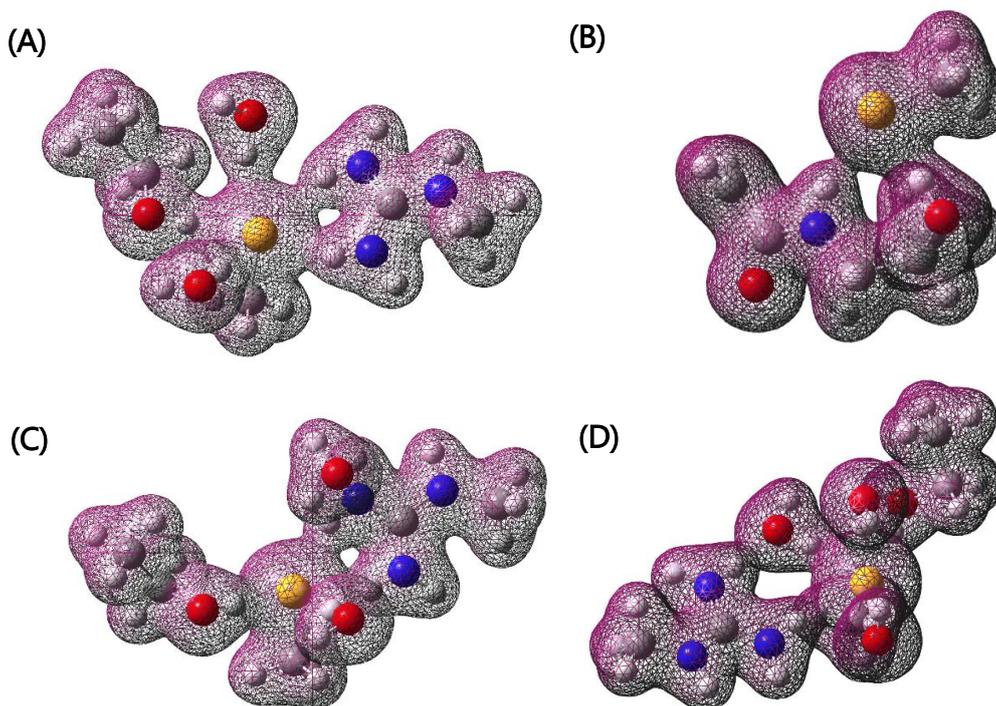
<sup>7</sup> La interacción de la  $C_P$  con la R152 apareció durante la minimización previa al cálculo QM/MM, no se registró en la dinámica.

diferente en cada monómero. En el primero se consideró la cadena lateral de la C47, así como la cadena lateral y en enlace amida de la T44, y en el segundo se consideró las cadenas laterales de los residuos C47, R156 y T144, así como las moléculas de agua del microambiente. Debido a que las regiones cuánticas eran diferentes en todos los casos, para poder comparar las energías electrónicas de diferentes sistemas se verificó que el orbital HOMO se encuentre centrado sobre el átomo de azufre en todos los casos (ver anexo, sección 7.7).

**Tabla 12.** Análisis de descriptores cuánticos de reactividad de la C<sub>P</sub>.

| <b>Descriptor (eV)</b>  | <b>Prdx6</b> | <b>gPrdx6</b> |
|-------------------------|--------------|---------------|
| <i>Energía del HOMO</i> | -2.45/-1.66  | -1.59/-1.81   |
| $\eta$                  | 2.38/2.21    | 1.35/2.61     |

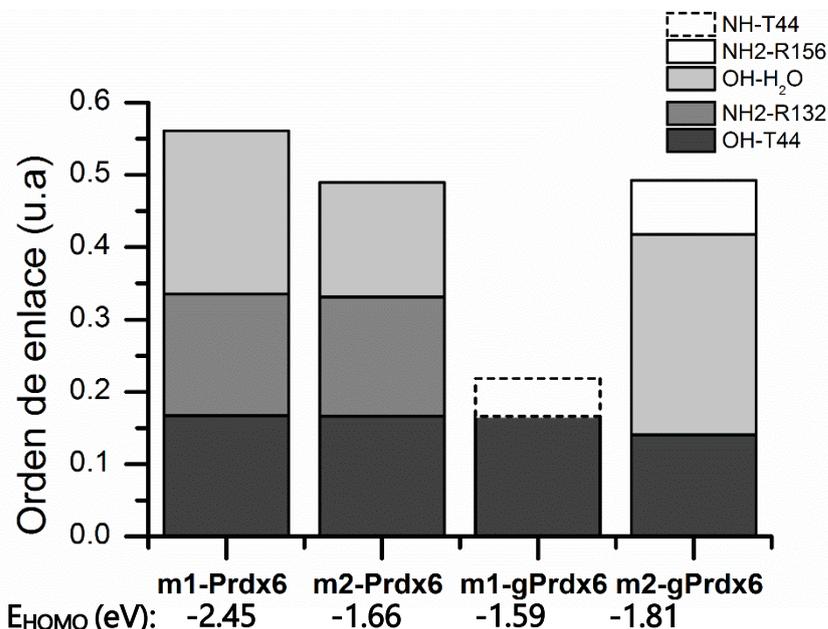
Al considerar el entorno de la C<sub>P</sub> en los diferentes casos, no se observan diferencias significativas frente a considerar únicamente a la C<sub>P</sub> en la zona QM. Para poder comprobar la fuerza de los enlaces de hidrogeno que existen entre los residuos del sitio catalítico y el tiolato de la C<sub>P</sub>, debido a las limitaciones del método ONIOM, se realizó un recorte de la zona cuántica extendida para poder estudiar los índices de Wiberg como indicadores del orden de enlace, y también poder estudiar descriptores locales como la *dureza local* o la *fukui condensada* explicadas en la sección 3.6. En la figura 41 se muestra un 98% de la densidad electrónica del sistema QM.



**Figura 41.** Densidad electrónica del recorte de la zona cuántica del cálculo QM/MM. **(A)** Cadena lateral de C47, T44 y R132, y 2 moléculas de H<sub>2</sub>O. **(B)** Cadena lateral de C47, T44 y R132, y 3 moléculas de H<sub>2</sub>O. **(C)** Cadena lateral de C47, así como enlace amida y cadena lateral de T44. **(D)** Cadena lateral de C47, T44 y R156, y 3 moléculas de H<sub>2</sub>O.

En la *figura 41* se observa densidad electrónica sobre los supuestos enlaces de hidrógeno, confirmando su existencia. Las aguas presentan un rol importante en la solvatación y estabilización del residuo en su forma catalítica. La interacción con la T44 se confirmó para los cuatro sistemas, lo cual es consistente con el rol propuesto

en la bibliografía para hPrdx5 de modular la nucleofilia de la C<sub>P</sub> para que solo reaccione con el sustrato<sup>40</sup>. A continuación, se muestra el índice de Wiberg de cada sistema.



**Figure 42.** Índices de Wiberg de los enlaces de hidrógeno entre el azufre de la C<sub>P</sub> y los diferentes residuos del sitio activo.

Al estudiar los índices de Wiberg de la red formada en el sitio activo en los diferentes monómeros, el orden de enlace total sobre el azufre del tiolato de la C<sub>P</sub> se puede correlacionar con la E<sub>HOMO</sub> del sistema QM/MM. Cuanto mayor es el orden de enlace sobre entre el azufre y los diferentes residuos, menor es el E<sub>HOMO</sub>. A partir de este hecho se puede concluir que cuanto más fuerte es la red de enlace de hidrogeno que establece el sitio activo con el azufre de la C<sub>P</sub>, el orbital HOMO se encontrará más estabilizado, por lo que su nucleofilia disminuirá. La glicación, según lo observado, hace que la reactividad intrínseca de la C<sub>P</sub> aumente, como se observó para hPrdx5, dónde la ruptura del enlace treonina/cisteína conlleva un aumento de nucleofilia<sup>40</sup>.

Para estudiar si existe un cambio en la reactividad específica del azufre de la C<sub>P</sub> se evaluaron las propiedades locales de éste, como se muestra en la *Tabla 13*.

**Tabla 13.** Análisis de descriptores cuánticos de reactividad de la C<sub>P</sub>.

| <b>Descriptor</b>   | <b>Prdx6</b> | <b>gPrdx6</b> |
|---------------------|--------------|---------------|
| <b>Fukui f(S)</b>   | 1.07 / 1.09  | 1.28 / 1.09   |
| <b>Dureza local</b> | 3.17 / 3.16  | 3.48 / 3.23   |

A partir de la función de *Fukui nucleofílica condensada* se evidencia que, en un monómero, la capacidad del azufre para reorganizar la densidad de carga se ve afectada con la glicación. Con respecto a la *dureza local*, se observa que gPrdx6-S<sup>-</sup> presenta mayor dureza frente a Prdx6-S<sup>-</sup>, lo que significa que la glicación aumenta la dureza del átomo de azufre, o lo que es lo mismo, disminuye su blandura y por lo tanto la capacidad de participar en nuevas reacciones covalentes tras la PTM.

## **5. CONCLUSIÓN**

## 5.1 Conclusiones

El presente estudio computacional permitió profundizar en el conocimiento disponible sobre efectos que experimenta la estructura y su dinámica de la peroxirredoxina 6 humana (hPrdx6) bajo la forma de homodímero en solución, tras sufrir dos tipos de modificaciones post-traduccionales (PTM) que aparecen reportadas en la bibliografía como capaces de alterar sus funciones iPLA<sub>2</sub> y peroxidasa: (A) la fosforilación en el residuo T177 de la proteína nativa oxidada a ácido sulfénico en la cisteína peroxidática (C<sub>P</sub>-SOH) y en conexión con la función iPLA<sub>2</sub> y (B) la glicación por metilgloxal en el residuo R132 de la proteína nativa en su forma reducida (C<sub>P</sub>-S<sup>-</sup>) en conexión con la función peroxidasa. Para esto se realizaron simulaciones de dinámica molecular clásica convencional (cMD) en ambos casos y acelerada (AMD) para el caso de la fosforilación, donde se buscó caracterizar la formación de un estado *molten globule*, manejado entre los antecedentes de partida, lo que requiere aplicar técnicas de muestro conformacional avanzado.

Adicionalmente, también se realizó aquí un primer acercamiento *in silico* al estudio de la interacción de esta proteína con DPPC, uno de sus sustratos principales para la actividad iPLA<sub>2</sub>, determinando su estructura por cMD con restricciones y la energía de formación del complejo con técnicas MM/PB(GB)SA. Por otra parte, se analizaron propiedades de la C<sub>P</sub> (pK<sub>a</sub> y nucleofilia) y del entorno inmediato que modula su reactividad en el sitio peroxidasa, tanto en la proteína nativa reducida como en el producto de glicación *argpirimidina* en el residuo R132. Para esto se emplearon simulaciones a pH constante para determinar su pK<sub>a</sub> y realizaron cálculos ONIOM:QM/MM(B3LPY:AMBER) para determinar indicadores de reactividad.

Respecto a efectos de la fosforilación, en primer lugar, se determinó una estructura estable representativa del homodímero en solución para la proteína oxidada hPrdx6-SOH en su forma nativa y fosforilada en T177. Los resultados obtenidos muestran que la fosforilación produce un cambio en la estructura terciaria de la proteína, llevándola a adoptar una conformación *molten globule*. Esto se evidenció mediante el análisis de R<sub>g</sub>, de la superficie global de la proteína expuesta al solvente (SASA) y del SASA de tres residuos triptófanos presentes en la estructura. Por otro lado, se estableció que la estructura secundaria no se ve alterada de forma significativa al incorporar la PTM, en consistencia con lo esperado para una este tipo de conformación. Para explorar en mayor detalle las características dinámicas del sitio activo iPLA<sub>2</sub>, se estudió la evolución temporal de su apertura, el nivel de exposición de la H26 (integrante de la triada catalítica e indicado como clave en la unión del ligando) y la distancia de los C $\alpha$  de S32 y D140, los otros dos residuos catalíticos. Si bien la oxidación de la CP a -SOH parece tener un efecto sobre el estado de oligomerización de la proteína, en concordancia con observaciones experimentales, no se encontró evidencia de cambios en la proteína que correlacionen directamente con el incremento observado en la actividad iPLA<sub>2</sub> tras la fosforilación ni variaciones significativas en la estabilidad del complejo que la proteína nativa o fosforilada forma con el ligando DPPC. Un elemento que si podría llegar a tener un efecto sobre la actividad catalítica IPLA2, es el cambio detectado en la red de interacciones del sustrato en el sitio activo, donde por efecto de la fosforilación se sustituye la interacción directa ligando-proteína por una serie más extendida de interacciones mediadas por moléculas de agua, algunas de las cuales pueden llegar a tener un rol catalítico en el mecanismo, aún desconocido a nivel detallado.

Respecto a los efectos de la glicación, se determinó la estructura en solución del homodímero de hPrdx6-S<sup>-</sup> nativa y argpirimidina en la R132, sin hallar diferencias estructurales significativas a nivel de la estructura cuaternaria, terciaria y secundaria de la proteína en solución. El análisis detallado de la red de enlaces de hidrógeno en el sitio activo peroxidasa mostró que la misma se debilita en la proteína glicada y que esto se traduce en un aumento en el pK<sub>a</sub> de la C<sub>P</sub>, que pasa de 4.8 a 9.3 unidades de pK<sub>a</sub>. Los estudios de reactividad de la C<sub>P</sub> muestran que la glicación por metilgloxal de la R132 produce un aumento en la nucleofilia de la cisteína peroxidática que se correlaciona con la suma de órdenes de enlace Wiberg sobre la red de interacciones de enlace de hidrógeno que involucran a la C<sub>P</sub>. A mayor orden de enlace, un HOMO más estable, y por ende una menor reactividad. En suma, estos resultados mostraron que la C<sub>P</sub> post-glicación presenta una mayor reactividad debido a que se encuentra menos estabilizada. Sin embargo, debido al aumento en su pK<sub>a</sub>, la fracción de tiolato a pH fisiológico será despreciable. Estos resultados permitirían explicar la inhibición de la actividad peroxidasa debido a la glicación.

## 6. *BIBLIOGRAFÍA*

- (1) Rhee, S. G., Kang, S. W., Chang, T. S., Jeong, W., and Kim, K. (2001) Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* 52, 35–41.
- (2) Hofmann, B., Hecht, H., and Flohé, L. (2002) Peroxiredoxins. *J. Biol. Chem.* 383, 347–364.
- (3) Chae, H. Z., Uhm, T. A. I. B., and Rheet, S. U. E. G. (1994) Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. *J. Biol. Chem.* 91, 7022–7026.
- (4) Harper, A. F., Leuthaeuser, J. B., Babbitt, P. C., Morris, J. H., Ferrin, T. E., Poole, L. B., and Fetrow, J. S. (2017) An Atlas of Peroxiredoxins Created Using an Active Site Profile-Based Approach to Functionally Relevant Clustering of Proteins. *PLoS Comput. Biol.* 13, e1005284.
- (5) Fisher, A. B. (2017) Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling. *Arch. Biochem. Biophys.* 617, 68–83.
- (6) Bae, J. Y., Ahn, S. J., Han, W., and Noh, D. Y. (2007) Peroxiredoxin I and II inhibit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death in MCF-7 cell lines. *J. Cell. Biochem.* 101, 1038–1045.
- (7) Li, L., Zhang, Y. G., and Chen, C. L. (2013) Anti-apoptotic role of peroxiredoxin III in cervical cancer cells. *FEBS Open Bio* 3, 51–54.
- (8) Masutani, H., and Ueda, S. (2005) The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis. *Cell Death Differ.* 12, 991–998.
- (9) Gretes, M. C., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2012) Peroxiredoxins in Parasites. *Antioxid. Redox Signal.* 17, 608–633.
- (10) Szabó, C., Ischiropoulos, H., and Radi, R. (2007) Peroxynitrite: Biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 662–680.
- (11) Robinson, M. W., Hutchinson, A. T., Dalton, J. P., and Donnelly, S. (2010) Peroxiredoxin : a central player in immune modulation. *Parasity Inmunol.* 32, 305–313.
- (12) Storz, G., Jacobson, F. S., Tartaglia, L. A., Morgan, R. W., Silveira, L. A., and Ames, B. N. (1989) An alkyl hydroperoxide reductase induced by oxidative stress in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: Genetic characterization and cloning of *ahp*. *J. Bacteriol.* 171, 2049–2055.
- (13) Veal, E. A., Day, A. M., and Morgan, B. A. (2007) Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol. Cell* 105–116.
- (14) Kwon, J., Lee, S.-R., Yang, K.-S., Ahn, Y., Kim, Y. J., Stadtman, E. R., and Rhee, S. G. (2004) Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 16419–16424.
- (15) Lee, S.-R., Kwon, K.-S., Kim, S.-R., and Rhee, S. G. (1998) Reversible Inactivation of Protein-tyrosine Phosphatase 1B in A431 Cells Stimulated with Epidermal Growth Factor. *J. Biol. Chem.* 273, 15366–15372.
- (16) Winterbourn, C. C. (2013) The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods Enzymol.* 1st ed. Elsevier Inc.
- (17) Rhee, S. G. (2016) Overview on Peroxiredoxin. *Mol. Cells* 39, 1–5.
- (18) Chang, T.-S., Jeong, W., Choi, S. Y., Yu, S., Kang, S. W., and Rhee, S. G. (2002) Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 277, 25370–25376.
- (19) Woo, H. A., Yim, S. H., Shin, D. H., Kang, D., Yu, D. Y., and Rhee, S. G. (2010) Inactivation of Peroxiredoxin I by Phosphorylation Allows Localized H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Accumulation for Cell Signaling. *Cell* 140, 517–528.

(20) Yang, K. S., Kang, S. W., Woo, H. A., Hwang, S. C., Chae, H. Z., Kim, K., and Rhee, S. G. (2002) Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. *J. Biol. Chem.* 277, 38029–38036.

(21) Hyun, A. W., Jeong, W., Chang, T. S., Kwang, J. P., Sung, J. P., Jeong, S. Y., and Sue, G. R. (2005) Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-Cys peroxiredoxins. *J. Biol. Chem.* 280, 3125–3128.

(22) Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J., and Poole, L. B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 32–40.

(23) Poole, L. B. (2007) The catalytic mechanism of peroxiredoxins. *Subcell. Biochem.* 44, 61–81.

(24) Soito, L., Williamson, C., Knutson, S. T., Fetrow, J. S., Poole, L. B., and Nelson, K. J. (2011) PREX: PeroxiRedoxin classification indEX, a database of subfamily assignments across the diverse peroxiredoxin family. *Nucleic Acids Res.* 39, D332-7.

(25) Schröder, E., and Ponting, C. P. (1998) Evidence that peroxiredoxins are novel members of the thioredoxin fold superfamily. *Protein Sci.* 7, 2465–2468.

(26) Copley, S. D., Novak, W., and Babbitt, P. C. (2004) Divergence of function in the thioredoxin-Fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from thioredoxins. *Biochemistry* 43, 13981–13995.

(27) Choi, H. J., Kang, S. W., Yang, C. H., Rhee, S. G., and Ryu, S. E. (1998) Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 5, 400–406.

(28) Martin, J. L. (1995) Thioredoxin -a fold for all reasons. *Structure* 3, 245–250.

(29) Echalié, A., Trivelli, X., Corbier, C., Rouhier, N., Walker, O., Tsan, P., Jacquot, J. P., Aubry, A., Krimm, I., and Lancelin, J. M. (2005) Crystal structure and solution NMR dynamics of a D (Type II) peroxiredoxin glutaredoxin and thioredoxin dependent: A new insight into the peroxiredoxin oligomerism. *Biochemistry* 44, 1755–1767.

(30) Noguera-Mazon, V., Krimm, I., Walker, O., and Lancelin, J.-M. (2006) Protein–protein interactions within peroxiredoxin systems. *Photosynth. Res.* 89, 277–290.

(31) Perkins, A., Gretes, M. C., Nelson, K. J., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2012) Mapping the active site helix-to-strand conversion of CxxxxC peroxiredoxin Q enzymes. *Biochemistry* 51, 7638–7650.

(32) Schröder, E., Littlechild, J. A., Lebedev, A. A., Errington, N., Vagin, A. A., and Isupov, M. N. (2000) Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution. *Structure* 8, 605–615.

(33) Wood, Z. A., Poole, L. B., Hantgan, R. R., and Karplus, P. A. (2002) Dimers to doughnuts: Redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry* 41, 5493–5504.

(34) Barranco-Medina, S., Lázaro, J. J., and Dietz, K. J. (2009) The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function. *FEBS Lett.* 583, 1809–1816.

(35) Mizohata, E., Sakai, H., Fusatomi, E., Terada, T., Murayama, K., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2005) Crystal structure of an archaeal peroxiredoxin from the aerobic hyperthermophilic crenarchaeon *Aeropyrum pernix* K1. *J. Mol. Biol.* 354, 317–329.

- (36) Noguera-Mazon, V., Lemoine, J., Walker, O., Rouhier, N., Salvador, A., Jacquot, J.-P., Lancelin, J.-M., and Krimm, I. (2006) Glutathionylation induces the dissociation of 1-Cys D-peroxiredoxin non-covalent homodimer. *J. Biol. Chem.* *281*, 31736–31742.
- (37) Parsonage, D., Youngblood, D. S., Sarma, G. N., Wood, Z. A., Karplus, P. A., and Poole, L. B. (2005) Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Biochemistry* *44*, 10583–10592.
- (38) Tairum, C. A., Santos, M. C., Breyer, C. A., Geyer, R. R., Nieves, C. J., Portillo-Ledesma, S., Ferrer-Sueta, G., Toledo, J. C., Toyama, M. H., Augusto, O., Netto, L. E. S., and De Oliveira, M. A. (2016) Catalytic Thr or ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms. *Sci. Rep.* *6*, 1–12.
- (39) Hall, A., Parsonage, D., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2010) Structural Evidence that Peroxiredoxin Catalytic Power is Based on Transition-State Stabilization. *J. Mol. Biol.* *402*, 194–209.
- (40) Portillo-ledesma, S., Sardi, F., Manta, B., Clippe, A., Knoops, B., Alvarez, B., Coitin, E. L., and Ferrer-sueta, G. (2014) Deconstructing the Catalytic Efficiency of Peroxiredoxin - 5 Peroxidatic Cysteine. *Biochemistry* *53*, 6113–6125.
- (41) Zeida, A., Reyes, A. M., Lebrero, M. C. G., Radi, R., Trujillo, M., and Estrin, D. A. (2014) The extraordinary catalytic ability of peroxiredoxins: a combined experimental and QM/MM study on the fast thiol oxidation step. *Chem. Commun.* *50*, 10070–10073.
- (42) Flohe, L., Budde, H., Bruns, K., Castro, H., Clos, J., Hofmann, B., Kansal-Kalavar, S., Krumme, D., Menge, U., Plank-Schumacher, K., Sztajer, H., Wissing, J., Wylegalla, C., and Hecht, H.-J. (2002) Tryparedoxin peroxidase of *Leishmania donovani*: molecular cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* *397*, 324–335.
- (43) Thurlkill, R. L., Thurlkill, R. L., Grimsley, G. R., Grimsley, G. R., Scholtz, J. M., Scholtz, J. M., Pace, C. N., and Pace, C. N. (2006) pK values of the ionizable groups of proteins. *Protein Sci* *15*, 1214–1218.
- (44) Ferrer-Sueta, G., Manta, B., Botti, H., Radi, R., Trujillo, M., and Denicola, A. (2011) Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. *Chem. Res. Toxicol.* *24*, 434–450.
- (45) König, J., Lotte, K., Plessow, R., Brockhinke, A., Baier, M., and Dietz, K. J. (2003) Reaction mechanism of plant 2-Cys peroxiredoxin: Role of the C terminus and the quaternary structure. *J. Biol. Chem.* *278*, 24409–24420.
- (46) Monteiro, G., Horta, B. B., Pimenta, D. C., Augusto, O., and Netto, L. E. S. (2007) Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 4886–4891.
- (47) Hall, A., Nelson, K., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2011) Structure-based Insights into the Catalytic Power and Conformational Dexterity of Peroxiredoxins. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 795–815.
- (48) Fisher, A. B. (2011) Peroxiredoxin 6: A Bifunctional Enzyme with Glutathione Peroxidase and Phospholipase A<sub>2</sub> Activities. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 831–844.
- (49) Chae, H. Z., Robison, K., Poole, L. B., Church, G., Storz, G., and Rhee, S. G. (1994) Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 7017–21.
- (50) Fisher, A. B. (2017) Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes

and cell signaling. *Arch. Biochem. Biophys.* 617, 68–83.

(51) Manevich, Y., Shuvaeva, T., Dodia, C., Kazi, A., Feinstein, S. I., and Fisher, A. B. (2009) Binding of peroxiredoxin 6 to substrate determines differential phospholipid hydroperoxide peroxidase and phospholipase A2 activities. *Arch. Biochem. Biophys.* 485, 139–149.

(52) Toledo, J. C., Audi, R., Ogusucu, R., Monteiro, G., Netto, L. E. S., and Augusto, O. (2011) Horseradish peroxidase compound i as a tool to investigate reactive protein-cysteine residues: From quantification to kinetics. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 1032–1038.

(53) Manevich, Y., Feinstein, S. I., and Fisher, A. B. (2004) Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with GST. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 3780–3785.

(54) Ralat, L. A., Manevich, Y., Fisher, A. B., and Colman, R. F. (2006) Direct Evidence for the Formation of a Complex between 1-Cysteine Peroxiredoxin and Glutathione S - Transferase  $\pi$  with Activity Changes in Both Enzymes. *Biochemistry* 45, 360–372.

(55) Kang, S. W., Baines, I. C., and Rhee, S. G. (1998) Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *J. Biol. Chem.* 273, 6303–6311.

(56) Fisher, A., Dodia, C., Manevich, Y., Chen, J., and Feinstein, S. (1999) Phospholipid hydroperoxidase are substrates for non-selenium glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 274, 21326–21334.

(57) Liu, G., Feinstein, S. I., Wang, Y., Dodia, C., Fisher, D., Yu, K., Ho, Y. S., and Fisher, A. B. (2010) Comparison of glutathione peroxidase 1 and peroxiredoxin 6 in protection against oxidative stress in the mouse lung. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1172–1181.

(58) Rivera-Santiago, R. F., Harper, S. L., Zhou, S., Sriswasdi, S., Feinstein, S. I., Fisher, A. B., and Speicher, D. W. (2015) Solution structure of the reduced form of human peroxiredoxin-6 elucidated using zero-length chemical cross-linking and homology modelling. *Biochem J* 468, 87–98.

(59) Kim, K. H., Lee, W., and Kim, E. E. K. (2016) Crystal structures of human peroxiredoxin 6 in different oxidation states. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 477, 717–722.

(60) Zhou, S., Sorokina, E. M., Harper, S., Li, H., Ralat, L., Dodia, C., Speicher, D. W., Feinstein, S. I., and Fisher, A. B. (2016) Peroxiredoxin 6 homodimerization and heterodimerization with glutathione S-transferase pi are required for its peroxidase but not phospholipase A2 activity. *Free Radic. Biol. Med.* 94, 145–156.

(61) Manevich, Y., Hutchens, S., Tew, K. D., and Townsend, D. M. (2013) Allelic variants of glutathione S-transferase P1-1 differentially mediate the peroxidase function of peroxiredoxin VI and alter membrane lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 54, 62–70.

(62) Kim, T. S., Sundaresh, C. S., Feinstein, S. I., Dodia, C., Skach, W. R., Jain, M. K., Nagase, T., Seki, N., Ishikawa, K., Nomura, N., and Fisher, A. B. (1997) Identification of a human cDNA clone for lysosomal type Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 and properties of the expressed protein. *J. Biol. Chem.* 272, 2542–50.

(63) Chen, J. W., Dodia, C., Feinstein, S. I., Jain, M. K., and Fisher, A. B. (2000) 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J. Biol. Chem.* 275, 28421–28427.

- (64) Wu, Y. Z., Manevich, Y., Baldwin, J. L., Dodia, C., Yu, K., Feinstein, S. I., and Fisher, A. B. (2006) Interaction of surfactant protein A with peroxiredoxin 6 regulates phospholipase A2 activity. *J. Biol. Chem.* *281*, 7515–7525.
- (65) Fisher, A. B., Dodia, C., Chander, A., and Jain, M. (1992) A competitive inhibitor of phospholipase A2 decreases surfactant phosphatidylcholine degradation by the rat lung. *Biochem. J.* *288*, 407–411.
- (66) Manevich, Y., Reddy, K. S., Shuvaeva, T., Feinstein, S. I., and Fisher, A. B. (2007) Structure and phospholipase function of peroxiredoxin 6: identification of the catalytic triad and its role in phospholipid substrate binding. *J. Lipid Res.* *48*, 2306–2318.
- (67) Fisher, A. B., and Jain, M. (2001) Phospholipases: Degradation of Phospholipids in Membranes and Emulsions, in eLS. John Wiley & Sons, Ltd.
- (68) Kim, S. Y., Chun, E., and Lee, K.-Y. (2011) Phospholipase A2 of peroxiredoxin 6 has a critical role in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* *18*, 1573–1583.
- (69) Lee, I., Dodia, C., Chatterjee, S., Zagorski, J., Mesaros, C., Blair, I. A., Feinstein, S. I., Jain, M., and Fisher, A. B. (2013) A Novel Nontoxic Inhibitor of the Activation of NADPH Oxidase Reduces Reactive Oxygen Species Production in Mouse Lung. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *345*, 284–296.
- (70) Yun, H. M., Choi, D. Y., Oh, K. W., and Hong, J. T. (2015) PRDX6 Exacerbates Dopaminergic Neurodegeneration in a MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *Mol. Neurobiol.* *52*, 422–431.
- (71) Shichita, T., Sakaguchi, R., Suzuki, M., and Yoshimura, A. (2012) Post-ischemic inflammation in the brain. *Front. Immunol.* *3*, 1–8.
- (72) Garcia-Bonilla, L., and Iadecola, C. (2012) Peroxiredoxin sets the brain on fire after stroke. *Nat. Med.* *18*, 858–859.
- (73) Shichita, T., Hasegawa, E., Kimura, A., Morita, R., Sakaguchi, R., Takada, I., Sekiya, T., Ooboshi, H., Kitazono, T., Yanagawa, T., Ishii, T., Takahashi, H., Mori, S., Nishibori, M., Kuroda, K., Akira, S., Miyake, K., and Yoshimura, A. (2012) Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat. Med.* *18*, 911–917.
- (74) Shanshan, Y., Beibei, J., Li, T., Minna, G., and Shipeng, L. (2017) Phospholipase A2 of Peroxiredoxin 6 Plays a Critical Role in Cerebral Ischemia / Reperfusion Inflammatory Injury *11*, 1–13.
- (75) Fisher, A. B., Dodia, C., Sorokina, E. M., Li, H., Zhou, S., Raabe, T., and Feinstein, S. I. (2016) A novel lysophosphatidylcholine acyl transferase activity is expressed by peroxiredoxin 6. *J. Lipid Res.* *57*, 587–596.
- (76) Shindou, H., Hishikawa, D., Harayama, T., Yuki, K., and Shimizu, T. (2009) Recent progress on acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase research. *J. Lipid Res.* *50*, S46–S51.
- (77) Chen, X., Hyatt, B. A., Mucenski, M. L., Mason, R. J., and Shannon, J. M. (2006) Identification and characterization of a lysophosphatidylcholine acyltransferase in alveolar type II cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *103*, 11724–11729.
- (78) So, Y. K., Jo, H. Y., Mi, H. K., Cha, Y. Y., Sung, W. C., Shim, J. H., Tae, J. K., and Lee, K. Y. (2008) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent hyperoxidation of peroxiredoxin 6 (Prdx6) plays a role in cellular toxicity via up-regulation of iPLA2 activity. *J. Biol. Chem.* *283*, 33563–33568.
- (79) Wu, Y., Feinstein, S. I., Manevich, Y., Chowdhury, I., Pak, J. H., Kazi, A., Dodia,

- C., Speicher, D. W., and Fisher, A. B. (2009) Mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation of peroxiredoxin 6 regulates its phospholipase A<sub>2</sub> activity. *Biochem. J.* 419, 669–679.
- (80) Rahaman, H., Zhou, S., Shuvaeva, T., Feinstein, S. I., and Fisher, A. B. (2011) Phosphorylation of peroxiredoxin 6 changes its conformation and increases its binding to phospholipids. *FASEB J.* 25, 939.5-939.5.
- (81) Rahaman, H., Zhou, S., Dodia, C., Feinstein, S. I., Huang, S., Speicher, D., and Fisher, A. B. (2012) Increased phospholipase A2 activity with phosphorylation of peroxiredoxin 6 requires a conformational change in the protein. *Biochemistry* 51, 5521–5530.
- (82) Ptitsyn, O. B. (1995) Molten Globule and Protein Folding. *Adv. Protein Chem.* 47, 83–229.
- (83) Ambruso, D. R., Ellison, M. A., Thurman, G. W., and Leto, T. L. (2012) Peroxiredoxin 6 translocates to the plasma membrane during neutrophil activation and is required for optimal NADPH oxidase activity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1823, 306–315.
- (84) Chatterjee, S., Feinstein, S. I., Dodia, C., Sorokina, E., Lien, Y. C., Nguyen, S., Debolt, K., Speicher, D., and Fisher, A. B. (2011) Peroxiredoxin 6 phosphorylation and subsequent phospholipase A2 activity are required for agonist-mediated activation of NADPH oxidase in mouse pulmonary microvascular endothelium and alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* 286, 11696–11706.
- (85) Takagi, T., Naito, Y., Oya-Ito, T., and Yoshikawa, T. (2012) The role of methylglyoxal-modified proteins in gastric ulcer healing. *Curr. Med. Chem.* 19, 137–44.
- (86) Thornalley, P. J. (2008) Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug Metabol. Drug Interact.* 23, 125–50.
- (87) Degenhardt, T. P., Thorpe, S. R., and Baynes, J. W. (1998) Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 44, 1139–1145.
- (88) Oya-Ito, T., Naito, Y., Takagi, T., Shima, K., Itoh, Y., and Yoshikawa, T. (2013) Relevance of Methylglyoxal Modification of Peroxiredoxin 6 to the Development of Diabetic Complications. *Free Radic. Biol. Med.* 65, S32.
- (89) Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., and Simmerling, C. (2006) Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins* 65, 712–725.
- (90) Rahaman, H., Zhou, S., Dodia, C., Shuvaeva, T., Feinstein, S. I., and Fisher, A. B. (2012) Phosphorylation of Prdx6 mediated by MAPkinase induces conformational change with concomitant increase in its phospholipase A2 activity. *FASEB J.* 26, 997.2-997.2.
- (91) Defelipe, L. A., Lanzarotti, E., Gauto, D., Marti, M. A., and Turjanski, A. G. (2015) Protein Topology Determines Cysteine Oxidation Fate: The Case of Sulfenyl Amide Formation among Protein Families. *PLoS Comput. Biol.* 11, 1–26.
- (92) Homeyer, N., Horn, A. H. C., Lanig, H., and Sticht, H. (2006) AMBER force-field parameters for phosphorylated amino acids in different protonation states: Phosphoserine, phosphothreonine, phosphotyrosine, and phosphohistidine. *J. Mol. Model.* 12, 281–289.
- (93) Dickson, C. J., Rosso, L., Betz, R. M., Walker, R. C., and Gould, I. R. (2012) GAFFlipid: a General Amber Force Field for the accurate molecular dynamics

simulation of phospholipid. *Soft Matter* 8, 9617.

(94) Stewart, J. J. P. (2007) Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Model.* 13, 1173–1213.

(95) M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Had, D. J. F. (2013) Gaussian 09 Rev. D.01. Wallingford, CT, USA.

(96) Singh, U. C., and Kollman, P. A. (1984) An approach to computing electrostatic charges for molecules. *J. Comput. Chem.* 5, 129–145.

(97) Besler, B. H., Merz, K. M., and Kollman, P. A. (1990) Atomic charges derived from semiempirical methods. *J. Comput. Chem.* 11, 431–439.

(98) Hehre, W. J., Ditchfield, R., and Pople, J. A. (1972) Self-Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian-Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules. *J. Chem. Phys.* 56, 2257–2261.

(99) Frisch, M. J., Pople, J. A., and Binkley, J. S. (1984) Self-consistent molecular orbital methods 25. Supplementary functions for Gaussian basis sets. *J. Chem. Phys.* 80, 3265–3269.

(100) Dupradeau, F.-Y., Pigache, A., Zaffran, T., Savineau, C., Lelong, R., Grivel, N., Lelong, D., Rosanski, W., and Cieplak, P. (2010) The R.E.D. tools: advances in RESP and ESP charge derivation and force field library building. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12, 7821–7839.

(101) D.A. Case, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese, H. Gohlke, A.W. Goetz, D. Greene, N. Homeyer, S. Izadi, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, D. Mermelstein, K.M. Merz, G. Monard, H., D. M. Y. and P. A. K. (2017) AMBER16. University of California, San Francisco.

(102) Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., and Case, D. A. (2004) Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* 25, 1157–1174.

(103) Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., and Klein, M. L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 79, 926–935.

(104) Toukmaji, A., Sagui, C., Board, J., and Darden, T. (2000) Efficient particle-mesh Ewald based approach to fixed and induced dipolar interactions. *J. Chem. Phys.* 113, 10913–10927.

(105) Hünenberger, P. H. (2005) Thermostat algorithms for molecular dynamics simulations. *Adv. Polym. Sci.* 173, 105–147.

(106) Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G., and Berendsen, H. J. C. (1977) Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* 23, 327–341.

(107) Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A., and Haak, J. R. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 81, 3684–3690.

(108) Hamelberg, D., Mongan, J., and McCammon, J. A. (2004) Accelerated molecular dynamics: A promising and efficient simulation method for biomolecules. *J. Chem. Phys.* 120, 11919–11929.

- (109) Kataoka, M., Tokunaga, F., Kuwajima, K., and Goto, Y. (2008) Structural characterization of the molten globule of  $\alpha$ -lactalbumin by solution X-ray scattering. *Protein Sci.* 6, 422–430.
- (110) Kataoka, M., Nishii, I., Fujisawa, T., Ueki, T., Tokunaga, F., and Goto, Y. (1995) Structural characterization of the molten globule and native states of apomyoglobin by solution X-ray scattering. *J. Mol. Biol.* 249, 215–28.
- (111) Flanagan, J. M., Kataoka, M., Shortle, D., and Engelman, D. M. (1992) Truncated staphylococcal nuclease is compact but disordered. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 748–52.
- (112) Lobanov, M. Y., Bogatyreva, N. S., and Galzitskaya, O. V. (2008) Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness. *Mol. Biol.* 42, 623–628.
- (113) D.A. Case, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese, H. Gohlke, A.W. Goetz, D. Greene, N. Homeyer, S. Izadi, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, D. Mermelstein, K.M. Merz, G. Monard, H., D. M. Y. and P. A. K. (2017) Amber16. University of California, San Francisco.
- (114) Shakhnovich, E. I., and Finkelstein, A. V. (1989) Theory of Cooperative Transitions in Protein Molecules .1. Why Denaturation of Globular Protein Is a 1st-Order Phase-Transition. *Biopolymers* 28, 1667–1680.
- (115) Neumaier, S., and Kiefhaber, T. (2014) Redefining the dry molten globule state of proteins. *J. Mol. Biol.* 426, 2520–2528.
- (116) Kabsch, W., and Sander, C. (1983) Dictionary of Protein Secondary Structure - Pattern-Recognition of Hydrogen-Bonded and Geometrical Features. *Biopolymers* 22, 2577–2637.
- (117) Amadei, A., Linssen, A., and Berendsen, H. J. C. (1993) Essential Dynamics of Proteins. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 17, 412–425.
- (118) Hayward, S., Kitao, A., and Go, N. (1994) Harmonic and anharmonic aspects in the dynamics of BPTI: A normal mode analysis and principal component analysis. *Protein Sci.* 3, 936–943.
- (119) Wold, S., Esbensen, K., and Geladi, P. (1987) Principal Component Analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 37–52.
- (120) Hayes, J. M., and Archontis, G. (2012) MM-GB (PB) SA Calculations of Protein-Ligand Binding Free Energies, in *Molecular Dynamics - Studies of Synthetic and Biological Macromolecules* (Wang, L., Ed.), pp 171–190. InTech.
- (121) Genheden, S., and Ryde, U. (2015) The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin. Drug Discov.* 10, 449–461.
- (122) Mongan, J., Case, D. A., and McCammon, J. A. (2004) Constant pH molecular dynamics in generalized Born implicit solvent. *J. Comput. Chem.* 25, 2038–2048.
- (123) Chung, L. W., Sameera, W. M. C., Ranzani, R., Page, A. J., Hatanaka, M., Petrova, G. P., Harris, T. V., Li, X., Ke, Z., Liu, F., Li, H.-B., Ding, L., and Morokuma, K. (2015) The ONIOM Method and Its Applications. *Chem. Rev.* 115, 5678–5796.
- (124) Lee, C., Yang, W., and Parr, R. G. (1988) Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* 37, 785–789.
- (125) Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D. C., Fox, T., Caldwell, J. W., and Kollman, P. A. (1995) A Second

Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 5179–5197.

(126) Reed, A. E., Curtiss, L. a, and Weinhold, F. (1988) Intermolecular interactions from a natural bond orbital, donor-acceptor viewpoint. *Chem. Rev. (Washington, DC, United States)* 88, 899–926.

(127) Geerlings, P., De Proft, F., and Langenaeker, W. (2010) Conceptual density functional theory. *Chem. Rev.* 9, 1793–873.

(128) Parr, R. G., and Yang, W. (1984) Density functional approach to the frontier-electron theory of chemical reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 4049–4050.

(129) Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. (1996) VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graph.* 14, 33–38.

(130) Inc, S. (2008) GaussView 5.0.

(131) Lins, L., Thomas, A., and Brasseur, R. (2003) Analysis of accessible surface of residues in proteins. *Protein Sci.* 12, 1406–17.

(132) Errington, N., and Doig, A. J. (2005) A phosphoserine-lysine salt bridge within and  $\alpha$ -helical peptide, the strongest  $\alpha$ -helix side-chain interaction measured to date. *Biochemistry* 44, 7553–7558.

(133) Samanta, U., and Bahnson, B. J. (2008) Crystal structure of human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: Structural implication to lipoprotein binding and catalysis. *J. Biol. Chem.* 283, 31617–31624.

(134) Xu, W., Yi, L., Feng, Y., Chen, L., and Liu, J. (2009) Structural insight into the activation mechanism of human pancreatic prophospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 284, 16659–16666.

(135) Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, A. J. (2009) Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* 16, 2785–91.

(136) Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., and Olson, A. J. (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 19, 1639–1662.

## **7. ANEXO**

### 7.1 Parámetros geométricos del residuo modificado argpirimidina

En la siguiente figura se muestra el residuo argpirimidina junto a la carga ESP de cada átomo obtenido tras parametrizar según el protocolo de la sección 3.1.

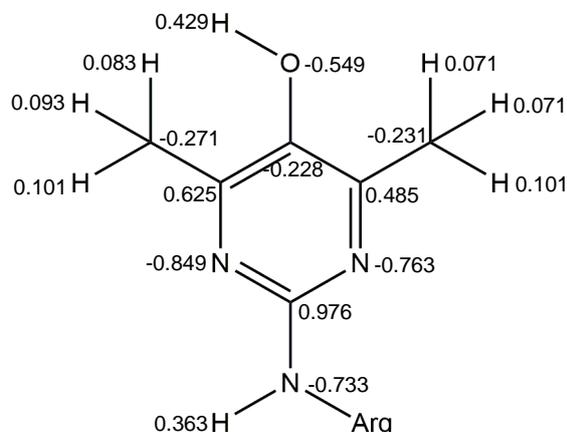


Figura A1. Cargas ESP del residuo modificado argpirimidina.

### 7.2 Fundamento teórico del análisis de componentes principales

El PCA fue realizado por el método de maximización de la varianza. En general para una variable tenemos que:

$$Y_j = v_{1j}X_1 + v_{2j}X_2 + \dots + v_{pj}X_n \quad (13)$$

donde  $Y_j$  representa la componente principal. Para todas las variables tenemos entonces una matriz formada por todas las variables de la siguiente forma:

$$\begin{pmatrix} Y_{1j} \\ \vdots \\ Y_{nj} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x_{11} & \dots & x_{1p} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{n1} & \dots & x_{np} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} v_{1j} \\ \vdots \\ v_{pj} \end{pmatrix} \quad (14)$$

Es posible reescribir dicha matriz en *notación matricial* como  $Y_j = Xv_j$ .

Para todo nuestro conjunto de valores se puede extraer una matriz de componentes principales:

$$\begin{pmatrix} y_{11} & \dots & y_{1p} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ y_{n1} & \dots & y_{np} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x_{11} & \dots & x_{1p} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{n1} & \dots & x_{np} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} v_{11} & \dots & v_{1p} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ v_{n1} & \dots & v_{np} \end{pmatrix} \quad (15)$$

Al igual que el caso para un único componente principal, es posible anotar dicha matriz con *notación matricial* como  $Y = XV$  donde  $Y$  contiene las puntuaciones de cada individuo y  $v$  los componentes de peso de las combinaciones lineales.

Una vez que tenemos la matriz de los componentes principales, necesitamos encontrar un *primer componente principal* que presente una varianza máxima. La varianza de esta se calcula siguiendo la ecuación MX.4.

$$Var(Y_1) = \frac{1}{2} y'1y_1 = \frac{1}{n} v'1X'v1X = v'1Sv1 \quad (16)$$

Se busca el máximo entonces poniendo como restricción que el vector en dirección del componente principal tenga módulo 1, es decir,  $v'1v1 = 1$ .

$$L(v1) = v'1Sv1 \mid v'1v1 = 1 \quad (17)$$

$$L(v1) = v'1Sv1 - \lambda(v'1v1 - 1) \quad (18)$$

$$\frac{L(v1)}{\partial v1} = 2Sv1 - 2\lambda v1 = 0 \quad (19)$$

$$Sv1 = \lambda v1 \quad (20)$$

Tenemos entonces que  $v1$  es un vector propio de la matriz propia de covarianza  $S1$  con un valor propio asociado  $\lambda$ .  $S$  presenta  $n$  valores propios  $\lambda1 \dots \lambda n$  diferentes ordenados en orden decreciente, es decir,  $\lambda1 > \lambda2 > \dots \lambda p > 0$ . Teniendo en cuenta que  $Var(Y1) = v'1Sv1 = \lambda$ , tenemos que  $\lambda$  es el valor propio más grande y por tanto  $v1$  el vector propio más grande asociado, por tanto, es posible tomarlo en cuenta como el componente principal más importante.

El segundo componente principal se obtiene de forma similar, pero añadiendo la restricción de que  $Y1$  e  $Y2$  se encuentren incorrelacionados.

$$covar(Y1, Y2) = \frac{1}{n} y'2y1 = \frac{1}{n} v'2X'Xv1 = v'2Sv1 = v'2\lambda1v1 = 0 \quad (21)$$

$$L(v2) = v'2Sv2 - \lambda(v'2v2 - 1) - \delta v'2v1 \quad (22)$$

$$\frac{L(v2)}{\partial v2} = 2Sv2 - 2\lambda v2 - \delta v1 = 0 \quad (23)$$

$$2v'1Sv2 - 2\lambda v'1v2 - \delta v'1v1 = 0 \quad (24)$$

$$Sv'1Sv2 - \delta = 0 \quad (25)$$

Como  $v'1Sv2 = 0$ , es posible visualizar que en el estado estacionario se cumple que  $\delta = 0$ , de forma que obtenemos una ecuación similar a la anterior,  $Sv2 = \lambda v2$ , donde  $v2$  representa el segundo vector propio y  $\lambda$  el valor propio. Es posible hacer este mismo procedimiento y de esta forma obtener todos los vectores y valores propios de la matriz de datos. Una vez obtenidos los vectores propios, solo resta proyectar nuestra matriz de datos sobre estos vectores y de esta forma tener representado nuestros datos en dos nuevas dimensiones que representan el análisis por componentes principales.

### 7.3 Estructura secundaria de los motivos del plegamiento tipo tiorredoxina

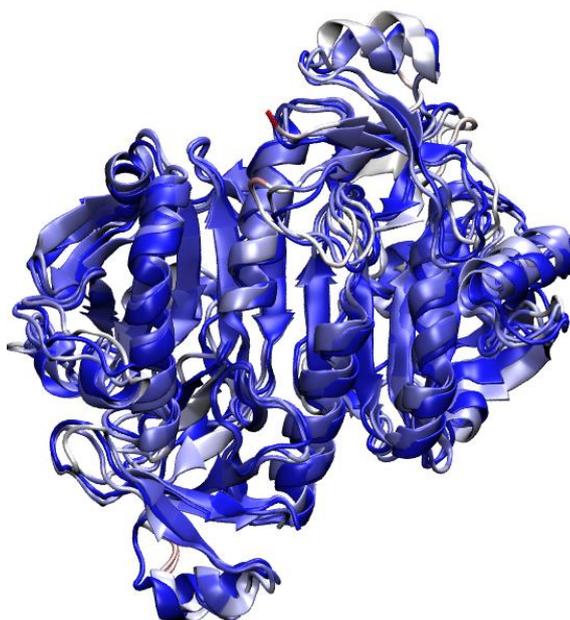
En la tabla A1 se muestra el porcentaje de estructura secundaria que presenta cada motivo conservado de la familia de las peroxirredoxinas.

**Tabla A1.** Porcentaje de estructura secundaria del plegamiento típico de las peroxirredoxinas.

|                   | $\beta 3$ | $\alpha 2$ | $\beta 4$ | $\alpha 4$ | $\beta 6$ | $\beta 7$ | $\alpha 5$ |
|-------------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|-----------|------------|
| <i>Prdx6-SOH</i>  | 89        | 96         | 96        | 89         | 85        | 62        | 91         |
| <i>pPrdx6-SOH</i> | 95        | 94         | 96        | 97         | 86        | 63        | 90         |

### 7.4 Superposición de estructuras representativas de *gPrdx6-S*<sup>-</sup>

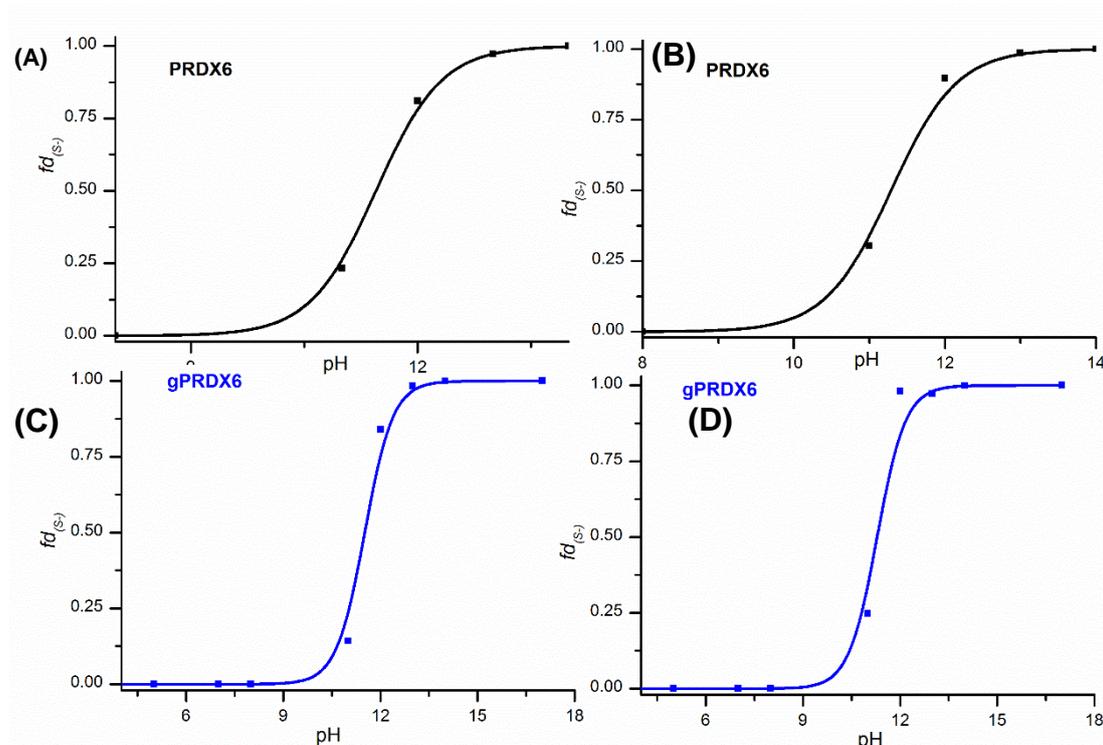
En la figura A2 se muestra la superposición de las estructuras extraídas del análisis de cluster de la simulación de *gPrdx6S*<sup>-</sup>.



**Figura A2.** Superposición de las estructuras representativas del análisis de cluster (91% entre las tres) de *gPrdx6-S*<sup>-</sup>, coloreado por RMSD.

### 7.5 pK<sub>a</sub> de la C92 en hPrdx6 con R132/R\*132

En la *figura A3* se muestra el ajuste de la curva de titulación de la C92 de ambos monómeros. Los pK<sub>a</sub> obtenidos se exponen en las tablas A2 y A3, y la tabla A4 corresponde al nivel de exposición de la C92 durante la simulación.



**Figura A3.** Curvas de titulación de la C92. **(A)** Primer monómero de Prdx6. **(B)** Segundo monómero de Prdx6. **(C)** Primer monómero de gPrdx6. **(D)** Segundo monómero de gPrdx6.

**Tabla A3.** Valores obtenidos del ajuste de la curva de titulación de Prdx6.

| Residuo titulado | pK <sub>a</sub> | R <sup>2</sup> | Desvío estándar |
|------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| C47              | 5.5/7.4         | 0.91/0.94      | 0.26/0.20       |
| C92              | 11.45/11.29     | 1/0.99         | 0.03/0.06       |

**Tabla A4.** Valores obtenidos del ajuste de la curva de titulación de gPrdx6.

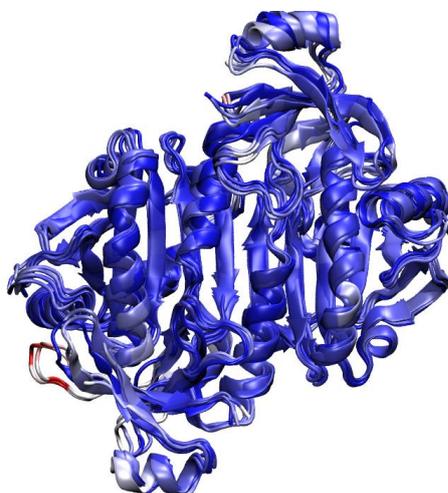
| Residuo titulado | pK <sub>a</sub> | R <sup>2</sup> | Desvío estándar |
|------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| C47              | 12.52/12.91     | 0.91/0.99      | 0.23/0.08       |
| C92              | 11.51/11.29     | 0.99/0.99      | 0.08/0.10       |

**Tabla A5.** Porcentaje y nivel de exposición de la C92 en Prdx6 y gPrdx6.

|        | % de exposición | Nivel de exposición |
|--------|-----------------|---------------------|
| Prdx6  | 111/104         | Expuesto/Expuesto   |
| gPrdx6 | 88/105          | Expuesto/Expuesto   |

### 7.6 Superposición de estructuras representativas de gPrdx6-SH

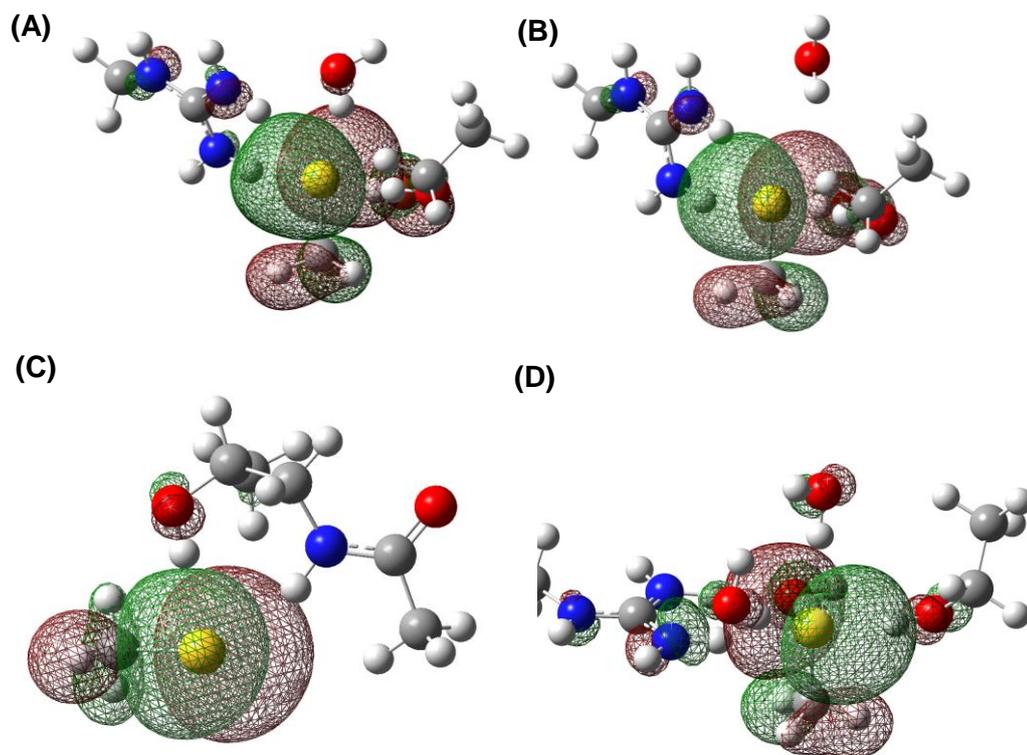
En la *figura A4* se muestra la superposición de las estructuras extraídas del análisis de cluster de la simulación de gPrdx6SH.



**Figura A4.** Superposición de las estructuras representativas del análisis de cluster de gPrdx6-SH coloreado por RMSD.

### 7.6 Orbitales HOMO de KS de Prdx6-S<sup>-</sup> y gPrdx6-S<sup>-</sup>

A continuación, se muestra el orbital HOMO de KS de cada Sistema QM/MM.



**Figura A5.** Orbital HOMO de KS del sistema QM/MM de Prdx6-S<sup>-</sup> (arriba) y gPrdx6-S<sup>-</sup> (abajo).