



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**

Tesina para la obtención del título de la Licenciatura en Bioquímica

# **Caracterización cinética de la proteína de fusión TR-Trx-Tpx de *Escherichia coli***

Bach. Vera Skafar Amen

**Tutor:** Dr. Gerardo Ferrer Sueta

Laboratorio de Fisicoquímica Biológica,  
Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias.

Montevideo, Uruguay

Mayo de 2019

## RESUMEN

El sistema tiorredoxina-peroxirredoxina está compuesto en la mayoría de los organismos por tres enzimas que funcionan en una secuencia de reacciones que emplean NADPH para reducir peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos orgánicos y ácido peroxinitroso. El sistema está compuesto, en el extremo reductor, por una tiorredoxina reductasa (TR), una flavoenzima dependiente de NADPH. El extremo oxidante a su vez está compuesto por una de varias peroxidasa dependientes de tioles, generalmente una peroxirredoxina (Prx), capaz de reducir oxidantes con el grupo funcional ROOH. Como vínculo entre ambos extremos está una oxidorreductasa llamada tiorredoxina (Trx) que posee funciones múltiples. En el sistema de nuestro interés acepta electrones de la TR y los cede a la Prx haciendo que la vía completa se comporte como una NADPH peroxidasa. Desde el punto de vista enzimático, el sistema involucra dos reacciones bimoleculares entre proteínas que implican difusión, reconocimiento, unión y reacción química. A pesar de que las reacciones entre TR y Trx y entre Trx y Prx son relativamente rápidas, la propia molecularidad de las reacciones puede imponer una limitación cinética a causa de las concentraciones de las proteínas.

En este contexto, motivados por la existencia de proteínas de fusión naturales, se generó un sistema proteico artificial de fusión que incorpora las actividades catalíticas de TR, Trx y una Prx 2-Cys atípica (Tpx), empleando para ello las enzimas TR, Trx y Tpx de *Escherichia coli*. Esto permitió obtener una proteína de tres módulos (TTT) con actividad global NADPH peroxidasa capaz de canalizar las reacciones de la vía.

En esta tesina de grado se propuso como objetivo central la caracterización cinética del sistema de fusión triple, empleando para ello diferentes técnicas espectroscópicas como absorbancia UV-vis y emisión de fluorescencia intrínseca. Los resultados experimentales preliminares obtenidos dan cuenta de que TTT presenta actividad global NADPH peroxidasa con una  $k_{cat}$  bastante pequeña de 0.2-0.3 s<sup>-1</sup>, satura a baja concentración de los sustratos NADPH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y muestra una actividad significativa NADPH oxidasa residual. La adición de dadores o aceptores de electrones alternativos (TR, Trx, Tpx o insulina) no

incrementa la velocidad de reacción global, lo que implica que el sistema presenta baja fuga de electrones.

Finalmente se emplearon técnicas espectrofotométricas de cinética rápida (stopped flow) para estudiar la oxidación/reducción de TTT, evidenciándose una cinética compleja como era de esperar por el número de reacciones intramoleculares necesarias para llevar los electrones desde el NADPH al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Palabras clave:** tiorredoxina reductasa, tiorredoxina, tiol peroxidasa, *Escherichia coli*, enzimología

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Sistemas peroxidasa dependiente de tioles .....	2
1.1.2 El sistema tiorredoxina-peroxirredoxina.....	3
1.2 Tiorredoxina reductasa .....	4
1.2.1 Aspectos generales.....	4
1.2.2 Tiorredoxina reductasa de <i>Escherichia coli</i> .....	5
1.2.2.1 Estructura .....	7
1.2.2.2 Cinética en condiciones de estado estacionario .....	10
1.2.2.3 Cinética en condiciones de estado preestacionario.....	11
1.3 Tiorredoxina .....	16
1.3.1 Aspectos generales.....	16
1.3.2 Tiorredoxina de <i>Escherichia coli</i> .....	19
1.3.2.1 Estructura .....	20
1.3.2.2 Cinética en condiciones de estado estacionario .....	22
1.3.2.3 Mecanismo catalítico .....	23
1.4 Peroxirredoxina .....	25
1.4.1 Aspectos generales.....	25
1.4.2 Tiol peroxidasa de <i>Escherichia coli</i> .....	26
1.4.2.1 Estructura .....	27
1.4.2.2 Ciclo catalítico .....	28
1.5 Antecedentes de proteínas de fusión naturales .....	29
2. OBJETIVOS .....	32
2.1 Objetivo general.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3. METODOLOGÍA.....	34
3.1 Materiales .....	35
3.2 Soluciones .....	35
3.3 Diseño, expresión y purificación de TTT.....	36
3.4 Determinación de la concentración proteica mediante absorción ultravioleta .....	37
3.5 Caracterización espectroscópica.....	38
3.6 Cinética en condiciones de estado estacionario .....	39
3.6.1 Actividad global NADPH peroxidasa.....	39
3.6.2 Evaluación de la fuga de electrones.....	39

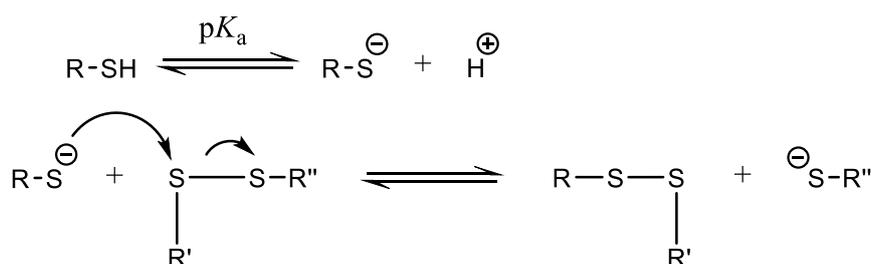
3.6.3	Determinación de los parámetros cinéticos .....	39
3.7	Cinética de reducción/oxidación en condiciones de estado preestacionario.....	39
3.7.1	Reacción de oxidación de TTT por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	40
3.7.2	Reacción de reducción subestequiométrica de TTT por NADPH .....	41
3.7.3	Reacción de reducción de TTT por NADPH en exceso .....	41
3.7.4	Reacción de reducción de TTT por Trx-(SH) <sub>2</sub> .....	41
3.7.5	Reacción de reducción de TTT por DTT .....	42
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
4.1	Caracterización biofísica-estructural.....	45
4.2	Propiedades espectroscópicas .....	47
4.3	Cinética en condiciones de estado estacionario .....	52
4.3.1	Actividad global NADPH peroxidasa.....	52
4.3.2	Evaluación de la fuga de electrones.....	53
4.3.3	Determinación de los parámetros cinéticos .....	56
4.4	Cinética de oxidación/reducción en condiciones de estado preestacionario.....	58
4.4.1	Reacción de oxidación de TTT <sub>red</sub> por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	58
4.4.2	Reacción de reducción subestequiométrica de TTT por NADPH .....	61
4.4.3	Reacción de reducción de TTT por NADPH en exceso .....	63
4.4.4	Reacción de reducción de TTT por Trx reducida .....	65
4.4.5	Reacción de reducción de TTT por DTT .....	68
5.	CONCLUSIÓN .....	70
5.1	Conclusiones y consideraciones finales .....	71
6.	REFERENCIAS.....	73
7.	AGRADECIMIENTOS.....	82

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Sistemas peroxidasas dependiente de tioles

Todos los organismos poseen un sistema de flujo de electrones mediado por tioles que cumplen diversas funciones en el metabolismo y en respuesta a estrés oxidativo. Los grupos tiol, por su capacidad de ionizarse en forma de anión tiolato, actúan como grupos reactivos de varias coenzimas y en la forma del aminoácido cisteína participan en los centros activos de numerosas enzimas. Las propiedades fisicoquímicas de dos cisteínas ubicadas en el entorno optimizado de plegamiento tipo tiorredoxina permiten la transferencia electrónica mediante el intercambio tiol/disulfuro<sup>1</sup>.

La reacción de oxidorreducción conocida como intercambio tiol/disulfuro procede por el ataque nucleofílico de un grupo sulfhidrilo ionizado en forma de anión tiolato sobre un enlace disulfuro, desplazando un átomo de azufre y formando un nuevo enlace con otro átomo de azufre<sup>2</sup>.



**Figura 1.** Reacción de intercambio tiol/disulfuro.

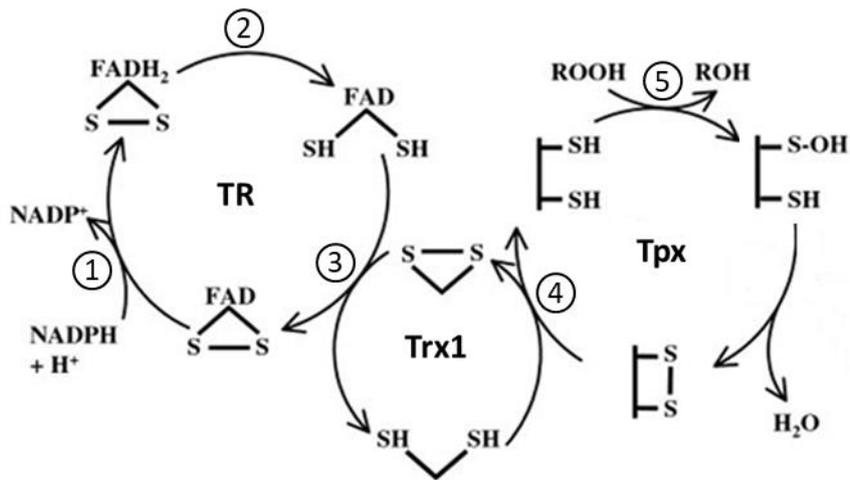
Los principales reductores en los sistemas biológicos son el NADH y el NADPH, los electrones provenientes de estas moléculas son captados por una familia de enzimas denominada piridín nucleótido disulfuro oxidorreductasa a través de su sitio activo disulfuro desde donde se transfieren mediante reacciones de intercambio tiol/disulfuro a aceptores específicos que pueden ser tioles de bajo peso molecular como glutatión disulfuro (GSSG) o proteicos como tiorredoxinas (Trx), las cuales a su vez reducen un número mayor de sustratos. Uno de estos sustratos son enzimas peroxidasas dependientes de tioles que catalizan la reducción de diversos peróxidos (peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos orgánicos y ácido peroxinitroso) y difieren en el reductor fisiológico que puede ser GSH, Trx, NADPH, o citocromo c<sup>1</sup>.

De esta forma, los organismos pertenecientes a todos los reinos biológicos utilizan cascadas de reacciones redox basadas en las cisteínas para mantener

las concentraciones intracelulares de estas especies oxidantes bajo control, actuando globalmente como un sistema peroxidasa que actúa como defensa antioxidante o como vía de señalización redox<sup>3</sup>.

### 1.1.2 El sistema tiorredoxina-peroxirredoxina

Está compuesto en la mayoría de los organismos por tres enzimas que funcionan en una secuencia de reacciones que emplean NADPH para reducir peróxidos. El sistema está compuesto, en el extremo reductor por una tiorredoxina reductasa (TR), una flavoenzima dependiente de NADPH. El extremo oxidante está compuesto por una de varias peroxidasa dependiente de tioles, capaz de reducir oxidantes con el grupo funcional ROOH. Como vínculo entre ambos extremos está la Trx, que posee funciones múltiples, acepta electrones de la TR y los cede a la Prx haciendo que la vía completa se comporte como una NADPH peroxidasa (figura 2).



**Figura 2.** Ciclo catalítico del sistema tiorredoxina-peroxirredoxina. Adaptado de Baker y Poole<sup>4</sup>.

## 1.2 Tiorredoxina reductasa

### 1.2.1 Aspectos generales

La TR es una flavoproteína homodimérica perteneciente a la familia piridín nucleótido disulfuro oxidoreductasa<sup>5</sup> que también incluye a las enzimas glutatión reductasa (GR), tripanotión reductasa (TryR), alquil hidroperóxido reductasa F (AhpF), lipoamida deshidrogenasa (LipDH) y mercurio (II) reductasa<sup>6</sup>. Cada monómero contiene un grupo flavín adenín dinucleótido (FAD) como grupo prostético y un centro activo disulfuro compuesto por dos cisteínas N-terminales<sup>7-9</sup>. Su principal actividad catalítica es la reducción de la Trx<sup>7,10</sup>.

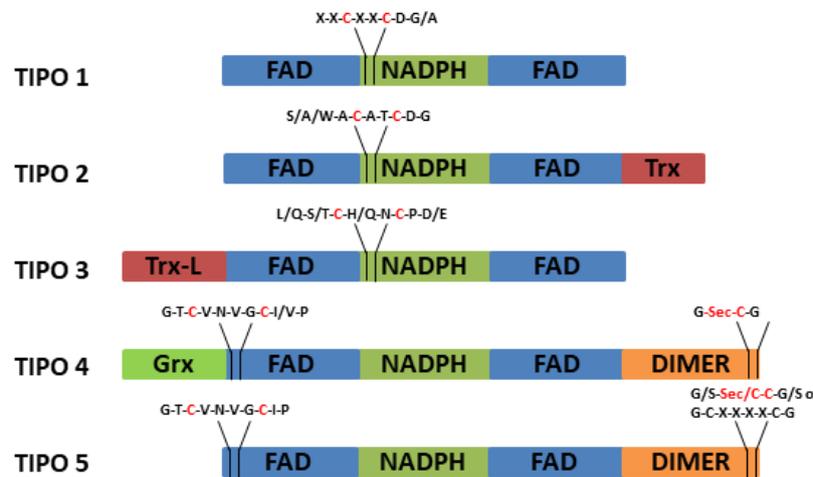
Existen dos clases de TR: con subunidades de alto peso molecular de 55-65 kDa (HMW TRs, por sus siglas en inglés) y de bajo peso molecular de 35 kDa (LMW TRs)<sup>11</sup>. Las primeras están presentes en eucariotas superiores<sup>12</sup>, mientras que las segundas en arqueas, bacterias, hongos y plantas<sup>11</sup>.

Las HMW TRs son enzimas complejas más relacionadas a las GRs que a las LMW TRs<sup>13</sup>. Al igual que la mayoría de las enzimas pertenecientes a la familia, contienen un sitio activo con el motivo CXXXXC N-terminal, con la secuencia CVNVGC<sup>14</sup>. Además, contienen un centro redox C-terminal adicional con un residuo de selenocisteína (Sec, U), un análogo de cisteína que contiene selenio en lugar de azufre<sup>15</sup>. El residuo de Sec se encuentra en la secuencia GCUG y se ha demostrado que es esencial para la actividad enzimática. Los electrones se transfieren del NADPH al FAD, del FAD al centro redox N-terminal y finalmente al centro redox C-terminal de la otra subunidad el cual contiene el residuo Sec. El motivo C-terminal es el responsable de reducir el disulfuro del sustrato<sup>14</sup>.

Las LMW TRs difieren estructuralmente de las HMW TRs. Presentan un sitio activo redox con el motivo N-terminal CXXC en lugar del motivo CXXXXC detallado anteriormente y carecen del sitio activo C-terminal adicional que contiene el residuo de Sec. Poseen dominios de unión a FAD y NADPH pero carecen de dominio interfaz<sup>11</sup>.

A pesar de que las propiedades de las TRs son diversas, los estudios estructurales y de alineamiento de secuencia indican que presentan alto grado de conservación en el sitio catalítico. Con base en esto, Netto *et al.*<sup>16</sup> sugieren una clasificación de las TRs en cinco categorías (figura 3) de acuerdo a la

organización estructural alrededor del sitio catalítico. Tal como se aprecia en la figura existen TRs con extensiones N o C-terminales con actividad catalítica Trx o Grx.

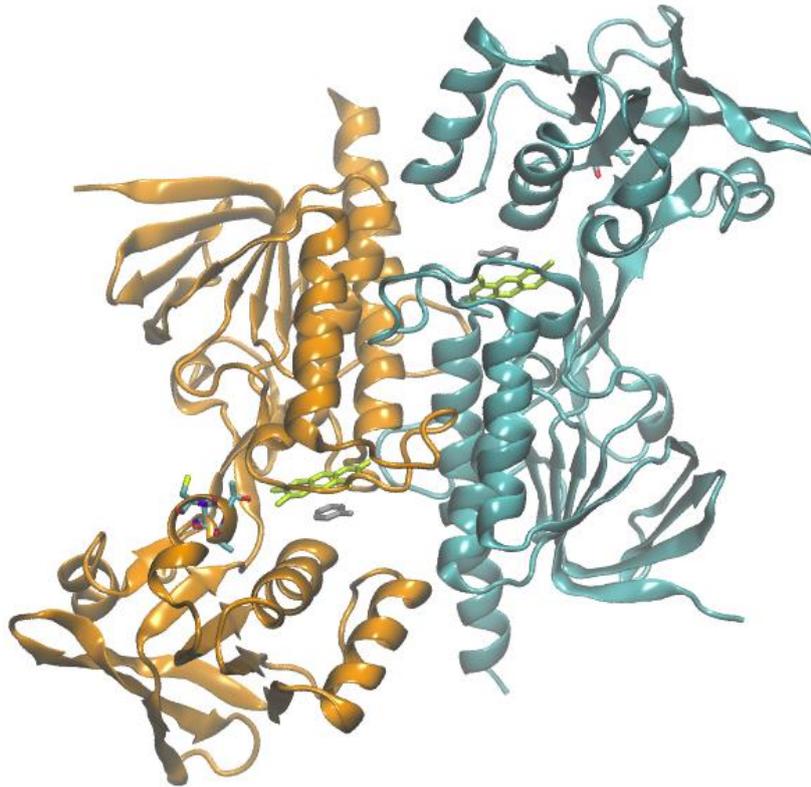


**Figura 3.** Clasificación de las TRs en cinco tipos. El diagrama muestra la organización de los elementos y dominios. En los tipos 1, 2 y 3 las cisteínas catalíticas se localizan en el dominio NADPH y en los tipos 4 y 5 se localizan en el dominio FAD. El término DIMER hace referencia al dominio de dimerización. Figura adaptada de Netto *et al.*<sup>16</sup>

En particular, la TR de mamíferos tiene otros blancos además de la Trx que incluyen el ácido lipoico, hidroperóxidos lipídicos, vitamina K3, ácido dehidroascórbico y la proteína supresora de tumores p53<sup>17</sup>. La relevancia biológica de la reducción de estos sustratos no se ha dilucidado. Esta amplia especificidad de sustratos se explica en parte por la alta accesibilidad del centro redox C-terminal<sup>17</sup>.

### 1.2.2 Tiorredoxina reductasa de *Escherichia coli*

La TR de *Escherichia coli* (EcTR, EC 1.6.4.5) es una proteína homodimérica, cuyos monómeros tienen un peso molecular de 35.5 kDa. Como se observa en la figura 4, contiene un grupo prostético FAD y un centro activo disulfuro por monómero<sup>7-9</sup>.



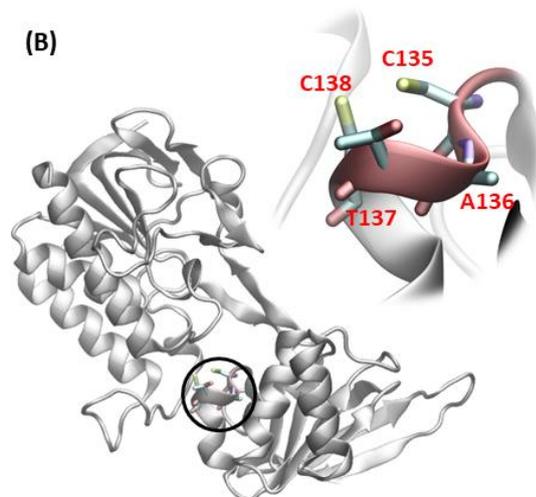
**Figura 4.** Estructura cristalográfica del homodímero de la enzima *EcTR* (PDB ID 1F6M). Los monómeros se representan en anaranjado y cian. El anillo de isoaloxazina del FAD se representa en verde. El anillo de nicotinamida del análogo de NADP<sup>+</sup> fosfato de 3-aminopiridina dinucleótido de adenina (AADP<sup>+</sup>) se representa en gris. El sitio activo se colorea según el elemento químico.

En la figura 5 siguiente se resalta el motivo consenso CXXC del sitio activo, con secuencia CATC.

(A)

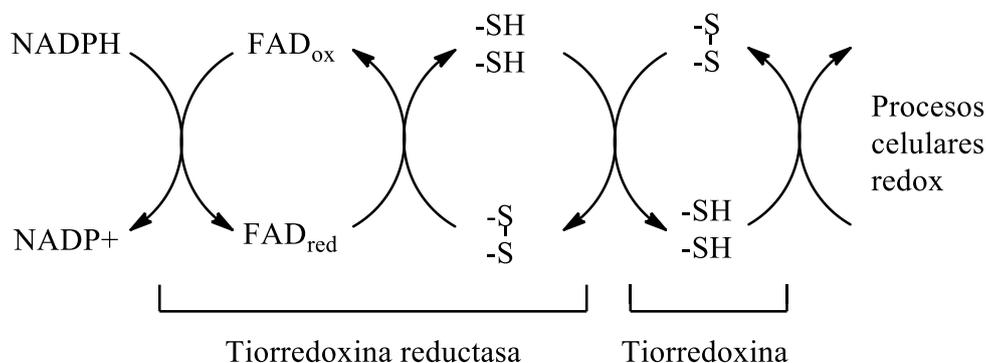
1	11	21
GTTKHSKLLI	LGSGPAGYTA	AVYAARANLQ
PVLITGMEKG	GQLTTTTEVE	NWPGDPNDLT
GPLLERMHE	HATKFETEII	FDHINKVDLQ
NRPFRLNGDN	GEYTCDALII	ATGASARYLG
LPSEEAFFKGR	GVSACATCDG	FFYRNQKVAV
IGGGNTAVEE	ALYLSNIASE	VHLIHRRDGF
RAEKILIKRL	MDKVENGNI	LHTNRTLEEVE
TGDQMGVTGV	RLRDTQNSDN	IESLDVAGLF
VAIGHSPNTA	IFEGQLELEN	GYIKVQSGIH
GNATQTSIPG	VFAAGDVMDH	IYRQAITSAG
TGCMAALDAE	RYLDGL	

(B)



**Figura 5. (A)** Secuencia de aminoácidos de la *EcTR*. Se resalta en rojo la secuencia conservada del sitio activo. **(B)** Estructura del monómero de la *EcTR* (PDB ID 1CLO) y su sitio activo. La secuencia CATC del motivo conservado se representa en rojo y el resto de la proteína en plateado.

Como se detalló en la sección 1.2.1 la enzima cataliza la reducción de la proteína Trx por NADPH<sup>7,10</sup>. Durante la catálisis los electrones se transfieren del NADPH a la flavina, de ésta al disulfuro del sitio activo y del ditiol recién formado al disulfuro del sitio activo de la Trx<sup>18</sup> (figura 6).



**Figura 6.** Secuencia de reacciones catalizadas por las enzimas *EcTR* y *EcTrx1*<sup>18</sup>.

La *EcTR* puede aceptar en total 4 electrones. La titulación potenciométrica resulta en un cambio gradual de la absorbancia de la flavina (cuyo coeficiente de extinción molar a 456 nm es de 11.3 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) sin la aparición de un intermediario espectral correspondiente a la *EcTR* reducida por 2 electrones. Esto se debe a que los potenciales de reducción de los pares redox disulfuro/ditiol y FAD/FADH<sub>2</sub> se encuentran separados tan solo por 11 mV a pH 7.6. En consecuencia, durante la titulación la enzima atraviesa por cuatro microformas que difieren en el estado redox: serían la enzima oxidada (E<sub>ox</sub>), las enzimas reducidas por 2 electrones (E(FAD)(SH)<sub>2</sub> y E(FADH<sub>2</sub>)(S<sub>2</sub>) y la enzima reducida por 4 electrones (E(FADH<sub>2</sub>)(SH)<sub>2</sub>)<sup>19</sup>.

### 1.2.2.1 Estructura

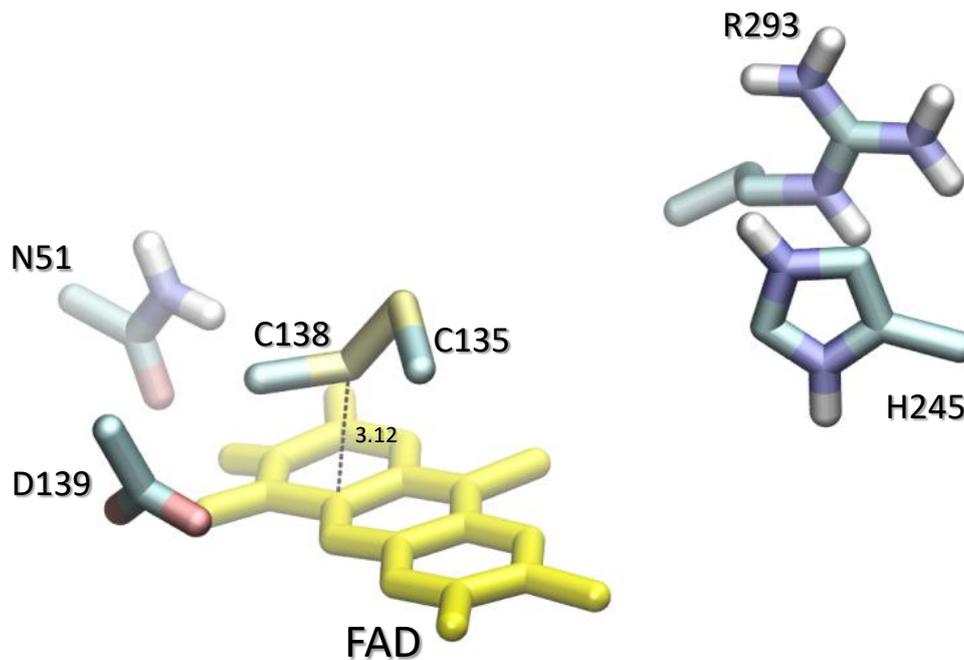
En la estructura resuelta por Kuriyan y colaboradores<sup>20,21</sup> cada cadena del dímero se pliega en dos dominios  $\alpha/\beta$  con topología relacionada con otros miembros de la familia, uno de unión a FAD y el otro de unión a NADPH por monómero. Del extremo amino al carboxilo terminal se encuentra la primera parte del dominio de unión a FAD (FAD-1), seguido del dominio de unión a NADPH y finalmente la última parte del dominio de unión a FAD (FAD-2), conectados por dos hojas  $\beta$  antiparalelas<sup>19</sup>. El centro activo formado por los residuos C135 y C138 se encuentra en el dominio de unión a NADPH en vez de en el dominio de unión a FAD como se observa en enzimas pertenecientes a la

familia piridín nucleótido disulfuro oxidorreductasa. Como consecuencia, el centro activo redox se encuentra adyacente al lado *re* de la flavina y por lo tanto, interpuesto entre los anillos de isoaloxazina y nicotinamida<sup>21</sup>.

En la estructura resuelta el dominio NADPH se encuentra rotado 66° con respecto al dominio FAD, a diferencia de lo que ocurre en los otros miembros de la familia GR y LipDH donde los dominios FAD y NADPH se encuentran superpuestos. Como consecuencia, el anillo de piridina del NADPH unido no se encuentra adyacente al anillo de isoaloxazina<sup>20</sup>.

La interfaz del dímero se forma por la interacción de tres hélices  $\alpha$  y dos bucles de cada monómero. Los dos bucles de un monómero se envuelven alrededor del otro monómero. El resto de la interfaz involucra la interacción de un dominio FAD de un monómero con el dominio NADPH del otro. Esto se encuentra en contraste con otros miembros de la familia donde un dominio separado forma una gran parte de la interfaz del dímero resultando en la formación de crestas que median la unión del sustrato. Solo depresiones superficiales se forman en la *EcTR* que carece de dominio interfaz<sup>19</sup>.

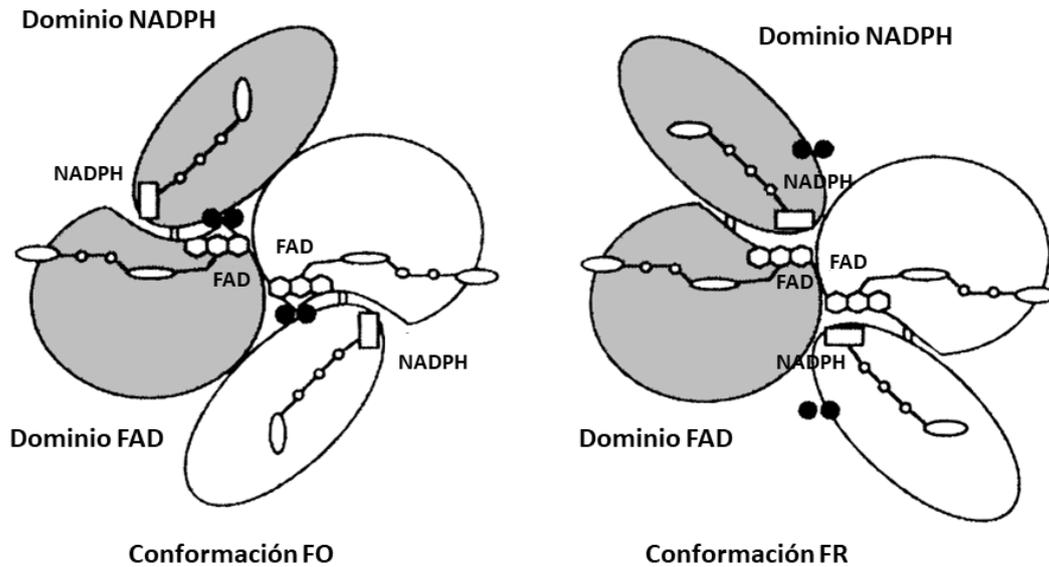
El azufre de la C138 del centro activo se localiza a una distancia de solo 3.12 Å del carbono C(4a) del anillo de isoaloxazina (figura 7), distancia que posibilita la reducción del disulfuro por la flavina. Sin embargo, el disulfuro del sitio activo se encuentra enterrado en el interior de la proteína y el anillo de nicotinamida del NADPH distante del FAD y en una posición inadecuada para la transferencia de hidruro. Debido a esto, en la estructura cristalográfica no existe una vía clara de transferencia de los equivalentes de reducción desde el nucleótido de piridina al centro activo disulfuro del sustrato<sup>21,22</sup>.



**Figura 7.** Sitio activo de la *EcTR*. El anillo de isoaloxazina del FAD se representa en amarillo. El sitio activo se colorea según el elemento químico (PDB ID 1TDE).

Por tanto, se ha propuesto una conformación alternativa donde el dominio de unión a NADPH se encuentra en una posición favorable para la transferencia de hidruro. Esta conformación se denota como conformación FR, debido a que permite la reducción de la flavina por el nucleótido de piridina. La conformación observada en el cristal se denota como FO, ya que permite la oxidación de la flavina<sup>21,22</sup>.

La catálisis requiere la alternancia entre las conformaciones FO y FR, lo que se traduce a un gran cambio conformacional que permite el acercamiento del nucleótido de piridina al anillo de isoaloxazina. El cambio conformacional consiste en la rotación de 66° del dominio NADPH respecto al dominio FAD, resultando en la yuxtaposición de los dominios, tal como se encuentran en la enzima GR (figura 8). Así se posibilita una eficiente transferencia de hidruro y a su vez el centro activo se mueve al exterior de la proteína permitiendo el intercambio tiol/disulfuro con la Trx. Se ha hipotetizado que ambas conformaciones se encuentran en un equilibrio dinámico, sin embargo, la cristalización favorece la conformación FO<sup>21,22</sup>.



**Figura 8.** Conformaciones FO y FR propuestas para la *EcTR* dimérica. En la izquierda se representa la conformación FO observada en las estructuras cristalográficas. En la derecha se representa la conformación FR. Para construir el modelo de la conformación FR el dominio NADPH se rota  $66^\circ$  con respecto al dominio FAD. Se encuentran representados el anillo de nicotinamida del NADPH y el anillo de isoaloxazina del FAD. Las dos cisteínas del sitio activo se representan en círculos negros. Figura adaptada de Lennon *et al*<sup>22</sup>.

### 1.2.2.2 Cinética en condiciones de estado estacionario

Los estudios cinéticos en condiciones de estado estacionario han sugerido mecanismo de orden de unión obligatorio sin formación del complejo ternario o Ping-Pong debido a que presenta gráficos de Lineweaver-Burk paralelos. Existe controversia en la literatura respecto a este punto, Williams y Lennon sugieren un mecanismo con formación de complejo ternario, como se detallará en la sección 1.2.2.3<sup>23,24</sup>.

Los parámetros cinéticos en condiciones de estado estacionario que se resumen en la tabla 1 se han determinado suponiendo un mecanismo de tipo Ping-Pong<sup>25-27</sup>.

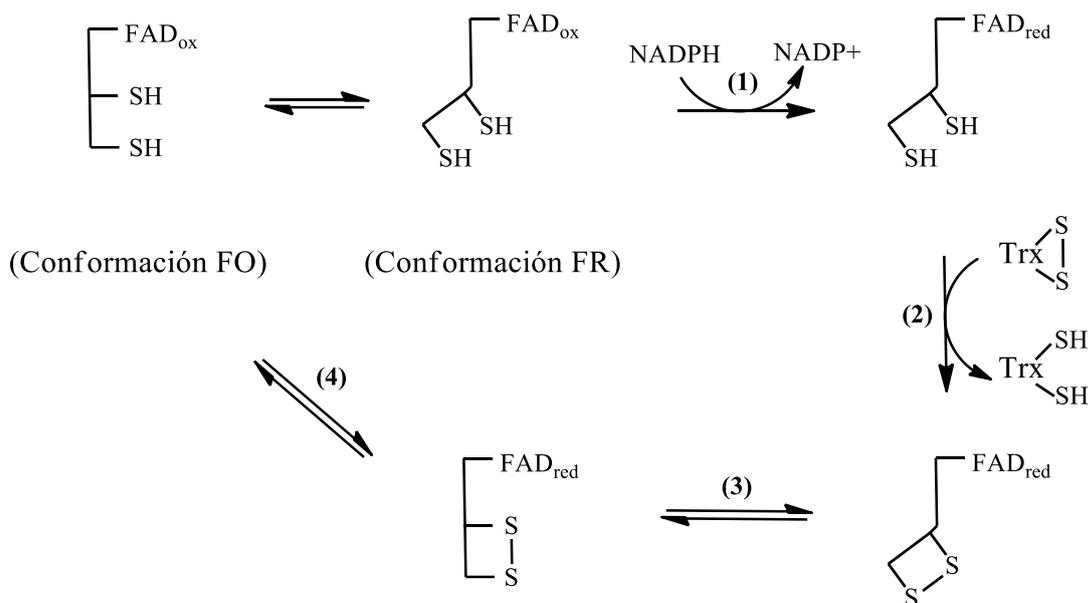
**Tabla 1.** Parámetros cinéticos en condiciones de estado estacionario de la EcTR a 25 °C y pH 7.6<sup>28</sup>.

Parámetro cinético	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ (μM)		$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	
		NADPH	Trx1	NADPH	Trx1
<b>Williams (1976)</b>	33	1.2	2.8	$2.8 \times 10^7$	$1.2 \times 10^7$
<b>Prongay et al. (1989)</b>	22	1.3	2.9	$1.7 \times 10^7$	$7.5 \times 10^6$
<b>Lennon y Williams (1997)</b>	33	2.7	3.7	$1.2 \times 10^7$	$8.9 \times 10^6$

Como se muestra en la tabla 1, la enzima es altamente específica para sus dos sustratos con valores de  $K_M$  de 1-3 μM y 3-4 μM para NADPH y Trx, respectivamente. Además se ha evidenciado que el NADP<sup>+</sup> es un inhibidor competitivo de la enzima con un  $K_i$  de 15 μM<sup>25</sup>.

### 1.2.2.3 Cinética en condiciones de estado preestacionario

En la figura 9 se representa el ciclo catalítico, que comienza con la enzima reducida por dos electrones en la forma E(FAD)(SH)<sub>2</sub>. Como se explicó anteriormente, se plantea que existe en un equilibrio dinámico entre las conformaciones FO y FR. El NADPH se une a la conformación FR y reduce a la flavina (paso 1) resultando en la especie reducida por cuatro electrones E(FADH<sub>2</sub>)(SH)<sub>2</sub>. En esta conformación es capaz de reducir a la Trx-(S<sub>2</sub>) (paso 2). A continuación se produce la rotación a la conformación FO (paso 3) y la reducción del disulfuro por la flavina reducida (paso 4) resultando en la especie E(FAD)(SH)<sub>2</sub> y el comienzo de un nuevo ciclo catalítico. Este mecanismo se puede dividir en la semirreacción reductiva, que consiste en la reducción de la enzima por el NADPH y la semirreacción oxidativa que comprende la reoxidación de la flavina reducida y el intercambio tiol/disulfuro con la Trx<sup>22,24</sup>. A continuación se profundizará en estas semirreacciones.



**Figura 9.** Ciclo catalítico de la *EcTR*. El paso 1 corresponde a la semirreacción reductiva y los pasos 2 y 4 a la semirreacción oxidativa. Figura adaptada de Lennon *et al*<sup>22</sup>

La semirreacción reductiva es potencialmente compleja por dos motivos. En primer lugar, como se detalló previamente en la sección 1.2.2, los potenciales de reducción de la flavina y del disulfuro se encuentran muy próximos. Así, la *EcTR* parcialmente reducida es una mezcla de cuatro especies que difieren en el estado redox. En segundo lugar, involucra características estructurales de la enzima<sup>28</sup>.

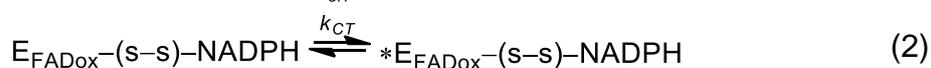
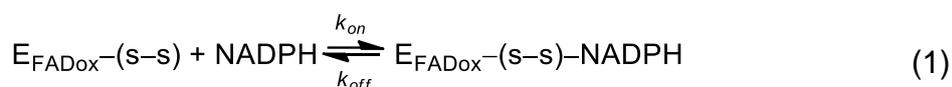
Lennon y Williams<sup>28</sup> realizaron estudios de cinética preestacionaria por espectrofotometría de flujo detenido (stopped flow) y determinaron que la reacción de reducción por NADPH ocurre en tres fases, cuyos parámetros cinéticos y termodinámicos determinados a dos temperaturas (1 y 25 °C) se presentan en la tabla 2.

**Tabla 2.** Parámetros cinéticos y termodinámicos de la semirreacción reductiva.

Fase	$k$	$k_{obs} (s^{-1})$		$K_d (\mu M)$	Dependencia con NADPH
		1 °C	25 °C	1° C	
1	$k_{CT}$	$950 \pm 30$	ND	$25 \pm 4$	Hiperbólica
2	$k_{FR}$	$69 \pm 1$	ND	$3.4 \pm 0.5$	Hiperbólica
3	$k_3$	$9.0 \pm 0.6$	$53 \pm 2$	—	Independiente

El primer paso aparece como una caída de la absorbancia a 456 nm, acompañada de la formación de una banda centrada en 550 nm la cual se

extiende pasados los 700 nm. Estos cambios espectrales son consistentes con la formación de un complejo de transferencia de carga NADPH–FAD (CT, por sus siglas en inglés). Como se aprecia en la tabla 2, (columna 3) la  $k_{obs}$  tiene gran error asociado debido a que este valor se encuentra en el límite de la técnica experimental. Presenta cinética de saturación que indica que la formación de complejo de transferencia de carga NADPH–FAD es un evento separado de primer orden luego de la unión del NADPH. En las ecuaciones 1, 2 y 3 se muestra el mecanismo más probable.



La especie \*E representa el complejo de transferencia de carga que se forma con una constante observada  $k_{CT}$ . El complejo inicial  $E_{FADox}-(s-s)-NADPH$  no se detecta espectralmente, ya sea porque no produce un cambio espectral o porque su formación es extremadamente rápida.

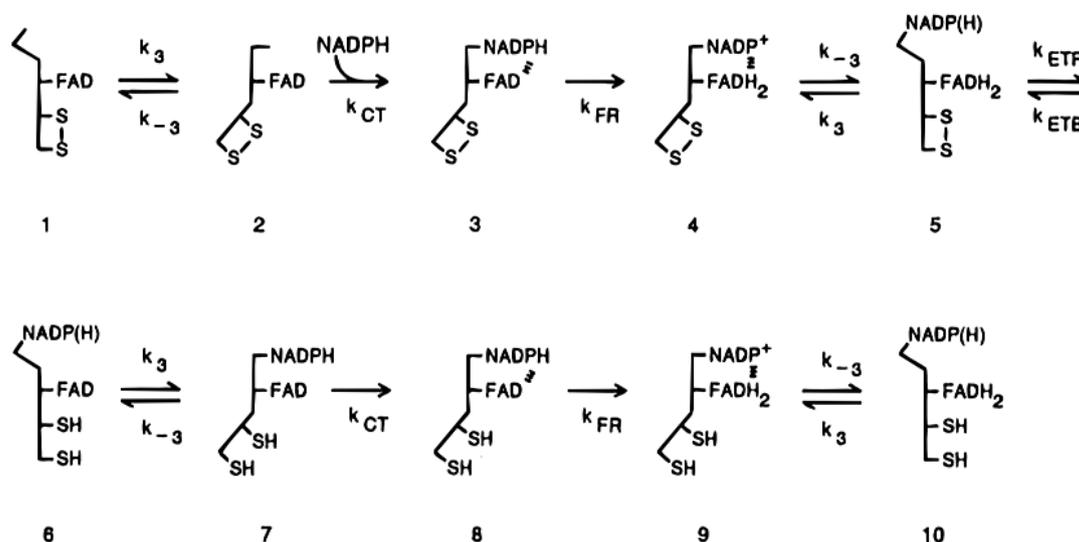
La segunda fase se observa como una caída de absorbancia a 456 nm que comprende el 60% del cambio total de absorbancia que se detecta en esa longitud de onda. Corresponde a la reducción de la flavina (FR, por sus siglas en inglés), con la caída del complejo de transferencia de carga NADPH–FAD. La absorbancia a 690 nm aumenta indicando la formación de un complejo de transferencia de carga flavina-NADP+.

El hecho de que  $k_{FR}$  dependa hiperbólicamente con la concentración de NADPH (tabla 2, columna 6) sugiere que la formación del complejo de transferencia de carga NADPH–FAD es reversible, de modo que solo se sabe que la suma de las constantes cinéticas en la dirección directa y reversa es  $950 \text{ s}^{-1}$  a  $1 \text{ }^\circ\text{C}$ . Como se muestra en la ecuación 3, la enzima se encuentra reducida solo en un 50%, debido a que requiere 4 electrones para estar totalmente reducida.

La tercera fase se detecta por una caída de absorbancia a 456 y 540 nm y un incremento de absorbancia a 690 nm a bajas concentraciones de NADPH ( $\leq 87 \text{ } \mu\text{M}$ ). Si bien este paso podría ser la liberación del NADP+ o a la reducción de la

flavina por un segundo equivalente de NADPH, Lennon y Williams presentan evidencia experimental a favor de que corresponde a la reducción de la flavina limitada en gran medida por el cambio conformacional. La constante de velocidad aparente  $k_3$  es independiente de la concentración de NADPH, de acuerdo con el mecanismo propuesto.

El mecanismo de la semirreacción reductiva postulado por estos autores se resume en la figura 10. El NADPH se une rápidamente a la fracción de enzima que se encuentra en la conformación FR para formar el complejo de transferencia de carga ( $k_{CT}$ , primera fase). Entonces ocurre la reducción de la flavina ( $k_{FR}$ , segunda fase). Mientras tanto, la fracción de la enzima que se encontraba inicialmente en la conformación FO rota a la conformación FR con una constante de velocidad más baja dando lugar a la tercera fase ( $k_3$ ), y a continuación ocurren las fases anteriormente mencionadas: la formación del complejo de transferencia de carga ( $k_{CT}$ ) y la reducción de la flavina ( $k_{FR}$ ). De acuerdo a lo detallado, parecería ser que el cambio conformacional es el paso limitante de la catálisis.



**Figura 10.** Esquema del mecanismo catalítico de la semirreacción reductiva de la *EcTR*<sup>28</sup>. Las conformaciones FO y FR se representan con esqueleto carbonado recto y doblado, respectivamente. Inicialmente la enzima se encuentra oxidada (1-3), luego se reduce por 2 electrones (4-8) y finalmente se reduce por 4 electrones (9 y 10).

Por el contrario, de acuerdo a las constantes cinéticas ningún paso es limitante de la velocidad en la semirreacción reductiva. Dado que el valor de la constante observada de la fase más lenta a 25 °C en la enzima salvaje es de 53 s<sup>-1</sup> (tabla

2) y la constante catalítica a la misma temperatura es de  $33 \text{ s}^{-1}$ , la tercera fase de la semirreacción reductiva no es únicamente el paso limitante.

Con respecto a la semirreacción oxidativa, los mismos autores, Lennon y Williams<sup>23</sup>, determinaron mediante cinética rápida de flujo detenido que la semirreacción oxidativa es trifásica. La primera fase se ha atribuido a la unión de la *EcTrx* a la *EcTR*, donde se produce un cambio en las propiedades espectrales de la flavina. La segunda fase contiene la mayor parte del cambio de absorbancia a 456 nm y se ha atribuido a la oxidación de la flavina con una constante cinética observada de  $36 \text{ s}^{-1}$  a pH 7.6, que es independiente de la concentración de Trx. Respecto a la tercera fase, aún no se ha identificado a qué paso del mecanismo corresponde.

La semirreacción oxidativa puede estar limitada por el intercambio tiol/disulfuro con la Trx o por el cambio conformacional (ver pasos 2 y 3 en la figura 9). Además se ha evidenciado que el comportamiento cinético de la oxidación no se altera si la flavina está presente en formas semiquinona, sin embargo la unión de nucleótidos de piridina altera significativamente disminuyendo la constante de oxidación de la flavina hasta alcanzar el valor límite de  $k_{cat}$  ( $33 \text{ s}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Se ha propuesto que la enzima actúa de acuerdo a un mecanismo de tipo Ping-Pong según la ecuación 4.



Existen dos líneas de evidencia en contra de este mecanismo. En primer lugar, la unión de NADP<sup>+</sup> altera la constante observada asignada a la oxidación de la flavina. Además, se ha detectado espectrofotométricamente la formación de un complejo de transferencia de carga FADH<sub>2</sub>-NADP<sup>+</sup>.

Con base en esto, la ecuación 5 plantea un mecanismo más probable con formación de complejo ternario.



Mediante estudios cristalográficos utilizando un análogo de NADP<sup>+</sup>, el compuesto AADP<sup>+</sup> y las proteínas mutantes *EcTR* C135S y *EcTrx* C35S se logró

obtener estructura cristalográfica del complejo ternario que apoya esta hipótesis<sup>24</sup>.

## 1.3 Tiorredoxina

### 1.3.1 Aspectos generales

La Trx es una enzima tiol-disulfuro oxidorreductasa de 12 kDa que participa en reacciones de intercambio tiol/disulfuro<sup>18</sup>. Al igual que TR, el sitio activo está formado por dos residuos de cisteína en un motivo conservado CXXC, típicamente con secuencia CGPC. Se encuentra ampliamente distribuida en todos los dominios de la vida<sup>11,29,30</sup>.

Fue descubierta en 1964 en *E. coli* como dador de electrones para la enzima ribonucleótido reductasa (RNR)<sup>18</sup>, enzima requerida para la síntesis de ADN<sup>31</sup>. Desde entonces se le han asignado múltiples funciones celulares y fisiológicas (tabla 3)<sup>13</sup>.

Participa en la reparación proteica ya que provee equivalentes de reducción para la metionil sulfóxido reductasa (MSR), enzima encargada de la reducción de sulfóxido de metionina. Además protege a las proteínas citosólicas del agregado y la inactivación oxidativa<sup>18,32</sup> y promueve el plegamiento proteico<sup>33</sup>.

Protege a células y tejidos de diferentes situaciones de estrés oxidativo, por ejemplo frente a especies reactivas de oxígeno, ROS, por sus siglas en inglés, peroxinitrito, arseniato<sup>34,35</sup>, neutrófilos activados, agentes quimioterapéuticos<sup>36</sup>, exposición a luz<sup>37</sup>. Estos efectos se deben en parte a su potencial redox negativo, constituye una de las principales rutas reductivas<sup>18</sup>, manteniendo un ambiente intracelular reductor donde la mayoría de las cisteínas se mantienen en la forma reducida. Como se mencionó anteriormente, participa en la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, debido a que muchas Prxs, las cuales catalizan la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, requieren de la reducción por Trx<sup>38-40</sup>.

En bacterias y levaduras actúa como dador de equivalentes de reducción para la 3'-fosfoadenilsulfato reductasa (PAPS reductasa) que participa en la asimilación de azufre<sup>41,42</sup>. Cumple funciones importantes en el ciclo de vida de virus y fagos (T7, f1, M13)<sup>18</sup>, por ejemplo, forma parte de una subunidad de la

ADN polimerasa de T7 aumentando su procesividad<sup>43</sup> y participa en el ensamblaje de fagos filamentosos<sup>44,45</sup>.

En plantas participa en la regulación de enzimas fotosintéticas de cloroplastos vía ferredoxina<sup>46</sup>. El estado redox del cloroplasto, regulado por Trx, regula la actividad de la ATP sintasa y de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa<sup>47</sup>.

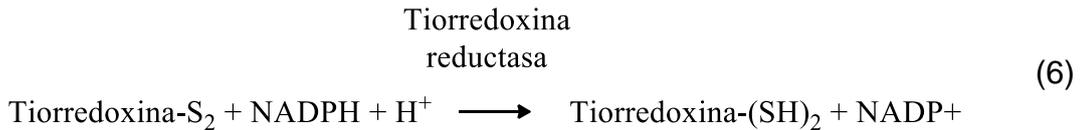
En mamíferos actúa como factor de crecimiento<sup>48</sup> y modula la respuesta inflamatoria, por ejemplo mediante la regulación de la expresión de citoquinas y quimioquinas<sup>49</sup>. Participa en vías de transducción de señales, regulando múltiples moléculas como NF- $\kappa$ B, ASK1, p38 MAPK, AP-1 y p53<sup>17,49</sup>. Previene la apoptosis mediante la unión a ASK-1 cuando la Trx se encuentra reducida<sup>50</sup>. Por otro lado, parece cumplir una función en el embarazo, asistiendo la implantación<sup>51-53</sup> y el nacimiento protegiendo de hiperoxia<sup>54</sup>.

**Tabla 3.** Rol de las tiorredoxinas en diferentes organismos<sup>13</sup>.

Organismo	Función de la Trx
<b>Todos los organismos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síntesis de ADN</li> <li>• Reducción de disulfuros proteicos</li> </ul>
<b>Algunos organismos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de la reducción de las Prxs</li> <li>• Reparación proteica por reducción de la MSR</li> </ul>
<b>Fagos de <i>E. coli</i> (T7, f1, M13)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumenta la procesividad de la DNA polimerasa formando parte de una subunidad</li> </ul>
<b>Bacterias y levaduras</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dador de equivalentes de reducción para la PAPS reductasa</li> </ul>
<b>Plantas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulación de enzimas fotosintéticas en cloroplasto</li> <li>• Regulación redox de factores de transcripción</li> <li>• Regulación de la apoptosis</li> <li>• Inmunomodulación</li> </ul>
<b>Mamíferos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Embarazo (asiste en la implantación y en el establecimiento del embarazo)</li> <li>• Nacimiento (prevención de hiperoxia)</li> <li>• Sistema nervioso central (promueve sobrevivencia neuronal en isquemia/reperfusión)</li> </ul>

Distintos organismos han desarrollado su propio subconjunto especializado de Trxs, las cuales se localizan en distintos compartimientos celulares. Algunas son abundantes en el citosol, mientras que otras se translocan al núcleo o a la mitocondria, asociadas a membrana o secretadas al espacio extracelular.

Las dos cisteínas del motivo CGPC son los residuos clave utilizados por las Trxs para reducir enlaces disulfuro de sustratos oxidados. Tras completar un ciclo catalítico, sus residuos de cisteína se oxidan formando un enlace disulfuro. La TR los convierte nuevamente al estado reducido a expensas del NADPH como se muestra en la ecuación 6. Por lo tanto, la Trx existe tanto en la forma reducida (Trx-(SH)<sub>2</sub>) como en la forma oxidada (Trx-S<sub>2</sub>)<sup>18</sup>. Las enzimas TR y Trx constituyen el sistema tiorredoxina.



### 1.3.2 Tiorredoxina de *Escherichia coli*

En el citoplasma de *E. coli* se encuentran presentes las enzimas Trx1 y Trx2 codificadas por los genes *trxA* y *trxC*, respectivamente<sup>30</sup>. Trx1 presenta gran poder reductor con un potencial redox estándar negativo estimado en -270 mV<sup>55</sup>. Como ya se mencionó, además de reducir la RNR, cataliza la reducción de otras proteínas como MSR, PAPS reductasa y DsbD, una proteína de la membrana interna que transfiere electrones al periplasma. Asimismo provee equivalentes de reducción para las Prxs<sup>56</sup>.

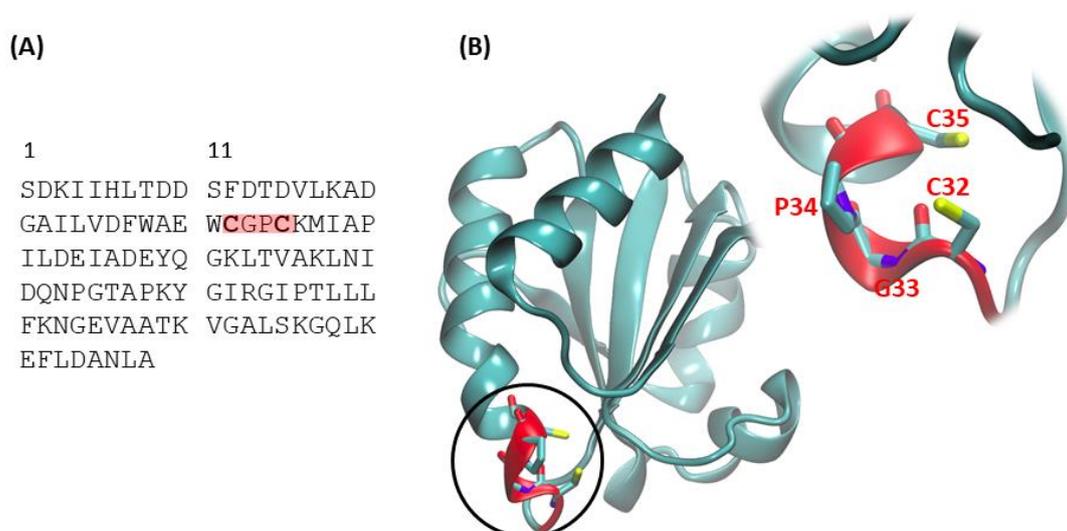
En 1974, Chamberlin *et al.*<sup>57</sup> aislaron una cepa mutante que carecía completamente de Trx1, lo que dio indicios de la presencia de otras proteínas citoplasmáticas capaces de mantener el balance redox de la célula en su ausencia. La búsqueda de un dador de equivalentes de reducción alternativo condujo al descubrimiento de varias Grxs y de Trx2<sup>58</sup>.

Trx2 difiere en varios aspectos estructurales y funcionales. En primer lugar, su expresión está regulada por el factor de transcripción OxyR, el cual controla la respuesta a peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Mientras que en condiciones normales Trx2 es cinco veces menos abundante que Trx1, aumenta alrededor de veinte veces cuando la célula se expone a estrés oxidativo. En estas condiciones, Trx2 se vuelve la enzima más abundante. El control de la expresión por OxyR sugiere que cumple una función específica en la respuesta a exposición a especies oxidantes<sup>59</sup>.

Comparte solo 28% de identidad de secuencia con Trx1 y presenta un dominio N-terminal adicional de 32 aminoácidos el cual contiene dos motivos CXXC. Estos cuatro residuos de cisteína se encuentran coordinados a Zn<sup>2+</sup> con afinidad extremadamente alta ( $K_c > 10^{18} \text{ M}^{-1}$ ). La exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conduce a la oxidación de las cisteínas y a la liberación del Zn<sup>2+</sup>, lo que induce un cambio conformacional en la enzima<sup>59</sup>. También puede reducir a las enzimas RNR, PAPS reductasa y DsbD, sin embargo presenta un potencial redox estándar menos negativo que Trx1 con un valor de -221 mV<sup>60</sup>.

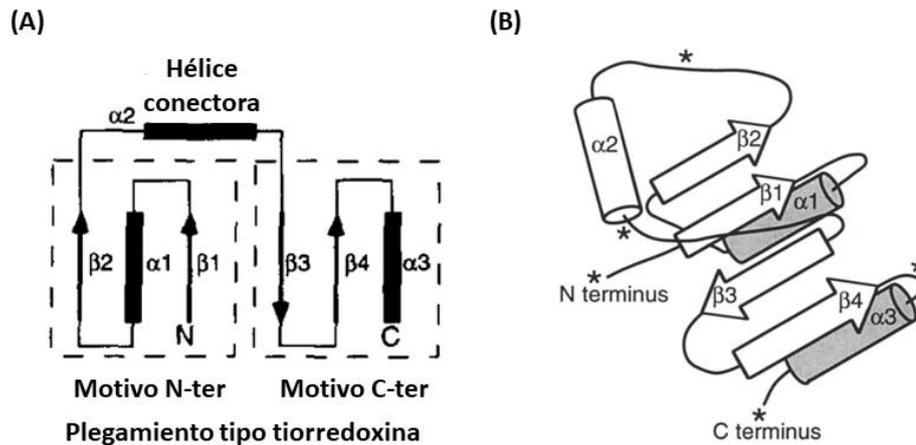
### 1.3.2.1 Estructura

La estructura primaria de Trx1 se determinó en 1968, consiste en una única cadena polipeptídica de 108 aminoácidos<sup>10</sup>. Trx1 se cristalizó por primera vez en 1970<sup>61</sup> y la estructura tridimensional fue resuelta en 1975<sup>62</sup> por Holmgren *et al.* El sitio activo está compuesto por las cisteínas C32 y C35 en el motivo conservado CGPC (figura 11). En el extremo N-terminal de C32 se encuentra el residuo conservado W31, el cual está expuesto en un extremo de la superficie hidrofóbica y se cree que es crucial para la función.



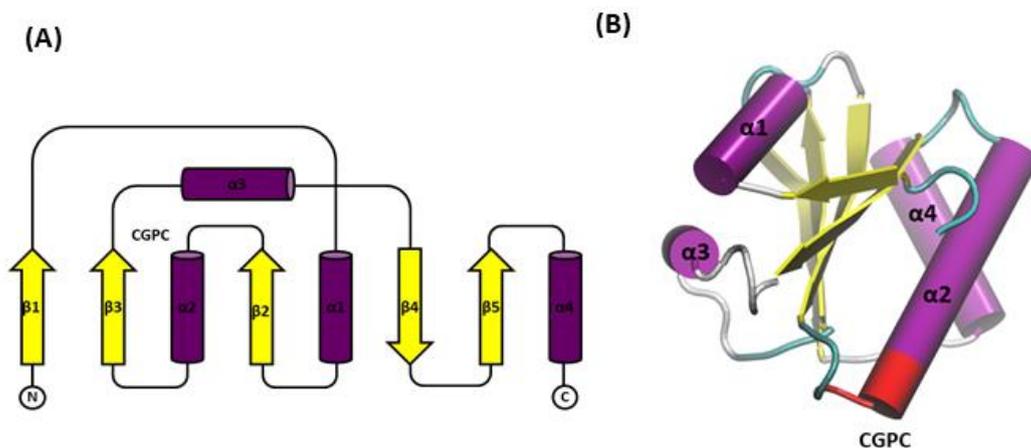
**Figura 11. (A)** Secuencia de aminoácidos de Trx1 de *E. coli*. Se resalta en rojo la secuencia consenso del sitio activo. **(B)** Estructura de la *EcTrx1* (PDB ID 1XOB) y su sitio activo. La secuencia CGPC del motivo consenso se representa en rojo y el resto de la proteína en cian. El sitio activo se colorea según el elemento químico.

Una versión mínima del plegamiento de la tiorredoxina (que carece de la hoja  $\beta_1$  y de la hélice  $\alpha_1$ ) se conoce como plegamiento tipo tiorredoxina<sup>63</sup> (figura 12). Este tipo de plegamiento ha sido identificado en otras proteínas como Grx<sup>64</sup>, Prx<sup>56</sup>, glutatión peroxidasas (Gpx)<sup>65</sup>, proteínas disulfuro isomerasas (PDI), disulfuro oxidases tales como DsbA, DsbD, glutatión transferasas (GST), canales intracelulares de cloruro (CLIC), o en la proteína DsbG. Muchas de las proteínas que tienen el plegamiento tipo tiorredoxina contienen el motivo catalítico conservado CXXC<sup>63</sup>.



**Figura 12.** (A) Arquitectura del plegamiento tipo tiorredoxina. Las hojas  $\beta$  se representan en flechas y las hélices  $\alpha$  en rectángulos. Las líneas discontinuas indican la separación entre el motivo N-terminal ( $\beta 1 \alpha 1 \beta 2$ ) y el C-terminal ( $\beta 3 \beta 4 \alpha 3$ ) conectados por la hélice  $\alpha 2$ . (B) Plegamiento tipo tiorredoxina donde se muestra la numeración de las hélices  $\alpha$  y hojas  $\beta$ . Los asteriscos representan los puntos donde se insertan residuos adicionales al pliegue. Adaptado de Martin JL<sup>63</sup>.

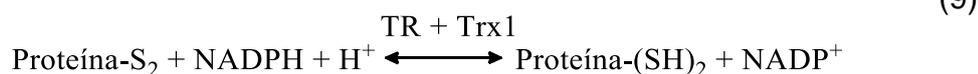
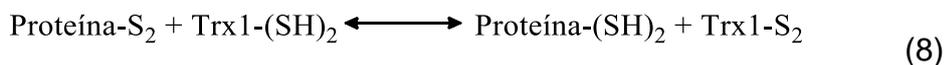
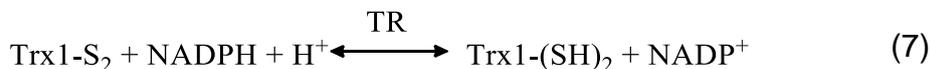
Como se observa en la figura 13, la estructura de Trx1 que presenta este plegamiento, consiste en un núcleo interno de cinco hojas  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 5$ ) rodeadas por cuatro  $\alpha$ -hélices ( $\alpha 1$ - $\alpha 4$ ). El plegamiento se puede dividir en un motivo N-terminal ( $\beta 1 \alpha 1 \beta 2 \alpha 2 \beta 3$ ) y un motivo C-terminal ( $\beta 4 \beta 5 \alpha 4$ ) conectados por la hélice  $\alpha 3$ . Las hojas  $\beta$  del motivo N-terminal son paralelas, mientras que las del motivo C-terminal son antiparalelas. Las hélices  $\alpha 2$  y  $\alpha 4$  se localizan en un lado de las hojas  $\beta$  central mientras que la hélice  $\alpha 3$  se localiza en el lado opuesto. La hélice  $\alpha 3$  se encuentra orientada perpendicular a las hélices  $\alpha 2$  y  $\alpha 4$ . El motivo catalítico se encuentra localizado en la superficie de la proteína en un pequeño segmento del extremo N-terminal de la hélice  $\alpha 2$ <sup>18</sup>.



**Figura 13.** Plegamiento de la Trx de *E. coli*. **(A)** Estructura secundaria de la *EcTrx* que consiste en 4 hélices  $\alpha$  y 5 hojas  $\beta$  centrales. El motivo conservado CGPC se localiza en el extremo N-terminal de la hélice  $\alpha 2$ . **(B)** Estructura tridimensional de la *EcTrx*. Las hojas  $\beta$  se representan en flechas en amarillo y las hélices  $\alpha$  en cilindros en violeta. La localización del motivo conservado CGPC se representa en rojo<sup>30</sup>.

### 1.3.2.2 Cinética en condiciones de estado estacionario

El sistema tiorredoxina cataliza la reducción de disulfuros proteicos, reacción que se muestra en la ecuación 9 por combinación de las reacciones de las ecuaciones 7 y 8.



Como se detalló en la sección 1.2.2.3, la reacción 7 se ha caracterizado cinéticamente (tabla 1), presenta un valor de  $K_M$  en el orden de 3-4  $\mu\text{M}$ , una  $k_{cat}$  de 33  $\text{s}^{-1}$  y una constante de especificidad  $k_{cat}/K_M$  de 9-12  $\times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

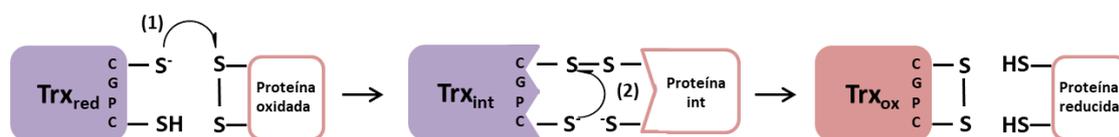
Además de las proteínas anteriormente detalladas, se ha estudiado que Trx1 reduce otras proteínas (insulina<sup>66</sup>, coriogonadotropina humana<sup>67</sup>, fibrinógeno<sup>68</sup> y factores de coagulación sanguínea<sup>69</sup>, particularmente factores VIII<sup>70</sup> y X<sup>71</sup>) y disulfuros de bajo peso molecular (DTT, cistamina, cistina, GSSG<sup>66,72</sup>).

Si bien Trx1 tiene amplia gama de sustratos, la reacción con Tpx se encuentra favorecida cinéticamente, lo cual explica la relevancia fisiológica del sistema

tioredoxina-peroxirredoxina. La caracterización cinética de esta reacción se detallará más adelante en la sección 1.4.2.2.

### 1.3.2.3 Mecanismo catalítico

Se ha propuesto que el mecanismo catalítico es de tipo Ping-Pong y cataliza dos sustituciones nucleofílicas bimoleculares ( $S_N2$ ) (figura 14).



**Figura 14.** Mecanismo de oxidación de las Trxs. Figura adaptada de Collet y Messens<sup>30</sup>.

La reacción comienza con el ataque nucleofílico del tiolato de C32 formando un disulfuro mixto con la proteína blanco y quedando C35 en forma de tiol (figura 14, paso 1). Este primer paso depende del valor de  $pK_a$  de C32 ( $\sim 7$ )<sup>18,73,74</sup>, el cual es significativamente menor al  $pK_a$  de la cisteína libre en solución ( $pK_a$  en el orden de 8.3-8.5)<sup>75,76</sup>. Esto implica que a pH fisiológico una fracción significativa de la especie tiolato se encuentra disponible para reaccionar. Este valor de  $pK_a$  bajo resulta en la estabilización del tiolato por el entorno proteico, probablemente por la interacción con el grupo  $\epsilon$ -amino del residuo K36 y por el grupo tiol de C35 ( $pK_a > 9$ )<sup>18,77</sup>.

Una vez formado el disulfuro mixto, la cisteína C35 debe activarse en forma de tiolato para permitir la disociación del complejo (figura 14, paso 2). Con respecto al mecanismo se han planteado distintas hipótesis<sup>78-84</sup>. De acuerdo a estudios computacionales realizados por Roos *et al.*<sup>84</sup>, la cisteína de C35 ataca el disulfuro mixto en la C32 liberando el sustrato reducido y quedando la enzima oxidada. Se ha propuesto que en la formación del disulfuro mixto se induce un cambio conformacional en el sitio activo que disminuye el  $pK_a$  de la cisteína C-terminal. El tiolato parece estabilizarse mediante enlace de hidrógeno con las amidas del esqueleto carbonado de un residuo de triptofano en el sitio activo y la cisteína N-terminal.

El enlace disulfuro formado luego de la reducción del sustrato no es estructural, sino que funciona como interruptor redox, se encuentra en la superficie y solo es accesible de un lado de la proteína<sup>30</sup>. La Trx es luego reducida por la TR a

expensas de NADPH, permitiendo regenerar la enzima reducida y comenzar un nuevo ciclo catalítico.

Mediante estudios de fluorescencia se evidenció un cambio conformacional localizado cerca del sitio activo luego de la reducción de la enzima donde se incrementa tres veces la emisión de fluorescencia correspondiente al triptofano. En Trx-(S<sub>2</sub>) la fluorescencia los dos residuos W28 y W31 se encuentra atenuada probablemente por el enlace disulfuro. El aumento de la emisión de fluorescencia se ha atribuido a W28, donde la reducción cambia el microambiente del residuo. La fluorescencia de W31 parece estar atenuada en ambas formas de la Trx oxidada y reducida<sup>18,55</sup>.

## 1.4 Peroxirredoxina

### 1.4.1 Aspectos generales

Las Prxs (EC 1.11.1.15) son una familia de enzimas peroxidasa que catalizan la reducción de diversos hidroperóxidos (ROOH): peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos orgánicos y ácido peroxinitroso<sup>56</sup>.

Presentan amplia distribución en todos los reinos biológicos mostrando un alto nivel de expresión, se encuentran entre las diez proteínas mayoritarias en *E. coli*, la segunda o tercera en eritrocitos y representa el 0.1-0.8% de las proteínas solubles en células de mamífero. Su localización es principalmente citosólica, sin embargo se han identificado en mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas, núcleo o asociada a membranas<sup>56</sup>.

Son rápidos catalizadores de reducción de peróxido con constantes de velocidad en el orden de  $\sim 10^5$ - $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ <sup>85</sup>, reduciendo más del 90% de los peróxidos presentes en la célula debido a su eficiencia sumado a su alto nivel de expresión. Además de su rol en la defensa antioxidante, muchas Prxs han sido identificadas como participantes clave en la regulación de vías de señalización redox<sup>85</sup>.

El ciclo catalítico involucra dos residuos de cisteína, denominadas cisteína peroxidática ( $C_P$ ), presente en todas las Prxs y cisteína resolutive ( $C_R$ ), que puede estar ausente. El sitio activo está altamente conservado, desde el punto de vista de la secuencia como estructural. El residuo  $C_P$ , el cual ataca al sustrato peróxido, se encuentra localizado en el extremo N-terminal de la hélice  $\alpha_2$  y se encuentra en el fondo del bolsillo del sitio activo rodeado por otros tres residuos conservados en las Prxs: prolina (P), treonina/serina (T/S) y arginina (R). Los residuos de cisteína, prolina y treonina o serina forman parte del motivo conservado PXXXT/SXXC, mientras que el residuo de arginina se encuentra alejado en la estructura primaria pero cercano espacialmente<sup>86</sup>.

De acuerdo al número de cisteínas conservadas involucradas en la catálisis se clasifican en Prxs 1-Cys y Prxs 2-Cys típicas o atípicas dependiendo la ubicación de la  $C_R$ . Las Prxs 1-Cys presentan una única cisteína conservada en el ciclo catalítico, mientras que las 2-Cys presentan dos cisteínas en diferente monómero (2 Cys típica) o en el mismo (2-Cys atípica).

Además de la clasificación de acuerdo a las características del ciclo catalítico, las Prxs también se pueden clasificar en seis subfamilias en base a la similitud de secuencia aminoacídica: AhpC-Prx1, BCP-PrxQ, Prx6, Prx5, Tpx y AhpE<sup>89</sup>. Todas estas subfamilias pueden encontrarse en bacterias, siendo Tpx y AhpE exclusivas de dicho reino<sup>90</sup>.

El ciclo catalítico de las Prxs 2-Cys involucra tres pasos: (1) oxidación, (2) resolución y (3) reducción. El segundo paso involucra una transición conformacional *fully folded* (FF) → *locally unfolded* (LU) que acerca a las cisteínas C<sub>P</sub> y C<sub>R</sub><sup>87,88</sup>. El primer paso del ciclo es común a todas las Prxs, mientras que los siguientes pasos difieren de un tipo a otro de Prxs.

Como se mencionó en la sección 1.3.2.1, el plegamiento compartido por estas enzimas es de tipo tiorredoxina, común en enzimas que catalizan la reducción e isomerización de enlaces disulfuro<sup>91</sup>.

Presentan diversos estados de oligomerización: monómero, dímero o decámero que varía entre las subfamilias de Prx y que también depende de múltiples factores como el pH, fuerza iónica, concentración de Ca<sup>2+</sup> o Mg<sup>2+</sup> y el estado redox de la cisteína C<sub>P</sub><sup>56</sup>. Los dímeros se pueden clasificar según las interacciones establecidas entre los diferentes monómeros que los forman y la orientación de la hoja β central, pudiendo ser paralela (tipo B) o perpendicular (tipo A)<sup>92</sup>.

#### 1.4.2 Tiol peroxidasa de *Escherichia coli*

La subfamilia Tpx de *E. coli*<sup>89</sup> presenta un ciclo catalítico común a las Prx 2-Cys atípicas, encontrada en especies de bacteria Gram-positivas y Gram-negativas<sup>93,94</sup>. Forma parte del sistema de reducción de peróxidos, reduciendo preferentemente hidroperóxidos de alquilo utilizando los equivalentes de reducción provenientes del sistema tiorredoxina,

En respuesta al estrés oxidativo, *E. coli* regula positivamente la expresión de Tpx a través de un elemento promotor sensible a oxígeno el cual se encuentra reprimido por los reguladores transcripcionales ArcA y Fnr bajo condiciones anaeróbicas<sup>4</sup>.

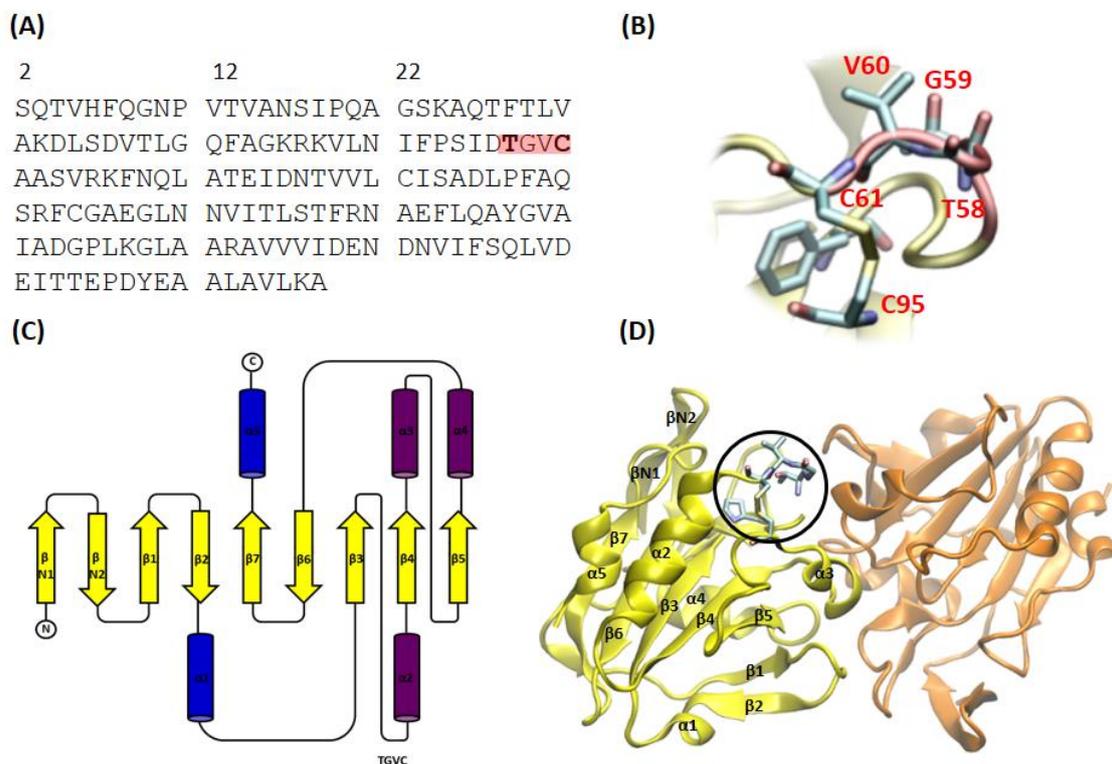
La descripción original de Tpx sugirió una localización periplásmica basada en su liberación por shock osmótico<sup>95,96</sup>. Sin embargo, la falta de secuencia señal

N-terminal de exportación y la formación de un disulfuro mixto con la Trx1 citoplasmática llevó a la propuesta de que es principalmente citoplasmática. Por lo tanto, tres Prxs de bacteria AhpC, BCP y Tpx que tienen actividades similares coexisten en el citoplasma<sup>97</sup>.

### 1.4.2.1 Estructura

Tpx contiene tres residuos de cisteína: C95, C82 y C61. El residuo C61 se alinea con la Cys N-terminal de otras peroxidases de la familia Prx y se ha identificado como la cisteína C<sub>P</sub>. El residuo C95 no se alinea con la Cys C-terminal de otros miembros de la familia, sin embargo su participación en la catálisis indica que es funcionalmente equivalente a la C<sub>R</sub>. La C<sub>P</sub> se encuentra en el extremo N-terminal de la hélice  $\alpha_2$  y la C<sub>R</sub> en el extremo C-terminal de la hélice  $\alpha_3$ <sup>88</sup>. En la figura 15 se muestra la secuencia aminoacídica y la localización del sitio activo en el monómero de la Tpx.

Todas las Tpx caracterizadas hasta el momento son homodiméricas en solución y presentan una interfaz tipo A altamente conservada (figura 15 panel D). El estado de oligomerización no varía de acuerdo al estado redox de la proteína<sup>88</sup>.



**Figura 15.** (A) Secuencia de aminoácidos de *EcTpx*. Se resalta en rojo la secuencia conservada del sitio activo. (B) Sitio activo de *EcTpx*. Se colorea según el elemento químico. (C) Estructura

secundaria de la EcTpx. El motivo conservado TGVC se localiza en el extremo N-terminal de la hélice  $\alpha 2^{88}$ . **(D)** Estructura tridimensional del homodímero de EcTpx en su forma oxidada. Los monómeros se representan en amarillo y naranja. El sitio activo se colorea según el elemento químico. PDB ID: 1QXH.

### 1.4.2.2 Ciclo catalítico

En la figura 16 se muestra el ciclo catalítico con los tres pasos químicos descritos en la sección 1.4.1 común a todas las Prxs 2-Cys caracterizadas hasta el momento.

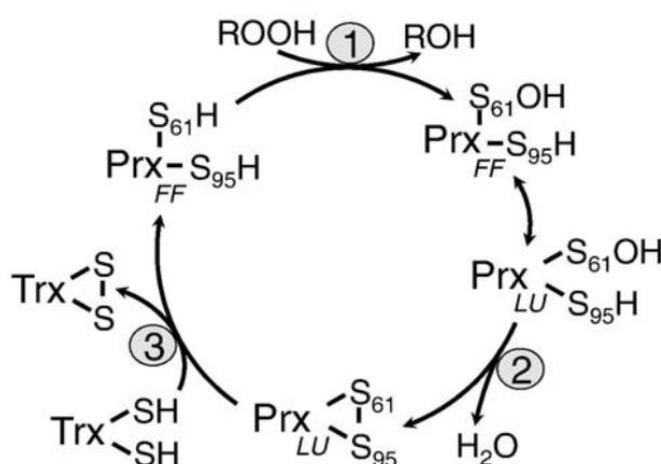
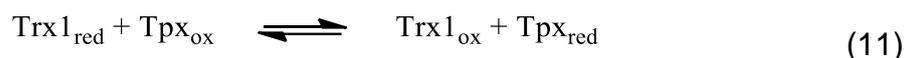
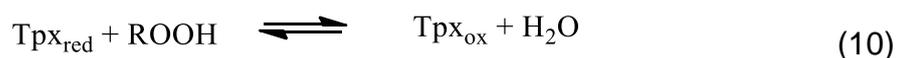


Figura 16. Ciclo catalítico de la Tpx<sup>88</sup>.

Para reducir peróxidos, la C61 ataca el enlace peróxido, con la formación de un intermediario ácido sulfénico (C61-SOH) que luego condensa con la C95 formando un enlace disulfuro. La transición conformacional FF  $\leftrightarrow$  LU de las hélices  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  acerca a ambas cisteínas y permite la formación del enlace disulfuro. Como se detalló anteriormente, el enlace disulfuro formado en el paso resolutivo es intramolecular y se ha identificado a la Trx1 como el reductor de la Tpx oxidada *in vivo*<sup>88</sup>.

En suma, las reacciones consecutivas son las siguientes:



Para la reacción de la ecuación 10 se han determinado los parámetros cinéticos en condiciones de estado estacionario con los peróxidos  $\text{H}_2\text{O}_2$  e hidroperóxido de cumeno (CHP) que se resumen en la tabla 4.

**Tabla 4.** Parámetros cinéticos en condiciones de estado estacionario para Tpx para dos sustratos a pH 7 y 25 °C<sup>4</sup>.

Peróxido	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> (μM)	$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	76 ± 8	1730 ± 360	4.4 x 10 <sup>4</sup>
CHP	70 ± 7	9 ± 2	7.7 x 10 <sup>6</sup>

Como se observa en la tabla 4, Tpx reacciona de manera diferencial con los peróxidos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y CHP, presentando un K<sub>M</sub> bajo para CHP de 9 μM y un K<sub>M</sub> mayor de 1.7 mM para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las constantes de especificidad  $k_{cat}/K_M$  evidencian una especificidad ~200 veces mayor para hidroperóxidos de alquilo frente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>4</sup>. Debido a esta reactividad preferencial, se ha sugerido que Tpx cumple un rol fundamental en la eliminación de hidroperóxidos lipídicos producidos por estrés oxidativo<sup>88</sup>, siendo el reductor más potente en comparación con los otros miembros de la familia AhpC y BCP<sup>4</sup>.

Respecto a la reducción de la Tpx por la Trx1 (ecuación 11) se ha determinado que la reacción presenta un valor de K<sub>M</sub> de 25 ± 3 μM. Además, se ha reportado un valor de  $k_{cat}/K_M$  de 3 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> por Baker y Poole<sup>4</sup> y un valor de  $k$  de 9 x 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> por Noguera *et al*<sup>98</sup> a pH 7 y 25 °C.

## 1.5 Antecedentes de proteínas de fusión naturales

Se han caracterizado proteínas de fusión naturales que incorporan las actividades catalíticas TR y Trx, ejemplos son la enzima NADPH-dependiente tiorredoxina reductasa C (NTRC) presente en algunos organismos fotosintéticos oxigénicos, la proteína MITR-Trx de *Mycobacterium leprae* y la enzima alquil hidroperóxido reductasa F (AhpF) de *Salmonella typhimurium*. Adicionalmente, se han descrito proteínas de fusión en bacterias que incorporan las actividades catalíticas Prx y Grx y la enzima tiorredoxina glutatión reductasa (TGR), caracterizada inicialmente en mamíferos, que incorpora las actividades catalíticas TR, GR y Grx. Todas estas proteínas de fusión contienen elementos conectores flexibles que permiten acercar los módulos catalíticos volviéndolas enzimáticamente activas.

Respecto a NTRC, se ha encontrado en plantas, algas y algunas cianobacterias, posee una TR dependiente de NADPH denominada NTRC que contiene en el

extremo C-terminal un módulo Trx conectado por un linker flexible de aproximadamente 20 aminoácidos. Es capaz de conjugar las actividades TR y Trx para reducir 2-Cys Prx. Su descubrimiento cambió la visión que se tenía de que las Trxs de cloroplasto se reducen exclusivamente por una TR dependiente de ferredoxina (FTR), así NTRC actúa en paralelo con esta vía en la regulación redox en plastidios. Estudios previos afirman que las constantes de velocidad observadas son menores en la enzima NTRC que las reportadas para el sistema TR/Trx de *E. coli*. Parecería ser que el elemento conector posiciona el módulo Trx en una configuración que disminuye la eficiencia catalítica. Además, en estudios estructurales se han demostrado movimientos adicionales en NTRC que se encuentran ausentes en las proteínas por separado y que son influenciados por la presencia del sustrato 2-Cys Prx<sup>99</sup>.

La proteína MITR-Trx de *Mycobacterium leprae* tiene un peso molecular estimado de 49 kDa y presenta la misma configuración que NTRC con un módulo catalítico TR en el extremo N-terminal unido por un elemento conector de 22 aminoácidos a un módulo Trx en el extremo C-terminal. Al igual que NTRC presenta menor actividad enzimática en comparación con el sistema TR/Trx de *E. coli*. Mediante estudios con la proteína truncada, que carece del módulo Trx, se demostró que la baja actividad enzimática no se debe a la presencia de un módulo Trx adicional que afecta los cambios conformacionales involucrados en la catálisis, sino que es una propiedad inherente al módulo TR<sup>100,101</sup>.

Finalmente AhpF de *Salmonella typhimurium* es una proteína homodimérica de 57 kDa por subunidad que cataliza la reducción dependiente de NADH del enlace disulfuro del sitio activo de AhpC, una peroxidasa perteneciente a la familia de las Prxs. La estructura cristalográfica muestra que tiene un dominio C-terminal equivalente a TR de *E. coli* y un dominio N-terminal formado por dos plegamientos tipo Trx continuos conteniendo un único centro activo disulfuro. Estos dos dominios están conectados por un elemento conector flexible de 13 aminoácidos. El dominio N-terminal es homólogo a la proteína oxidorreductasa tipo Trx de *Pyrococcus furiosus* y es responsable de reducir a la AhpC. La enzima se ha caracterizado cinéticamente, presenta un valor de  $k_{cat}$  de  $106 \text{ s}^{-1}$  y un valor de  $K_M$  de  $2.2 \mu\text{M}$  para NADH a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y pH 8<sup>102,103</sup>.

Además se han identificado proteínas de fusión naturales que incorporan las actividades Prx y Grx en especies de bacteria como *Neisseria meningitidis*, *Chromatium gracile* y *Haemophilus influenzae*. Estas enzimas pueden utilizar GSH como dador de electrones para reducir peróxido de hidrógeno o hidroperóxidos orgánicos<sup>104,105</sup>.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1 Objetivo general

En esta tesina de graduación se plantea la caracterización cinética de un sistema proteico artificial de fusión que incorpore las funciones catalíticas tiorredoxina reductasa (TR), tiorredoxina (Trx) y una peroxirredoxina 2-cys atípica (Tpx), empleando para esto TR, Trx y Tpx de *Escherichia coli*. Esto permitiría obtener una enzima de tres módulos con actividad global NADPH peroxidasa capaz de canalizar las reacciones de la vía, volviéndola específica y altamente eficiente.

## 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la cinética enzimática en el sistema triple en comparación con los sistemas silvestres separados correspondientes.
- Evaluar las posibles ventajas cinéticas de las reacciones intramoleculares en el sistema triple respecto a las reacciones bimoleculares en secuencia de los sistemas simples.
- Medir la actividad enzimática global NADPH peroxidasa del sistema triple y determinar los parámetros cinéticos  $k_{cat}$  y  $K_M$  para los sustratos  $H_2O_2$  y NADPH.
- Estudiar las posibles fugas de electrones en cada uno de los módulos catalíticos del sistema triple.
- Determinar las constantes de velocidad bimoleculares con los sustratos  $H_2O_2$ , NADPH,  $Trx_{red}$  y DTT, para eso se emplearán técnicas de cinética rápida (stopped flow).
- Evaluar cuál es el paso redox intramolecular limitante de la velocidad en el sistema triple.

### **3. METODOLOGÍA**

### 3.1 Materiales

Los reactivos NADPH, FAD, ditioneitol (DTT), Tris y NaCl fueron adquiridos de Applichem, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de J. T. Baker Co., tris-2-carboxietil fosfina (TCEP), ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) e insulina de Sigma-Aldrich, el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) de Acros y finalmente el ácido acético corresponde a Dorwil. La columna PD-10 (Sephadex G-25) fue adquirida de GE Healthcare.

Las enzimas Trx, Tpx y TR de *E. coli* se obtuvieron de forma recombinante por el Dr. Bruno Manta y la Dra. Stephanie Portillo de acuerdo a Santos *et al*<sup>106</sup>.

Para la caracterización espectral de TTT y para el estudio cinético en condiciones de estado estacionario se realizaron determinaciones espectrofotométricas de absorbancia utilizando el espectrofotómetro Varian Cary 50 UV-visible o utilizando un lector de placas Varioskan Flash (Thermo Scientific). Las medidas de fluorescencia se realizaron empleando un fluorómetro CHRONOS FD. Para los espectros de dicroísmo circular (CD) se utilizó un espectropolarímetro Chirascan Q100 (Applied Photophysics).

Para el estudio cinético en condiciones de estado preestacionario se trabajó con un equipo de flujo detenido asociado a un detector de absorbancia o fluorescencia (Applied PhotoPhysics SX-20).

### 3.2 Soluciones

El peróxido de hidrógeno se preparó en agua destilada y su concentración se determinó midiendo absorbancia a 240 nm utilizando un  $\epsilon = 39.5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ <sup>107</sup>. El NADPH se preparó en amortiguador Tris/Acético/MES conteniendo Tris 30 mM, MES 15 mM, ácido acético 15 mM, NaCl 120 mM, DTPA 0.1 mM, pH 7.0<sup>108</sup> y su concentración se determinó midiendo absorbancia a 340 nm y utilizando un  $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ <sup>109</sup>. Las proteínas se prepararon en el mismo amortiguador Tris/Acético/MES y la cuantificación proteica se determinó por absorbancia a 280 nm como se detalla en la sección 3.4.

Para la obtención de la tiorredoxina reducida se incubó *EcTrx* preparada en amortiguador Tris/Acético/MES con DTT 5 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el exceso de reductor por gel filtración en columna PD-10

de 5 mL equilibrada previamente con amortiguador. La concentración de tioles se determinó mediante la reacción con 4,4-ditiodipiridina (DTDPy) que genera 4-tiopiridona<sup>110</sup>, que se cuantifica por absorbancia a 324 nm ( $\epsilon = 21400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), obteniéndose una relación  $\text{Trx}_{\text{red}}/\text{Trx}_{\text{total}} \sim 0.9$ .

Los experimentos se realizaron en amortiguador Tris/acético/MES conteniendo Tris 30 mM, MES 15 mM, ácido acético 15 mM, NaCl 120 mM, DTPA 0.1 mM, pH 7.0<sup>108</sup> a 25 °C, salvo que se indique lo contrario.

### 3.3 Diseño, expresión y purificación de TTT

El diseño de la construcción, la expresión y purificación de la proteína de fusión se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Javier Santos en el Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas IQUIFIB (UBA-CONICET) y luego se replicó en Montevideo por la Dra. Stephanie Portillo.

Las tres enzimas TR, Trx y Tpx de *E. coli* se incorporaron en una cadena polipeptídica y se eligieron como elementos conectores de las enzimas segmentos altamente flexibles de poli glicina intercalando el residuo de treonina por motivos estratégicos en cuanto a la inclusión en el ADN de la construcción sitios de restricción correspondientes a enzimas comúnmente utilizadas en el laboratorio y a su vez, para otorgarle un mayor carácter polar:



Se utilizó esta secuencia con la Trx en el extremo N-terminal seguido de las secuencias de TR y Tpx, dado que la Trx es una proteína pequeña que se pliega correctamente en bacteria y su ubicación en el extremo N-terminal favorecería el correcto plegamiento de toda la proteína recombinante.

El plásmido conteniendo la secuencia optimizada de TTT (629 residuos y un gen de 1896 pares de bases) para su expresión en *E. coli* BL21 (DE3) fue obtenido comercialmente de ATUM.

La expresión se realizó en medio LB en presencia de kanamicina  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  a 37 °C. Una vez que las células llegaron a  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de  $\sim 0.9$  se realizó la inducción con IPTG 1 mM durante 4 horas. La purificación se realizó mediante protocolo estándar para la matriz NTA-Ni<sup>2+</sup> (*Thermofisher Handbook Protocols*). El pellet de bacterias de aproximadamente 5 gramos, fue resuspendido en amortiguador

Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, pH 8.0 y lisadas por sonicación. Posteriormente a una centrifugación a 10000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante fue incubado con 2-3 mL de matriz durante 1 hora a 4 °C con agitación constante suave. Seguidamente, se realizó un lavado de la matriz (en columna) con amortiguador de resuspensión (20-30 mL). La elución se realizó escalonadamente (aproximadamente 5 mL cada uno) conteniendo 5, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 mM imidazol, preparado en el mismo amortiguador (Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, pH 8.0). La elución de la proteína de interés (TTT) fue corroborada mediante SDS-PAGE y posterior tinción con Azul Coomassie. Las fracciones conteniendo la proteína de fusión (imidazol 0.5 M y 1 M) fueron juntadas y dializadas contra amortiguador Tris-HCl 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7.0 durante 16 horas. La presencia de FAD inferida por un color amarillo en las fracciones se conservó incluso luego de la diálisis. Posteriormente la proteína se suplementó con FAD y se eliminó el exceso mediante gel filtración en columna PD-10 de 5 mL equilibrada previamente con amortiguador.

### 3.4 Determinación de la concentración proteica mediante absorción ultravioleta

La concentración proteica se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm que corresponde a la contribución de los residuos aromáticos en el rango del UV cercano (250-300 nm). El coeficiente de absortividad molar a 280 nm de las proteínas se estimó con la herramienta computacional ProtParam<sup>111,112</sup> a partir de la composición aminoacídica el cual se basa en el método de Edelhoch<sup>113</sup> (ecuación 12) y utiliza los valores reportados por Pace *et al.*<sup>114</sup> para los coeficientes de extinción molar para los residuos aislados los cuales fueron validados experimentalmente para un grupo importante de proteínas globulares y en su estado nativo<sup>114,115</sup>.

$$\epsilon_{\text{Prot}}^{280\text{nm}} = N_{\text{Tyr}} \cdot \epsilon_{\text{Tyr}}^{280\text{nm}} + N_{\text{Trp}} \cdot \epsilon_{\text{Trp}}^{280\text{nm}} + N_{\text{S-S}} \cdot \epsilon_{\text{S-S}}^{280\text{nm}} \quad (12)$$

En la ecuación 12,  $N_{\text{Tyr}}$ ,  $N_{\text{Trp}}$  y  $N_{\text{S-S}}$  son el número de tirosinas, triptofanos y enlaces disulfuros presentes en la proteína y  $\epsilon_{\text{Tyr}}^{280\text{nm}}$ ,  $\epsilon_{\text{Trp}}^{280\text{nm}}$  y  $\epsilon_{\text{S-S}}^{280\text{nm}}$  son los coeficientes de extinción de los residuos aislados y del puente disulfuro en 1490, 5500 y 125 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, respectivamente.

Se determinó un  $\varepsilon$  teórico de 19035, 14042.5 y 3042.5  $M^{-1} cm^{-1}$  para TR, Trx y Tpx de *E. coli*. En el caso de TR hubo que considerar la contribución correspondiente al FAD, por lo tanto se utilizó un  $\varepsilon$  determinado de forma experimental de 51700  $M^{-1} cm^{-1}$  reportado previamente<sup>24</sup>.

Un estimado del coeficiente de absortividad molar de TTT se determinó mediante la suma de los  $\varepsilon$  obtenidos para las tres proteínas que conforman la proteína de fusión (36120  $M^{-1} cm^{-1}$ ) y el  $\varepsilon$  del FAD de la TR, que se calculó por diferencia entre el  $\varepsilon$  de TR determinado de forma experimental y teórica (ecuación 13).

$$\varepsilon_{FAD_{TR}}^{280nm} = (51700 - 19035) M^{-1}cm^{-1} = 32665 M^{-1}cm^{-1} \quad (13)$$

De esta forma se obtuvo un  $\varepsilon$  aproximado para TTT de 69000  $M^{-1} cm^{-1}$ .

### 3.5 Caracterización espectroscópica

Se realizaron espectros de absorbancia UV-vis de TTT 3  $\mu M$  en estado oxidado o reducido luego del agregado de DTT 2 mM directamente en la cubeta. Es necesario aclarar que la proteína TTT se encuentra en estado oxidado porque se oxida con el oxígeno del aire, a no ser que se especifique que se agrega reductor se asume que la enzima se encuentra en estado oxidado.

Posteriormente se obtuvo un espectro diferencial restando el valor de absorbancia de TTT<sub>ox</sub> al valor de absorbancia de TTT<sub>red</sub> para cada longitud de onda.

Se registraron espectros de emisión de fluorescencia de TTT 1.2  $\mu M$  en la forma oxidada o reducida luego del agregado de DTT 10 mM utilizando una longitud de onda de excitación de 280, 380 o 456 nm.

Los espectros CD fueron adquiridos utilizando una celda de 0.1 cm de paso óptico para el UV lejano (180-250 nm) y 1.0 cm para el UV cercano (240-350 nm) y UV visible (340-700 nm). Para cada muestra se adquirieron y promediaron 5 espectros en cada rango. En todos los casos el blanco amortiguador fue sustraído del espectro promedio. Los experimentos se realizaron en amortiguador fosfato 10 mM pH 7.4. La concentración final de TTT fue 1.6  $\mu M$  para el CD UV lejano, 13.3  $\mu M$  para el CD UV cercano y 74  $\mu M$  para el CD UV-vis. En el caso de los experimentos de CD UV cercano o visible se agregó reductor DTT 4.1 mM o TCEP 1.6 mM directamente en la cubeta.

## 3.6 Cinética en condiciones de estado estacionario

### 3.6.1 Actividad global NADPH peroxidasa

La actividad NADPH peroxidasa fue monitoreada siguiendo absorbancia a 340 nm en función del tiempo. Todas las medidas de actividad se realizaron en concentraciones saturantes de sustratos. Las concentraciones fueron NADPH 200  $\mu\text{M}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$  y se varió la concentración de TTT en el rango de 0-0.2  $\mu\text{M}$ . La dependencia de la velocidad inicial en función de la concentración de TTT fue ajustada por mínimos cuadrado a una función lineal.

### 3.6.2 Evaluación de la fuga de electrones

Para la evaluación de la fuga de electrones se realizó el mismo experimento descrito en la sección 3.6.1 pero esta vez con TTT en concentración 24 nM y suplementando la mezcla reactiva con las enzimas *EcTR*, *EcTrx* o *EcTpx* simples en concentración 0.5 o 1  $\mu\text{M}$ . Posteriormente se evaluó la fuga de electrones para una concentración equivalente de TTT y suplemento.

### 3.6.3 Determinación de los parámetros cinéticos

Para la obtención de los parámetros cinéticos se calculó la velocidad inicial para distintas concentraciones de sustrato de la misma forma que en la sección 3.6.1. Para el sustrato NADPH se utilizó TTT 136 nM,  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$  y NADPH variable en el rango de 0-470  $\mu\text{M}$ . Para el sustrato  $\text{H}_2\text{O}_2$  se utilizó TTT 101 nM, NADPH 113  $\mu\text{M}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  variable en el rango de 0-120  $\mu\text{M}$ . Para el sustrato insulina se utilizó TTT 375 nM, NADPH 117  $\mu\text{M}$  e insulina variable en el rango de 0-120  $\mu\text{M}$ . En el caso de los sustratos NADPH y  $\text{H}_2\text{O}_2$  la función hiperbólica se ajustó a los datos experimentales obteniéndose los parámetros cinéticos  $K_M$  y  $V_{\text{máx}}$ .

## 3.7 Cinética de reducción/oxidación en condiciones de estado preestacionario

Los experimentos se realizaron utilizando un equipo de flujo detenido donde se siguió el cambio de absorbancia o fluorescencia que acompaña el cambio en el estado de oxidación de TTT.

### 3.7.1 Reacción de oxidación de TTT por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La cinética de oxidación de TTT<sub>red</sub> por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se siguió utilizando una técnica de flujo detenido en modo mezclado secuencial siguiendo el cambio de fluorescencia intrínseca. Primero se mezcló la proteína TTT en concentración final 442.5 nM con NADPH en concentración final 2.9 μM, los cuales se colocaron en la primera (A) y segunda jeringa (B) del equipo de flujo detenido. Luego de 5 s de reacción, la TTT reducida por NADPH se mezcla con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cuya concentración final varía en el rango de 15-234 μM, solución que se coloca en la tercera jeringa (C). En la cuarta jeringa (F) se coloca el amortiguador Tris/acético/MES descrito anteriormente. Se siguió la reacción midiendo la fluorescencia en el tiempo, excitando a una longitud de onda de 280 nm y detectando la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda ≥ 320 nm. La función simple exponencial de la ecuación 14 se ajustó a los cursos temporales en los primeros 3 segundos de reacción y la función simple exponencial más recta de la ecuación 15 se ajustó en el intervalo de 15 a 50 segundos de reacción obteniéndose constantes cinéticas observadas.

$$Y = A_1 e^{-k_{obs1}t} + A_\infty \quad (14)$$

$$Y = A_1 e^{-k_{obs2}t} + A_\infty + Ct \quad (15)$$

Donde  $A_1$  es la amplitud de la señal,  $k_{obs1}$ ,  $k_{obs2}$  son las constante de velocidad observadas,  $A_\infty$  es la señal extrapolada a tiempo infinito y C corresponde a la pendiente de la función lineal.

Las constantes cinéticas observadas ( $k_{obs1}$ ,  $k_{obs2}$ ) se graficaron en función de la concentración de peróxido de hidrógeno. La función hipérbola de la ecuación 16 se ajustó al gráfico de  $k_{obs1}$  en función de la concentración de peróxido de hidrógeno.

$$Y = \frac{Ax}{K_{0.5} + x} \quad (16)$$

Del ajuste se obtuvieron dos parámetros cinéticos, la asíntota (A) y la pendiente inicial. La pendiente inicial se calculó de acuerdo a la ecuación 17.

$$\text{Pendiente inicial} = \frac{A}{K_{0.5}} \quad (17)$$

### 3.7.2 Reacción de reducción subestequiométrica de TTT por NADPH

Para el estudio de la reducción subestequiométrica, en primer lugar se realizaron espectros UV-vis en el tiempo, donde se mezcló TTT 4  $\mu\text{M}$  y NADPH 5  $\mu\text{M}$  y se registraron los espectros en el rango de 250 a 500 nm cada 4 ms. En segundo lugar, se siguió la reacción por el cambio de absorbancia a 456 nm, correspondiente a la contribución del FAD, donde se mezcló TTT y NADPH en concentración final 6 y 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente. La función doble exponencial más recta de la ecuación 18 se ajustó a los cursos temporales.

$$Y = A_1 e^{-k_{obs1}t} + A_2 e^{-k_{obs2}t} + A_\infty + Ct \quad (18)$$

### 3.7.3 Reacción de reducción de TTT por NADPH en exceso

Se siguió la reacción midiendo el cambio de la fluorescencia intrínseca de la proteína correspondiente a la contribución de los triptofanos proteicos. Para emplear esta metodología, se tuvo en cuenta que TTT contiene un residuo de triptofano por monómero de TR (W52) y dos residuos (W28 y W31) provenientes del módulo catalítico Trx. El experimento se realizó en condiciones de pseudo-primer orden con concentración final de TTT de 0.4  $\mu\text{M}$  y concentración final de NADPH variable en el rango de 4-31  $\mu\text{M}$ . La longitud de onda de excitación fue de 280 nm y la longitud de onda de emisión  $\geq 320$  nm. La función doble exponencial de la ecuación 19 se ajustó en una primera fase rápida (0-0.1 s) y una segunda fase más lenta (0.1-5 s).

$$Y = A_1 e^{-k_{obs1}t} + A_2 e^{-k_{obs2}t} + A_\infty \quad (19)$$

Del ajuste se obtuvieron dos constantes cinéticas observadas para la fase rápida y dos para la fase lenta. La función hipérbola de la ecuación 16 se ajustó a las constantes cinéticas observadas para la fase lenta, obteniéndose del ajuste los parámetros cinéticos asíntota ( $A$ ) y pendiente inicial ( $A/K_{0.5}$ ).

### 3.7.4 Reacción de reducción de TTT por Trx-(SH)<sub>2</sub>

Con la finalidad de estudiar la cinética de reducción de TTT por Trx-(SH)<sub>2</sub> se realizaron espectros de emisión de fluorescencia ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) de las enzimas Trx reducida 0.36  $\mu\text{M}$ , TTT oxidada 0.95  $\mu\text{M}$  y de la mezcla Trx reducida 0.18  $\mu\text{M}$  y TTT oxidada 0.475  $\mu\text{M}$ .

Posteriormente, se siguió la cinética de reducción de  $\text{TTT}_{\text{ox}}$  por  $\text{Trx}-(\text{SH})_2$  mediante el decaimiento total de la fluorescencia proveniente de los triptófanos proteicos. Para emplear esta metodología se tuvieron en cuenta trabajos reportados previamente donde el pasaje de Trx del estado reducido a estado oxidado se acompaña de una disminución en la emisión de fluorescencia correspondiente a W28<sup>18,55</sup>. La enzima TTT se coloca en una jeringa del equipo de flujo detenido y la Trx previamente reducida como se detalló en la sección 3.2, en la segunda jeringa. Se trabaja en condiciones de pseudo-primer orden con TTT en concentración final de 0.45  $\mu\text{M}$  y  $\text{Trx}-(\text{SH})_2$  variable y al menos 10 veces en exceso en el rango de 4-26  $\mu\text{M}$ .

Los cambios de fluorescencia se observaron con excitación a 280 nm y emisión a una longitud de onda  $\geq 320$  nm. La función doble exponencial más recta de la ecuación 18 se ajustó a los cursos temporales. De los parámetros del ajuste se obtienen las constantes observadas  $k_{\text{obs}1}$  y  $k_{\text{obs}2}$  que posteriormente son graficadas en función de la concentración de Trx. La función lineal se ajustó al gráfico de  $k_{\text{obs}1}$  en función de  $[\text{Trx}]$  y la función hipérbola de la ecuación 16 se ajustó al gráfico de  $k_{\text{obs}2}$  en función de  $[\text{Trx}]$  con la finalidad de obtener las constantes cinéticas de la reacción.

### 3.7.5 Reacción de reducción de TTT por DTT

Se estudió la reacción de reducción con el reductor no específico DTT midiendo el cambio de fluorescencia intrínseca o de absorbancia a 456 nm.

En primer lugar, se siguió el incremento de la intensidad de fluorescencia trabajando en condiciones de pseudo-primer orden con una concentración final de TTT de 12 nM y de DTT variable y al menos 10 veces en exceso en el rango de 1-25 mM. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 280 nm y de emisión  $\geq 320$  nm. La función simple exponencial (ecuación 14) se ajustó a los cursos temporales obteniéndose una constante de velocidad observada que posteriormente se grafica en función de la concentración de DTT obteniéndose la constante de velocidad de segundo orden de la reacción mediante regresión lineal.

En segundo lugar se estudió la reacción midiendo la disminución de absorbancia a 456 nm en condiciones de pseudo-primer orden utilizando una concentración

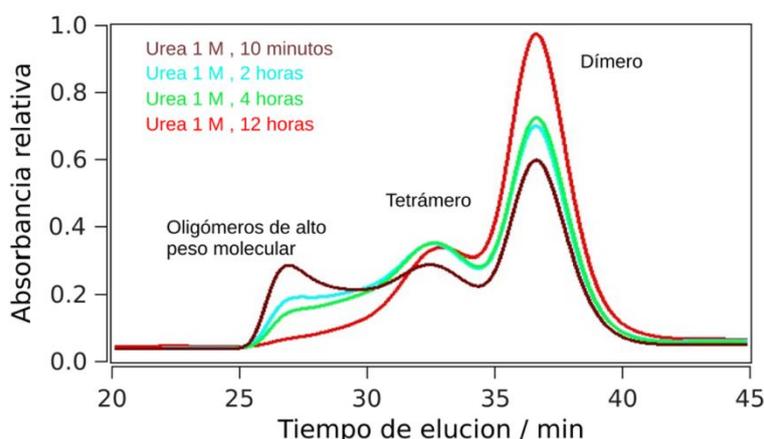
final de TTT de 2  $\mu\text{M}$  y DTT variable en el rango de 0.14-6 mM. La función simple exponencial de la ecuación 15 se ajustó a los cursos temporales.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 4.1 Caracterización biofísica-estructural

La caracterización biofísica-estructural preliminar fue realizada por experimentos de exclusión molecular (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) acoplado a experimentos de dispersión de luz láser estática (*Multi-Angle Laser-Light Scattering*, MALLS) en el laboratorio que dirige el Dr. Javier Santos (IQUIFIB UBA-CONICET) y experimentos de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (*Small Angle X-ray Scattering*, SAXS) en el laboratorio que dirige el Dr. Luis Netto (IB-USP).

Con respecto a los experimentos de exclusión molecular, el perfil de elución indicó que TTT se encuentra principalmente como dímero TTT-TTT, mientras minoritariamente en forma tetramérica  $2x(\text{TTT-TTT})$ . Además, se detectaron agregados de alta masa molecular que pudieron ser desensamblados mediante incubación con urea (figura 17).



**Figura 17.** Perfiles de exclusión molecular de TTT luego de una incubación de 10 minutos (línea marrón), 2 horas (línea celeste), 4 horas (línea verde) o 12 horas (línea roja) a temperatura ambiente.

Mediante experimentos de dispersión de luz pudo evaluarse el radio hidrodinámico ( $R_h$ ) de TTT en forma dimérica y tetramérica en el estado oxidado (tabla 5). Los pesos moleculares se determinaron con el módulo MALLS, mientras que los  $R_h$  se determinaron mediante el uso del módulo *Dynamic Light Scattering* (DLS) que permite analizar las fluctuaciones de la intensidad de luz dispersada y su correlación temporal.

**Tabla 5.** Comportamiento hidrodinámico SEC-FPLC/Dispersión luminosa de TTT.

Estado oligomérico de TTT	Rh (Å)	Peso molecular (kDa)
Dímero	49.42 ± 17.84	133.7 ± 2.5
Tetrámero	71.44 ± 7.24	245.2 ± 5.7

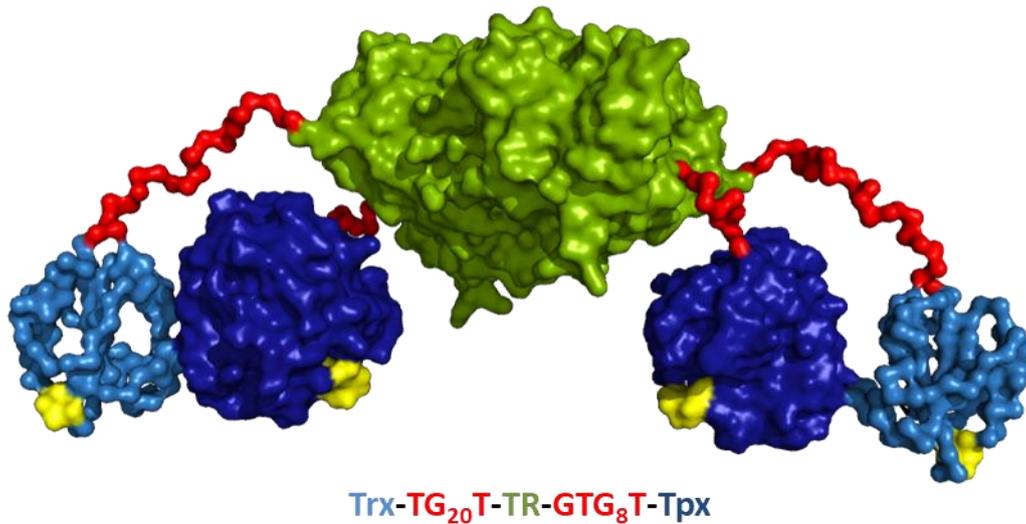
Adicionalmente, en el laboratorio que dirige el Dr. Luis Netto se analizó la proteína de fusión mediante SAXS, en el estado reducido u oxidado. De los ajustes de las curvas experimentales se obtuvo el radio de giro ( $R_g$ ) y un peso molecular acorde al complejo dimérico (136.3 kDa), resultados que se muestran en la tabla 6.

Por otra parte, pudo llevarse adelante en forma preliminar el modelado *ab initio* en base a los resultados SAXS de modo de obtener un modelo de baja resolución de TTT (figura 18). Para esto se usó el programa DAMMIN que en conjunto con los datos del diámetro máximo de partícula, encuentra un conjunto de arreglos estructurales que mejor ajustan al perfil de intensidades de dispersión generados por la muestra.

**Tabla 6.** Resultados de SAXS de radio de giro y peso molecular. El  $R_h$  se dedujo a partir del  $R_g$  en forma preliminar y solo con fines comparativos asumiendo una forma esférica.

Muestra	$R_g$ (Å)	$R_h$ (Å)	Peso molecular (kDa)
TTT oxidado	46.5 ± 0.3	60.0 ± 0.4	146 ± 12
TTT reducido	43.1 ± 0.2	55.6 ± 0.4	125 ± 10

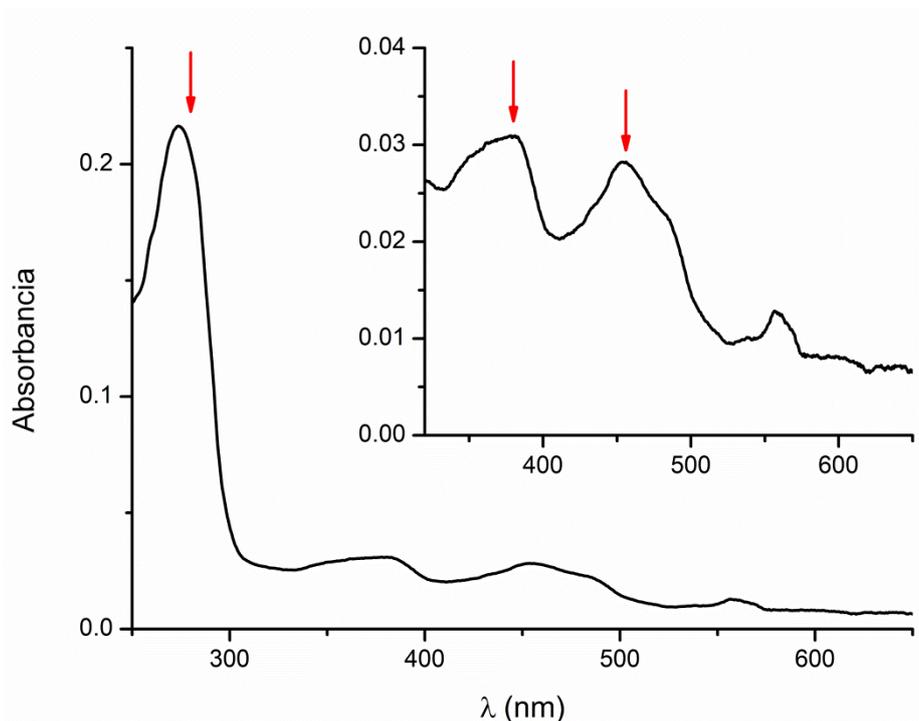
A continuación en la figura 18, se muestra una primera aproximación a la estructura de TTT en forma dimérica basada en los experimentos de SAXS.



**Figura 18.** Modelo de TTT dimérica de baja resolución generado a partir de experimentos de SAXS. La superficie de dimerización está determinada por TR. Trx se representa en celeste, TR en verde, Tpx en azul y los elementos conectores en rojo. Los motivos conservados del sitio activo se representan en amarillo.

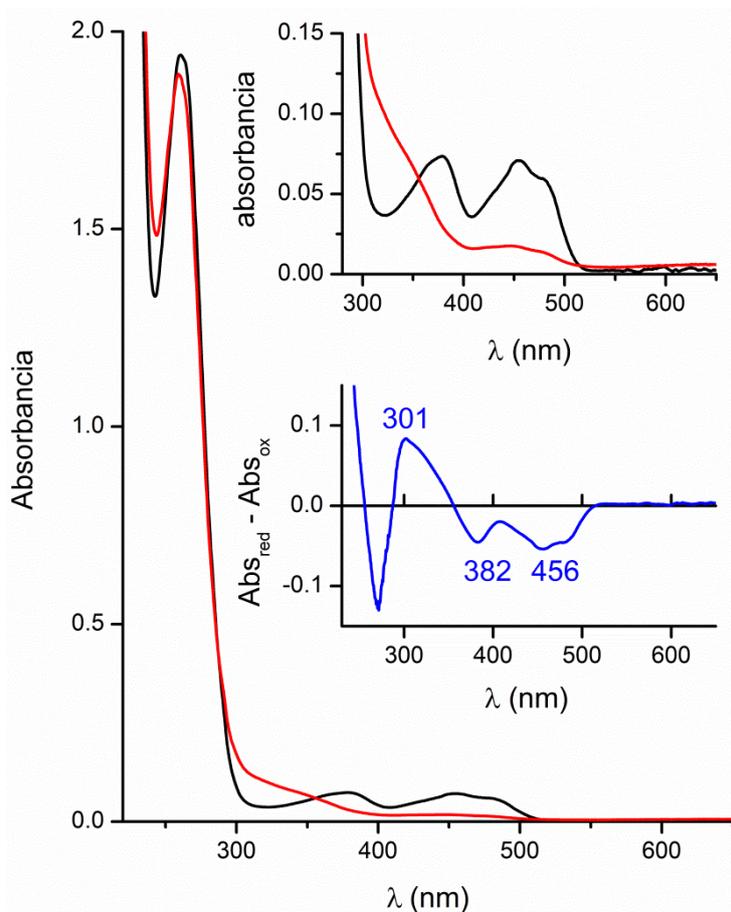
## 4.2 Propiedades espectroscópicas

Una vez que se expresó y purificó la proteína TTT en el laboratorio que dirige el Dr. Javier Santos en Buenos Aires y por la Dra. Stephanie Portillo en Montevideo se procedió a la caracterización espectroscópica de la enzima utilizando tres técnicas, espectros de absorbancia UV-vis, emisión de fluorescencia y CD.



**Figura 19.** Espectro UV-vis de TTT oxidada 3  $\mu\text{M}$ . En el inserto se muestra en detalle la sección del espectro correspondiente al rango de 320-650 nm.

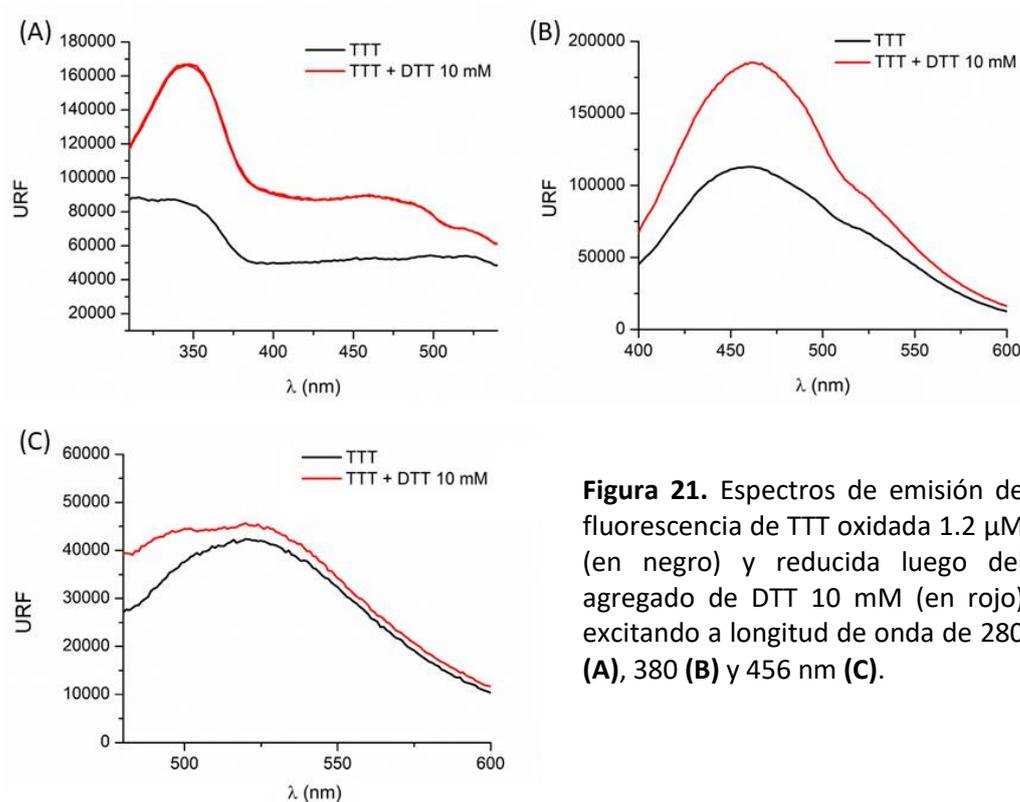
El espectro de absorbancia UV-vis de TTT en forma oxidada de la figura 19 muestra tres máximos a 270, 380 y 456 nm. El máximo a la longitud de onda cercana a 280 nm corresponde a la contribución de los aminoácidos aromáticos triptofano y tirosina<sup>114</sup>, mientras que los dos máximos restantes corresponden a la contribución del grupo prostético FAD. Se ha reportado previamente en la literatura que la absorción UV-vis en la región del anillo de isoaloxazina varía de acuerdo al entorno y el estado redox, presentando dos máximos aproximadamente en 380 y 450 nm en la flavina oxidada que no se encuentran presentes en la flavina reducida por dos electrones<sup>116</sup>.



**Figura 20.** Espectro UV-vis de TTT oxidada 11  $\mu\text{M}$  (línea en negro) y reducida (línea en rojo). En el inserto se muestra en detalle el espectro en el rango de 280-650 nm (arriba) y el espectro diferencial ( $\text{Abs}_{\text{red}} - \text{Abs}_{\text{ox}}$ ) en el rango de 230-600 nm (abajo).

En la figura 20 se muestran los espectros UV-vis de TTT en estado oxidado y reducido luego del agregado de DTT en exceso, donde se aprecia que la absorbancia en la región de la flavina varía con el estado redox de la proteína. El espectro diferencial que se muestra en el inserto presenta tres longitudes de onda donde la diferencia es máxima a 301, 382 y 456 nm. Esta diferencia espectral permite monitorear los cambios redox de la enzima a través de distintas técnicas espectroscópicas como cambio de absorbancia UV-vis, CD UV-vis y emisión de fluorescencia.

Siguiendo con la caracterización de la enzima, se realizaron espectros de emisión de fluorescencia (figura 21) excitando en los máximos de absorbancia identificados previamente.



**Figura 21.** Espectros de emisión de fluorescencia de TTT oxidada 1.2  $\mu\text{M}$  (en negro) y reducida luego del agregado de DTT 10 mM (en rojo) excitando a longitud de onda de 280 **(A)**, 380 **(B)** y 456 nm **(C)**.

El espectro de emisión correspondiente a los aminoácidos aromáticos ( $\lambda_{\text{exc}} = 280$  nm) muestra una diferencia importante entre TTT en la forma oxidada y reducida luego del agregado de DTT en exceso. En la forma reducida se observa un máximo en la región donde emite el triptofano (330-360 nm), que no se encuentra presente en la forma oxidada. Además la enzima reducida presenta mayor intensidad de fluorescencia correspondiente a la contribución del grupo prostético FAD ( $\sim 450$  nm).

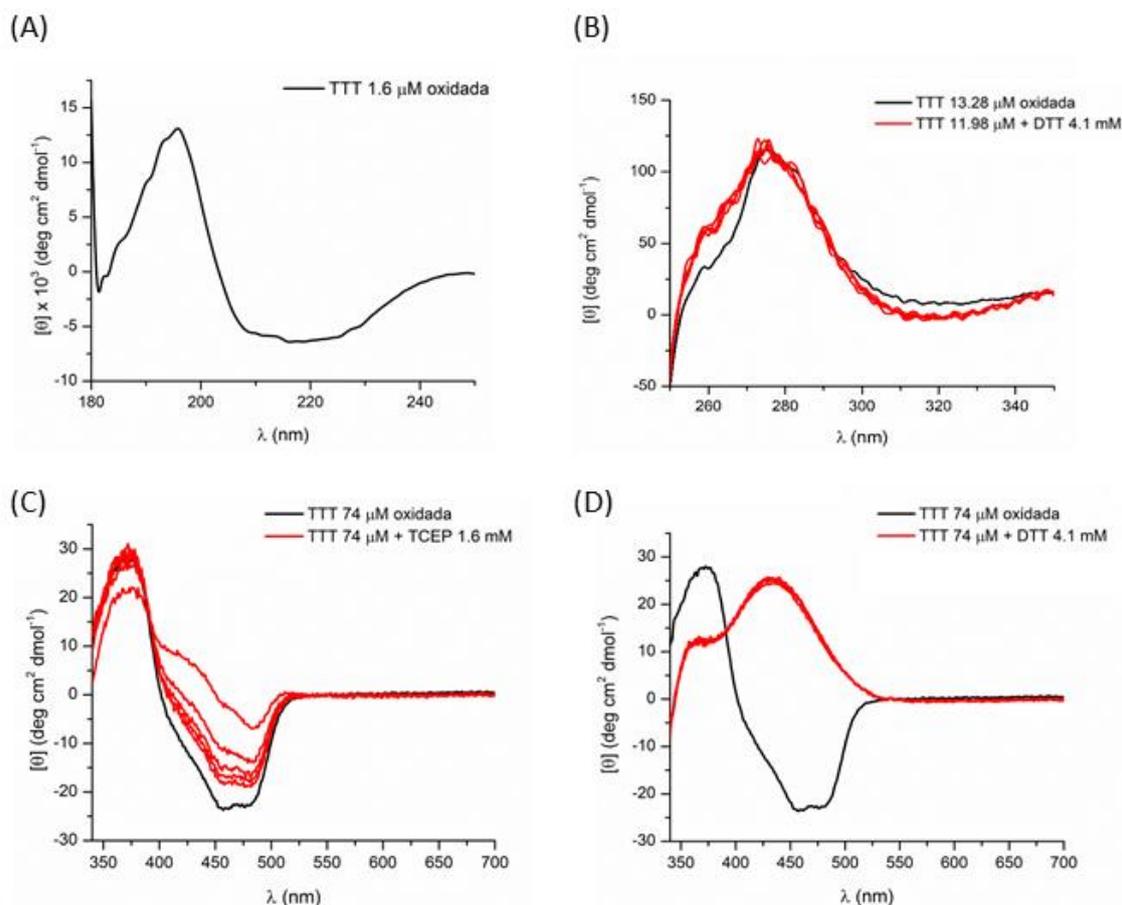
Cuando excitamos el FAD utilizando un  $\lambda_{\text{exc}} = 380$  nm la proteína emite en la región del visible presentando un máximo de emisión en el entorno de 400-550 nm que aumenta la intensidad de fluorescencia cuando la enzima pasa de oxidada a reducida.

Por el contrario, cuando excitamos el FAD con una longitud de onda de 456 nm el espectro no varía con el estado redox de la proteína.

Finalmente se realizaron experimentos utilizando espectroscopía de luz circularmente polarizada, técnica que permite fácilmente constatar alteraciones tanto en el contenido de estructura secundaria analizando el UV-lejano o el plegado terciario de las proteínas, en el UV cercano.

En la figura 22 panel B se observan los espectros CD en el UV cercano de la proteína oxidada o reducida con DTT 4.1 mM. Estos espectros evidencian un pequeño cambio en la región de 250-280 nm donde presenta señal el enlace disulfuro (cercano a 260 nm) y los residuos aromáticos (270-285 nm).

En la figura 22 paneles C y D se evidencia que TTT presenta señal CD visible correspondiente a la contribución del cromóforo FAD. Cuando TTT se encuentra en estado oxidado el espectro presenta señal positiva con un máximo a 377 nm y negativa con dos mínimos a 462 y 476 nm. La forma del espectro cambia cuando la enzima se reduce con TCEP (figura 22 panel C) o DTT (figura 22 panel D), donde la reducción con TCEP es más lenta que con DTT.



**Figura 22. Estado de oxidación y cambios detectados por CD. (A)** Espectro CD lejano de TTT 1.6  $\mu\text{M}$  en estado oxidado. **(B)** Espectro UV cercano de TTT 13.3  $\mu\text{M}$  en estado oxidado (línea en negro) y reducido con DTT 4.1 mM (línea en rojo). **(C)** Espectro UV visible de TTT 74  $\mu\text{M}$  en estado oxidado (línea en negro) y reducido con TCEP 1.6 mM (línea en rojo). **(D)** Espectro de TTT 74  $\mu\text{M}$  en estado oxidado (línea en negro) y reducido con DTT 4.1 mM (línea en rojo).

Estos cambios espectroscópicos detectados cuando cambia el estado de oxidación de la proteína TTT serán utilizados para estudiar la cinética en condiciones de estado preestacionario (sección 4.4), donde la reducción de TTT se acompaña de una disminución en la absorbancia (correspondiente a la contribución del FAD) y un aumento en la intensidad de fluorescencia intrínseca (principalmente correspondiente a la emisión de los triptofanos).

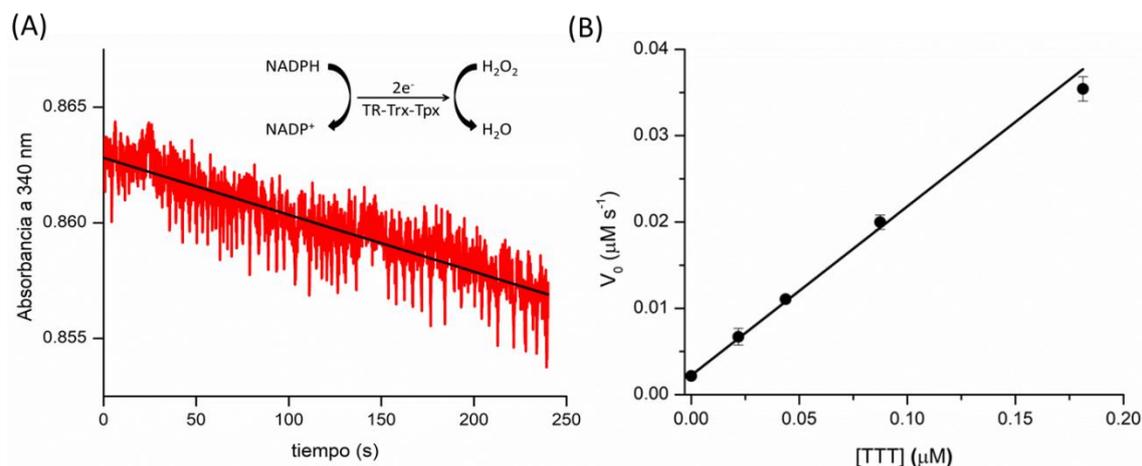
## 4.3 Cinética en condiciones de estado estacionario

### 4.3.1 Actividad global NADPH peroxidasa

Como fue descrito en el apartado de metodología, la actividad global NADPH peroxidasa de TTT se determinó siguiendo la absorbancia a 340 nm donde los puntos correspondientes a los primeros cuatro minutos se ajustaron a una línea recta para obtener un valor de pendiente inicial que es proporcional al valor de

velocidad inicial. Un curso temporal representativo se muestra en la figura 23 panel A.

Luego se realizaron medidas de actividad utilizando concentraciones crecientes de TTT hasta 0.2  $\mu\text{M}$ , gráfico que se muestra en la figura 23 panel B.

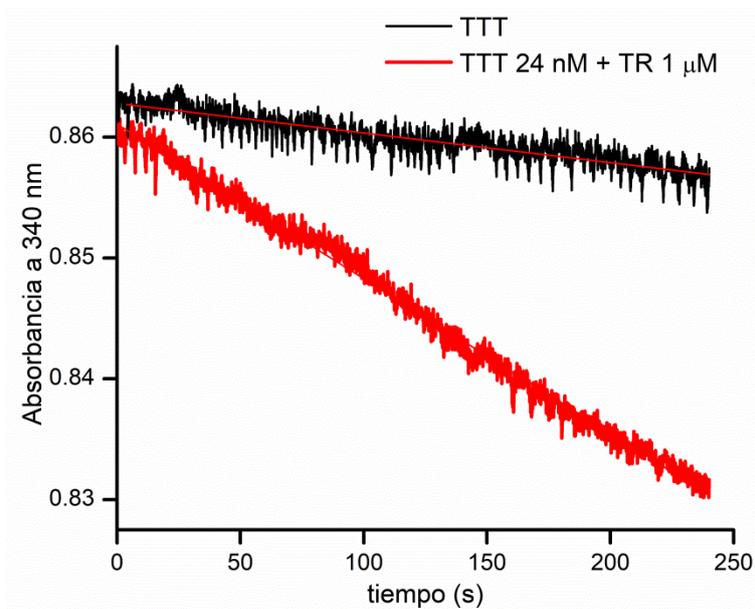


**Figura 23. (A)** Curso temporal representativo de la reacción catalizada por TTT en condiciones de velocidad inicial donde se mezcló TTT 24 nM, NADPH 200  $\mu\text{M}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$  y se siguió el cambio de absorbancia a 340 nm durante 4 minutos. El experimento se realizó a concentraciones saturantes de sustratos **(B)** Velocidad inicial ( $\mu\text{M s}^{-1}$ ) en función de la concentración de TTT que varía en el rango de 0-0.2  $\mu\text{M}$ .

Tal como se observa en la figura 23 panel B, la velocidad inicial varía en forma lineal con la concentración de TTT. A partir de este gráfico se obtuvo un número de recambio de 0.2  $\text{s}^{-1}$ .

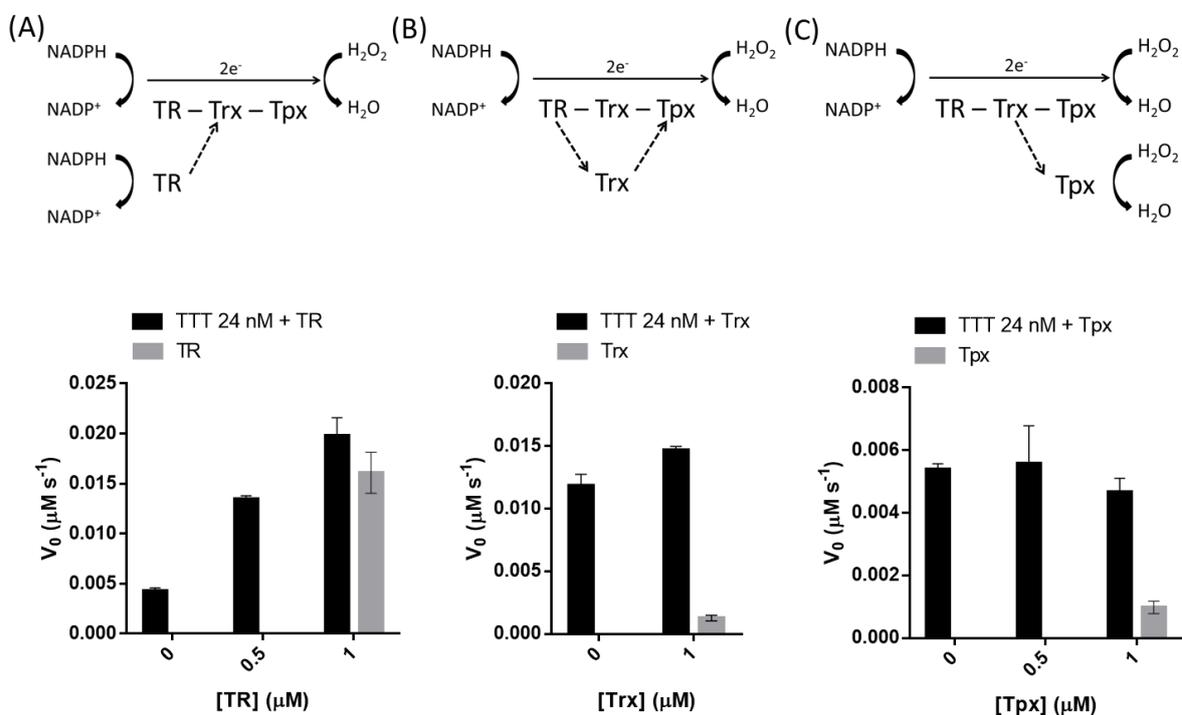
### 4.3.2 Evaluación de la fuga de electrones

Una vez que se verificó que la proteína de fusión contiene actividad NADPH peroxidasa se evaluó la posible fuga de electrones en cada uno de los módulos catalíticos del sistema triple. Con este objetivo, se midió la actividad NADPH peroxidasa de la enzima TTT y TTT suplementada con una de las tres enzimas simples TR, Trx o Tpx de *E. coli* (dos cursos temporales representativos se muestran en la figura 24). A partir de las pendientes de los cursos temporales se calculó la velocidad inicial para cada condición. Como control se midió la velocidad inicial de las enzimas simples. En el caso de que exista fuga de electrones esperamos evidenciar un aumento en la velocidad inicial de la reacción cuando suplementamos con las enzimas en comparación con la suma de velocidad de las enzimas separadas (velocidad de TTT sumado a la velocidad de la enzima simple TR, Trx o Tpx).



**Figura 24.** Cursos temporales representativos de la actividad NADPH peroxidasa de TTT 24 nM (en negro) y de la mezcla TTT 24 nM y TR 1 μM (en rojo). El experimento se realizó a concentraciones saturantes de sustratos.

Los resultados obtenidos acerca de la fuga de electrones para los tres módulos catalíticos se resumen en la figura 25 y en la tabla 7.



**Figura 25.** Evaluación de la fuga de electrones en el módulo catalítico TR (A), Trx (B) y Tpx (C).

En la figura 25 panel A se observa que la velocidad inicial aumenta aproximadamente tres veces cuando se agrega TR 0.5 μM y cuatro veces cuando se agrega TR 1 μM. Sin embargo, el control que corresponde a la enzima

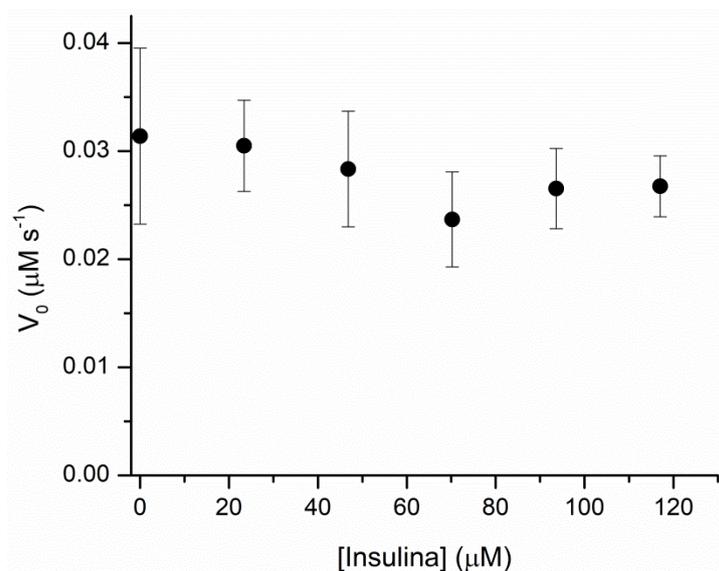
TR simple contiene actividad NADPH peroxidasa significativa (figura 25 panel A, representación en barra color gris). Asimismo en la figura 25 panel B, se observa que cuando se suplementa con Trx 1  $\mu\text{M}$  la velocidad inicial aumenta aproximadamente 1.2 veces. Finalmente en la figura 25 panel C no se observa un aumento significativo de la velocidad inicial cuando se agrega Tpx en concentración 0.5 o 1  $\mu\text{M}$ . Por su parte, los controles Trx y Tpx no tienen actividad NADPH peroxidasa considerable.

Como se observa en la tabla 7, los valores de velocidad inicial de la suma de las enzimas individuales son similares a los valores de velocidades de TTT medidos en presencia de suplemento TR, Trx o Tpx.

**Tabla 7.** Valores de velocidad inicial de TTT en concentración 24 nM y de suplemento en concentración 1  $\mu\text{M}$  o de la suma de las velocidades iniciales de las enzimas individuales. Adicionalmente se muestran los valores de velocidad inicial de TTT en presencia de suplemento.

Módulo catalítico	Velocidad inicial ( $\mu\text{M s}^{-1}$ )			
	$V_0$ TTT 24 nM	$V_0$ TR 1 $\mu\text{M}$	$V_0$ TTT + $V_0$ TR	$V_0$ (TTT + TR)
TR	$V_0$ TTT 24 nM	$V_0$ TR 1 $\mu\text{M}$	$V_0$ TTT + $V_0$ TR	$V_0$ (TTT + TR)
	0.0043	0.016	0.02	0.02
Trx	$V_0$ TTT 24 nM	$V_0$ Trx 1 $\mu\text{M}$	$V_0$ TTT + $V_0$ Trx	$V_0$ (TTT + Trx)
	0.012	0.0013	0.013	0.015
Tpx	$V_0$ TTT 24 nM	$V_0$ Tpx 1 $\mu\text{M}$	$V_0$ TTT + $V_0$ Tpx	$V_0$ (TTT + Tpx)
	0.0054	$9.8 \times 10^{-4}$	0.0064	0.0047

A continuación en la figura 26, se muestran los resultados obtenidos cuando se realizó el mismo experimento pero esta vez agregando insulina como aceptor alternativo de electrones en concentración variable en el rango de 0-120  $\mu\text{M}$ . Es importante aclarar que en este experimento (a diferencia de los experimentos anteriores) no se agrega  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en su lugar se agregó insulina.



**Figura 26.**  $V_0$  en función de la concentración de insulina. Se agregó TTT 375 nM, NADPH 117  $\mu\text{M}$  e insulina variable en el rango de 0-120  $\mu\text{M}$ .

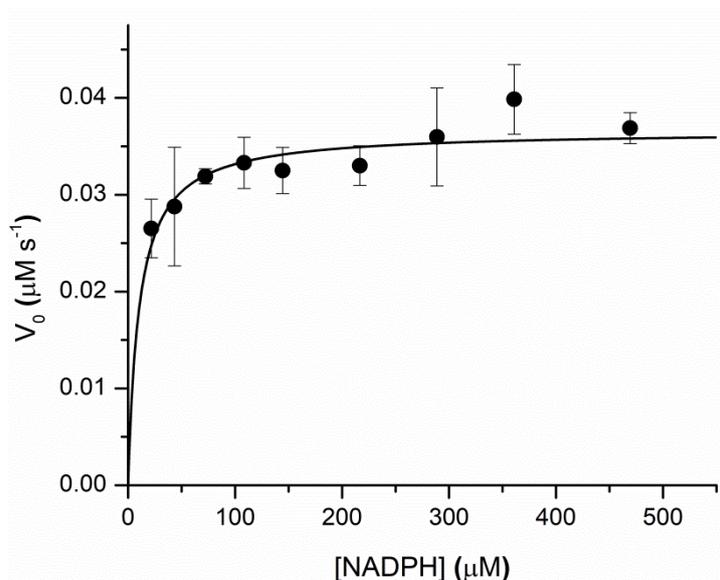
En la figura 26 se observa que el agregado de insulina no aumenta la velocidad inicial de reacción, lo que evidencia que no existe fuga de electrones desde Trx hacia la insulina. Además es interesante destacar que en ausencia de insulina tenemos una velocidad inicial de  $0.03 \mu\text{M s}^{-1}$ , esto se podría explicar por una actividad NADPH oxidasa de TTT, que se hace notoria dado que en este experimento se utilizó mayor concentración de enzima (375 nM) en comparación con los experimentos anteriores (24 nM de TTT).

Mediante estos experimentos en condiciones de estado estacionario se verificó que la enzima TTT presenta actividad global NADPH peroxidasa (figura 23). Evidenciamos que la velocidad inicial varía de forma lineal con la concentración de TTT y por lo tanto la pendiente corresponde a la constante catalítica  $k_{cat}$  que tiene un valor de  $0.2-0.3 \text{ s}^{-1}$ . A pesar de que el valor de  $k_{cat}$  es bastante pequeño, nos encontramos con que TTT es enzimáticamente activa, es decir, estamos frente a un sistema nuevo y artificial de reducción de peróxido de hidrógeno. Además, los resultados preliminares de evaluación de fuga de electrones sugieren que TTT no presenta gran fuga de electrones cuando se suplementa con de las proteínas simples TR, Trx, Tpx o insulina.

### 4.3.3 Determinación de los parámetros cinéticos

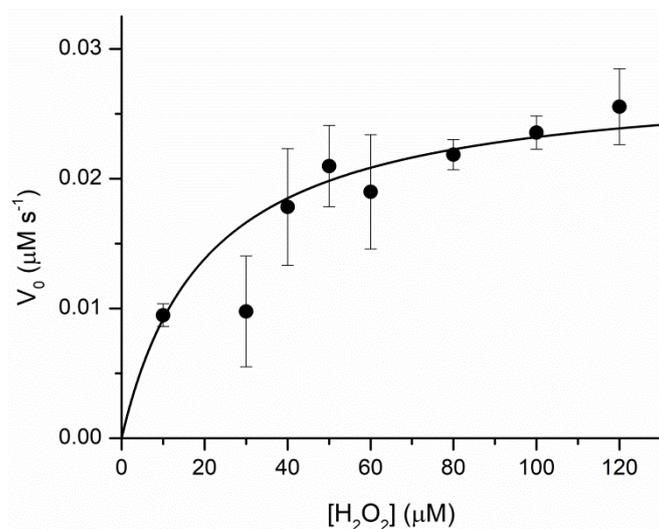
Con el objetivo de determinar los parámetros cinéticos  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$  de TTT se midió la velocidad inicial variando la concentración de los sustratos NADPH o  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Para determinar los parámetros cinéticos para el sustrato NADPH se dejó constante el sustrato  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $100 \mu\text{M}$  y se varió la concentración de NADPH en el rango de  $0\text{-}470 \mu\text{M}$ . Como se observa en la figura 27, la enzima satura a muy baja concentración de NADPH, lo que dificultó la determinación de  $K_M$ . Del ajuste hiperbólico se obtuvo un valor de  $K_M$  en el rango de  $3\text{-}10 \mu\text{M}$  y un valor de  $V_{\text{máx}}$  de  $0.03\text{-}0.04 \mu\text{M s}^{-1}$ .



**Figura 27.**  $V_0$  en función de la concentración de NADPH variable en el rango de  $0\text{-}470 \mu\text{M}$ . Se utilizó una concentración de TTT de  $136 \text{ nM}$  y de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de  $100 \mu\text{M}$ . La función hipérbola se ajustó a los datos experimentales.

De igual forma, para determinar los parámetros cinéticos para el sustrato  $\text{H}_2\text{O}_2$  se determinó la velocidad inicial utilizando una concentración de NADPH constante en  $\sim 110 \mu\text{M}$  y se varió el sustrato  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el rango de  $0\text{-}120 \mu\text{M}$ . Del ajuste hiperbólico se determinó un valor de  $K_M$  de  $20 \pm 3 \mu\text{M}$  y un valor de  $V_{\text{máx}}$  de  $0.03 \mu\text{M s}^{-1}$  (figura 28).



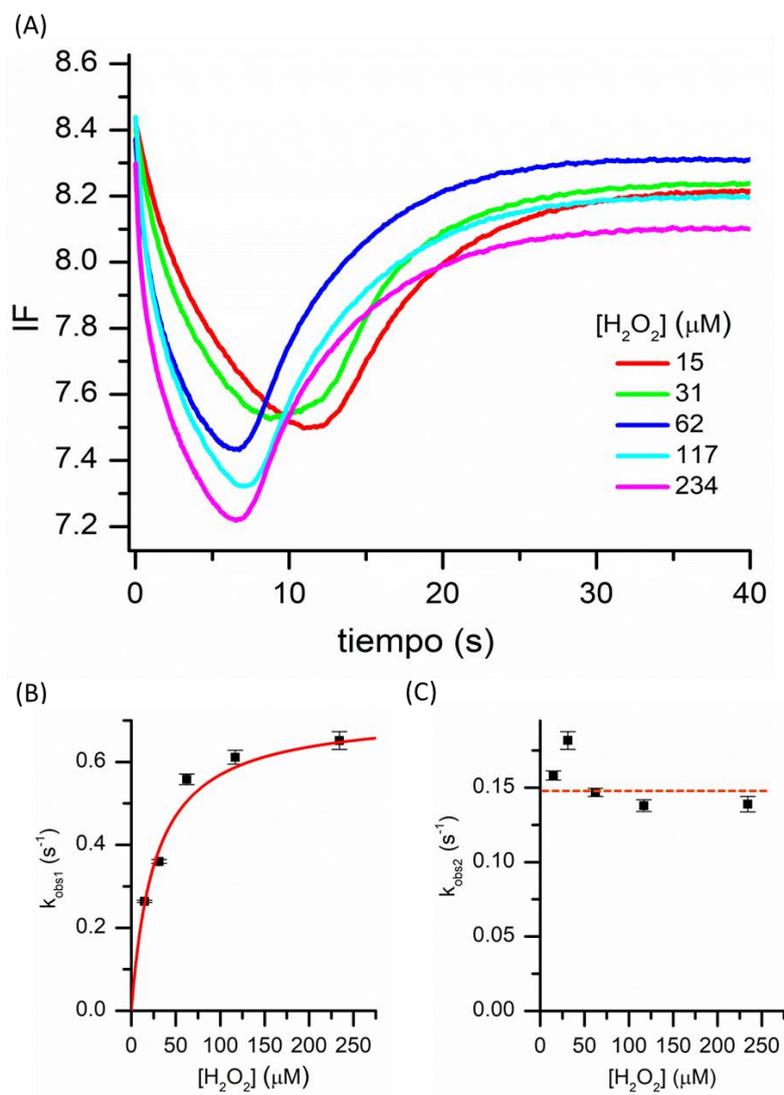
**Figura 28.**  $V_0$  en función de la concentración de  $H_2O_2$  que varía en el rango de 0-120  $\mu M$ . Se utilizó una concentración de TTT 101 nM y NADPH 113  $\mu M$ . La función hipérbola se ajustó a los datos experimentales.

Según estos resultados, al igual que para TR (se ha reportado un valor de  $K_M$  para NADPH en el rango de 1-3  $\mu M$ ), TTT satura a muy baja concentración de los sustratos NADPH y  $H_2O_2$ , lo que dificultó la determinación de los parámetros cinéticos.

## 4.4 Cinética de oxidación/reducción en condiciones de estado preestacionario

### 4.4.1 Reacción de oxidación de TTT<sub>red</sub> por $H_2O_2$

Se estudió la cinética de oxidación de TTT<sub>red</sub> por  $H_2O_2$  en condiciones de pseudo-primer orden. Tal como se describe en el apartado de metodología en la sección 3.7.1, la enzima TTT fue reducida con NADPH previo a la mezcla con  $H_2O_2$  en un experimento de flujo detenido con accesorio de mezclado secuencial donde se siguió el cambio de fluorescencia en el tiempo ( $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} \geq 320 \text{ nm}$ ).



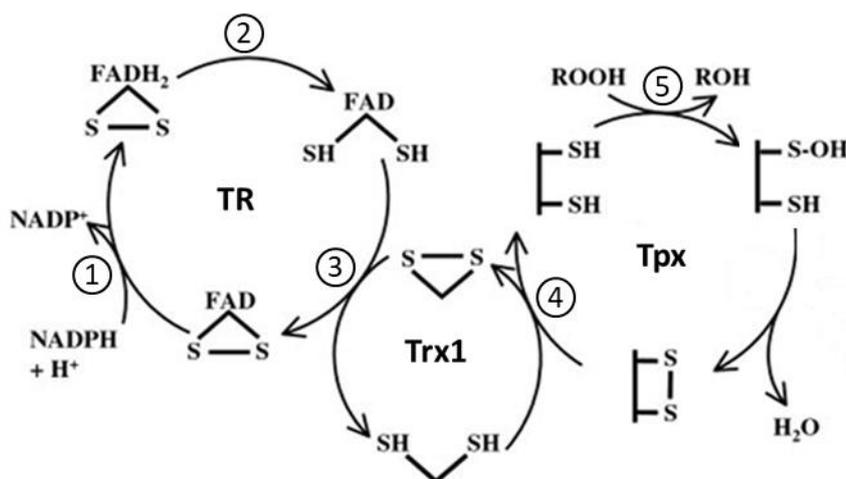
**Figura 29.** Cinética de oxidación de TTT por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **(A)** Cursos temporales de la reacción en condiciones de pseudo-primer orden, la enzima TTT reducida 0.44 μM se mezcló con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> variable en el rango de 15-234 μM y se siguió la intensidad de fluorescencia ( $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} \geq 320 \text{ nm}$ ) en el tiempo. **(B)** Gráfico de  $k_{obs1}$  en función de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La función hipérbola se ajustó a los datos **(C)** Gráfico de  $k_{obs2}$  en función de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Como se observa en la figura 29 panel A, el curso temporal de la reacción de oxidación de TTT muestra al menos dos fases, una fase que se asocia con una disminución en la emisión de fluorescencia (oxidación del módulo Trx de TTT), seguida de una fase que se asocia con un aumento en la emisión de fluorescencia (reducción del módulo Trx de TTT).

Como se aprecia en la figura 29 panel B,  $k_{obs1}$  sigue una tendencia hiperbólica con la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de donde se pueden obtener dos constantes cinéticas, de la pendiente inicial ( $A/K_{0.5}$ ) y la asíntota del ajuste, que equivalen a  $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y  $0.7 \text{ s}^{-1}$ , respectivamente.

En el gráfico de la figura 29 panel C, se muestran las constantes cinéticas observadas obtenidas del ajuste de la segunda fase, que no dependen de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y tienden a un valor estimado en  $0.15 \text{ s}^{-1}$

Con la intención de hacer más clara la interpretación de estos resultados, retomamos aquí la figura 2, donde se representa el ciclo catalítico del sistema tiorredoxina-peroxirredoxina.



**Figura 30.** Ciclo catalítico del sistema tiorredoxina-peroxirredoxina. Adaptado de Baker y Poole<sup>4</sup>.

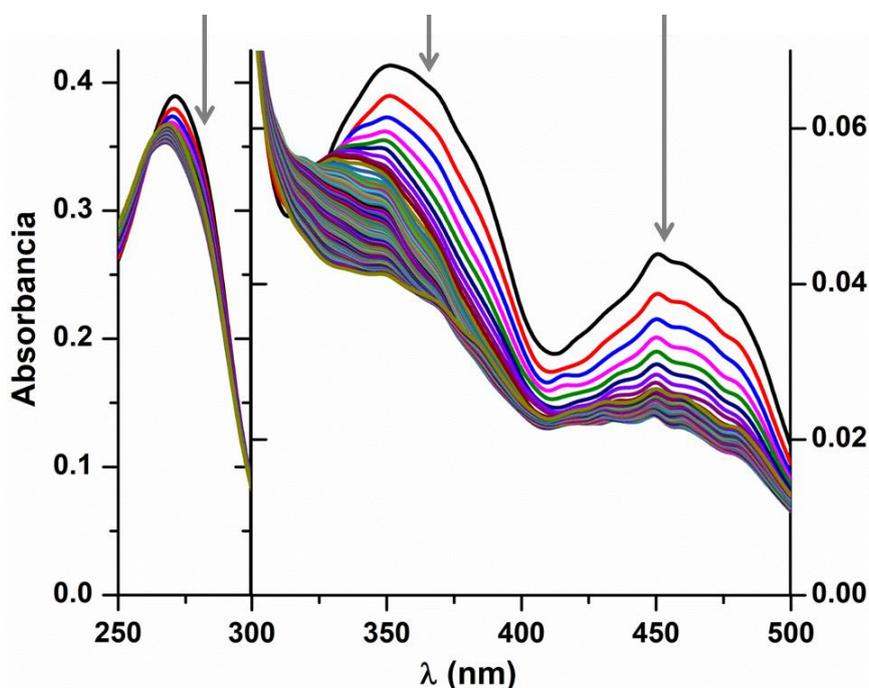
Esperamos que la reacción favorecida sea entre el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el extremo oxidante de la proteína de fusión, es decir con el módulo catalítico Tpx (figura 30, paso 5). Esta reacción no está asociada a un cambio de fluorescencia intrínseca debido a que la proteína Tpx no contiene residuos de triptofano en su secuencia aminoacídica. Además, esperamos que sea una reacción de primer orden para  $\text{H}_2\text{O}_2$ , es decir, que  $k_{obs1}$  aumente de forma lineal con el aumento de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La pendiente inicial del gráfico hiperbólico de  $k_{obs1}$  en función de  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  (figura 29 panel B), correspondería a la constante de velocidad de orden dos de esta reacción, con un valor de  $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Este valor se encuentra en el mismo orden de magnitud que el valor de  $k_{cat}/K_M$  determinado por Baker y Poole de  $4.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para la reacción entre Tpx y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (sección 1.4.2.2, tabla 4). La asíntota del ajuste hiperbólico que tiene un valor de  $0.7 \text{ s}^{-1}$ , podría corresponder a la constante cinética del paso de transferencia electrónica interna desde el módulo Trx a Tpx, dado que se asocia con una disminución en la intensidad de fluorescencia y es un proceso de orden cero para la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (figura 30, paso 4).

Con respecto a la fase que se asocia a la reducción del módulo Trx de TTT, la  $k_{obs2}$  es de orden cero para la  $[H_2O_2]$  y se estima en un valor de  $0.15\text{ s}^{-1}$ , constante cinética que podría corresponder a la transferencia electrónica interna desde el módulo catalítico TR a Trx (figura 30, paso 3). Este valor es muy similar al valor determinado para  $k_{cat}$  ( $0.2\text{-}0.3\text{ s}^{-1}$ ), de modo que sería el paso limitante en la catálisis.

En este experimento se utilizó una técnica de flujo detenido en modo mezclado secuencial y no otra técnica más sencilla, como por ejemplo reducción con NADPH y luego separación del reductor mediante gel filtración en columna PD-10, debido a que la enzima TTT presenta actividad NADPH oxidasa, volviéndose a oxidar rápidamente en presencia de oxígeno.

#### 4.4.2 Reacción de reducción subestequiométrica de TTT por NADPH

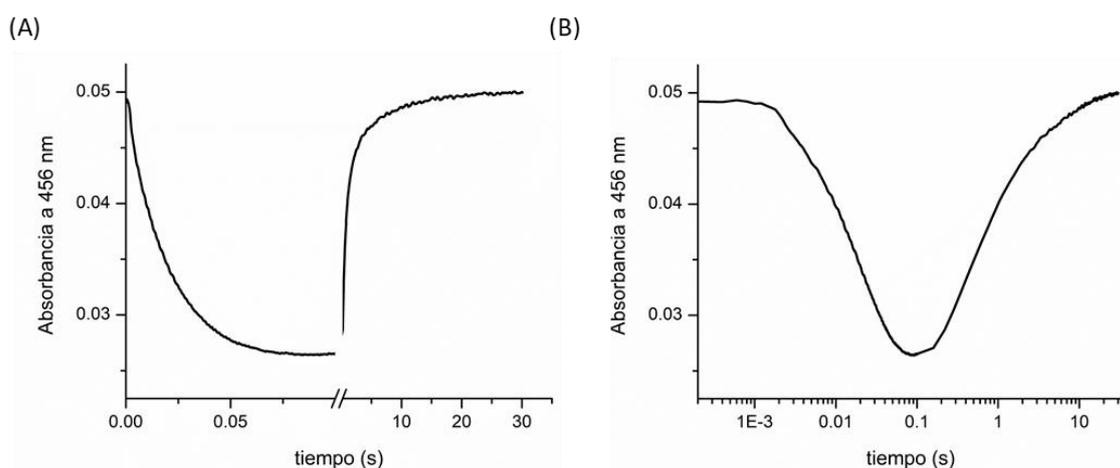
Como se detalló en la sección 4.2, cambios en el estado de oxidación de la flavina acompañan cambios en el espectro de absorbancia de la proteína, lo que nos permitiría seguir la cinética. Para caracterizar estos cambios, se mezcló TTT  $4\text{ }\mu\text{M}$  y NADPH  $5\text{ }\mu\text{M}$  y se realizaron espectros de absorbancia en el tiempo (figura 31).



**Figura 31.** Espectros de absorbancia en el tiempo. Se mezcló TTT  $4\text{ }\mu\text{M}$  y NADPH  $5\text{ }\mu\text{M}$  y se registraron espectros de absorbancia en el rango de 250-500 nm cada 4 ms.

En la figura 31 se observa que cuando la enzima se reduce disminuye la absorbancia a 280 nm (correspondiente a la contribución de los aminoácidos aromáticos) y en los máximos a 370 y 456 nm (correspondiente a la contribución del FAD).

A continuación, se estudió la reducción subestequiométrica de TTT por NADPH, mezclando con estequiometría aproximada 1:1 y considerando que para la reducción completa de TTT se requieren 4 equivalentes de NADPH. La reacción se siguió monitoreando el cambio de absorbancia a 456 nm.



**Figura 32.** Cinética de reacción de TTT con NADPH. La enzima TTT 6  $\mu\text{M}$  en estado oxidado se mezcló con NADPH 5  $\mu\text{M}$  y se registró el cambio de absorbancia a 456 nm dependiente del tiempo que se representa en escala lineal (A) y logarítmica (B). Se muestra la curva promedio de 10 corridas.

Los cursos temporales de la figura 32 muestran una cinética compleja que involucra varios pasos. Se observa una fase que se asocia con una caída de absorbancia a 456 nm (reducción de la flavina) que se completa a los 0.1 segundos de reacción seguida de una fase que se asocia con un aumento en la absorbancia (oxidación de la flavina).

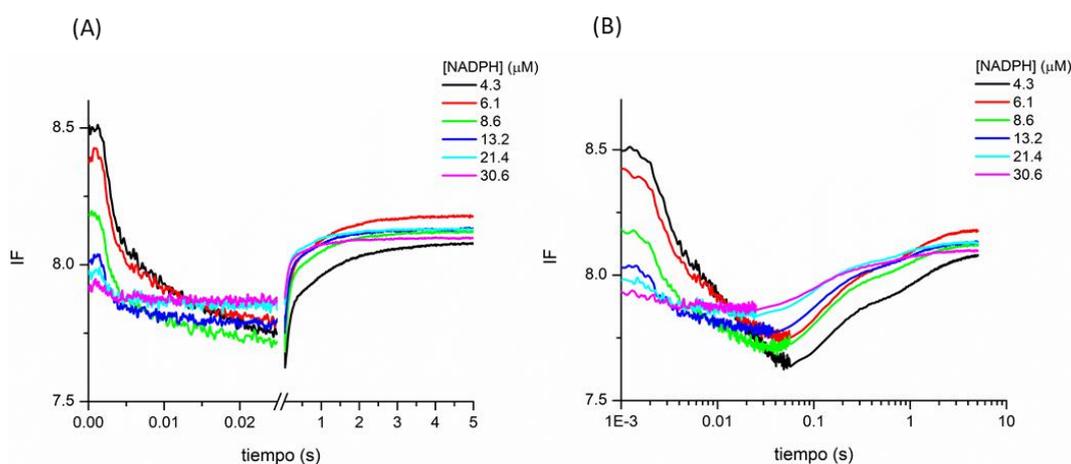
Con respecto a la fase de reducción de la flavina, la función doble exponencial se ajustó al curso temporal, evidenciándose que la reducción ocurre en dos pasos. Un paso es rápido, con una constante cinética observada de  $247 \pm 73 \text{ s}^{-1}$  y el otro paso es más lento con una constante cinética observada de  $42 \pm 4 \text{ s}^{-1}$ . De acuerdo al mecanismo planteado por Lennon y Williams<sup>28</sup>, detallado en la sección 1.2.2.4 en el apartado de Introducción, el paso rápido podría corresponder al complejo de transferencia de carga  $\text{FADH}_2\text{-NADPH}$  ( $k_{CT}$ ) y el segundo paso a la reducción de la flavina ( $k_{FR}$ ) (figura 30, paso 1). El paso rápido

no correspondería a la unión del NADPH a la enzima dado que se ha reportado en la bibliografía que es extremadamente rápido y no se podría detectar mediante este diseño experimental<sup>28</sup>.

El aumento en la absorbancia a 456 nm en el tiempo se atribuye a la reoxidación de la flavina y de igual forma, la función doble exponencial se ajustó al curso temporal. La reacción ocurre con un primer paso con una constante cinética observada de  $1.7 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ , seguida de un paso más lento con una constante cinética observada de  $0.22 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$  que no se completa a los 30 segundos de reacción. La constante de velocidad observada de  $1.7 \text{ s}^{-1}$  podría corresponder al paso de transferencia electrónica desde el  $\text{FADH}_2$  al centro redox disulfuro de la TR (figura 30, paso 2) y el paso con constante observada de  $0.22 \text{ s}^{-1}$ , podría corresponder al paso de transferencia electrónica desde el módulo TR a Trx (figura 30 paso 3), dado que este valor es similar a la constante de  $0.15 \text{ s}^{-1}$  que asociamos a este paso en el experimento anteriormente detallado de oxidación de TTT con  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### 4.4.3 Reacción de reducción de TTT por NADPH en exceso

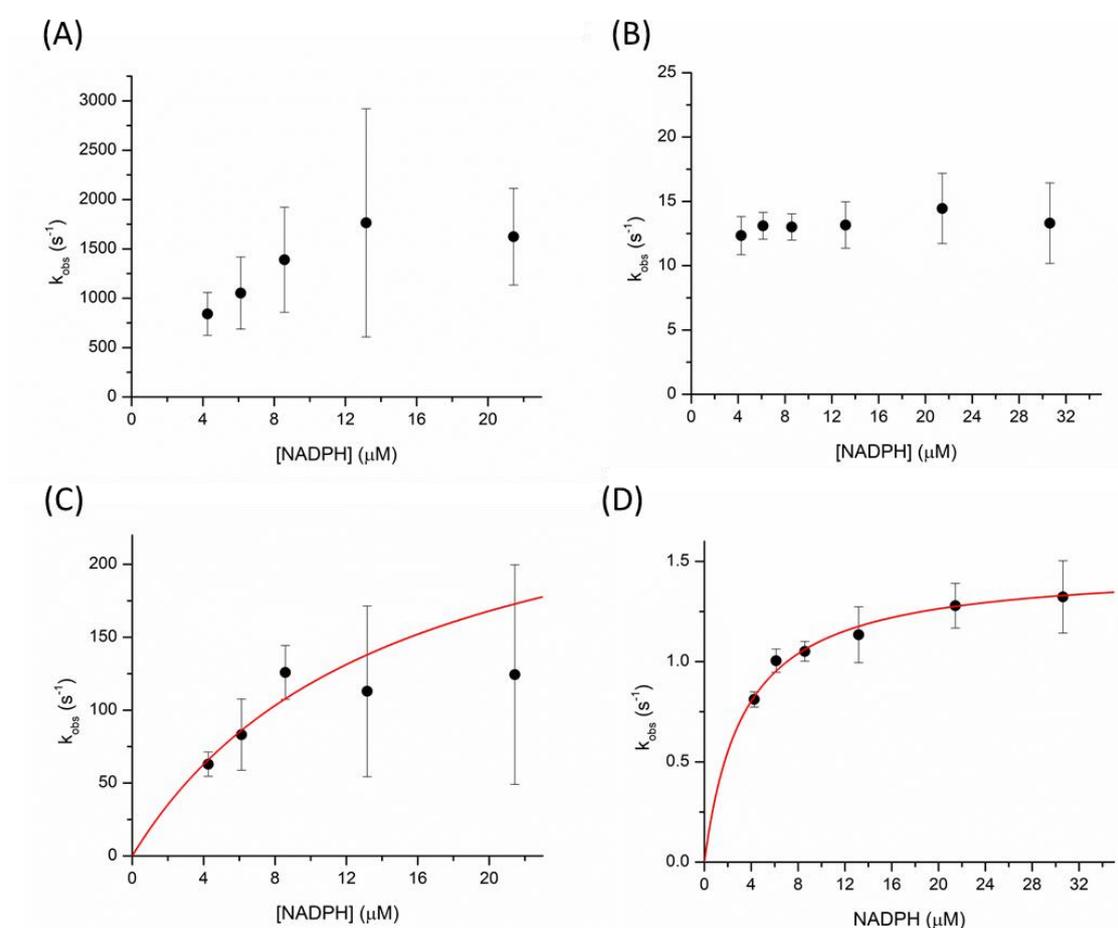
Se estudió la reducción con NADPH siguiendo el cambio de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 320 \text{ nm}$ ) en el tiempo en condiciones de pseudo-primer orden utilizando NADPH al menos 10 veces en exceso. A continuación en la figura 33 se muestran los cursos temporales obtenidos.



**Figura 33.** Cinética de reacción de TTT con NADPH. La enzima TTT oxidada  $0.4 \mu\text{M}$  se mezcló con NADPH en el rango de  $4\text{--}31 \mu\text{M}$  y se registró el cambio de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 320 \text{ nm}$ ) dependiente del tiempo que se representa en escala lineal **(A)** o logarítmica **(B)**. Se muestran las curvas promedio de 10 corridas.

Los cursos temporales de la figura 33 evidencian una cinética compleja, en varias fases, mostrando una disminución en la intensidad de fluorescencia en los primeros 0.02 segundos de reacción seguida de un aumento en la intensidad de fluorescencia. Cuatro funciones exponenciales se ajustaron a los cursos temporales que muestran al menos cuatro fases.

Las constantes observadas obtenidas del ajuste a la función exponencial posteriormente se graficaron en función de la concentración de NADPH, estos gráficos se muestran en la figura 34 que sigue y los parámetros obtenidos se resumen en la tabla 8.



**Figura 34.** Gráficos de  $k_{obs}$  en función de la concentración de NADPH. **(A)**  $k_{obs}$  en función de la concentración de NADPH en el rango de 4-21  $\mu M$  para la fase rápida de la oxidación de TTT. **(B)**  $k_{obs}$  en función de la concentración de NADPH en el rango de 4-31  $\mu M$  para la fase lenta de la oxidación de TTT. **(C)**  $k_{obs}$  en función de la concentración de NADPH en el rango de 4-21  $\mu M$  para la fase rápida de la reducción de TTT. **(D)**  $k_{obs}$  en función de la concentración de NADPH en el rango de 4-31  $\mu M$  para la fase lenta de la reducción de TTT.

Con respecto a la fase de oxidación de TTT, ocurre un paso extremadamente rápido ( $k_{obs} \sim 1000$ ) que se encuentra en el límite de la técnica experimental y por

lo tanto presenta gran dispersión (figura 34 panel A) y una fase más lenta que es independiente de la concentración de NADPH que presenta un valor aproximado de  $\sim 13 \text{ s}^{-1}$  (figura 34 panel B).

Con respecto a la fase de reducción de TTT, ocurre un paso rápido que sigue una tendencia hiperbólica con la concentración de NADPH (figura 34 panel C). Del ajuste a una función hiperbólica se obtuvieron valores de  $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y  $289 \text{ s}^{-1}$  correspondientes a la pendiente inicial ( $A/K_{0.5}$ ) y a la asíntota del ajuste hiperbólico, respectivamente. También ocurre un paso más lento que muestra tendencia hiperbólica con la concentración de NADPH (figura 34 panel D), de donde se obtuvieron las constantes cinéticas  $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y  $1.5 \text{ s}^{-1}$  de la pendiente inicial y a la asíntota del ajuste, respectivamente.

Este experimento es de difícil interpretación dado que agregamos el NADPH en exceso sumado a que la técnica experimental utilizada detecta indistintamente el cambio de intensidad de fluorescencia correspondiente a la contribución de la flavina y de los residuos de triptofano ( $\lambda_{em} \geq 320 \text{ nm}$ ).

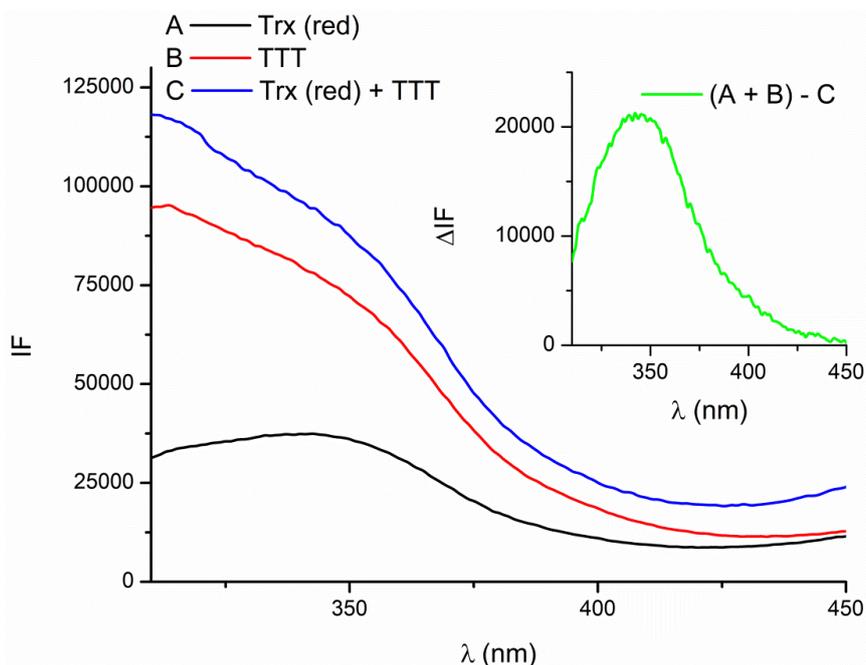
**Tabla 8.** Parámetros cinéticos obtenidos de la reacción de TTT con NADPH en condiciones de pseudo-primer orden seguida por intensidad de fluorescencia.

Cambio	$k_{obs}$	Dependencia con NADPH	$k \text{ (s}^{-1}\text{)}$	Pendiente inicial ( $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	Asíntota ( $\text{s}^{-1}$ )	Amplitud promedio
Disminución de IF	$k_{obs1}$	Independiente	$\sim 1000$	---	---	$1.3 \pm 0.8$
	$k_{obs2}$	Independiente	$\sim 13$	---	---	$0.8 \pm 1$
Aumento de IF	$k_{obs3}$	Hiperbólica	---	$2 \times 10^7$	289	$-0.43 \pm 0.07$
	$k_{obs4}$	Hiperbólica	---	$4 \times 10^5$	1.5	$-0.21 \pm 0.05$

#### 4.4.4 Reacción de reducción de TTT por Trx reducida

Con la finalidad de estudiar la cinética de reducción de TTT con Trx reducida se realizaron espectros de emisión de fluorescencia intrínseca ( $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ ) de las enzimas Trx reducida (figura 35, espectro A) y TTT oxidada (figura 35, espectro B). Posteriormente se agregaron las dos enzimas y se registró el espectro resultante de la mezcla (figura 35, espectro C). Se realizó el espectro diferencial donde la intensidad de fluorescencia de la mezcla Trx y TTT determinado experimentalmente (C) fue sustraído a la intensidad de

fluorescencia de la suma de los espectros individuales de Trx y TTT (A + B) a cada longitud de onda (figura 35, gráfico inserto).

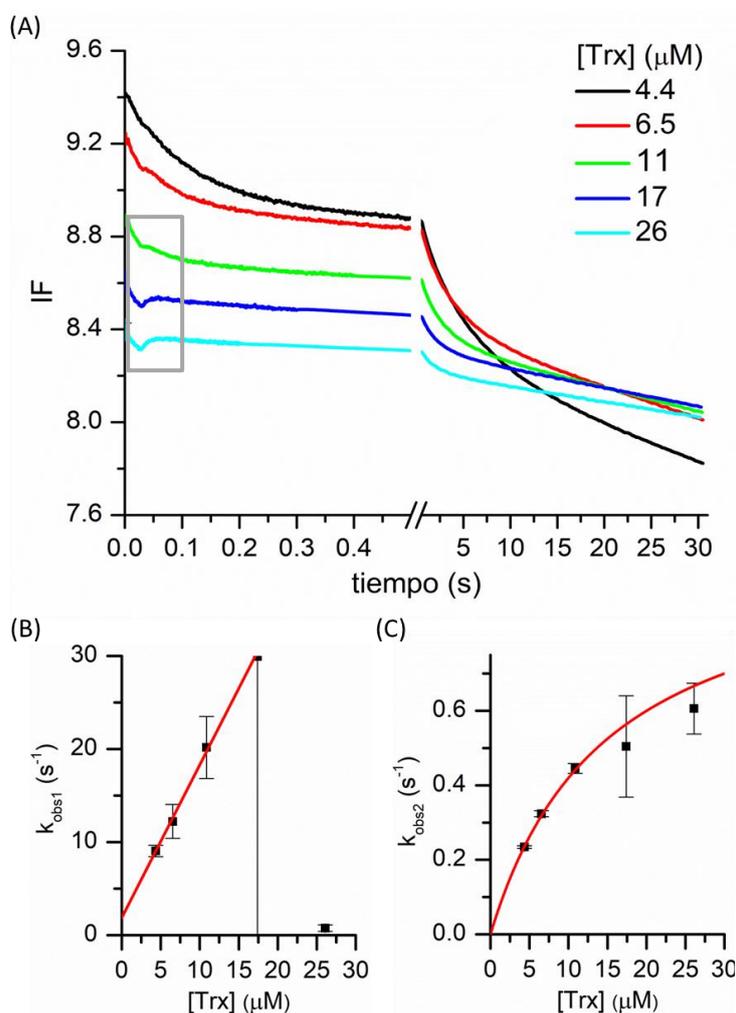


**Figura 35.** Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de las proteínas Trx reducida 0.18  $\mu\text{M}$  (A, en negro), TTT oxidada 0.475  $\mu\text{M}$  (B, en rojo) y la mezcla Trx reducida 0.18  $\mu\text{M}$  y TTT oxidada 0.475  $\mu\text{M}$  (C, en azul). El espectro diferencial (A + B) - C se muestra en el gráfico inserto.

Los resultados experimentales muestran que la emisión correspondiente a la mezcla TTT oxidada y Trx reducida (figura 35, espectro C) es menor que la suma de los espectros de las proteínas individuales (suma de espectros A y B). Esta disminución en la emisión de fluorescencia evidencia la reacción entre Trx inicialmente reducida y TTT. Esperamos que la reacción favorecida sea entre Trx reducida y el módulo catalítico Tpx de TTT. También se podría llegar a reducir el módulo Trx de TTT, si esto ocurriera, esperaríamos que a medida que disminuye la fluorescencia de Trx simple, aumente la fluorescencia del módulo Trx de TTT y esta reacción no estaría asociada a un cambio significativo en la emisión de fluorescencia. Es interesante destacar que el gráfico diferencial (figura 35, gráfico inserto) presenta la misma forma que el espectro de emisión de fluorescencia de la Trx<sup>117</sup>.

Una vez detectado este cambio de fluorescencia se procedió a seguir la cinética de reacción midiendo la caída de intensidad de fluorescencia intrínseca en el tiempo ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 320 \text{ nm}$ ) en condiciones de pseudo-primer orden

donde se añadió Trx al menos 10 veces en exceso. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 36 que sigue.



**Figura 36.** Cinética de reducción de TTT por Trx. **(A)** Cursos temporales de la reacción donde se mezcló TTT 0.45  $\mu\text{M}$  y Trx de concentración variable en el rango de 4-26  $\mu\text{M}$ . Se siguió la intensidad de fluorescencia intrínseca en el tiempo ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 320 \text{ nm}$ ) **(B)** Gráfico de  $k_{obs1}$  en función de la concentración de Trx. Se realizó un ajuste lineal **(C)** Gráfico de  $k_{obs2}$  en función de la concentración de Trx. Se realizó un ajuste a función hipérbola.

Los cursos temporales de la figura 36 panel A muestran una cinética de reacción compleja con al menos dos fases, una ocurre en los primeros 0.5 segundos de reacción y la otra no llega a completitud a los 30 segundos de reacción. La intensidad de fluorescencia disminuye en el tiempo, es decir que estamos visualizando principalmente la oxidación de la Trx externa.

Tal como se detalló previamente en el apartado de metodología sección 3.7.4, las constantes observadas obtenidas del ajuste a función doble exponencial se graficaron en función de la concentración de Trx con la finalidad de obtener las constantes cinéticas. El gráfico de la figura 36 panel B muestra una constante

observada que es de primer orden para Trx, por lo tanto, podría corresponder a la reacción entre Trx y el módulo Tpx de TTT detallada previamente. Se realizó un ajuste lineal a los datos y se obtuvo la ecuación de la recta de la ecuación 20:

$$k_{obs1} = 1.6 \times 10^6 [\text{Trx}] + 1.876 \quad (20)$$

De la pendiente se obtuvo un valor para la constante de velocidad de segundo orden de la reacción entre el módulo Tpx de TTT y la Trx externa de  $1.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Este valor se encuentra en el mismo orden de magnitud que el valor de  $k_{cat}/K_M$  reportada para las enzimas simples de  $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  determinado por Baker y Poole<sup>4</sup>, por el contrario no coincide con la constante cinética de segundo orden de  $9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  reportado por Noguera *et al*<sup>98</sup>.

Cuando utilizamos altas concentraciones de Trx reducida, los cursos temporales son diferentes en los primeros milisegundos (figura 36 panel A, recuadro gris) y en consecuencia, el ajuste no es bueno y las constantes observadas obtenidas del mismo presentan gran error asociado. Este comportamiento podría corresponder a cursos temporales que aumentan y disminuyen en el tiempo de forma simultánea. A bajas concentraciones de Trx, la reacción favorecida sería con el módulo Tpx de TTT, sin embargo a altas concentraciones, podría reaccionar también con los módulos catalíticos Trx y TR de TTT, lo que explicaría el fenómeno observado.

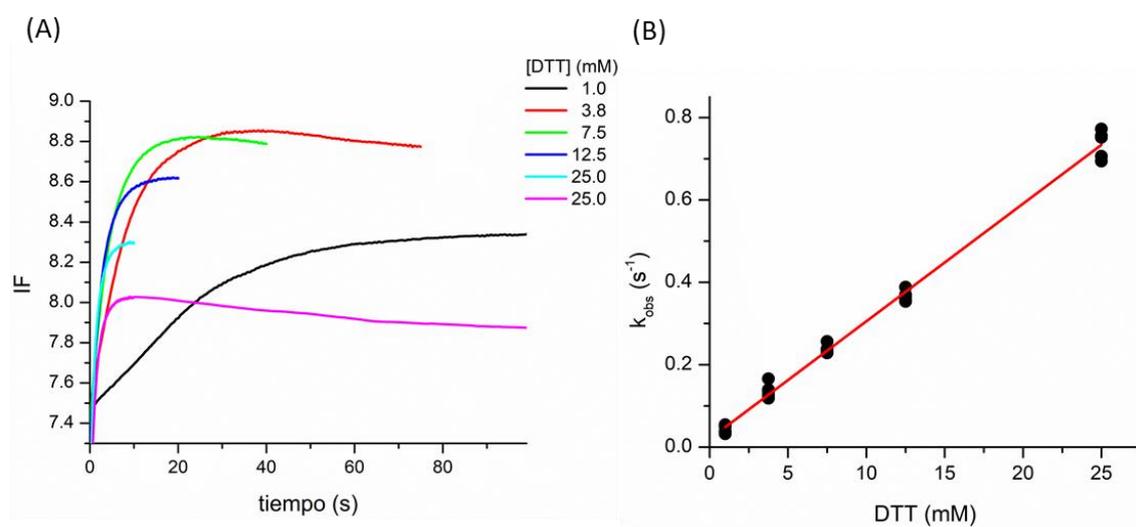
El gráfico de  $k_{obs2}$  en función de la concentración de Trx, correspondiente a la segunda fase, muestra una tendencia hiperbólica con la concentración de Trx (figura 36, panel C). Del ajuste se obtienen dos valores, correspondientes a la pendiente inicial ( $A/K_{0.5}$ ) y a la asíntota de la hipérbola que equivalen a  $7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y  $1.05 \text{ s}^{-1}$ , respectivamente.

#### 4.4.5 Reacción de reducción de TTT por DTT

Finalmente se redujeron los disulfuros proteicos agregando DTT al menos 10 veces en exceso (condiciones de pseudo-primer orden) y se siguió el cambio de fluorescencia en el tiempo utilizando un  $\lambda_{em} \geq 320 \text{ nm}$ . Es importante aclarar que mediante este diseño experimental detectamos indistintamente la fluorescencia correspondiente a la contribución de los triptofanos proteicos y del FAD.

La reducción de la enzima se acompaña de un aumento en la intensidad de fluorescencia en el tiempo (figura 37 panel A). La función simple exponencial se ajustó a los cursos temporales obteniéndose constantes cinéticas observadas que posteriormente se graficaron en función de la concentración de DTT (figura 37 panel B). A partir de la pendiente el gráfico se obtuvo una constante de velocidad de segundo orden de  $28.6 \pm 0.5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

La reacción con los reactivos DTT y TCEP (figura 22, panel C) es lenta, lo que nos sugiere cierta especificidad de TTT por los sustratos estudiados  $\text{H}_2\text{O}_2$ , NADPH y Trx.



**Figura 37. (A)** Cursos temporales de la reacción de reducción de TTT 12 nM con DTT en concentración variable en el rango de 1-25 mM. Se muestran las curvas promedio de 10 corridas **(B)** Constante observada en función de la concentración de DTT. Se realizó un ajuste lineal.

## 5. CONCLUSIÓN

## 5.1 Conclusiones y consideraciones finales

En este estudio se caracterizó la cinética del sistema artificial de fusión, evidenciándose que presenta actividad global NADPH peroxidasa con una  $k_{cat}$  bastante pequeña de 0.2-0.3 s<sup>-1</sup>, satura a muy bajas concentraciones de los sustratos NADPH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y no presenta gran fuga de electrones en los tres módulos catalíticos cuando se suplementa con las proteínas TR, Trx, Tpx o insulina.

Los resultados preliminares de cinética preestacionaria poseen un gran potencial para el entendimiento de la cinética de la enzima, sugiriendo que el paso limitante de la catálisis es el paso de transferencia electrónica desde el módulo catalítico TR al módulo Trx con una constante de velocidad equivalente a  $k_{cat}$ . Que este paso sea el limitante se podría deber al diseño de la construcción, donde el elemento conector que une las enzimas TR y Trx es altamente flexible, si bien esta flexibilidad permite acercar los módulos catalíticos para que se dé la reacción, podría aportar movimientos adicionales a la proteína de fusión que limitarían la catálisis. Además en la proteína de fusión se podrían restringir los cambios conformacionales que se ha reportado que son requeridos en el ciclo catalítico de las enzimas individuales.

Para continuar con este trabajo se propone modificar el elemento conector que une los módulos catalíticos TR y Trx, con base en elementos conectores de otras proteínas de fusión naturales como TGR o NTRC y evaluar si se consigue aumentar la  $k_{cat}$  de la enzima. Además, para profundizar en la cinética en condiciones de estado preestacionario sería importante contar con más filtros de emisión de fluorescencia, dado que en este trabajo se utilizó en todos los casos una longitud de onda de emisión  $\geq 320$  nm.

La optimización de TTT podría llevar a aumentar la eficiencia catalítica del sistema tiorredoxina-peroxirredoxina, porque a pesar de que la reacción entre TR y Trx separadas es relativamente rápida ( $k_{cat}/K_M$  de 9-12 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>), así como también la reacción entre Trx y Tpx ( $k_{cat}/K_M$  de 3 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>), la propia molecularidad de las reacciones puede imponer una limitación cinética a causa de las concentraciones de las proteínas. El flujo de electrones puede verse limitado en situaciones donde haya diversos blancos disponibles para ser reducidos por la Trx. En este sentido, esta proteína de fusión que incorpora las

actividades enzimáticas TR, Trx y Tpx podría canalizar las reacciones de la vía, volviéndola específica y altamente eficiente.

## 6. REFERENCIAS

1. Vlamis-gardikas, A. The multiple functions of the thiol-based electron flow pathways of *Escherichia coli*: Eternal concepts revisited. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 1170–1200 (2008).
2. Bach, R. D., Dmitrenko, O. & Thorpe, C. Mechanism of thiolate-disulfide interchange reactions in biochemistry. *J. Org. Chem.* **73**, 12–21 (2008).
3. Mishra, S. & Imlay, J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Arch. Biochem. Biophys.* **525**, 145–160 (2012).
4. Baker, L. M. S. & Poole, L. B. Catalytic mechanism of thiol peroxidase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **278**, 9203–9211 (2003).
5. Williams, C. J. Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase, and mercuric ion reductase - a family of flavoenzyme transhydrogenases. in *Chemistry and Biochemistry of flavoenzymes, Vol III* (ed. Muller, F.) 121–211 (Boca Raton: CRC Press, 1992).
6. Argyrou, A. & Blanchard, J. S. Flavoprotein Disulfide Reductases: Advances in Chemistry and Function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **78**, 89–142 (2004).
7. Moore, E. C., Reichard, P. & Thelander, L. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. *J. Biol. Chem.* **239**, 3445–3 (1964).
8. Russel, M. & Model, P. Sequence of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**, 9015–9019 (1988).
9. Williams, C. H., Zanetti, J. G., Arscott, D. & McAllister, J. K. Lipoamide Dehydrogenase, Glutathione Reductase, Thioredoxin Reductase, and Thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **242**, 5226–5231 (1967).
10. Holmgren, A. Thioredoxin. The Amino Acid Sequence of the Protein from *Escherichia coli* B. *Eur. J. Biochem.* **6**, 475–484 (1968).
11. Lu, J. & Holmgren, A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic. Biol. Med.* **66**, 75–87 (2014).
12. Williams, C. H. J. *et al.* Thioredoxin reductase: Two modes of catalysis have evolved. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6110–6117 (2000).
13. Arnér, E. S. J. & Holmgren, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6102–6109 (2000).
14. Zhong, L., Arnér, E. S. J. & Holmgren, A. Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: The active site is a redox-active selenothiol/selenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5854–5859 (2000).
15. Stadtman, T. C. Selenocysteine. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 83–100 (1996).
16. Oliveira, M. A. *et al.* Insights into the Specificity of Thioredoxin Reductase-

- Thioredoxin Interactions. A Structural and Functional Investigation of the Yeast Thioredoxin System. *Biochemistry* **49**, 3317–3326 (2010).
17. Nordberg, J. & Arnér, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1287–1312 (2001).
  18. Holmgren, A. Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 237–271 (1985).
  19. Williams, C. H. J. Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *FASEB J.* **9**, 1267–1276 (1995).
  20. Kuriyan, J. *et al.* Convergent evolution of similar function in two structurally divergent enzymes. *Nature* **352**, 172–174 (1991).
  21. Waksman, G., Krishna, T. S. R., Williams, C. H. J. & Kuriyan, J. Crystal Structure of *Escherichia coli* Thioredoxin Reductase Refined at 2 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* **236**, 800–816 (1994).
  22. Lennon, B. W., Williams, C. H. J. & Ludwig, M. L. Crystal structure of reduced thioredoxin reductase from *Escherichia coli*: Structural flexibility in the isoalloxazine ring of the flavin adenine dinucleotide cofactor. *Protein Sci.* **8**, 2366–2379 (2008).
  23. Lennon, B. W. & Williams, C. H. J. Effect of Pyridine Nucleotide on the Oxidative Half-Reaction of *Escherichia coli* Thioredoxin Reductase. *Biochemistry* **34**, 3670–3677 (1995).
  24. Wang, P., Veine, D. M., Ahn, S. H. & Williams, C. H. J. A Stable Mixed Disulfide between Thioredoxin Reductase and Its Substrate, Thioredoxin: Preparation and Characterization. *Biochemistry* **35**, 4812–4819 (1996).
  25. Williams, C. H. J. Flavin-Containing Dehydrogenases. in *The Enzymes* 89–173 (1976).
  26. Prongay, A. J., Engelke, D. R. & Williams, C. H. J. Characterization of Two Active Site Mutations of Thioredoxin Reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**, 2656–2664 (1989).
  27. Baker, L. M., Raudonikiene, A., Hoffman, P. S. & Poole, L. B. Essential thioredoxin-dependent peroxiredoxin system from *Helicobacter pylori*: genetic and kinetic characterization. *J. Bacteriol.* **183**, 1961–1973 (2001).
  28. Lennon, B. W. & Williams, C. H. J. Reductive Half-Reaction of Thioredoxin Reductase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **36**, 9464–77 (1997).
  29. Eklund, H., Gleason, F. K. & Holmgren, A. Structural and Functional Relations Among thioredoxins of Different Species. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **11**, 13–28 (1991).
  30. Collet, J. & Messens, J. Structure, Function, and Mechanism of Thioredoxin Proteins. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 1205–1216 (2010).
  31. Thelander, L. & Reichard, P. Reduction of ribonucleotides. *Ann. Rev.*

- Biochem.* **48**, 133–158 (1979).
32. Holmgren, A. Thioredoxin and glutaredoxin isoforms. *J. Biol. Chem.* **264**, 13963–13966 (1989).
  33. Kern, R., Malki, A., Holmgren, A. & Richarme, G. Chaperone properties of *Escherichia coli* thioredoxin and thioredoxin reductase. *Biochem. J.* **371**, 965–972 (2003).
  34. Landino, L. M., Skreslet, T. E. & Alston, J. A. Cysteine oxidation of tau and microtubule-associated Protein-2 by Peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* **279**, 35101–35105 (2004).
  35. Messens, J. & Silver, S. Arsenate Reduction: Thiol Cascade Chemistry with Convergent Evolution. *J. Mol. Biol.* **362**, 1–17 (2006).
  36. Shioji, K. *et al.* Overexpression of thioredoxin-1 in transgenic mice attenuates adriamycin-induced cardiotoxicity. *Circulation* **106**, 1403–1409 (2002).
  37. Tanito, M., Masutani, H., Nakamura, H., Ohira, A. & Yodoi, J. Cytoprotective effect of thioredoxin against retinal photic injury in mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 1162–1167 (2002).
  38. Kang, S. W. *et al.* Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Biol Chem* **273**, 6297–6302 (1998).
  39. Zhang, P. *et al.* Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *J. Biol. Chem.* **272**, 30615–30618 (1997).
  40. Chae, H. Z., Kang, S. W. & Rhee, S. G. Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol.* **300**, 219–226 (1999).
  41. Lillig, C. H. *et al.* New thioredoxins and glutaredoxins as electron donors of 3'-phosphoadenylylsulfate PAPS reductase. *J. Biol. Chem.* **274**, 7695–7698 (1999).
  42. Schwenn, J. D., Krone, F. A. & Husmann, K. Yeast PAPS reductase: properties and requirements of the purified enzyme. *Arch. Microbiol.* **150**, 313–319 (1988).
  43. Huber, H. E., Tabor, S. & Richardson, C. C. *Escherichia coli* thioredoxin stabilizes complexes of bacteriophage T7 DNA polymerase and primed templates. *J. Biol. Chem.* **262**, 16224–16232 (1987).
  44. Russel, M. & Model, P. The role of thioredoxin in filamentous phage assembly. Construction, isolation, and characterization of mutant thioredoxins. *J. Biol. Chem.* **261**, 14997–15005 (1986).
  45. Feng, J. nong, Model, P. & Russel, M. A trans-envelope protein complex needed for filamentous phage assembly and export. *Mol. Microbiol.* **34**,

- 745–755 (1999).
46. Buchanan, B. B. Regulation of CO<sub>2</sub> assimilation in oxygenic photosynthesis: The ferredoxin/thioredoxin system. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 1–9 (1991).
  47. Hisabori, T. *et al.* Thioredoxin affinity chromatography: A useful method for further understanding the thioredoxin network. *J. Exp. Bot.* **56**, 1463–1468 (2005).
  48. Powis, G., Mustacich, D. & Coon, A. The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 312–322 (2000).
  49. Nakamura, T. *et al.* Redox Regulation of Lung Inflammation by Thioredoxin. *Antioxid. Redox Signal.* **7**, 60–71 (2005).
  50. Saitoh, M. *et al.* Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* **17**, 2596–2606 (1998).
  51. Bösl, M. R., Takaku, K., Oshima, M., Nishimura, S. & Taketo, M. M. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (*Trsp*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5531–4 (1997).
  52. Goto, Y., Noda, Y., Narimoto, K., Umaoka, T. & Mori, T. Oxidative stress on mouse embryo development in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* **13**, 47–53 (1992).
  53. Di Trapani, G., Perkins, A. & Clarke, F. Production and secretion of thioredoxin from transformed human trophoblast cells. *Mol. Hum. Reprod.* **4**, 369–75 (1998).
  54. Das, K. C., Guo, X. . & White, C. Induction of thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in lungs of newborn primates by oxygen. *Am. Physiol. Soc.* **276**, 530–539 (1999).
  55. Krause, G. & Holmgren, A. Substitution of the conserved -Tryptophan 31 in *Escherichia coli* thioredoxin by site-directed mutagenesis and structure-function analysis. *J. Biol. Chem.* **266**, 4056–4066 (1991).
  56. Wood, Z., Schröder, E., Harris, J. & Poole, L. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *TRENDS Biochem. Sci.* **28**, 32–40 (2003).
  57. Chamberlin, M. Isolation and characterization of prototrophic mutants of *Escherichia coli* unable to support the intracellular growth of T7. *J. Virol.* **14**, 509–516 (1974).
  58. Miranda-Vizueté, A., Damdimopoulos, A., Gustafsson, J. & Spyrou, G. Cloning, expression, and characterization of a novel *Escherichia coli* thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **272**, 30841–7 (1997).
  59. Collet, J., D'Souza, J., Jakob, U. & Bardwell, J. Thioredoxin 2, an oxidative stress-induced protein, contains a high affinity zinc binding site. *J. Biol.*

- Chem.* **278**, 45325–45332 (2003).
60. Hajjaji, He. *et al.* The zinc center influences the redox and thermodynamic properties of *Escherichia coli* thioredoxin 2. *J. Mol. Biol.* **386**, 60–71 (2009).
  61. Holmgren, A. & Söderberg, B. Crystallization and preliminary crystallographic data for thioredoxin from *Escherichia coli* B. *J. Mol. Biol.* **54**, 387–388 (1970).
  62. Holmgren, A., Soderberg, B., Eklund, H. & Branden, C. I. Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 2305–2309 (1975).
  63. Martin, J. L. Thioredoxin - a fold for all reasons. *Structure* **3**, 245–250 (1995).
  64. Fernandes, A. P. & Holmgren, A. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid. Redox Signal.* **6**, 63–74 (2003).
  65. Ladenstein, R. *et al.* Structure analysis and molecular model of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **134**, 199–218 (1979).
  66. Holmgren, A. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J. Biol. Chem.* **254**, 9627–9632 (1979).
  67. Holmgren, A. & Morgan, F. J. Enzymic reduction of disulfide bonds by thioredoxin. *Eur. J. Biochem.* **70**, 377–383 (1976).
  68. Blombäck, B. *et al.* Enzymatic reduction of disulfide bonds in fibrinogen by the thioredoxin system. *Thromb. Res.* **4**, 55–75 (1974).
  69. Savidge, G. *et al.* Reduction of factor VIII and other coagulation factors by the thioredoxin system. *Thromb. Res.* **16**, 587–599 (1979).
  70. Hessel, B. *et al.* Structure-function relationships of human factor VIII complex studied by thioredoxin dependent disulfide reduction. *Thromb. Res.* **35**, 637–651 (1984).
  71. Sugo, T., Björk, I., Holmgren, A. & Stenflo, J. Calcium-binding properties of bovine factor X lacking the  $\gamma$ -carboxyglutamic acid-containing region. *J. Biol. Chem.* **259**, 5705–5710 (1984).
  72. Holmgren, A. Reduction of disulfides by thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **254**, 9113–9119 (1979).
  73. Dillet, V., Dyson, H. J. & Bashford, D. Calculations of electrostatic interactions and pK<sub>a</sub>s in the active site of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* **37**, 10298–10306 (1998).
  74. Dyson, H. J., Tennant, L. L. & Holmgren, A. Proton-transfer in the active-site region of *Escherichia coli* thioredoxin using two-dimensional <sup>1</sup>H NMR. *Biochemistry* **30**, 4262–4268 (1991).

75. Harris, T. K. & Turner, G. J. Structural basis of perturbed pK<sub>a</sub> values of catalytic groups in enzyme active sites. *IUBMB Life* **53**, 85–98 (2002).
76. Winterbourn, C. C. & Metodiewa, D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 322–328 (1999).
77. Bulaj, G., Kortemme, T. & Goldenberg, D. P. Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry* **37**, 8965–8972 (1998).
78. Carvalho, A. T. P., Fernandes, P. A. & Ramos, M. J. Determination of the  $\Delta pK_a$  between the active site cysteines of thioredoxin and DsbA. *J. Comput. Chem.* **27**, 966–975 (2006).
79. Carvalho, A. T. P. *et al.* Mechanism of thioredoxin-catalyzed disulfide reduction. Activation of the buried Thiol and role of the variable active-site residues. *J. Phys. Chem. B* **112**, 2511–2523 (2008).
80. Chivers, P. T. & Raines, R. T. General acid/base catalysis in the active site of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* **36**, 15810–15816 (1997).
81. Dyson, H. J. *et al.* Effects of buried charged groups on cysteine thiol ionization and reactivity in *Escherichia coli* thioredoxin: structural and functional characterization of mutants of Asp 26 and Lys 57. *Biochemistry* **36**, 2622–2636 (1997).
82. Gleason, F. K. Mutation of conserved residues in *Escherichia coli* thioredoxin: effects on stability and function. *Protein Sci.* **1**, 609–616 (1992).
83. Kallis, G. B. & Holmgren, A. Differential reactivity of the functional sulfhydryl groups of cysteine-32 and cysteine-32 present in the reduced form of thioredoxin from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **255**, 10261–10265 (1980).
84. Roos, G. *et al.* How thioredoxin dissociates its mixed disulfide. *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000461 (2009).
85. Zeida, A. *et al.* The extraordinary catalytic ability of peroxiredoxins: a combined experimental and QM/MM study on the fast thiol oxidation step. *Chem. Commun.* **50**, 10070–10073 (2014).
86. Flohé, L., Toppo, S., Cozza, G. & Ursini, F. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 763–780 (2011).
87. Hall, A., Nelson, K., Poole, L. B. & Karplus, P. A. Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 795–815 (2011).
88. Hall, A., Sankaran, B., Poole, L. B. & Karplus, P. A. Structural changes common to catalysis in the Tpx peroxiredoxin subfamily. *J. Mol. Biol.* **393**, 867–881 (2009).
89. Soito, L. *et al.* PREX: PeroxiRedoxin classification indEX, a database of

- subfamily assignments across the diverse peroxiredoxin family. *Nucleic Acids Res.* **39**, 332–337 (2011).
90. Poole, L. B. & Nelson, K. J. Distribution and features of the six classes of peroxiredoxins. *Mol. Cells* **39**, 53–59 (2016).
  91. Schröder, E. & Ponting, C. P. Evidence that peroxiredoxins are novel members of the thioredoxin fold superfamily. *Protein Sci.* **7**, 2465–2468 (1998).
  92. Noguera-Mazon, V., Krimm, I., Walker, O. & Lancelin, J. M. Protein-protein interactions within peroxiredoxin systems. *Photosynth. Res.* **89**, 277–290 (2006).
  93. Hofmann, B., Hecht, H. & Flohé, L. Peroxiredoxins. *Biol. Chem.* **383**, 347–364 (2002).
  94. Wan, X. Y. *et al.* Scavengase p20: a novel family of bacterial antioxidant enzymes. *FEBS Lett.* **407**, 32–36 (1997).
  95. Cha, M., Kim, H. & Kim, I. Thioredoxin-linked ‘thiol-peroxidase’ from periplasmic space of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**, 28635–28641 (1995).
  96. Link, A. J., Robison, K. & Church, G. M. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis* **18**, 1259–1313 (1997).
  97. Tao, K. Subcellular localization and in vivo oxidation-reduction kinetics of thiol peroxidase in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **289**, 41–45 (2008).
  98. Noguera, M. E. *et al.* Structural variability of *E. coli* thioredoxin captured in the crystal structures of single-point mutants. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
  99. Bernal-Bayard, P., Hervaś, M., Cejudo, F. J. & Navarro, J. A. Electron transfer pathways and dynamics of chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase C (NTRC). *J. Biol. Chem.* **287**, 33865–33872 (2012).
  100. Wang, P. F., Marcinkeviciene, J., Williams, C. H. & Blanchard, J. S. Thioredoxin reductase - thioredoxin fusion enzyme from *Mycobacterium leprae*: comparison with the separately expressed thioredoxin reductase. *Biochemistry* **37**, 16378–16389 (1998).
  101. Wieles, B. *et al.* Unique gene organization of thioredoxin and thioredoxin reductase in *Mycobacterium leprae*. *Mol. Microbiol.* **16**, 921–929 (1995).
  102. Poole, L. B. & Ellis, H. R. Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. Purification and enzymatic activities of overexpressed AhpF and AhpC Proteins. *Biochemistry* **35**, 56–64 (1996).
  103. Wood, Z. A., Poole, L. B. & Karplus, P. A. Structure of intact AhpF reveals a mirrored thioredoxin-like active site and implies large domain rotations during catalysis. *Biochemistry* **40**, 3900–3911 (2001).

104. Rouhier, N. *et al.* Engineering functional artificial hybrid proteins between poplar peroxiredoxin II and glutaredoxin or thioredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 1300–1308 (2006).
105. Rouhier, N. & Jacquot, J. P. Molecular and catalytic properties of a peroxiredoxin-glutaredoxin hybrid from *Neisseria meningitidis*. *FEBS Lett.* **554**, 149–153 (2003).
106. Santos, J., Marino-Buslje, C., Kleinman, C., Ermácora, M. R. & Delfino, J. M. Consolidation of the thioredoxin fold by peptide recognition: interaction between *E. coli* thioredoxin fragments 1-93 and 94-108. *Biochemistry* **46**, 5148–5159 (2007).
107. Nelson, D. P. & Kiesow, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). *Anal. Biochem.* **49**, 474–478 (1972).
108. Ellis, K. J. & Morrison, J. F. Buffer of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. *Methods Enzymol.* **87**, 405–426 (1982).
109. Malcolm, A. D. B. Temperature dependence of the spectroscopic properties of NADH. *Methods Enzymol.* **66**, 8–11 (1980).
110. Grassetti, D. R. & Murray, J. F. J. Determination of sulfhydryl groups with 2,2' - or 4,4'-dithiodipyridine. *Arch. Biochem. Biophys.* **119**, 41–49 (1967).
111. Gasteiger, E. *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. in *The proteomics protocols handbook* (ed. Walker, J. M.) 571–607 (Humana Press, 2005).
112. Artimo, P. *et al.* ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* **40**, W597–W603 (2012).
113. Edelhoch, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* **6**, 1948–1954 (1967).
114. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411–2423 (1995).
115. Gill, S. C. & Hoppel, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319–326 (1989).
116. Massey, V. The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 283–296 (2000).
117. Holmgren, A. Tryptophan fluorescence study of conformational transitions of the oxidized and reduced form of thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **247**, 1992–1998 (1972).

## 7. AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Gerardo Ferrer-Sueta, por permitirme realizar la tesina en su laboratorio, por guiarme en mis primeros pasos en la ciencia y por todo lo que me ha enseñado.

A Stephanie Portillo y Javier Santos por ayudarme con la purificación de la proteína.

A todos los integrantes de los laboratorios de Fisicoquímica Biológica y Enzimología, por generar un ambiente tan lindo de trabajo y por siempre darme una mano.

A mis compañeros y amigos de la carrera, de quienes me llevo los más lindos recuerdos. Especialmente gracias a mis grandes amigos Santi y Pau por lo compartido en estos años.

A los integrantes del Depto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina, por todo lo que he aprendido en este último año. Especialmente gracias a Seba y Ale por la gran ayuda con la discusión de resultados.

Al Call center y adeptos: Gabi, Flo, Ine, Nico, Jenny, Santi, Caro, Clarita, Nikito, Fefa, Mauri y Mechi gracias por todo! Por acompañarme y aconsejarme en la escritura.

A mi familia y amigos, a mis padres por incentivarme a que estudie lo que me gusta y a mis hermanas Ine y Juli por su confianza en mí.

Finalmente, gracias a CSIC y CABBIO por la financiación del proyecto en el cual se enmarcó este trabajo.