



Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
Subárea Bioquímica
Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Caracterización funcional y estructural de Prx1 humana; parámetros diferenciales con Prx2

Lic. Joaquín Dalla Rizza Aishemberg

Directora: Dra. Ana Denicola

Laboratorio de Físicoquímica Biológica
Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Noviembre 2018, Montevideo, Uruguay

Agradecimientos

A Ana Denicola por permitirme realizar la tesis en el laboratorio de Fisiología Biológica, y por su dedicación y paciencia en las discusiones y correcciones durante el transcurso de la misma, sobre todo en la etapa final de escritura.

A todos los compañeros de los laboratorios de Fisiología Biológica y Enzimología por toda la ayuda brindada durante estos años y por estar siempre a disposición para dar una mano, desde la parte experimental hasta la discusión de resultados en las reuniones de los miércoles. En particular tengo que agradecer a Lía Randall y a Gerardo Ferrer-Sueta, que fueron fundamentales en mi aprendizaje de varias de las técnicas utilizadas, y en la planificación de experimentos y discusión de resultados.

A las agencias financiadoras, la Comisión Académica de Posgrados de la Universidad de la República, la Comisión Sectorial de Investigación Científica, y el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas.

Por último, a mi familia y amigos por todo su apoyo durante estos años, especialmente a Mechi por su paciencia y por el apoyo durante todo el proceso.

Contenido

Contenido	3
Resumen.....	7
1) Introducción	8
a) Peroxirredoxinas	8
i) Definición y breve reseña histórica sobre su descubrimiento	8
ii) Ciclo catalítico y clasificación	10
iii) Estructura terciaria y oligomerización	13
iv) Sobreoxidación.....	16
b) Bioquímica de peróxidos biológicos.....	19
i) Peróxido de hidrógeno.....	19
ii) Peroxinitrito	21
c) Señalización Redox.....	24
i) H ₂ O ₂ como segundo mensajero	24
d) Peroxirredoxinas humanas.....	28
i) Prx1 vs. Prx2	29
2) Objetivos	31
3) Materiales y métodos	32
a) Reactivos y materiales.....	32
b) Procedimientos generales.....	32
i) Medidas espectroscópicas	32
ii) Cuantificación de proteínas	33
iii) Cuantificación de peróxidos.....	33
iv) Cuantificación de tioles proteicos.....	34
v) Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	34
vi) Western Blot	34
c) Proteínas recombinantes	34
i) Diseño de plásmidos para expresión de Prx1 y Prx2 humanas recombinantes.....	34
ii) Expresión y purificación de proteínas recombinantes.....	35
(I) Prx con Histag (Prx1 y Prx2)	35
(II) Prx1 construcción sin Histag.....	36
(III) Proteasa del virus del grabado del tabaco (TEVp)	37

(IV)	Tiorredoxina 1 de <i>E. coli</i> (<i>EcTrx1</i>)	38
(V)	Tiorredoxina Reductasa de <i>E. coli</i> (<i>EcTR</i>)	39
iii)	Reducción de Prx y oxidación controlada del sitio catalítico de Prx a disulfuro	39
iv)	Medidas de actividad de Prx	40
(I)	Ensayo de actividad peroxidasa con sistema acoplado Prx- <i>EcTrx1</i> - <i>EcTR</i>	40
(II)	Reducción de H ₂ O ₂ por Prx seguida por fluorescencia en Stopped Flow.....	40
v)	Actividad peroxinitrito reductasa.....	41
(I)	Ensayo de competencia con HRP	41
(II)	Registros temporales de cambio de fluorescencia intrínseca de Prx1 y Prx2 por oxidación con peroxinitrito	42
vi)	Nitración de Prx con peroxinitrito.....	43
4)	Resultados y discusión	45
a)	Purificación de proteínas recombinantes	45
i)	Prx1 y Prx2 con Histag	45
ii)	Prx1 expresada sin Histag.....	49
b)	Caracterización de la cinética de reacción con H ₂ O ₂	51
i)	Consumo de H ₂ O ₂ en catálisis de Prx1 y Prx2	51
ii)	Espectros de emisión de fluorescencia según el estado redox del sitio catalítico	52
iii)	Espectros de dicroísmo circular (CD) diferenciales en el UV cercano.....	53
iv)	Determinación de constantes cinéticas para la reacción con H ₂ O ₂	54
v)	Constante de sobreoxidación.....	57
vi)	Susceptibilidad a la sobreoxidación por H ₂ O ₂	59
c)	Prx1 y peroxinitrito.....	62
i)	Actividad peroxinitrito reductasa.....	62
(I)	Determinación de la constante de reacción de reducción de peroxinitrito por Prx1 en ensayo de competencia con HRP	63
(II)	Determinación de la constante de reacción de Prx1 y Prx2 con peroxinitrito por fluorescencia.	65
ii)	Efecto del peroxinitrito en la actividad peroxidasa de Prx1.	69
5)	Conclusiones y perspectivas.....	73
6)	Bibliografía	76

Abreviaturas

AhpC	Alquilhidroperóxido reductasa C
ASK1	Quinasa reguladora de la señal de la apoptosis 1
CD	Dicroísmo circular
C _p	Cisteína peroxidática
C _R	Cisteína resolutive
DEAE	Dietilaminoetil
DTDPy	4,4'-Ditiodipiridina
dtpa	Ácido dietilentriaminopentaacético
DTT	Ditiotreitol
EcTR	Tiorredoxina reductasa de E. coli
EcTrx	Tiorredoxina 1 de E. coli
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epitelial
FF	Completamente plegada
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GPx1	Glutación peroxidasa 1
GSH	Glutación
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HIF-1a	Factor 1-alfa inducible por hipoxia
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IAM	Iodoacetamida
IFN-g	Interferón gamma
IMAC	Cromatografía de afinidad a metal no inmovilizado
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
LPS	Lipopolisacárido
LU	Localmente desplegada
MMS	S-metil metanetiosulfonato
NaPi	Fosfato de sodio
NO ₂ Y	Nitrotirosina
NOX	NADPH oxidasa
ONOOH	Peroxinitrito
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Prx	Peroxirredoxina
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
ROOH	Alquilhidroperóxido
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante
SH	Tiol
SOH	Ácido sulfénico
SO ₂ H	Ácido sulfínico

TEVp
TNF- α
TSA
WB
SEC

Proteasa del virus del grabado del tabaco
Factor de necrosis tumoral alfa
Antioxidante específico de tioles
Western blot
Cromatografía de exclusión molecular

Resumen

Las peroxirredoxinas son peroxidases dependientes de tioles que participan en la eliminación de peróxidos y en señalización redox celular. De las 6 isoformas que se expresan en humanos, las peroxirredoxinas citosólicas Prx1 y Prx2 presentan 97% similitud de secuencia (77% identidad), pero presentan distintas funciones biológicas. Ambas pertenecen a la clase 2-Cys Prx típicas donde la cisteína peroxidática (C_P) oxidada a sulfénico por el peróxido sustrato (paso de oxidación), reacciona con la cisteína resolutive (C_R) de otra subunidad formando un disulfuro intermolecular (paso de resolución) que luego vuelve a la enzima activa reducida (paso de reducción) en general por el sistema tioredoxina/tioredoxina reductasa a expensas de NADPH.

En este trabajo se purificaron Prx1 y Prx2 recombinantes humanas y se hizo particular énfasis en la caracterización cinética de las reacciones de oxidación, cierre de disulfuro, y sobreoxidación de estas enzimas por los sustratos peróxido de hidrógeno y peroxinitrito. Dicha caracterización se realizó principalmente siguiendo los cursos temporales de oxidación a través de los cambios en la fluorescencia intrínseca de estas proteínas. Además, se estudió el efecto del peroxinitrito en la actividad peroxidasa y la susceptibilidad a la sobreoxidación de Prx1, de manera comparativa a lo previamente reportado en la literatura para Prx2.

La C_P de ambas proteínas tiene alta especificidad por reducir H_2O_2 (ca $10^8 M^{-1}s^{-1}$, 10 veces más rápido que con peroxinitrito) pero se diferencian en el siguiente paso de resolución. El cierre del disulfuro de Prx2 es más de un orden de magnitud más lento, habilitando la posible reacción de sobreoxidación o formación de disulfuro mixto con otros tioles proteicos. Esta "pausa cinética" abre diferentes caminos en la señalización redox para estas dos isoformas. La vida media más larga del sulfénico de Prx2 le permite reaccionar con otros tioles proteicos para transmitir la señal (vía disulfuro mixto con la C_P), mientras que Prx1 continúa el ciclo y transmite la señal vía disulfuro con la C_R . Además, la presencia de la C83 en Prx1 (ausente en Prx2) afecta diferencialmente la actividad peroxidasa luego de la exposición a peroxinitrito.

1) Introducción

a) Peroxirredoxinas

Ya que esta tesis se centra en la caracterización de dos peroxirredoxinas, en este capítulo se define a esta familia de proteínas, su clasificación, y se desarrollan algunas de sus propiedades bioquímicas más características como su ciclo catalítico, estructura terciaria y cuaternaria.

i) **Definición y breve reseña histórica sobre su descubrimiento**

Las peroxirredoxinas (Prx; EC 1.11.1.15) son una gran familia de proteínas altamente conservadas a lo largo de la evolución, que se expresan en archeas, bacterias y organismos eucariotas [1, 2]. Su principal atributo es que son enzimas oxidoreductasas del tipo peroxidasa, con la capacidad de reducir peróxido de hidrógeno (H_2O_2), alquil hidroperóxidos (ROOH) y peroxinitrito¹ (ONOOH), con la particularidad de que su acción catalítica la logran a través de un mecanismo basado exclusivamente en cisteínas de su secuencia primaria, sin la participación de ningún cofactor [3].

La caracterización bioquímica y funcional de esta familia de enzimas comenzó alrededor de la década del 90, luego de que en el año 1988 Kim y colaboradores purificaran por primera vez una proteína de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con un peso molecular alrededor de los 27 kDa, con la capacidad de proteger a la glutamina sintetasa de la inactivación por especies reactivas del oxígeno (ROS por su sigla en inglés) [4]. Su diseño experimental para evaluar la capacidad antioxidante de esta proteína, implicó la utilización de un sistema generador de ROS compuesto por Fe^{+3} , ditioneitol (DTT) y oxígeno, el cual genera radicales libres por reacción de Fenton (descrita más adelante). Al observar que la sustitución del DTT por un dador de electrones no tiólico conduce a la pérdida de la capacidad protectora de esta nueva proteína, los autores propusieron que la enzima actuaba removiendo especies reactivas azufradas (como RS^{\bullet} , $RSSR^{\bullet-}$, o $RSOOH$), por lo que la denominaron proteína antioxidante tiol-específica (TSA por la sigla en inglés). Casi al mismo tiempo, se publicaban trabajos sobre la identificación y caracterización de genes presentes en las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* cuya expresión se ve aumentada por acción de OxyR, un

¹ El término peroxinitrito refiere a la mezcla de anión peroxinitrito ($ONOO^-$) y ácido peroxinitroso ($ONOOH$); la nomenclatura recomendada por IUPAC es oxoperoxinitrato e hidrógeno peroxonitrato respectivamente

factor de transcripción activado por H_2O_2 [5]. La purificación de una de las proteínas reguladas por OxyR llevó a la identificación de la proteína AhpC, denominada así por su nombre en inglés *Alkyl hydroperoxide reductase*, la cual reduce alquil hidroperóxidos con alta eficiencia a expensas del poder reductor de NADH o NADPH [6].

En los años 1993 y 1994 se publicaron una serie de trabajos que marcaron un hito para la definición de las peroxirredoxinas como familia de proteínas antioxidantes. El primero de estos trabajos logra identificar el gen que codifica para la proteína TSA [7], lo cual llevó a la observación de la homología entre la proteína de levadura, la AhpC de *E. coli*, y más de 25 proteínas identificadas en organismos de todos los reinos [8]. El análisis de las secuencias de este grupo de proteínas reveló la presencia de dos cisteínas altamente conservadas, las cuales pueden formar un enlace disulfuro de manera cruzada entre dos subunidades, estando implicado por tanto en la dimerización de la proteína. Además, una de estas cisteínas (C47 en TSA) es indispensable para la actividad peroxidasa de la enzima [9]. Finalmente, se propuso un mecanismo por el cual la TSA ejerce su acción protectora, identificando al H_2O_2 y a los alquil hidroperóxidos como sustratos reducidos por la enzima, y al sistema tiorredoxina-tiorredoxina reductasa como reductor de TSA [10]. Por lo tanto, en este último trabajo se propone por primera vez un mecanismo catalítico para TSA, que se resumiría en que el peróxido es reducido por el tiol de la C47, el cual se oxida a ácido sulfénico. Este sulfénico reacciona con la segunda cisteína conservada, la C170 de la otra subunidad del dímero, para formar un disulfuro intermolecular. La enzima se recicla por la reducción del disulfuro entre C47 y C170 a través del sistema tiorredoxina-tiorredoxina reductasa, que usa NADPH como fuente de equivalentes de reducción. Este mecanismo significó un cambio de paradigma respecto a las peroxidases caracterizadas hasta ese momento, cuya acción redox se ejecuta a través de algún metal, grupo hemo, flavina, o selenocisteína. El nuevo mecanismo propuesto para la TSA es independiente de estos centros redox convencionales, utilizando directa y exclusivamente una cisteína proteica. Con el transcurso del tiempo más proteínas de esta familia fueron identificadas y caracterizadas en distintos organismos, y su nomenclatura se fue tornando heterogénea y confusa, pero finalmente se propuso el nombre peroxirredoxina, el cual hoy es aceptado y utilizado por la comunidad científica [8].

ii) Ciclo catalítico y clasificación

Todas las Prx tienen en su secuencia primaria el motivo conservado P-XXX-(T/S)-XX-C en su dominio N-terminal (en la mayoría de los casos el 5° residuo del motivo es una treonina, siendo el uso de serina menos frecuente), y una arginina hacia el C-terminal. Según la secuencia de Peroxirredoxina 2 humana, serían Pro44, Thr48, Cys52 y Arg127 que se encuentran cercanos espacialmente entre sí, y que constituyen el sitio catalítico altamente especializado en la reducción de peróxidos (figura 1) [11-14]. El tiol de la cisteína presente en este motivo es el que interviene directamente en la reducción de peróxido, por lo que se denomina a este residuo cisteína peroxidática (C_p).

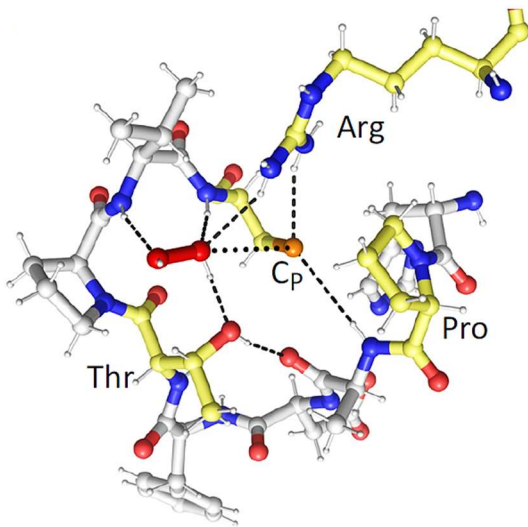


Figura 1. Sitio catalítico universal de las Prx. Se muestran coloreados los cuatro residuos determinantes para la actividad peroxidasa de estas enzimas. En rojo se representa una molécula de H_2O_2 , y en líneas punteadas los enlaces de hidrógeno clave en la reacción de reducción. Tomado de [3]

El ciclo catalítico de la actividad peroxidasa puede ser dividido en tres grandes pasos denominados oxidación, resolución y reducción (figura 2) [2].

El primer paso denominado oxidación, consiste en la reducción del peróxido con la consecuente oxidación del tiol de la C_p , generando como producto una molécula de agua y el ácido sulfénico sobre la C_p . Si bien este paso oxidativo del ciclo catalítico es común a todas las peroxirredoxinas, la siguiente etapa, la resolución del sulfénico de la C_p , varía de acuerdo a motivos estructurales particulares de las Prx, por lo que se propuso clasificar a estas proteínas según esta característica [8, 13, 15]. Esta clasificación divide a las Prxs en tres grandes grupos: peroxirredoxinas de una cisteína (1-Cys Prx), peroxirredoxinas de dos cisteínas típicas (2-Cys Prx típicas), y peroxirredoxinas de dos cisteínas atípicas (2-Cys Prx atípicas).

Las primeras peroxirredoxinas identificadas y caracterizadas pertenecen al grupo de las 2-Cys Prx típicas (AhpC de *E. coli* y de *Salmonella typhimurium*, y TSA de *Saccharomyces cerevisiae*). En estas

proteínas, a la formación del ácido sulfénico en la C_P le sucede la formación de un disulfuro con una segunda cisteína, denominada cisteína resolutive (C_R) ubicada en el dominio C-terminal de la proteína. Particularmente en las 2-Cys Prx típicas, el disulfuro que se forma entre la C_P y la C_R ocurre entre cadenas polipeptídicas diferentes, lo cual implica que su unidad catalítica mínima sea un dímero [13]. En el caso de las 2-Cys Prx atípicas, se forma el disulfuro entre la C_P y la C_R de la misma subunidad, o sea un disulfuro intramolecular. Las C_R de las 2-Cys Prx típicas y atípicas no están conservadas en la secuencia entre sí, pero cumplen funciones equivalentes [13]. Por último, las 1-Cys Prx son peroxidoxinas que no presentan una C_R en su secuencia, por lo que el ácido sulfénico de la C_P debe resolverse por interacción con otros reductores, como ácido ascórbico o glutatión (GSH) [16, 17].

Volviendo al ciclo catalítico, el último paso del mismo corresponde al reciclado de la enzima, retornándola a su estado redox activo (tiol o tiolato en la C_P). El disulfuro formado sobre la C_P es reducido por una tioredoxina, o alguna proteína o dominio tioredoxina-like, como es el caso de la AhpF de bacterias.

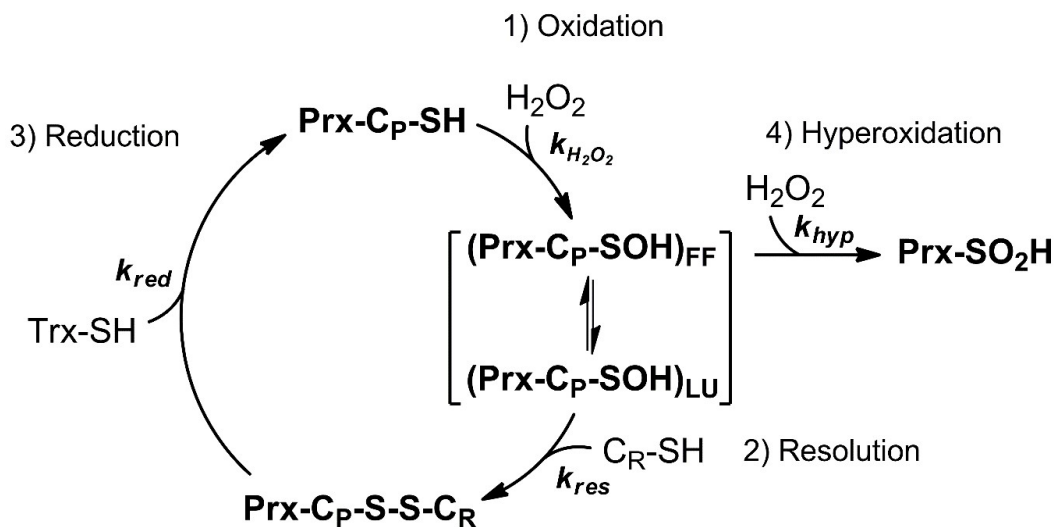


Figura 2. Ciclo catalítico de reducción de peróxido por las 2-Cys Prx. 1) Oxidación. La reacción del tiol de la C_P por peróxido (H_2O_2 en este ejemplo) produce ácido sulfénico en la C_P . **2) Resolución.** Formación de disulfuro entre la C_P y la C_R (intermolecular en el caso de las típicas, intramolecular en el caso de las atípicas). **3) Reducción.** La tioredoxina reduce el disulfuro para completar el ciclo. **4) Sobreoxidación.** Reacción del ácido sulfénico de la C_P con una segunda molécula de peróxido, formando ácido sulfínico. Esta modificación lleva a la pérdida de actividad peroxidasa. Para cada paso, se representa su constante cinética asociada. Entre corchetes se representa el cambio conformacional entre FF y LU (ver texto).

Un detalle importante del ciclo catalítico, es que durante su transcurso todas las Prx presentan cambios estructurales importantes a nivel del sitio activo. En particular, transitan por dos conformaciones concretas denominadas “completamente plegada” (FF por *fully folded*) y “localmente desplegada” (LU, por *locally unfolded*) [13, 18, 19]. En la conformación FF, la C_P se encuentra en el fondo de un bolsillo de la estructura, rodeada de los residuos que conforman el sitio activo, en la configuración más favorable para la reacción con el sustrato [20]. Esta conformación, presenta a las C_P y C_R alejadas entre sí en la estructura, a una distancia alrededor de los 14 Å (figura 3, panel de la izquierda). Por lo tanto, la conformación FF es incompatible con la formación de un enlace disulfuro entre ambos residuos. Sin embargo, la formación de ácido sulfénico en la C_P por la reducción de una molécula de peróxido, favorece un cambio conformacional que implica como mínimo el desplegamiento de una vuelta de la hélice α que contiene la C_P [20, 21] (se detalla más adelante, cuando se hable de estructura), de manera que la acerca a la C_R , dando la oportunidad a que se forme el disulfuro (figura 3, panel de la derecha). Esta conformación es la denominada LU. Cuando la C_P está en forma de tiolato, las conformaciones FF y LU se encontrarían en equilibrio dinámico, pero la formación del disulfuro bloquea la configuración de la proteína en la forma LU [3].

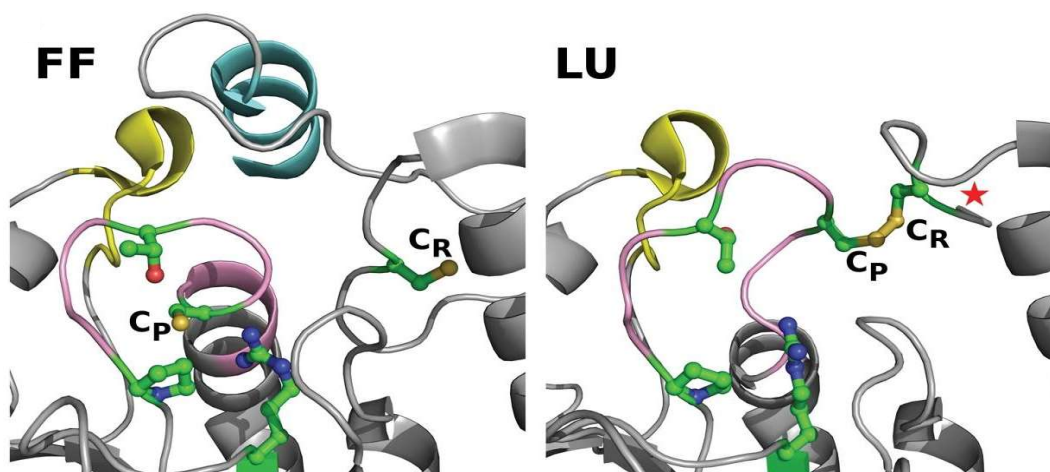


Figura 3. Comparación estructural de las conformaciones FF y LU. En el panel de la izquierda se muestra la estructura del sitio catalítico de la Prx2 humana en la conformación FF (PDB ID: 1QMV), donde las C_P y C_R se encuentran alejadas, a una distancia incompatible con la formación del disulfuro. A la derecha se muestra en la misma orientación la estructura del sitio catalítico de la Prx2 de rata oxidada a disulfuro (PDB ID: 1QQ2). La estrella roja indica que la cadena peptídica continúa, pero no pudo ser resuelta en el modelo. Adaptado de [2].

Por último, vale la pena retomar la clasificación de las Prx. Por una cuestión de practicidad, se comentó durante la descripción del ciclo catalítico su clasificación según el mecanismo en Prx 1-Cys, 2-Cys típicas y 2-Cys atípicas. Si bien esta clasificación es válida según el mecanismo catalítico de todas las Prx, este criterio lleva a agrupar proteínas con distintas características estructurales dentro de una misma subfamilia. En 2011 se propuso una nueva clasificación a partir de un análisis bioinformático por alineamiento de secuencias, utilizando la información estructural disponible hasta ese momento [12], lo cual junto a datos bioquímicos llevó a determinar los motivos estructurales y las propiedades que hacen a la identidad de las 6 subfamilias discriminadas según este criterio [20]. Estas subfamilias se denominan Prx1, Prx6, Prx5, Tpx, PrxQ (también denominada BCP) y AhpE. La presencia de genes de las distintas subfamilias de Prxs se distribuye de manera desigual en los distintos organismos. Por ejemplo, las Prx clasificadas como Tpx y AhpE se expresan casi exclusivamente en bacterias, siendo estos organismos los únicos en los cuales se expresan todas las subfamilias. En contraste, los animales superiores expresan solamente peroxirredoxinas de las subfamilias Prx1, Prx5, y Prx6 [12]. En humanos se expresan 6 isoformas, denominadas Prx1, Prx2, Prx3, Prx4 (todas pertenecientes a la subfamilia Prx1), Prx5 y Prx6 (estas dos últimas pertenecen cada una a su subfamilia homónima) [3].

iii) Estructura terciaria y oligomerización

Desde el punto de vista de su estructura terciaria, las peroxirredoxinas son proteínas globulares que presentan un plegamiento espacial sumamente conservado del tipo tiorredoxina [1]. Este plegamiento implica un núcleo (o core) compuesto por 5 hojas β antiparalelas (β_5 - β_4 - β_3 - β_6 - β_7), rodeado por un motivo β_1 - β_2 - α_1 y la hélice α_4 de un lado de la lámina, y cubierto por las hélices α_2 , α_3 y α_5 hacia la otra cara (figura 4) [20]. Las inserciones que difieren entre las distintas Prx se encuentran generalmente en los extremos N- y C-terminal, y en loops entre los elementos de estructura secundaria conservada [20].

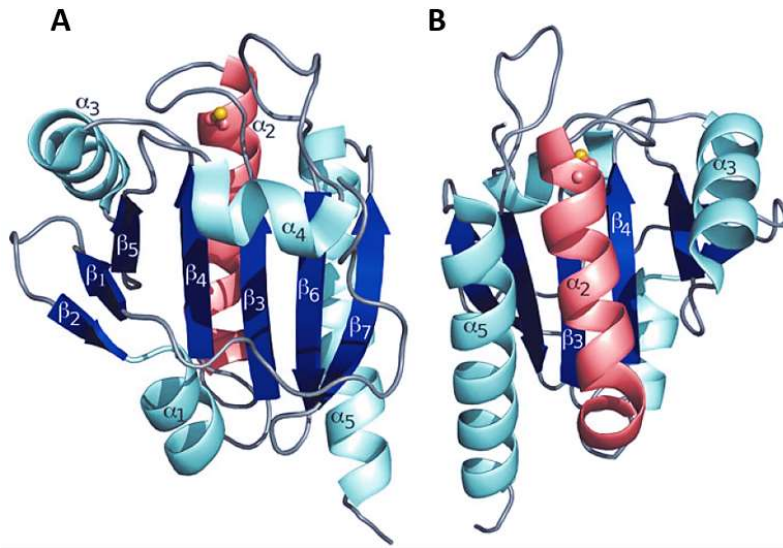


Figura 4. Plegamiento de la estructura secundaria de las Prx.

A) Se muestra la distribución espacial de los elementos de estructura secundaria común a todas las Prx. Las hojas β se representan en azul, y las hélices α se presentan en celeste y rosado. La C_p se muestra por representación de bastones y esferas, con el átomo de azufre en color amarillo. **B)** representación en **A)** visualizada desde un giro de 180° en el eje y. Editado de [20].

Según la topología genérica de las Prx, en FF (conformación en la que la C_p reacciona con el sustrato) la C_p se encuentra siempre en la primera vuelta de α_2 y su estructura terciaria está altamente conservada. La transición a la conformación LU (la conformación en la cual se forma el disulfuro entre la C_p y la C_R) implica siempre por lo menos el desenrollamiento de esta primera vuelta de hélice, sacando a la C_p del fondo del bolsillo del sitio activo, dejándola más expuesta al solvente. La estructura en LU no es tan conservada como en FF, ya que la amplitud del cambio conformacional va a depender de la ubicación de la C_R , la cual puede encontrarse hasta en 5 posiciones diferentes dependiendo del tipo de Prx [11]. Particularmente en las 2-Cys Prx típicas, el cambio de FF a LU implica además algún cambio conformacional en la región de la C_R .

Con respecto a la oligomerización de estas enzimas, la norma es que formen dímeros, siendo la excepción algunas proteínas de la subfamilia BCP (PrxQ) que fueron caracterizadas como monómeros [21]. La oligomerización se puede dar por dos superficies distintas denominadas superficie A y superficie B. Las Prx que dimerizan a través de la superficie B, interactúan por medio de las láminas β del core en un dímero cabeza cola, donde las láminas se alinean formando una especie de lámina continua de 10 hojas β (se llama superficie B en referencia a la interacción por las láminas β). Además, estas Prx poseen una extensión C-terminal que se extiende sobre el sitio activo de la subunidad adyacente, reforzando la interacción. La mayoría de las Prx que dimerizan a través de la superficie B, forman estructuras oligoméricas más complejas, ensamblando los dímeros en un decámero con forma toroidal (en casos puntuales pueden formarse dodecámeros), lo que es equivalente a decir que se forma un pentámero de dímeros (figura 5). Los dímeros dentro del

decámero, interactúan por medio de la superficie A, que es la otra superficie por la cual se pueden formar dímeros de Prx. La dimerización a través de la superficie A ocurre por interacción de motivos externos a la lámina β central, que serían las hojas $\beta 1$ y $\beta 2$, y las hélices $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$ (figura 4). Esta superficie se denominó originalmente A, por ser considerada una superficie de dimerización “alternativa”, ya que las primeras estructuras resueltas mostraban la dimerización a través de la superficie B. Las Prxs de las subfamilias Prx5, y Tpx solamente forman dímeros del tipo superficie A, y las de la subfamilia PrxQ, o forman dímeros de este tipo, o son monoméricas [3, 20, 21].

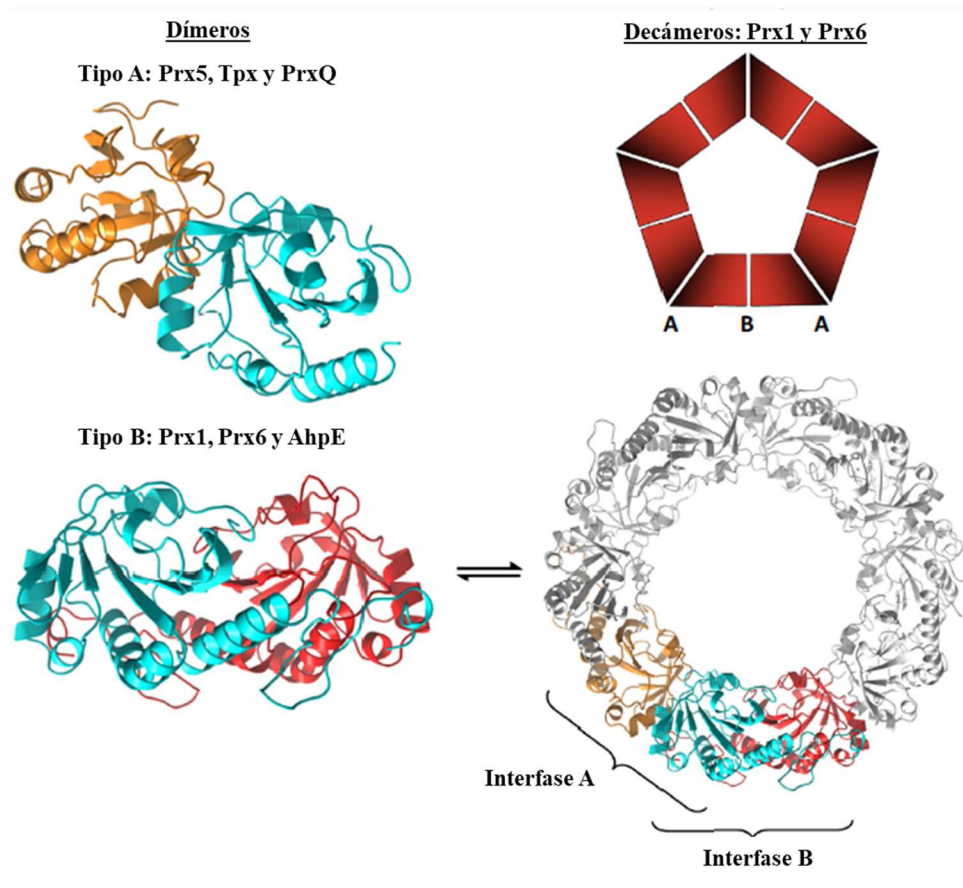


Figura 5. Superficies de oligomerización de las Prx. A la izquierda se muestran caricaturas de las estructuras de dímeros formados por interacción a través de la superficie A (arriba) y a través de la superficie B (abajo). A la derecha se esquematizan decámeros, ensamblados a partir de dímeros del tipo B, que interactúan por la superficie A, formando un pentámero de dímeros

iv) Sobreoxidación

El ciclo catalítico de las peroxirredoxinas puede verse interrumpido por la sobreoxidación de la cisteína peroxidática. Como se muestra en la figura 2, además de la resolución por formación del disulfuro con la C_R (o un antioxidante de bajo peso molecular para las 1-Cys Prx), el ácido sulfénico en la C_P puede seguir por un segundo camino (figura 2, reacción 4)) que implicaría la reducción de una segunda molécula de peróxido, liberando una molécula de agua, y formando ácido sulfínico sobre la C_P. A esta modificación de la C_P se le denomina sobreoxidación (o hiperoxidación, o incluso sulfinilación), y tiene como consecuencia la pérdida de la actividad peroxidasa, ya que bloquea a la C_P en ese estado de oxidación inactivo, que además no puede ser reducida por la tiorredoxina [22].

Si bien esta inactivación es potencialmente posible en todas las peroxirredoxinas, la frecuencia o facilidad con la que ocurre dicha modificación no es común a todas ellas. Tal es así, que en la literatura es común encontrar la distinción entre peroxirredoxinas sensibles (o susceptibles) y peroxirredoxinas robustas [23], donde las primeras se sobreoxidán en presencia de concentraciones bajas de peróxido (en el orden μM) y se encuentran principalmente en organismos eucariotas, mientras que las últimas necesitan altas concentraciones de sustrato para inactivarse (en el orden mM), y serían más características de los organismos procariotas. El análisis bioinformático de secuencias, y la elucidación de estructuras por cristalografía de rayos X y NMR, permitió la identificación de motivos estructurales diferenciales entre peroxirredoxinas robustas y sensibles, que explican en parte dichas diferencias funcionales [24]. La susceptibilidad a la sobreoxidación se atribuyó entonces a la presencia de dos motivos estructurales hacia el extremo C-terminal, el motivo YF, y el motivo GGLG. Como se muestra en la figura 6, cuando el sitio activo de la Prx se encuentra en la conformación FF (conformación en la cual la C_P reacciona con el sustrato y se oxida a ácido sulfénico), los residuos YF cubren la hélice α_2 , donde se encuentra la C_P, dificultando el desenrollamiento de la misma, el cual es necesario para progresar a la conformación LU. Por lo tanto, la presencia de los motivos YF y GGLG imponen una pausa en la conformación FF, que tiene como consecuencia que el ácido sulfénico sobre la C_P tenga mayor probabilidad de encontrarse y reaccionar con una segunda molécula de peróxido, llevando así a su inactivación.

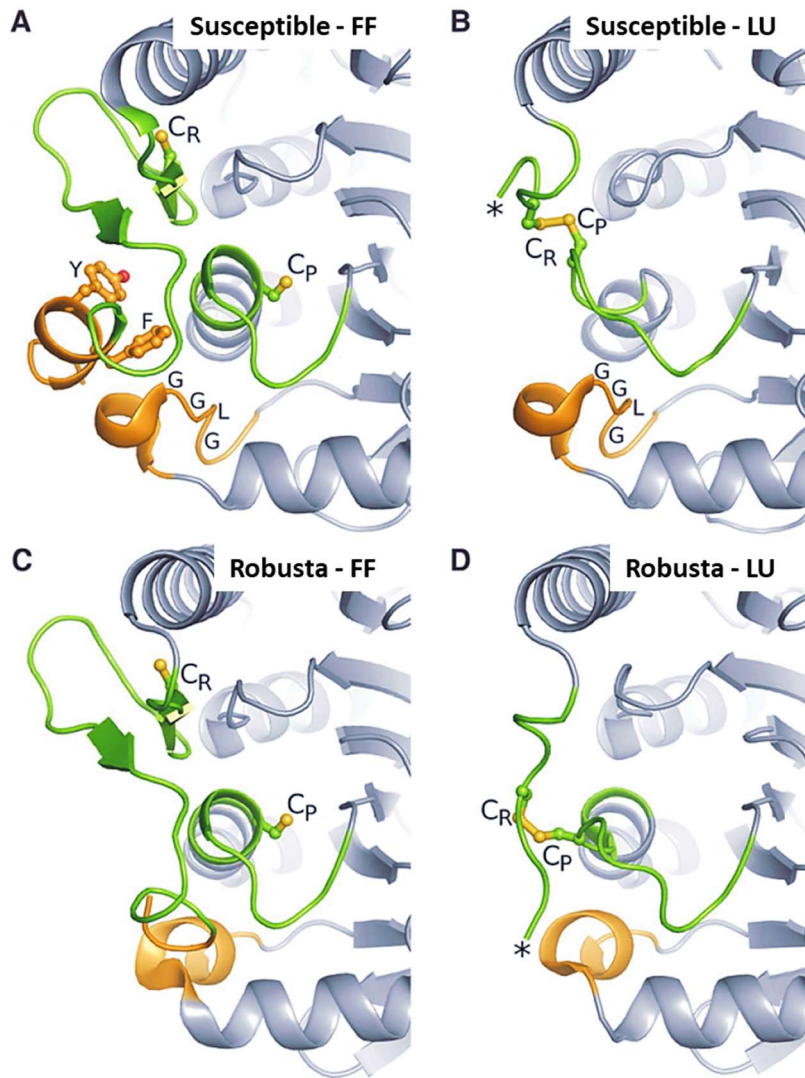


Figura 6. Los motivos YF y GGLG marcan la diferencia entre Prx susceptibles y Prx robustas a la sobreoxidación. En A y B se muestra la estructura de una Prx susceptible a nivel del sitio catalítico, en las conformaciones FF y LU respectivamente. En A se muestra como el loop del motivo YF bloquea al sitio activo, estorbando la transición a LU. En C y D se muestran estructuras equivalentes de una Prx robusta, también en las conformaciones FF y LU. En verde se representan las regiones cercanas a las C_P y C_R, y en dorado en el panel de arriba se representan las regiones de los motivos YF y GGLG.

A su vez, al menos dentro de las Prx susceptibles, existen distintos grados de sensibilidad [25-27]. En junio de este año, Bolduc y colaboradores realizaron estudios estructurales y funcionales que los llevaron a la determinación de nuevos motivos, externos a los YF y GGLG ya mencionados, que modulan más finamente la susceptibilidad a la sobreoxidación [28].

Como regla general, se acepta que los organismos procariontes poseen Prx robustas, y que los organismos eucariotas poseen Prx susceptibles. Como todo en biología, existen excepciones a esta regla, ya que se encontraron organismos procariontes que expresan Prxs sensibles con los motivos YF y GGLG en su secuencia [29]. De todas maneras, la aparición tardía en la evolución de estos motivos estructurales que retienen a la proteína en la conformación FF dando más tiempo de

reaccionar al intermediario sulfénico, le confieren una nueva función a estas enzimas, que se propuso está vinculada a la señalización redox mediada por peróxido (en particular por H_2O_2) [30].

La sulfinilación de cisteínas (sobreoxidación) fue considerada por mucho tiempo como una modificación post-traducciona irreversible [31], pero en 2003 Woo y colaboradores observaron que el tratamiento de varias líneas celulares de mamífero con H_2O_2 conduce a la sobreoxidación de las peroxirredoxinas 1 y 2, y que la cantidad de enzima sulfinilada decae con el transcurso del tiempo. Este decaimiento no es consecuencia de la degradación de las proteínas, y de hecho, se observó que las Prx1 y 2 vuelven a su forma catalíticamente activa, lo cual sugiere la posibilidad de que exista un sistema enzimático actuando en la reducción del ácido sulfínico sobre las C_p [32]. La existencia de este sistema se demostró con la identificación de una proteína de 13 kDa capaz de reducir el ácido sulfínico de la C_p de Tsa1 de *Saccharomyces cerevisiae* a través de un mecanismo que requiere la presencia de magnesio, y que implica la hidrólisis de ATP [33]. A esta proteína se la denominó sulfirredoxina, y sus genes homólogos fueron posteriormente identificados en varios organismos eucariotas y en algunas cianobacterias que expresan peroxirredoxinas susceptibles a la sobreoxidación, lo que sugiere que la reducción del ácido sulfínico en las Prx podría ser un mecanismo conservado [23, 34].

b) Bioquímica de peróxidos biológicos

Para entender mejor el rol de las peroxirredoxinas en el contexto celular, es importante tener en cuenta propiedades químicas de sus sustratos, para dimensionar la relevancia de la presencia de estos sistemas antioxidantes y de señalización redox. En este capítulo se desarrollan específicamente las propiedades del peróxido de hidrógeno y el peroxinitrito.

i) Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno forma parte de las llamadas especies reactivas del oxígeno (ROS). Desde la aparición del metabolismo aerobio, los organismos que utilizan al oxígeno como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria, así como los que utilizan agua como fuente de electrones en la fase fotoquímica de la fotosíntesis, han tenido que lidiar con estas especies reactivas, que pueden reaccionar y dañar macromoléculas biológicas como proteínas, ADN, así como membranas. Estos compuestos oxidantes se generan a partir del dióxígeno (O_2 , es un diradical, molécula prácticamente inerte frente a moléculas orgánicas) por reacciones de transferencia de electrones formando primero el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el cual luego a través de reducciones secuenciales puede dar lugar, entre otras, al H_2O_2 y radical hidroxilo ($\bullet OH$) [35] (figura 7).

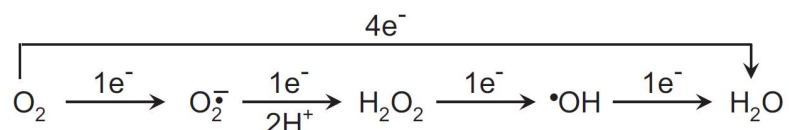


Figura 7. Reducción secuencial del dióxígeno a agua por ganancia de a un electrón. Tomado de [36].

La mayoría del H_2O_2 en las células se forma a partir de la reacción de dismutación del $O_2^{\bullet-}$ (reacción entre dos moléculas de $O_2^{\bullet-}$, una se oxida, otra se reduce, generando como productos H_2O_2 y O_2). La misma se da de manera espontánea a una velocidad relativamente alta ($\approx 10^5 M^{-1}s^{-1}$ a pH 7.0) [37], pero además puede ser catalizada por las enzimas Superóxido dismutasas (SOD), las cuales la aceleran hasta $10^9 M^{-1}s^{-1}$, convirtiéndolo en un proceso casi controlado por difusión [38]. Además, están las Superóxido reductasas (SOR), que son enzimas que catalizan la reducción directa del $O_2^{\bullet-}$, y también forman como producto H_2O_2 [38]. Por lo tanto, las fuentes de $O_2^{\bullet-}$ son consideradas también fuentes de H_2O_2 [35]. En las células de mamíferos, las NADPH oxidasas (NOX) y las cadenas transportadoras de electrones de las mitocondrias son consideradas las principales fuentes de $O_2^{\bullet-}$,

pero además existen otros sistemas capaces de generar $O_2^{\bullet-}$, como la Xantina oxidasa y el sistema enzimático del citocromo P450, entre otros [39, 40].

Respecto a sus propiedades químicas, el H_2O_2 es una pequeña molécula polar sin carga, por lo que tiene la capacidad de atravesar membranas de manera limitada [41], y si bien se la clasifica como una de las especies reactivas del oxígeno, ROS, no es una especie radicalar y es relativamente estable, ya que reacciona muy lentamente con la mayoría de las moléculas biológicas. Esto se debe a que para poder oxidar a otra molécula, debe superar una barrera energética muy alta por lo que su reactividad es un proceso dirigido cinéticamente más que termodinámicamente [42].

Sin embargo, a pesar de su baja capacidad para oxidar directamente a las distintas biomoléculas, el H_2O_2 no deja de ser potencialmente dañino, ya que su reacción con metales de transición como el hierro, lleva a la generación del radical hidroxilo, por medio de reacciones del tipo Fenton o Haber-Weiss (figura 8) [42]

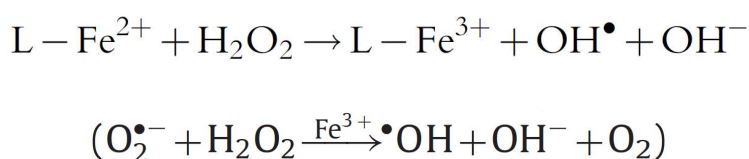


Figura 8. Reacciones de Fenton (arriba) y de Haber-Weiss (abajo). En la reacción de Fenton el hierro aparece acoplado a un ligando representado como L. Adaptado de [42].

El radical hidroxilo, es uno de los oxidantes biológicos más potente y tiene una vida media de menos de 1 ns [43], por lo que reaccionará muy cerca del lugar donde se esté produciendo [44], pudiendo causar grandes daños en los componentes celulares.

Por último, queda mencionar los destinos celulares del H_2O_2 . Los organismos poseen sistemas especializados en mantener a raya las concentraciones de peróxido, dentro de los cuales se encuentran la catalasa, las glutatión peroxidasa, y las peroxirredoxinas. Estas últimas dos son las que se encuentran mayormente distribuidas entre los compartimientos subcelulares y reaccionan con alta eficiencia ($\approx 10^5 - 10^8 M^{-1}s^{-1}$). Considerando además sus concentraciones dentro de la célula, estos sistemas serán los primeros y principales blancos del H_2O_2 . [42, 45]. El rol del H_2O_2 como segundo mensajero en la señalización redox se desarrollará más adelante en el texto.

ii) Peroxinitrito

El peroxinitrito se forma por la reacción de terminación entre los radicales superóxido y óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$). Esta molécula que forma parte de las llamadas especies reactivas del nitrógeno (RNS), si bien no es un radical libre, posee propiedades químicas que la convierten en un potente oxidante (el par ($\text{ONOO}^-/\text{NO}_2^-$) tiene un potencial de reducción estándar $E'_0 = 1.20 \text{ V}$ [42]), incluso mayor que sus precursores radicalares. La velocidad a la cual se forma el peroxinitrito por la reacción entre el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el $\cdot\text{NO}$ fue estudiada por diferentes metodologías, y se determinó que la constante de segundo orden asociada a dicha reacción está en el rango de $4\text{-}16 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [46]. Por lo tanto, basta que los radicales “parentales” del peroxinitrito se encuentren para que se produzca su síntesis. Como se mencionó anteriormente, existen varias fuentes de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en la célula, siendo las principales las NADPH oxidasas y las cadenas transportadoras de electrones en las mitocondrias. Por otra parte, el $\cdot\text{NO}$ es producido principalmente por las enzimas Óxido nítrico sintasas (NOS). La diferencia de carga entre el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el $\cdot\text{NO}$, confina la síntesis del peroxinitrito al compartimiento subcelular en el cual se esté formando el $\text{O}_2^{\cdot-}$, ya que por ser esta última una molécula cargada, su capacidad de difundir a través de membranas lipídicas está limitada. Por el contrario, el $\cdot\text{NO}$ es una molécula sin carga y además prácticamente apolar, por lo que su movilidad entre compartimientos está menos restringida. Otro componente que influye en la localización de la síntesis de ONOOH es la corta vida media del $\text{O}_2^{\cdot-}$ [46].

Dentro de la célula, el peroxinitrito estará presente tanto en su forma protonada como desprotonada, debido a que tiene un $\text{pK}_a = 6.8$ a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, lo cual es importante ya que estas dos especies reaccionan de maneras diferentes. La forma protonada (ONOOH) es inestable en medio acuoso y en ausencia de blancos puede decaer por dos vías; isomerizando a nitrato, o por ruptura homolítica formando radical hidroxilo y radical dióxido de nitrógeno (figura 9). El rendimiento de la homólisis para dar las especies radicalares se estima que esté alrededor del 30%.

Otra vía importante de decaimiento de peroxinitrito es la reacción con bicarbonato ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$), cuyo producto es primero el intermediario nitroso-peroxo-carboxilato (ONOOCO_2^-), que finalmente puede derivar en nitrato y dióxido de carbono, o las especies radicalares dióxido nítrico radical, y carbonato radical (figura 9), en donde el rendimiento de la homólisis rondaría el 35% [47].

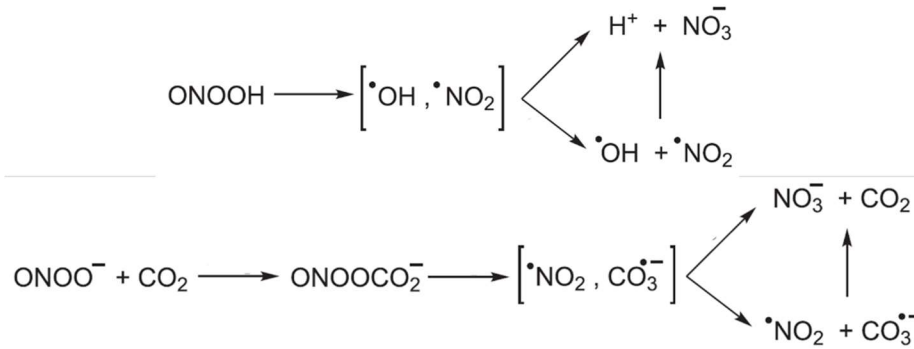


Figura 9. Esquemas de reacción para el decaimiento de ONOOH. El esquema de arriba muestra la homólisis del ácido peroxinitroso, y los productos que se pueden generar de esta reacción. El esquema de abajo muestra la reacción de anión peroxinitrito con CO₂ y su posterior decaimiento por homólisis, y sus posibles productos. Tomado de [47].

La corta vida media del peroxinitrito (10-20 ms en células y tejidos; [48]) significa un impedimento para detectar y estudiar su formación *in vivo*, por lo cual, al igual que con muchos otros agentes oxidantes, se asoció su presencia en células con una determinada modificación de biomoléculas que serían características de su acción, funcionando como una especie de rastro o huella. En el caso del peroxinitrito, esta huella es la nitración de tirosinas [47].

El mecanismo de nitración de tirosinas por peroxinitrito ha sido ampliamente estudiado usando tanto peroxinitrito, como flujos de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$, y se ha demostrado que se trata de un proceso radicalar que involucra al radical tirosilo y dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) [49-52], es decir que no es consecuencia de una reacción directa con el peroxinitrito, sino más bien con los radicales producto de su descomposición. Esta reacción puede ser promovida por metales de transición, ciertas metaloenzimas y dióxido de carbono.

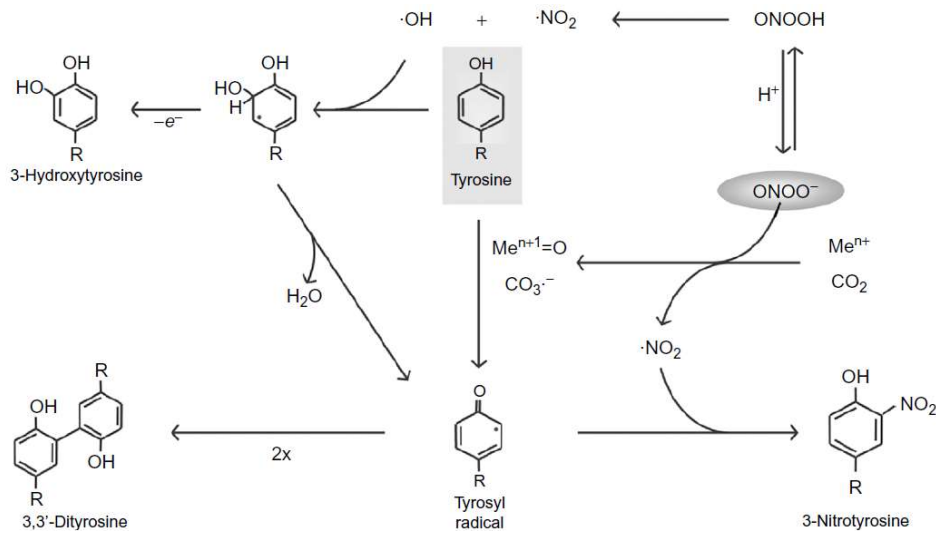


Figura 10. Mecanismos de nitración de tirosinas proteicas y formación de ditirosinas por peroxinitrito.

Extraído de [51]

El mecanismo de nitración (ilustrado en la figura 10) implica primero la reacción entre el residuo de tirosina y un radical libre, para formar el radical tirosilo (Tyr^{*}). La reacción de terminación de este radical con otro radical, el ^{*}NO₂, o con ^{*}NO y su posterior oxidación, llevan a la formación de la 3-nitrotirosina. Esta modificación nitrooxidativa (que también puede ocurrir por vías independientes de peroxinitrito) tiene como consecuencia cambios en las propiedades fisicoquímicas de las tirosinas como su pKa, su potencial redox, su hidrofobicidad y su volumen [53]. Por lo tanto, no sólo altera el punto isoeléctrico (pI) de la proteína en cuestión, sino que además introduce un sustituyente de tamaño importante que puede imponer restricciones estéricas con posibles efectos, por ejemplo, en fosforilación de tirosinas [54], pudiendo afectar también su interacción con otras proteínas.

La nitración de tirosinas en proteínas puede llevar a la pérdida o ganancia de función (hay pocas proteínas a las que la formación de nitrotirosina no afecta su funcionalidad), siendo la mayoría de los casos reportados en la literatura el primer caso [46]. Un ejemplo bien estudiado de ganancia de función es el Citocromo c, proteína que al nitrarse en la tirosina 74, cambia su estructura, aumentando su actividad peroxidasa [55, 56]. En oposición, como ejemplo de pérdida de función por nitración de tirosinas se puede mencionar a la MnSOD humana [57, 58], la cual se inactiva como consecuencia de la nitración de la tirosina 34. La tabla 7 de la referencia [46] resume información actualizada sobre 23 proteínas en la que se estudió esta modificación post-traduccional.

c) Señalización Redox

Las distintas especies reactivas (del oxígeno, del nitrógeno, del azufre, etc.) constituyen una potencial amenaza para cualquier tipo de células, debido a su capacidad para provocar lo que se conoce como estrés oxidativo. El estrés oxidativo primeramente definido como el desbalance entre las moléculas oxidantes y antioxidantes en favor de los oxidantes [59], ahora se entiende más bien como una disrupción del balance redox celular [60]. Para lograr una respuesta rápida frente al aumento de las especies oxidantes, e incluso para regular varios procesos en condiciones fisiológicas, los sistemas biológicos poseen vías de señalización redox, capaces de modular una gran variedad de procesos biológicos [61].

i) H₂O₂ como segundo mensajero

Si bien originalmente se asoció al H₂O₂ (y al resto de las ROS) con el daño oxidativo en las células, el desarrollo de estados patológicos y con procesos relacionados al envejecimiento, con el tiempo la visión sobre el rol de esta molécula en la célula fue cambiando gradualmente, reconociendo que además de tener poder destructor (cumpliendo un rol fundamental en los mecanismos efectores de las células del sistema inmune innato [62]), en bajas concentraciones es protagonista en las vías de señalización que modulan una gran variedad de procesos biológicos en condiciones fisiológicas, como proliferación, crecimiento, migración, apoptosis, entre otras [63-65].

En mamíferos, una manifestación indirecta de la importancia del H₂O₂ en la señalización celular, es la presencia de las NOX en distintos tejidos. Cada una de las cinco isoformas caracterizadas de NOX está relacionada con múltiples vías de transducción de señales, cuya activación deriva en distintos procesos biológicos como duplicación o migración celular, crecimiento, hipertrofia, necrosis, etc. En todos los casos, existe una señal que aumenta la expresión de NOX, lo cual conlleva un incremento en la producción de O₂^{•-}, y eventualmente de H₂O₂. Estas especies reactivas (ROS), pueden modificar proteínas redox reguladoras de alguna vía de señalización, resultando finalmente en la expresión o inhibición diferencial de genes blanco de dicha vía [62]. Algunas de las señales que disparan la producción de peróxido en condiciones fisiológicas son PDGF, EGF, IFN-g, HIF-1a, TNF-a, LPS, insulina y angiotensina II. Como ejemplos de proteínas reguladoras cuya actividad está modulada de manera redox por H₂O₂ hay quinasas (por ejemplo ASK1 [66]), fosfatasa (por ejemplo la fosfatasa PTEN [67]), y factores de transcripción (por ejemplo NFκB y STAT3 [68, 69]).

A pesar de que la participación del H₂O₂ en estos procesos es incuestionable, los mecanismos específicos por los cuales este oxidante transmite la señalización no están del todo esclarecidos, lo que nos lleva a evaluar al H₂O₂ como molécula señalizadora. En la revisión de Young y colaboradores se resumen las propiedades que hacen del H₂O₂ una molécula adecuada para funcionar como mensajero secundario [70]. Estas son:

- 1) Existen pocos blancos reactivos importantes de acuerdo con las características cinéticas de reacción, como peroxirredoxinas y centros metálicos.
- 2) Es una especie química relativamente estable (vida media en el orden de los milisegundos) lo que permite su difusión desde la localización donde es producido.
- 3) Su producción está finamente controlada y puede ser estimulada por varios factores externos.

Para entender los dos primeros puntos, es fundamental la información recabada sobre las constantes de reacción entre los distintos posibles tioles reactivos y sus concentraciones celulares.

Tabla 1. Las peroxirredoxinas son el primer blanco de acción del H₂O₂. Se indican los valores estimados de concentración y constante de reacción con H₂O₂ para distintos tioles biológicos. Datos tomados de [42, 45]

Tiol	Concentración celular (μM)	Constante de reacción con H ₂ O ₂ (M ⁻¹ s ⁻¹)
Prx	20	10 ⁸
GPx1	2	10 ⁷
GAPDH	50	500
GSH	2000	0.89

Como se muestra en la tabla 1, dentro de los tioles más importantes según su posibilidad de reacción con H₂O₂, se destacan las C_p de las peroxirredoxinas como principal diana de su acción señalizadora, dirigiendo a la gran mayoría del H₂O₂ producido a la modificación de estas proteínas [42, 45]. Entonces surge una de las preguntas más pertinentes respecto a la señalización mediada por H₂O₂: Cómo puede el H₂O₂ oxidar específicamente al tiol de una proteína reguladora de determinada vía, (pongamos como ejemplo a una quinasa) que modula su actividad por modificaciones redox (por ejemplo un disulfuro en su estructura), si todo el peróxido generado va a ser consumido por las Prx? Parecería improbable que una proteína que se expresa en cantidades bastante inferiores a la de las

Prx, y con tioles menos reactivos pueda captar H_2O_2 en este escenario. Para responder a esta pregunta, a partir de la evidencia experimental generada de estudiar el funcionamiento de las Prxs en contextos celulares de señalización, se propusieron las tres grandes teorías que siguen siendo debatidas hoy en día.

La primera es conocida como la hipótesis de la “compuerta” (en inglés se llama *floodgate model*). Según este modelo, las Prx imponen una barrera protectora a la acción del H_2O_2 , removiéndolo mientras se encuentra a concentraciones bajas (basales). Pero un incremento moderado en su concentración llevará a la inactivación por sobreoxidación de las Prx cercanas a la fuente de H_2O_2 , permitiendo que exista una acumulación local de H_2O_2 que escaparía de la acción antioxidante de las Prx y que ahora puede reaccionar con los tioles de reactividad moderada de las proteínas redox, que se encuentren cerca de la fuente [24, 30, 71]. Esta teoría entonces realza a la inactivación por sobreoxidación como modificación clave en la señalización redox. En la misma línea, se demostró que en células estimuladas con factores de crecimiento, se promueve la fosforilación de Prx1 asociada a la membrana en la tirosina de su motivo YF (Y194), y que esta modificación post-traducciona l tiene como consecuencia la pérdida de la actividad peroxidasa [72, 73].

La segunda teoría, también involucra a la sobreoxidación de las Prx como parte de la señalización mediada por peróxido, pero en vez de interpretarla como un mecanismo para lograr que el H_2O_2 oxide un blanco determinado, esta teoría propone que la señalización se transmite porque la sobreoxidación limita la oxidación de la tiorredoxina por parte de las Prx, ya que el ácido sulfínico no puede ser reducido por la tiorredoxina. En otras palabras, la sobreoxidación sería un mecanismo importante para que haya más tiorredoxina disponible para reducir otros disulfuros (los cuales intervienen en la señalización), distintos a los de las Prx [30, 74]

Por último, la tercera teoría pone a las Prx en un lugar diferente en la señalización respecto a la teoría de la compuerta, ya que éstas, en vez de representar una barrera que debe ser derribada para permitir la acción del H_2O_2 , son más bien transductores directos de la señal redox. A este mecanismo se lo llama relevos redox (*redox-relays*) y propone que la señal del H_2O_2 es captada por las Prx, que luego transmiten los equivalentes de oxidación a las proteínas reguladoras a través de intercambios tiol-disulfuro, mecanismo que implica entonces la formación de disulfuros mixtos transitorios entre Prx y la proteína reguladora. Este mecanismo se observó por primera vez para el caso de la peroxirredoxina Orp1 de levadura (también denominada Gpx3, ya que originalmente se

la identificó como una proteína relacionada a la glutatión peroxidasa), la cual oxida al factor de transcripción Yap1 a través del intercambio de disulfuros [75]. La formación de disulfuros intramoleculares en Yap1 impide su salida desde el núcleo, donde su actividad transcripcional inicia la respuesta adaptativa correspondiente. El relevo del equivalente de oxidación ocurre porque el ácido sulfénico formado en la C_P (por la actividad peroxidasa de Orp1), en vez de reaccionar con su C_R, es resuelto por una cisteína de Yap1. Para que esta reacción pueda competir con el cierre de disulfuro por la C_R, es necesaria la participación de una proteína accesoria, denominada Ybp1 (por *Yap1-binding protein*) que interactúa con ambas, formando un complejo ternario que predispone la cercanía de las cisteínas protagonistas del intercambio [76].

Un trabajo importante para afianzar la idea de los relevos, fue la primera demostración de que este mecanismo funciona también en células de mamíferos [69]. En este trabajo, los autores demuestran que la oxidación del factor de transcripción STAT3, es mediada por la formación de un disulfuro mixto con la Prx citosólica Prx2, observándolo tras la adición de H₂O₂ de manera exógena, y promoviendo su producción endógena por estimulación de las células con la citoquina IL-6. Además de estos casos, más adelante este mecanismo se demostró para otras proteínas [66, 77].

Por último, hay que mencionar un trabajo del mismo grupo que identificó la interacción entre Prx2 y STAT3, donde demuestran la importancia de los relevos poniendo a prueba una hipótesis “sencilla”. La idea es la siguiente: si las Prx modulan la señalización del H₂O₂ actuando como barreras que al inactivarse permiten la señalización (modelo de la compuerta), entonces al remover a las Prx citosólicas, la oxidación de blancos por H₂O₂ en este compartimento celular debe verse aumentada. Por el contrario, si las Prx son importantes para transmitir los equivalentes de oxidación (relevos redox), al remover las Prx del mismo compartimento, debería observarse la disminución de la oxidación de proteínas diana. Sus datos experimentales coinciden con esta última teoría, aunque en la discusión los autores dejan claro que sus datos no invalidan, ni son incompatibles con el modelo de la compuerta, por la metodología empleada para ver la oxidación de proteínas diana [78]. Un detalle que vale mencionar respecto de este trabajo, es que por su abordaje experimental las proteínas reguladas de manera redox que detectan, son solamente las que serían reducibles por tiorredoxina.

d) Peroxirredoxinas humanas

En humanos se expresan 6 isoformas de Prx, que se denominan Prx1, Prx2, Prx3, Prx4, Prx5 y Prx6 (también es común en la literatura que se nombre PRDX específicamente a las Prx humanas). Las primeras 4 se clasifican en la subfamilia de las Prx1 (y según su ciclo catalítico como 2-Cys Prx típicas); Prx5 (2-Cys atípica) y Prx6 (1-Cys Prx) pertenecen a sus subfamilias homónimas, respectivamente. Si bien varias de estas Prx se pueden encontrar en más de un compartimiento subcelular, Prx1 y Prx2 son principalmente citosólicas, Prx3 se localiza en la mitocondria [68], Prx4 en el retículo endoplasmático [79], Prx5 en mitocondrias, peroxisomas y citosol [80], y la Prx6 se localiza en el citosol [81].

En nuestro laboratorio se trabajó extensivamente en la caracterización de la Prx2 humana [82-84], principalmente por ser una de las proteínas más abundantes en eritrocitos (240 μ M, [85]), y por su rol protagónico en la interacción con ROS y RNS. En el año 2009 Manta y colaboradores caracterizaron la cinética de reacción de Prx2 purificada de glóbulo rojo humano con H_2O_2 y con peroxinitrito [82], y más adelante Randall y colaboradores caracterizaron los efectos del peroxinitrito en la estructura y función de la misma Prx [83, 84]. En estos últimos trabajos, se observó que al tratar con peroxinitrito a Prx2 oxidada en su sitio catalítico (es decir con la C_P y la C_R formando el enlace disulfuro), la enzima se nitra y lejos de inactivarse, sorprendentemente aumenta su actividad peroxidasa y disminuye su susceptibilidad a la inactivación por sobreoxidación. Este efecto modulador se lo atribuyen a la nitración de tirosinas, y proponen que es posible que el efecto se deba principalmente a la formación de nitrotirosina sobre la tirosina del motivo YF (Y193).

Saliendo del caso particular del glóbulo rojo, donde Prx2 es claramente la peroxirredoxina predominante, en la mayoría del resto de los tejidos celulares Prx2 comparte la localización subcelular con otras tres peroxirredoxinas, Prx1, Prx5 y Prx6, todas presentes en el citosol de la célula. Sin embargo, con respecto a estas otras Prx, Prx2 presenta una similitud significativa respecto a solo una de ellas, la Prx1.

i) Prx1 vs. Prx2

Prx1 y Prx2 son peroxirredoxinas que además de compartir la localización subcelular, tienen 97% de similitud de secuencia y 77% de identidad (figura 11).

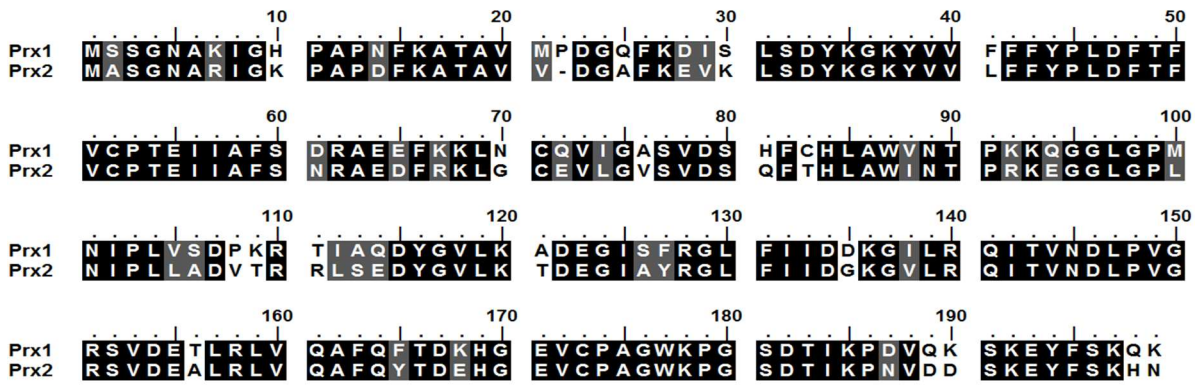


Figura 11. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Prx1 y Prx2. Los residuos idénticos se destacan en color negro, mientras que los residuos similares se destacan en color gris. El alineamiento se generó usando software MEGA7.

Ambas pertenecen a la subfamilia de las Prx1, y su mecanismo catalítico corresponde al de las 2-Cys típicas. Sin embargo, a pesar de tener todas estas características en común, mucha evidencia indica que dichas proteínas se distinguen en sus funciones dentro de la célula. Para empezar, ratones knockout para cada una de estas proteínas presentan fenotipos diferentes: los modelos de ratón que no expresan Prx1 presentan una esperanza de vida reducida respecto al genotipo salvaje (*wild type*, WT), debido al desarrollo de anemia hemolítica y varios tipos de cáncer [86]. En cambio, los ratones knockout en Prx2 son fértiles y saludables, aunque desarrollan esplenomegalia [87].

La primera vez que se estudió a las Prx1 y Prx2 humanas recombinantes de manera comparativa [25], justamente intentando explicar sus diferencias funcionales, se observó a la Prx1 como la más sensible a la sobreoxidación, por medidas de actividad peroxidasa y por inmunodetección usando anticuerpo anti Prx-sobreoxidada (anticuerpo que reconoce tanto ácido sulfínico como sulfónico sobre la C_p, en ambas Prx). Los autores atribuyen toda la diferencia funcional a la presencia de la C83 en Prx1 (en esa posición Prx2 tiene una treonina), ya que cuando la mutan por serina, Prx1 pasa a comportarse de manera idéntica a Prx2, tanto en su susceptibilidad a la sobreoxidación, como en su estructura cuaternaria (por cromatografía de exclusión molecular y espectrometría de masa observan que Prx1 WT se encuentra principalmente como decámero, mientras que Prx2 WT se encuentra mayoritariamente como dímero). Además resuelven la estructura cristalográfica de Prx1

WT (aunque no reportan el PDB ID). En los mapas de densidad electrónica en la región de las interfases entre dímeros (superficie A), encuentran que las C83 de dímeros adyacentes forman enlaces disulfuro, estabilizando de manera covalente al decámero.

Posteriormente, en el año 2009, Cox y colaboradores compararon la susceptibilidad a la sobreoxidación de las peroxirredoxinas Prx1, Prx2 y Prx3 humanas en células Jurkat T de linfoma y HeLa de adenocarcinoma cervical, y observaron que la Prx3 (mitocondrial) es una peroxirredoxina mucho más resistente a la sobreoxidación respecto a las dos Prx citosólicas, pero además, notaron que Prx2 se sobreoxida con mayor facilidad que Prx1, en oposición a lo reportado por Lee y colaboradores en el año 2007 [25].

Más recientemente, Carvalho y colaboradores [88] caracterizaron la reducción de urato hidroperóxido por Prx1 y Prx2, así como el paso de resolución, observando también que Prx2 es más susceptible a la sobreoxidación por H_2O_2 . Vale mencionar que este último trabajo se publicó durante el transcurso de esta Maestría.

Con toda la información comentada anteriormente, surge nuestra propuesta de intentar estudiar un poco más en profundidad a Prx1 y Prx2 desde el punto de vista principalmente cinético, para contribuir a la comprensión de cómo dos proteínas tan similares puedan cumplir funciones diferentes a nivel celular.

2) Objetivos

Objetivo general:

Profundizar en la caracterización funcional y estructural de Prx1 humana, comparativamente con la otra 2-Cys Prx típica citosólica, Prx2.

Objetivos específicos:

- Expresión y purificación de Prx1 y Prx2 humanas recombinante.
- Caracterización de la actividad peroxidasa, en particular peróxido de hidrógeno y peroxinitrito reductasa, haciendo énfasis en la susceptibilidad a la sobreoxidación.
- Evaluar el efecto del tratamiento con peroxinitrito sobre Prx1 (nitrición de tirosinas), y compararlo con lo ya estudiado para Prx2.

3) Materiales y métodos

a) Reactivos y materiales

Todos los reactivos químicos utilizados fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (USA) o AppliChem (Alemania), salvo excepciones que se detallan. La 4,4'-Ditiodipiridina (DTDPy) fue adquirida en Acros Organics (Fisher Scientific, USA). Los anticuerpos policlonales de conejo contra Prx sobreoxidada (α -Prx-SO₂H/SO₃H) fueron adquiridos en AbFrontier (Seúl, Corea), mientras que el anticuerpo secundario fluorescente IRDye 680RD fue adquirido en LI-COR Biosciences (Lincoln, NE). El anticuerpo policlonal de conejo anti-nitrotirosina (α -NO₂Y) fue gentilmente cedido por el Laboratorio de Radicales Libres, Depto. Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República. El peroxinitrito fue sintetizado según [89] mediante un reactor de flujo detenido a partir de nitrito de sodio y peróxido de hidrógeno. La contaminación con nitrito fue típicamente menor al 30% de la concentración de peroxinitrito, cuantificada por el método de Griess (según se describe en [90]). Los materiales para filtración fueron adquiridos en Millipore (USA), con la excepción de los filtros de 0.22 μ m que fueron adquiridos en Whatman (USA).

b) Procedimientos generales

i) Medidas espectroscópicas

Las medidas espectrofotométricas (espectros de absorbancia, medidas puntuales, y cinéticas) se realizaron en un espectrofotómetro Varian Cary 50 (Agilent) con portacubeta no termostatzado usando cubetas apropiadas.

Los espectros y medidas de fluorescencia en estado estacionario fueron realizados en un fluorómetro Chronos FD (ISS, USA) con control de temperatura, usando cubetas apropiadas. Para los espectros de emisión de fluorescencia de las Prxs oxidadas y reducidas se utilizó 10 μ M de proteína en su correspondiente estado de oxidación (la reducción y oxidación de las proteínas se describe más adelante) en buffer fosfato de sodio (NaPi) 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, ácido dietilentriaminopentaacético (dtpa) 0.1 mM (buffer de reacción). La longitud de onda de la luz utilizada para excitar la muestra fue de 295 nm, de manera de detectar principalmente la emisión

de fluorescencia de los triptófanos. Los experimentos se realizaron a 25 °C. Se registró la emisión entre 310 y 450 nm.

Los espectros de dicroísmo circular de Prx1 se realizaron en un espectropolarímetro Chirascan Q100 (Applied Photophysics). Las medidas en la región UV cercano se realizaron en cubeta con camino óptico de 1 cm con 50 μM Prx1 y las medidas en el UV lejano se realizaron con 5 μM Prx1 en cubeta con paso óptico de 0.1 cm. La proteína fue preparada en buffer NaPi 10 mM a pH 7.4. Para la Prx2, los espectros de dicroísmo circular se realizaron en un equipo Jasco CDF-4265/15. Las medidas en el UV cercano se realizaron en celdas de 1 cm con 31 μM Prx2 en NaPi 20 mM, pH 7.4 con 50 mM NaCl. Para las medidas en el UV lejano se utilizó una cubeta de 0.1 cm, con 5 μM Prx2 en el mismo buffer.

ii) Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína se determinó por su absorbancia a 280 nm usando el coeficiente de absortividad molar de la proteínas nativas calculado con la herramienta web ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) a partir de sus secuencias aminoacídicas, teniendo en cuenta el estado redox de sus cisteínas en caso de que correspondiera. Las únicas excepciones fueron la tiorredoxina reductasa de *E. coli* (*EcTR*), para la cual se utilizó el coeficiente de absortividad molar a 280 nm reportado en [91] ($51700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), y la peroxidasa de rábano picante (HRP), para la cual se utilizó el coeficiente a 403 nm de $1.03 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [92]. Los coeficientes de extinción molar utilizados para el resto de las proteínas fueron: $\text{Prx1}_{\text{ox}} = 18700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\text{Prx1}_{\text{red}} = 18450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\text{Prx2}_{\text{ox}} = 21555 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\text{Prx2}_{\text{red}} = 21430 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\text{EcTrx1} = 14060 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\text{TEVp} = 36130 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

iii) Cuantificación de peróxidos

Las soluciones de trabajo de H_2O_2 se cuantificaron por absorbancia a 240 nm considerando un $\epsilon = 39.4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [93]. Para trabajar con peroxinitrito, cada vez que se retira una alícuota del freezer -80 °C (concentrado por congelamiento), se le agrega dióxido de manganeso granular para eliminar el peróxido de hidrógeno que pueda haber quedado remanente de su síntesis y se determina su concentración por su absorbancia a 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [94] en hidróxido de sodio (NaOH) $\approx 10 \text{ mM}$.

iv) Cuantificación de tioles proteicos

La cuantificación de tioles proteicos se realizó de manera espectrofotométrica por reacción con 4,4'-ditiodipiridina (DTDPy) según descrito en [95]. Brevemente, la proteína se incubó a temperatura ambiente con DTDPy en exceso, y luego se cuantifica el producto de reacción, 4-tiopiridona, por absorbancia a 324 nm (coeficiente de extinción $21400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

v) Electroforesis en geles de poliacrilamida

La pureza de todas las proteínas recombinantes producidas y purificadas fue evaluada por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida discontinuo (SDS-PAGE) entre 10 y 15% para el gel separador, y 5% para el gel concentrador. Para todos los geles se utilizó el sistema Amersham Biosciences (GE Healthcare). El revelado de las proteínas se realizó por tinción con Azul de Coomassie coloidal. [96].

vi) Western Blot

En los ensayos de inmunodetección (*Western Blot*, WB) se corrieron las muestras en gel de poliacrilamida, para luego ser transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF). Después de incubar la membrana con solución de bloqueo (leche descremada 5%, Tween 3% en buffer Tris 50 mM pH 7.6, NaCl 0.15 M) durante una hora, se realizó la incubación con el anticuerpo primario correspondiente según las indicaciones del fabricante. El revelado del ensayo se realizó con anticuerpo secundario fluorescente IRDye 680RD (LI-COR Biosciences; Lincoln, NE), en un equipo G-box Chemi XRQ (Syngene, Cambridge, UK).

c) Proteínas recombinantes

i) Diseño de plásmidos para expresión de Prx1 y Prx2 humanas recombinantes

Los plásmidos pET28_Prx1 y pET28_Prx2 se compraron a Genscript. Las construcciones se diseñaron de manera que las secuencias que codifican para las proteínas humanas Prx1 y Prx2 (número de acceso en GenBank NM_001202431.1 y NM_005809.5 respectivamente) contengan una cola de poli-histidinas (Histag) y un sitio de corte para la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEVp por su sigla en inglés) hacia el extremo 5' de la secuencia nucleotídica. Además, se les adicionaron

sitios de corte para enzimas de restricción en los extremos 5' y 3' de ambas secuencias (*NcoI* y *HindIII* para Prx1, y *NcoI* y *BamHI* para Prx2), de manera que pudieran ser clonados en el vector pET28a. La síntesis de las secuencias codificantes (incluyendo optimización del uso de codones para expresión en *E. coli*) y el clonado en el vector de expresión de ambas construcciones fueron realizados por Genscript.

ii) Expresión y purificación de proteínas recombinantes

(I) Prx con Histag (Prx1 y Prx2)

La expresión de todas las proteínas recombinantes fue realizada en la cepa BL21(DE3) de *E. coli* a menos que se especifique otra cosa. Las células quimiocompetentes se transformaron con 1 μ L de su plásmido correspondiente por shock térmico, y fueron luego esparcidas en medio Luria-Bertani-agar (LB, 10 g/L de triptona, 10 g/L de NaCl y 5 g/L de extracto de levadura) con kanamicina 50 μ g/ μ L (resistencia adquirida por la incorporación del plásmido). Para la expresión, se creció un pre-cultivo de 3 mL de LB con el correspondiente antibiótico durante toda la noche (ON) a 37 °C. Al día siguiente se realizó el escalado con un inóculo 1:100 en 1 litro de LB con antibiótico en matraz de 5 litros. Este cultivo se dejó crecer a 37 °C con agitación a 200 rpm, por aproximadamente 3 horas hasta que las bacterias alcanzaran la fase de crecimiento exponencial ($OD_{600nm} \approx 0.6$). En ese momento se enfrió el matraz en baño con hielo, y se indujo la expresión de proteína recombinante con el agregado de 0.5 mM Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 20 °C ON. Luego de la inducción las bacterias fueron centrifugadas a 6000 g por 30 minutos a 4 °C, y el pellet se guardó a -80 °C.

Para la purificación de las Prxs con cola de histidinas, los pellets bacterianos se descongelaron y se resuspendieron en buffer de lisis agregando 5 mL por gramo de pellet húmedo. La composición del buffer de lisis es buffer de reacción, con 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), y 1 mg/mL de lisozima. Las bacterias se terminaron de lisar por sonicación con pulsos de 1 segundo con 40% de amplitud cada 3 segundos durante 1 minuto, o hasta que el extracto perdiera viscosidad y cambiara de aspecto. El fraccionamiento de las fracciones soluble e insoluble se realizó por centrifugación a 17.000 g durante 30 minutos. La purificación se continúa con el sobrenadante (fracción soluble).

El primer paso de la purificación es una cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC). Para esto, la fracción soluble del extracto celular se pasó por filtro de 0.45 μ m y se cargó con bomba peristáltica en una columna de Ni²⁺ Sepharosa HisTrap (GE Healthcare) equilibrada con buffer IMAC

A (buffer de reacción a pH 8.0, con 20 mM imidazol), en cámara fría. La IMAC se realizó en un equipo de FPLC ÄKTA Prime plus (GE). Una vez cargada la muestra, se lavó la columna con 10 volúmenes de columna de buffer IMAC A. Posteriormente se realizó un lavado similar, aumentando la concentración de imidazol a 50 mM, para lavar impurezas que puedan haberse pegado de manera inespecífica a la columna. Por último, se eluyó la proteína de interés con buffer IMAC B (buffer IMAC A con 250 mM imidazol).

La remoción del Histag se realizó en dos pasos. El primero, es la escisión del péptido de fusión por proteólisis con TEVp. Para esto se juntaron las fracciones de la IMAC en las que eluyó la proteína y se les agregó EDTA a concentración final 0.5 mM y ditioneitol (DTT) a concentración final 1 mM. Estos reactivos se agregaron para optimizar las condiciones de corte de TEVp. Luego se agregó 2 mg de TEVp, y se dializó extensivamente contra buffer de reacción más EDTA 0.5 mM y DTT 1mM, a 4 °C, ON. El segundo paso implica la separación de la proteasa y las colas de histidinas de la proteína de interés. Para esto, al día siguiente de la diálisis se realizó una segunda IMAC con HisTrap, de manera que los tags de poli-histidina y la TEVp (que tiene Histag) quedan retenidas en la columna, mientras que la Prx pasa en la fracción no unida.

Como último paso de purificación, se realizó una cromatografía de exclusión molecular con una columna Superdex 200 16/600 (GE Healthcare) equilibrada en buffer de reacción. La muestra a inyectar en la columna fue concentrada hasta aproximadamente 500 µL, se trató con 10 mM DTT por 30 minutos a temperatura ambiente y se inyectó en la columna a flujo 1 mL/min. Las fracciones correspondientes a la proteína se juntaron, concentraron con concentradores Vivaspin (GE Healthcare) con corte de 10 kDa, y se guardaron a -80 °C hasta su uso. La pureza y la identidad de la proteína recombinante se evaluó por SDS-PAGE y por espectrometría de masa.

(II) Prx1 construcción sin Histag

El plásmido pET17b_PrX1 para la expresión de la proteína Prx1 sin cola de histidinas fue cedido amablemente por la Dra. Flavia Meotti (University of São Paulo, Department of Biochemistry (IQ), São Paulo, Brazil). La expresión de esta proteína se realizó en idénticas condiciones que para la construcción Prx1 con Histag, a excepción del antibiótico utilizado para seleccionar a las bacterias transformantes. Se utilizó ampicilina 100 µg/µL en los cultivos bacterianos (resistencia que otorga el vector en el cual está clonada la secuencia de Prx1, pET 17b). La purificación se realizó según el protocolo publicado en [97].

El pellet de bacterias obtenido luego de la expresión se resuspendió en buffer de lisis 25 mM Tris pH 8.8, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF y 1 mg/mL lisozima, y se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso. Para la purificación, las bacterias se terminaron de romper por sonicatedo, y se realizó el fraccionamiento por centrifugación del lisado como se describió más arriba.

La Prx1 se purifica a partir de la fracción soluble por intercambio iónico en una columna de Dietilaminoetil-Sepharosa (HiPrep DEAE FF 16/10; GE Healthcare). Para esto, primero se trata al extracto celular con 10 mM DTT por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se inyecta en la columna DEAE equilibrada con 25 mM Tris pH 8.8, 1 mM EDTA y 2 mM DTT. En estas condiciones Prx1 eluye en la fracción no unida (punto isoeléctrico teórico = 8.3). Las fracciones colectadas se analizan por SDS-PAGE para saber en cuáles eluye la Prx1. Se juntan las fracciones que contienen Prx1, se concentran hasta un volumen entre 0.5–5 mL, se reduce con 10 mM DTT por 30 minutos a temperatura ambiente, y se inyecta en una columna Superdex 200 16/60 equilibrada con buffer de reacción. La proteína purificada se concentró y almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

(III) Proteasa del virus del grabado del tabaco (TEVp)

El plásmido TEV-pTH24 para la expresión de la proteasa TEVp fue cedido amablemente por el Dr. Alejandro Buschiazco (Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay). La purificación de la proteína recombinante se realizó según [98], con modificaciones menores en el protocolo.

Para la expresión se usó la cepa de *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS. Las bacterias transformadas por shock térmico con $1\mu\text{L}$ de plásmido TEVp-pTH24 crecieron en cultivos de 3 mL de medio LB suplementado con ampicilina ($100\text{ }\mu\text{g/mL}$) y cloranfenicol ($30\text{ }\mu\text{g/mL}$) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ON. A partir de los pre-cultivos se realizó escalado 1:100 a 1 litro de LB con antibióticos, y se dejaron crecer a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación a 200 rpm hasta alcanzar una OD_{600} de aproximadamente 0.6. La inducción se realizó por 16 horas a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación a 200 rpm con 1 mM IPTG. Las bacterias se bajaron por centrifugación a 2800 g por 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se guardaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para la purificación, las bacterias se resuspendieron en 50 mM NaPi pH 8.0, 300 mM NaCl (buffer A) complementado con 1 mM PMSF y 1 mg/mL de lisozima. La lisis celular se completó por sonicatedo con pulsos de 1 segundo con 40% de amplitud cada 3 segundos durante 1 minuto, o hasta que el extracto perdiera viscosidad y cambiara de aspecto. Se separó la fracción soluble de la insoluble por centrifugación a 17000 g por 30 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante se pasó por filtro de $0.45\text{ }\mu\text{m}$ y se cargó en columna de Ni^{2+} Sepharosa HisTrap equilibrada en buffer A. Una vez pasado todo el

extracto celular, se lavó con 10 volúmenes de columna de buffer A con 20 mM imidazol, y luego se eluyó la proteína en gradiente de imidazol de 20 a 500 mM (usando buffer A con 500 mM imidazol). Se juntaron las fracciones con proteína y se le agregó 2 mM EDTA y 5 mM DTT por 30 minutos. Por último, se realizó un cambio de buffer con una columna HiPrep 26/10 Desalting (GE Healthcare) y se dejó la proteína en buffer 25 mM NaPi pH 7.0, 200 mM NaCl, 2 mM DTT, 2 mM EDTA y 10% glicerol. La proteína se concentró y se guardó a -80 °C en alícuotas de a 1 mg de TEV.

(IV) Tiorredoxina 1 de *E. coli* (EcTrx1)

Para la expresión de la proteína EcTrx1 se usó una construcción con su gen correspondiente (Gen Name: *trxA*, Accesion Number: b3781) incorporado en el plásmido pET9a (Novagen, USA) cedido amablemente por el Dr. Javier Santos (Universidad de Buenos Aires, Argentina).

La expresión de la proteína recombinante se realizó en medio ZYM-5052 [99] complementado con 50 µg/mL kanamicina, y se indujo bajando la temperatura a 20 °C por 16-18 horas. Las bacterias se bajaron a 5.000 g por 20 minutos a 4 °C y se guardaron a -80 °C hasta la purificación.

El protocolo de purificación se basa en lo publicado en [100]. Brevemente, el pellet se resuspendió en aproximadamente 10 volúmenes de buffer 20 mM Tris pH 7.4, 2.5 mM EDTA, 20% sacarosa, y posteriormente se centrifugó a 5.000 g durante 20 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se realizó el shock osmótico con 10-50 volúmenes de H₂O mQ fría durante 1 hora en hielo. Las bacterias se centrifugaron a 6.000 g por 30 minutos, y se conservó el sobrenadante, al cual se le agregó 10% 100 mM Tris pH 7.4.

El extracto celular a ese pH se cargó en columna de intercambio iónico HiPrep DEAE FF 16/10 (GE Healthcare) pre-equilibrada con buffer 10 mM Tris pH 7.4. La columna se lava con el mismo buffer hasta estabilizar la absorbancia a 280 nm, y luego se eluyó la proteína en un gradiente de 0 a 100% de buffer 10 mM Tris pH 7.4, 1 M NaCl en 200 mL. Las fracciones colectadas se trataron con 10 mM DTT, y se dializaron ON a 4 °C contra 100 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA. Como último paso de purificación, la proteína dializada se concentró y se inyectó en una columna Superdex 75 10/300 equilibrada con 50 mM bicarbonato de amonio pH 8.5. El pico que eluye con el volumen de retención para la EcTrx1 (peso molecular de 12 kDa) es colectado, concentrado, cuantificado y almacenado a -20 °C.

(V) Tiorredoxina Reductasa de *E. coli* (*EcTR*)

La *EcTR* se expresó en *E. coli* BL21(DE3) transformada con el plásmido pTrR301, y se purificó según lo reportado en [101], con algunas modificaciones. En este caso se usó el medio 2YT [99] con 100 µg/mL de ampicilina, complementado con 0.8% glicerol y 2 mM sulfato de magnesio. Una vez realizado el escalado, el cultivo se dejó crecer durante 20 horas a 37 °C, y la inducción se realizó ON a 37 °C con 1 mM IPTG. Las bacterias se bajaron a 5.000 g por 20 minutos a 4 °C. Posteriormente se resuspendieron en dos volúmenes de buffer NaPi 10 mM pH 7.6, EDTA 0.3 mM con PMSF 0.5 mM y 2 µM flavínadenínucleótido (FAD).

Las bacterias se rompieron por sonicación, y después se separó la fracción soluble de la insoluble por centrifugación a 27.000 g por 30 minutos a 4 °C. Al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio (0.56 g/mL de lisado). Una vez que quedó disuelto completamente, se centrifugó a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. El pellet amarillo se resuspendió en 5-10 mL de buffer NaPi 10 mM pH 7.6, EDTA 0.3 mM, y se dializó ON contra ese mismo buffer a 4 °C.

Al día siguiente se recuperó el dializado, se filtró por 0.45 µm, y se sembró en una columna de ADP Sepharosa equilibrada con buffer NaPi 10 mM pH 7.6, EDTA 0.3 mM. Se lavó la columna con buffer el mismo buffer hasta que disminuyó y se estabilizó la absorbancia a 280 nm. La enzima se eluyó en un gradiente de 120 mL de 0 a 1 M NaCl en buffer el mismo buffer. Durante la cromatografía se monitoreó la absorbancia a 280 y 456 nm. La *EcTR* eluye en las fracciones con la menor relación Abs_{280}/Abs_{456} . Se verificó en que fracciones eluye la proteína por SDS-PAGE, se juntaron dichas fracciones, y se les realizó un cambio de buffer con una columna HiPrep™ 26/10 Desalting buffer NaPi 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4. La proteína se concentró y guardó a -20 °C.

iii) Reducción de Prx y oxidación controlada del sitio catalítico de Prx a disulfuro

La reducción de las Prxs se realizó en todos los casos agregando una concentración final de 10 mM DTT, durante 30 minutos a temperatura ambiente. A menos que se especifique lo contrario, una vez reducida la proteína se removió el DTT pasando la muestra por dos columnas consecutivas PD SpinTrap G-25 (GE) equilibradas en el buffer de trabajo correspondiente. Para la oxidación controlada del sitio catalítico a disulfuro, se parte de la proteína reducida ya sin DTT. En el caso de Prx1, se cuantifican la proteína y los tioles de la muestra y se calcula el cociente SH/Prx1. Por cuantificación con DTDPy se llegan a detectar hasta 3 de los 4 tioles de Prx1, que corresponderían a

la C_P, la C_R, y la C83 (tanto en el caso de Prx1 como en el caso de Prx2, hay una cisteína que no reacciona con DTDPy, la C71 en Prx1, C70 en Prx2, probablemente porque se encuentran internalizadas hacia el core de la proteína, poco accesible al solvente). Para oxidar solamente el sitio catalítico se agregan 0.5 equivalentes de H₂O₂ por SH, habiendo previamente restado el SH que corresponde a la C83. Por la alta constante de reacción de la C_P con H₂O₂, el tiol de la C83 no llega a oxidarse en estas condiciones. Para Prx2, directamente se agregan 0.5 equivalentes de H₂O₂ por mol de SH, ya que en este caso no hay otra cisteína que pueda ser oxidada por H₂O₂. Una vez oxidadas las proteínas, se recuantificaron los tioles para corroborar la oxidación del sitio catalítico.

iv) Medidas de actividad de Prx

(I) Ensayo de actividad peroxidasa con sistema acoplado Prx-*EcTrx1*-*EcTR*

Se puede medir la actividad peroxidasa de las Prxs en su ciclo catalítico de manera espectrofotométrica siguiendo el consumo de NADPH (su oxidación a NADP⁺ lleva a la pérdida de absorbancia a 340 nm, $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, figura 2), según lo reportado en [82, 83, 102]. Las medidas se realizaron en cubeta de cuarzo de 50 μL , a volumen final 100 μL . En la cubeta se mezclan 200 μM NADPH, 1 μM *EcTR*, 8 μM *EcTrx1* y 0.5 o 0.25 μM Prx en buffer de reacción. La reacción se dispara con el agregado de H₂O₂, y se sigue registrando la absorbancia a 340 nm. Las concentraciones de las enzimas *EcTR* y *EcTrx1* se ajustaron de manera que no sean limitantes en el curso de la reacción. Para los ensayos de determinación de parámetros cinéticos para Prx1 y Prx2 respecto a la tiorredoxina de *E. coli*, se utilizaron concentraciones de *EcTrx1* entre 0.5 y 40 μM . Los registros de los cursos temporales se iniciaron tras la adición de 10 μM H₂O₂.

(II) Reducción de H₂O₂ por Prx seguida por fluorescencia en Stopped Flow

La reacción de oxidación del tiol de la cisteína peroxidática genera cambios en la fluorescencia intrínseca de algunas Prxs [88, 103-105], por lo que se puede seguir los cursos temporales de esta reacción en un equipo de cinética rápida (stopped flow) con detector de fluorescencia. Los experimentos de reducción de H₂O₂ por Prxs se realizaron en un fluorímetro de flujo detenido (stopped-flow) Applied Photophysics SX20 con un tiempo de mezclado menor a los 2 ms, con control

de temperatura. Para estos experimentos se configuró la longitud de onda de excitación a 280 nm, y se detectó la fluorescencia total con un filtro de 320 nm, fijando el ancho de rendija en 0.5 nm. Las medidas se realizaron a 25 °C. Una jeringa del equipo se cargó con 0.5 μM Prxs (0.25 μM final en la celda) pre-reducida en buffer de reacción, mientras que en la otra jeringa se cargó H₂O₂ a la concentración de interés, diluido en buffer de reacción. Los cursos temporales registrados ajustan bien a una ecuación del tipo doble exponencial (ecuación 1)

$$y = F_{\infty} + Amp_1 * (exp^{-k_1*x}) + Amp_2 * (exp^{-k_2*x}) \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde F_{∞} es la fluorescencia a tiempo final, Amp_1 y Amp_2 son las amplitudes de la primera y la segunda fase respectivamente, y k_1 y k_2 son las constantes observadas asociadas a dichas exponenciales.

De manera de simplificar los ajustes y el procesamiento, se ajustó cada fase por separado a una exponencial simple (ecuación 2):

$$y = (F_0 - F_{\infty}) * exp^{-kx} + F_{\infty} \quad \text{Ecuación 2}$$

Aquí, F_0 es la fluorescencia al inicio de la fase, F_{∞} es la fluorescencia a tiempo infinito, y k es la constante observada asociada al proceso.

v) Actividad peroxinitrito reductasa

(I) Ensayo de competencia con HRP

La constante de reacción de segundo orden entre Prx1 reducida y peroxinitrito se determinó por ensayo de competencia con HRP de la misma manera que fue reportado previamente [82, 106, 107]. Las medidas se realizaron en un equipo de stopped flow Applied Photophysics SX20 con un tiempo de mezclado menor a los 2 ms, con control de temperatura. La oxidación de la HRP a compuesto I se siguió registrando la absorbancia a 398 nm (punto isobéptico entre compuesto I y compuesto II). Los experimentos se realizaron con 5 μM HRP en ausencia o presencia de Prx (de 0 a 3.4 μM), contra 0.7 μM peroxinitrito. Las soluciones de proteína se prepararon en buffer NaPi 100 mM pH 7.4, dtpa 0.1 mM, y el peroxinitrito se diluyó en NaOH ≈10 mM.

Como la determinación de la constante para Prx1 se realiza de manera indirecta en competencia con la HRP, es necesario conocer el valor de la constante de reacción entre HRP y peroxinitrito. Si

bien esta constante ha sido reportada previamente, su valor puede variar con las condiciones en las cuales se realiza el experimento, por lo que se determinó también en este trabajo. Para esto se registraron cursos temporales de reacción entre 0.7 μM peroxinitrito y concentraciones variables de HRP (de 2.5 a 12.5 μM). Los cursos temporales fueron ajustados a una exponencial simple (ecuación 2), y de la pendiente del gráfico secundario de las constantes observadas en función de la concentración de HRP se determina la constante de segundo orden entre HRP y peroxinitrito.

Una vez obtenidos los cursos temporales de reacción de HRP con peroxinitrito en presencia de las distintas concentraciones de Prx1, se ajusta cada curso temporal a una exponencial simple (ecuación 2), y para cada corrida se calcula la constante de reacción entre Prx1 y peroxinitrito a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{k_1}{k_{\text{ONOOH}}} = \frac{\ln\left\{\frac{[\text{R1}]_0}{[\text{R1}]_0 - [\text{P1}]_\infty}\right\}}{\ln\left\{\frac{[\text{PRX-SH}]_0}{[\text{PRX-SH}]_0 - [\text{PRX-SS}]_\infty}\right\}} \quad \text{Ecuación 3}$$

En esta ecuación, $[\text{R1}]_0$ es la concentración de HRP inicial, k_1 es la constante de reacción entre HRP y peroxinitrito determinada experimentalmente, $[\text{P1}]_\infty$ es la concentración de HRP oxidada al finalizar la reacción (se calcula a partir del $\Delta\epsilon_{398} = 4.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [107], $[\text{PRX-SH}]_0$ es la concentración inicial de Prx1 reducida, y $[\text{PRX-SS}]_\infty$ es la concentración de Prx1 oxidada al finalizar la reacción, y se puede calcular a partir de la diferencia entre $[\text{P1}]_\infty$ en ausencia de Prx1 respecto a $[\text{P1}]_\infty$ en presencia de Prx1. Por último, k_{ONOOH} corresponde a la constante de reacción entre Prx1 y peroxinitrito. Todas las medidas se realizaron a 25 °C.

(II) Registros temporales de cambio de fluorescencia intrínseca de Prx1 y Prx2 por oxidación con peroxinitrito

La reacción entre el tiol de la C_p de Prx1 y Prx2 con ONOOH fue caracterizada cinéticamente de manera análoga a lo realizado con H_2O_2 , siguiendo los cambios de fluorescencia intrínseca de las proteínas como consecuencia de la oxidación de la C_p . Para esto se tomaron registros de los cursos temporales de fluorescencia en las mismas condiciones mencionadas anteriormente (equipo y configuración). Una jeringa del equipo se cargó con 1 μM Prxs (0.5 μM final en la celda) pre-reducida en buffer de reacción (2x) a pH 7.25, mientras que en la otra jeringa se cargó peroxinitrito (5.6 - 142 μM) en 1.5 mM NaOH. El pH medido a la salida de la celda fue de 7.3. Cada fase de los cursos

temporales se ajustó a una exponencial simple, y a partir de los gráficos secundarios se determinaron las constantes de oxidación, cierre de disulfuro, y sobreoxidación para cada proteína. Todas las medidas se realizaron a 25 °C.

vi) Nitración de Prx con peroxinitrito

Los tratamientos con peroxinitrito se realizaron siempre con proteína previamente oxidada a disulfuro en su sitio catalítico para evitar modificaciones en las cisteínas del sitio activo. El protocolo utilizado está adaptado de [83]. Para esto, se trata 100 μ L de Prx 130 μ M con 650 μ M peroxinitrito (exceso en relación 5:1, denominado 5X ONOOH), agregado en vortex de a 1 μ L en 10 repeticiones en intervalos constantes de manera de aproximarse a lo que podría ser un flujo de peroxinitrito (no en bolo). Siempre que se realiza un tratamiento con peroxinitrito, en paralelo se realiza un tratamiento equivalente, al cual en lugar de agregarle peroxinitrito a la muestra, se agregan 10 μ L de NaOH 10 mM (en que se diluye el peroxinitrito), de manera idéntica al tratamiento 5X ONOOH.

La confirmación de la nitración de la Prx luego del tratamiento con peroxinitrito se realizó por WB con anticuerpo anti-nitrotirosina.

En los experimentos en que se bloqueó la C83 con iodoacetamida (IAM), Prx1 oxidada en el sitio catalítico fue tratada con IAM a concentración final 55 mM, y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se removió el exceso de IAM con PD SpinTrap G-25 (GE) realizando pasadas consecutivas por 2 columnas equilibradas en buffer de reacción, de manera de asegurar la remoción de todo el agente bloqueante.

Para evaluar el efecto del tratamiento con peroxinitrito sobre Prx1, manteniendo intacto el tiol de la cisteína 83, se trató Prx1 oxidada a disulfuro con 1 mM metilmetanetiosulfonato (MMTS) durante una hora a temperatura ambiente. Luego el MMTS se removió por PD SpinTrap G-25 (GE) en dos columnas de la misma manera que se le realizó para la proteína tratada con IAM. Una vez oxidado el sitio catalítico y la C83, se realizó el tratamiento con peroxinitrito. Para recuperar el tiol de la C83, se redujeron los tioles con DTT (reduciendo el sitio catalítico, y la C83) previo a las medidas de actividad. En la figura 12 se esquematizan los cambios en los estados de oxidación de las cisteínas 52, 83 y 173 de Prx1 durante este tratamiento.

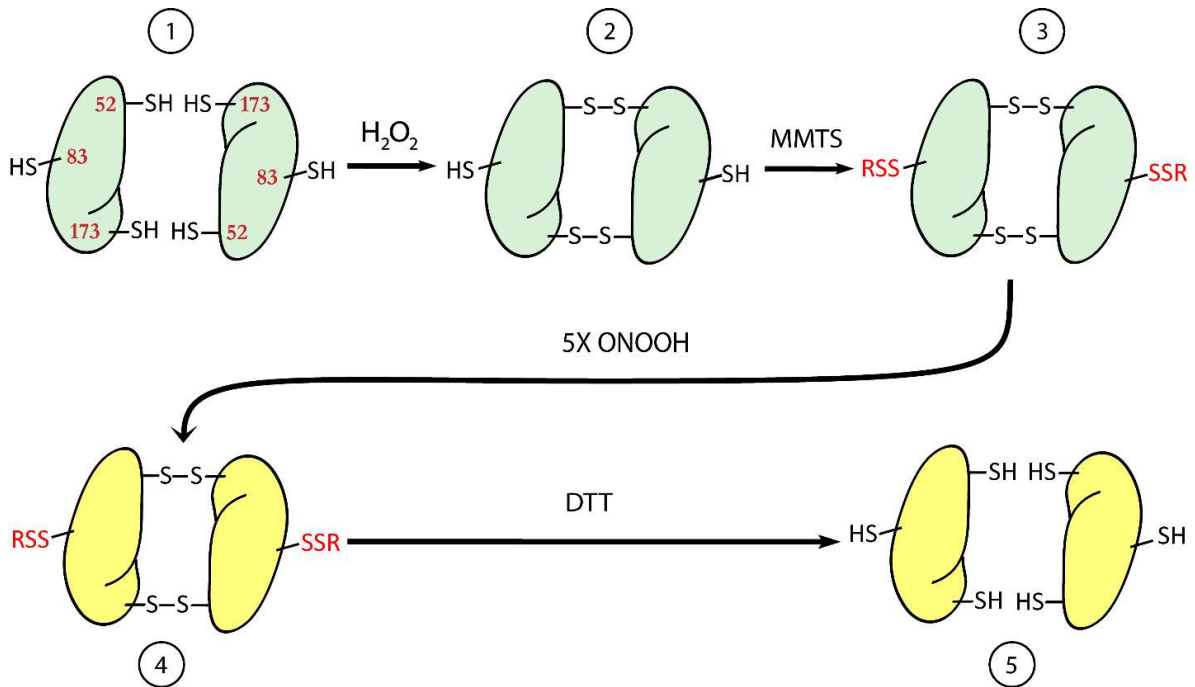


Figura 12. Tratamiento con peroxinitrito sobre Prx1, protegiendo el sitio catalítico y la C83. Esquema de la modificación de las cisteínas de Prx1 en el tratamiento con MMTS. Se representa el dímero de Prx1, indicando la identidad de cada cisteína representada en bordeaux en el esquema de la proteína (1). Se parte de proteína pre-reducida con DTT, con las 3 cisteínas reducidas (1). La oxidación controlada con H_2O_2 lleva al cierre del disulfuro en el sitio catalítico, mientras que la C83 se mantiene reducida (2). Esta proteína es tratada con MMTS, de manera que se forma un disulfuro mixto en la cisteína 83, la única cisteína disponible para reaccionar (3). A la proteína (3) se le realiza el tratamiento con peroxinitrito (el cual no puede modificar ninguna de estas 3 cisteínas; 4). La modificación por peroxinitrito sobre la Prx1 se representa con el cambio de color a amarillo. Finalmente, se trata la muestra con DTT de manera de obtener la proteína modificada por peroxinitrito (nitrada), pero con los tioles de las 3 cisteínas en estado reducido (5).

4) Resultados y discusión

a) Purificación de proteínas recombinantes

i) Prx1 y Prx2 con Histag

Como se describió en la sección Materiales y métodos, los plásmidos para la expresión de las Prxs recombinantes fueron diseñados de manera de facilitar la purificación de las proteínas. En la figura 13 se muestra un esquema de los plásmidos pET28a_Prx1 y pET28a_Prx2. La secuencia de poli-histidinas (Histag) hacia el extremo amino terminal de las proteínas permite su purificación por IMAC, mientras que el sitio de corte para TEVp sirve para la posterior remoción del Histag.

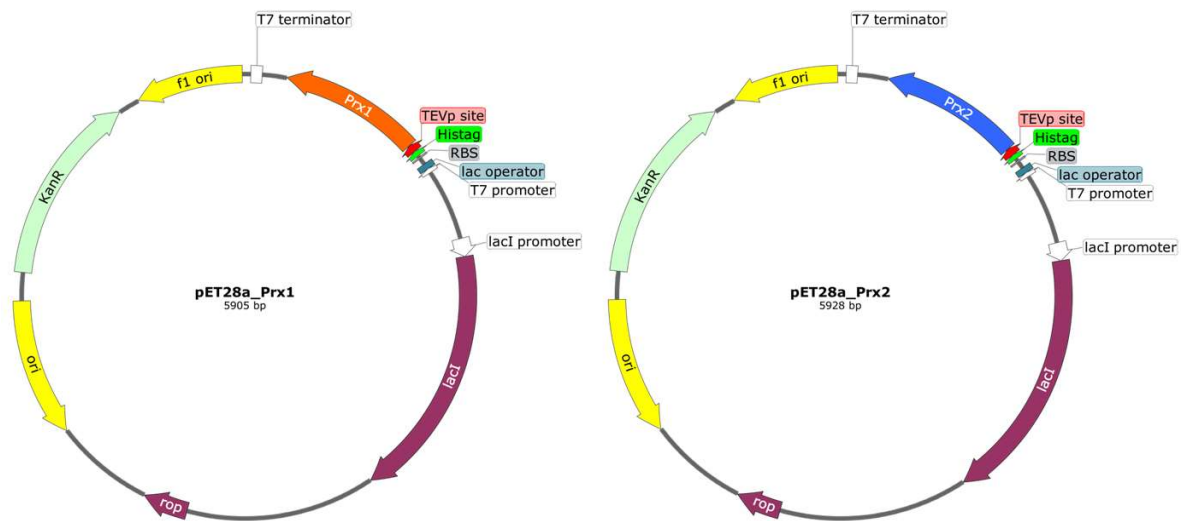


Figura 13. Plásmidos de expresión pET28a_Prx1 y pET28a_Prx2. Esquema de construcciones para expresión de Prx1 y Prx2. Se indica en verde el Histag, en rojo el sitio de corte para TEVp, y en naranja y en azul los insertos que corresponden a Prx1 y a Prx2 respectivamente.

Una vez obtenido el pellet de bacterias que expresaron la proteína recombinante en cuestión, se preparó el extracto bacteriano y se cargó en una columna HisTrap para realizar la purificación por cromatografía de afinidad IMAC. Como se observa en los cromatogramas de la figura 14, durante el lavado con buffer IMAC A (50 mM NaPi, 150 mM NaCl) con 20 mM imidazol, se remueven abundantes impurezas como fracción no unida a la columna. Una vez que se lleva fase móvil a 100 % buffer IMAC B (buffer IMAC A con 250 mM imidazol), comienza a eluir la proteína que se unió de manera específica.

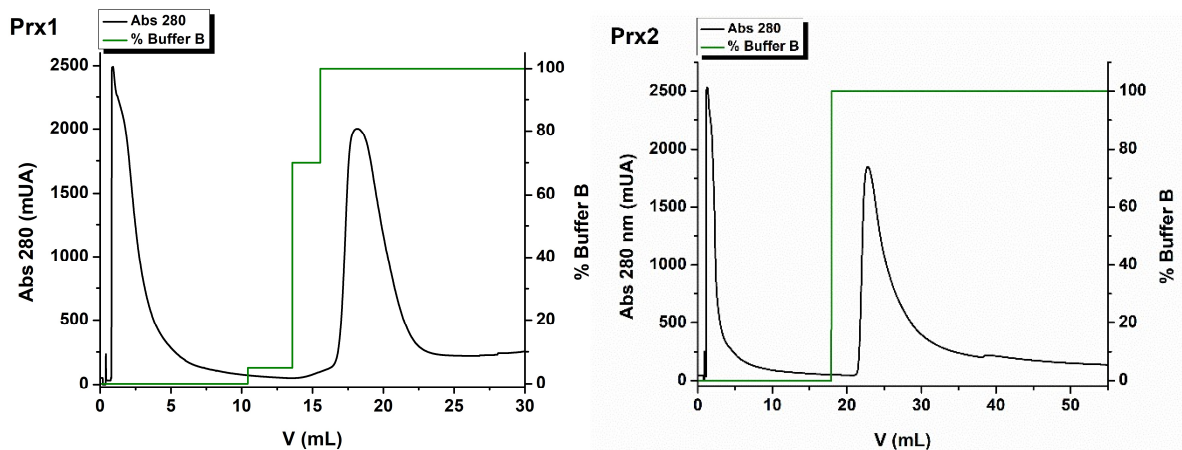


Figura 14. IMAC Prx1 y Prx2. Cromatogramas de la primer IMAC de purificación de Prx1 y Prx2 recombinantes. El trazo negro es el registro de la absorbancia a 280 nm. El trazo verde indica el porcentaje de buffer IMAC B

Ya por el perfil de elución de la IMAC se evidencia que la expresión de las proteínas recombinantes en forma soluble se da de manera abundante en las condiciones establecidas. Como la proteína eluye en buffer con alta concentración de imidazol se realiza una diálisis contra buffer de reacción y se aprovecha este paso para remover el Histag por digestión con la proteasa TEVp. Las condiciones óptimas para la actividad proteolítica de TEVp incluyen la adición de 0.5 mM EDTA y 1 mM DTT, por lo que se agregaron estos aditivos tanto en tubo de diálisis como en el buffer de intercambio.

Posteriormente TEVp y los Histags escindidos se separan de la Prx por una segunda IMAC, en donde los primeros quedan unidos a la columna (TEVp tiene Histag en su secuencia), mientras que la Prx (ya sin Histag) no interacciona con la resina y sale en la fracción no unida.

La digestión con TEVp dio resultados distintos para Prx1 y Prx2. En la figura 15 se muestra un gel de purificación de Prx1, en el cual se observa que, si bien hay corte por parte de la proteasa, no se logró ponerlo a punto para lograr un 100% de eficiencia. El segundo problema que presenta esta purificación es que en la segunda IMAC no se logra una separación completa de las fracciones digerida y la que aún mantiene el Histag. En el carril 9 de la figura se pueden ver dos bandas, identificadas por espectrometría de masa MALDI-TOF como Prx1 con Histag, y Prx1 cortada por TEVp. La purificación de Prx2 recombinante no presentó este problema ya que el corte por TEVp fue eficiente (figura 15). De todas maneras, el eluido de la segunda IMAC muestra que hay Prx2 que a pesar de no tener la Histag en su secuencia, interacciona con la resina de níquel.

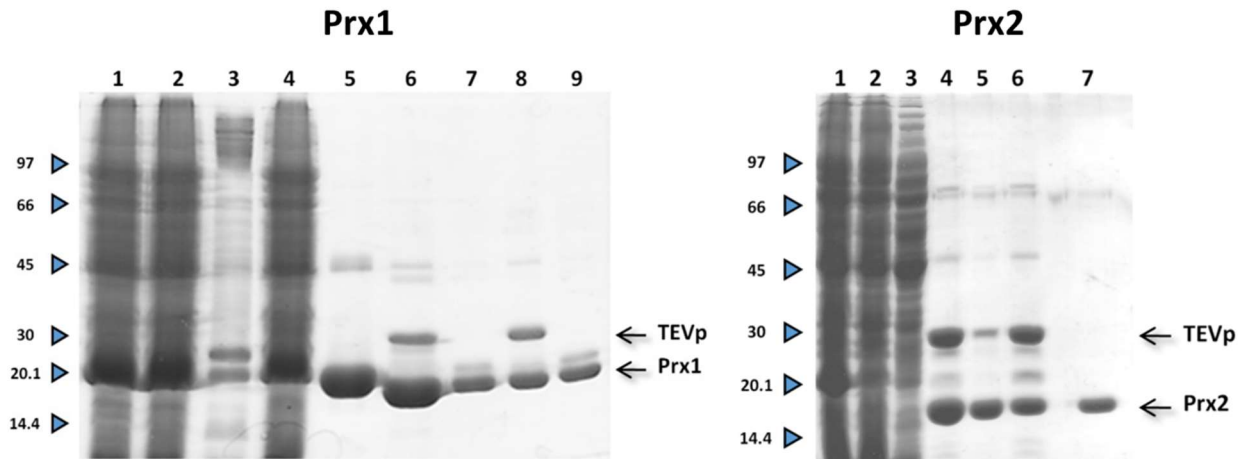


Figura 15. SDS-PAGE de purificación de Prx1 y Prx2. La electroforesis se realizó en un gel de acrilamida al 12% en condiciones reductoras. **Prx1**) 1- Lisado bacteriano; 2- Fracción soluble; 3- Fracción insoluble; 4- Fracción no unida a primer IMAC; 5- Pico de primer IMAC; 6- Prx1 + TEVp (pre-segunda IMAC); 7- Prx1 post segunda IMAC; 8- Eluido segunda IMAC; 9- Pico de SEC. **Prx2**) 1- Lisado bacteriano; 2- Fracción soluble; 3- Fracción no unida en primer IMAC; 4- Prx2 + TEVp (pre-segunda IMAC); 5- Prx2 después de segunda IMAC; 6- Eluido de segunda IMAC; 7- Pico de SEC.

Como último paso se realizó una SEC habiendo reducido a la proteína previamente con DTT. Tanto Prx1 como Prx2 eluyen como decámeros según el perfil cromatográfico en la columna Superdex 200 16/60 (figura 16), lo cual coincide con lo reportado previamente sobre la relación entre la oligomerización y el estado de oxidación del sitio catalítico de estas proteínas [108]. En los insertos de la figura 16 se muestran las proteínas purificadas resueltas por SDS-PAGE reductor en un gel 12%.

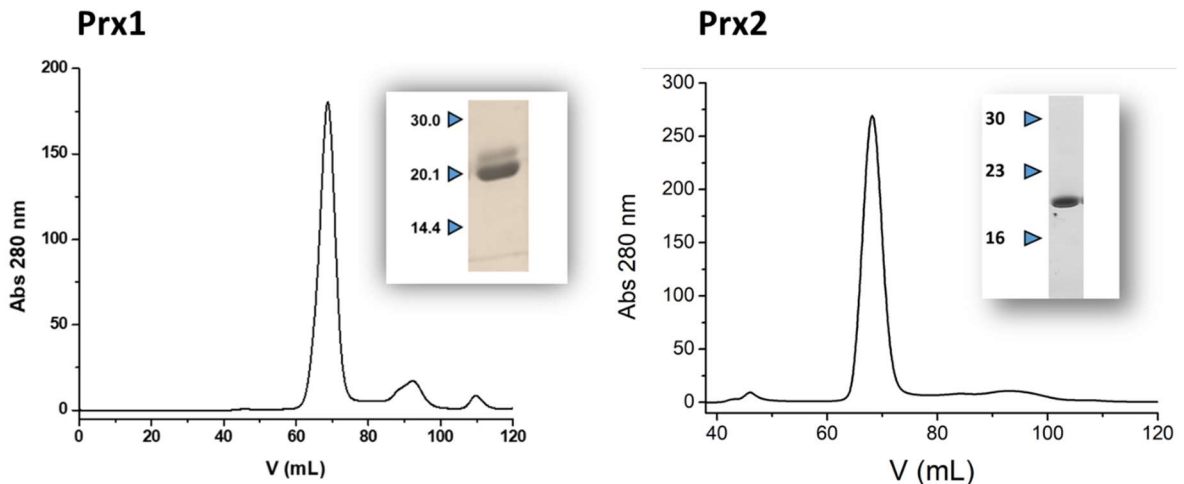


Figura 16. Cromatogramas de SEC de Prx1 y Prx2. Ambas proteínas eluyen como decámeros en el último paso de purificación. En los insertos se muestran gels de electroforesis de las proteínas purificadas.

Tanto el perfil cromatográfico en la SEC como los geles de electroforesis apuntan a que la proteína purificada corresponde a la proteína de interés (para Prx1 y Prx2). Sin embargo, estos datos no son suficientes para confirmar la identidad de cada proteína. Una gran ventaja de que la proteína recombinante en cuestión sea una enzima, es que si existe algún ensayo que permita medir su actividad, se puede verificar su identidad y el correcto plegamiento de la misma evaluando su funcionalidad.

En el caso de las peroxirredoxinas se puede medir su actividad en catálisis a través del sistema acoplado Prx-*EcTrx1*-*EcTR*, en el que se sigue espectrofotométricamente a 340 nm el consumo de NADPH cuando se agrega H_2O_2 a una cubeta que contiene las enzimas *EcTR*, *EcTrx1* y la Prx. Los cursos temporales de Prx1 y Prx2 purificadas mostraron la caída en la absorbancia característica de la actividad peroxidasa de estas proteínas (figura 17), confirmando que se logró purificar ambas proteínas funcionales de manera exitosa. Vale la pena destacar en los cursos cinéticos de estas enzimas, de que se consume todo el peróxido sustrato prácticamente a velocidad máxima (aprox. $0.2 \mu M/s$ y pasa a cero) lo que indica una alta afinidad por ese sustrato (K_m para H_2O_2 bajo como se reportó previamente [82]).

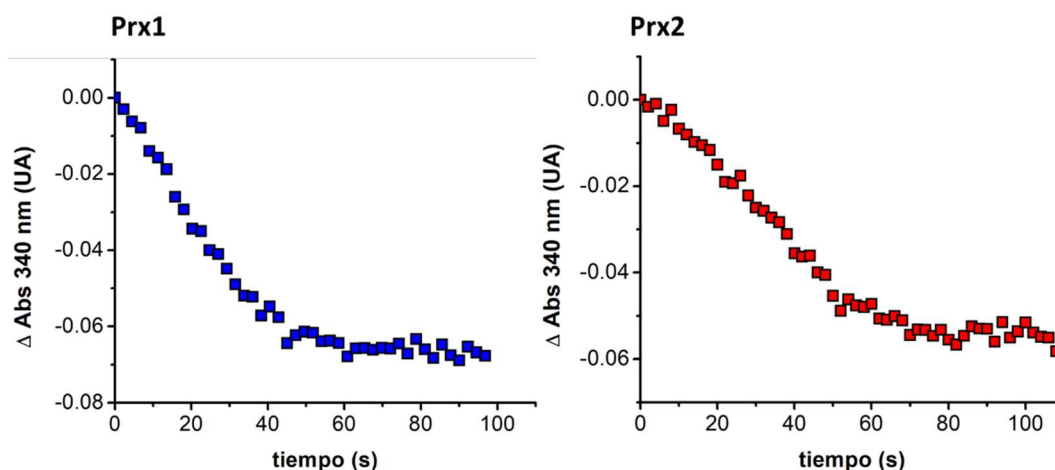


Figura 17. Ensayo de actividad de Prx1 y Prx2 recombinantes. Cursos temporales de actividad peroxidasa de $0.5 \mu M$ Prx1 (izquierda) y Prx2 (derecha) recombinantes con el sistema acoplado Prx-*EcTrx1*-*EcTR* con $10 \mu M H_2O_2$.

ii) Prx1 expresada sin Histag

Expresar una proteína fusionada a un Histag en general simplifica enormemente el proceso de su purificación. En la mayoría de los casos bastan una IMAC y una SEC para obtener proteína con alto grado de pureza. Sin embargo, el producto final va a contener una región extra que no pertenece a la proteína original (hacia el extremo C o N-terminal dependiendo de la construcción), la cual es difícil de predecir si puede afectar la estructura o la actividad de la misma. En particular para las Prxs, se ha reportado que la presencia de un Histag en el extremo N-terminal de la Prx3 afecta tanto su actividad peroxidasa como su estado oligomérico [109]. Por esta razón, se agregó un sitio de corte con la proteasa TEVp a continuación del Histag en las construcciones de Prx1 y Prx2 (figura 13, arriba en el texto). Como se discutió previamente, en el caso de Prx1 no se lograron poner a punto el corte con TEVp para tener un rendimiento del 100%, ni la separación de las proteínas con Histag de las proteínas escindidas en la segunda IMAC, por lo que se buscaron alternativas mientras se intentaba optimizar estos pasos de la purificación. Durante el transcurso de esta tesis nos pusimos en contacto con el grupo del Profesor Luis Eduardo Soares Netto de la Universidad de San Pablo, donde trabajaban con Prx1 humana recombinante expresada sin ningún tag. Ellos tuvieron la amabilidad de donar su plásmido y el protocolo para la purificación de Prx1.

La estrategia de purificación de Prx1 expresada con el plásmido pET17b_PrX1 fue publicada originalmente en [97]. La misma se basa en tomar ventaja del alto punto isoeléctrico de la proteína ($pI = 8.3$, valor teórico calculado con la herramienta <https://web.expasy.org/protparam> a partir de la secuencia primaria de la proteína), para separarla del resto de las proteínas de *E. coli* por intercambio iónico. En la figura 18 se muestra el cromatograma del intercambio aniónico en la columna DEAE-Sepharosa, en la cual se distinguen principalmente cuatro picos. Ya inyectada la muestra, a baja fuerza iónica, mientras se lava la columna con buffer 25 mM Tris pH 8.8, 1 mM EDTA, eluyen dos grandes picos. El primero contiene mayoritariamente impurezas, mientras que el siguiente contiene casi exclusivamente Prx1, como se muestra por SDS-PAGE en la figura 18.

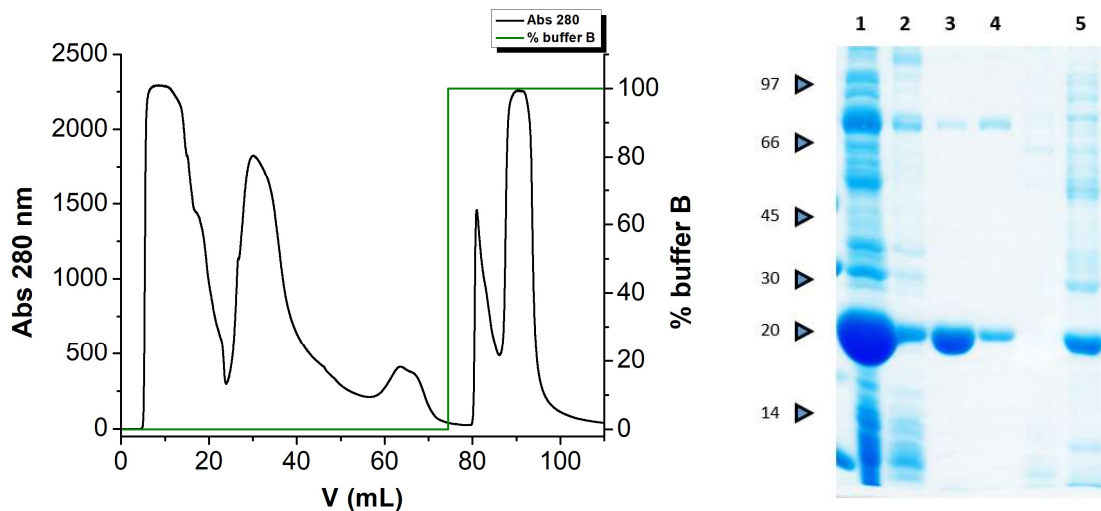


Figura 18. Purificación Prx1 sin Histag. A la izquierda se muestra el cromatograma del intercambio aniónico de Prx1 expresada sin Histag. La Prx1 eluye en la fracción no unida a la columna, en el segundo pico. Para eluir las proteínas que interaccionan con la columna se realizó un escalón de 0 a 100% buffer B (buffer de unión con 2 M NaCl). A la derecha se muestra un gel de la purificación. 1- Fracción soluble; 2- Primer pico de DEAE (5 a 20 mL); 3- Segundo pico DEAE (entre 20 y 50 mL); 4- Tercer pico DEAE (cerca de 80 mL); 5- Último pico del cromatograma.

Como último paso de purificación se inyectó la fracción de Prx1 colectada del intercambio aniónico en una columna Superdex 200 16/60 (habiéndola tratado previamente con DTT por 30 minutos a temperatura ambiente). En la SEC, esta proteína eluye con un perfil similar al de la Prx1 que se expresó como proteína de fusión al Histag. Se confirmó la identidad y el correcto plegamiento de la proteína por medidas de actividad en ensayo con el sistema acoplado Prx-*EcTrx1-EcTR*.

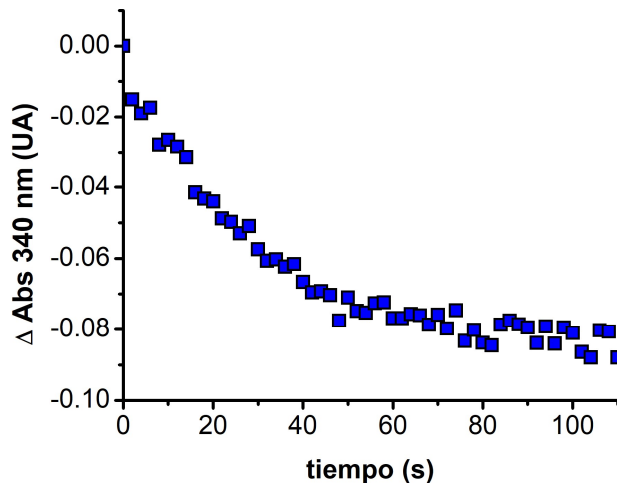


Figura 18. Ensayo de actividad de Prx1 expresada sin Histag. Curso temporal de actividad peroxidasa de 0.5 μM Prx1 recombinante expresada sin Histag con el sistema acoplado Prx-*EcTrx1-EcTR* con 10 μM H_2O_2 .

Tanto el alto rendimiento de la purificación, así como el alto grado de pureza de la proteína que se obtiene en solo dos pasos cromatográficos, nos llevaron a trabajar con esta proteína, que sobre todo, tiene la ventaja de no presentar ningún residuo extra en su secuencia, y evita el problema de tener mezcla de proteína con y sin Histag.

b) Caracterización de la cinética de reacción con H₂O₂

i) Consumo de H₂O₂ en catálisis de Prx1 y Prx2

El ensayo de actividad con el sistema acoplado Prx-EcTrx1-EcTR es una herramienta que permite estudiar las cinéticas del consumo de peróxido de las Prxs en catálisis. De esta manera estudiamos la variación de la velocidad inicial a una concentración fija de peróxido de hidrógeno (10 μM), en función de concentraciones crecientes de EcTrx1 (figura 19). La gráfica obtenida es del tipo Michaelis-Menten, por lo que los datos experimentales ajustan a una hipérbola rectangular según la ecuación 4.

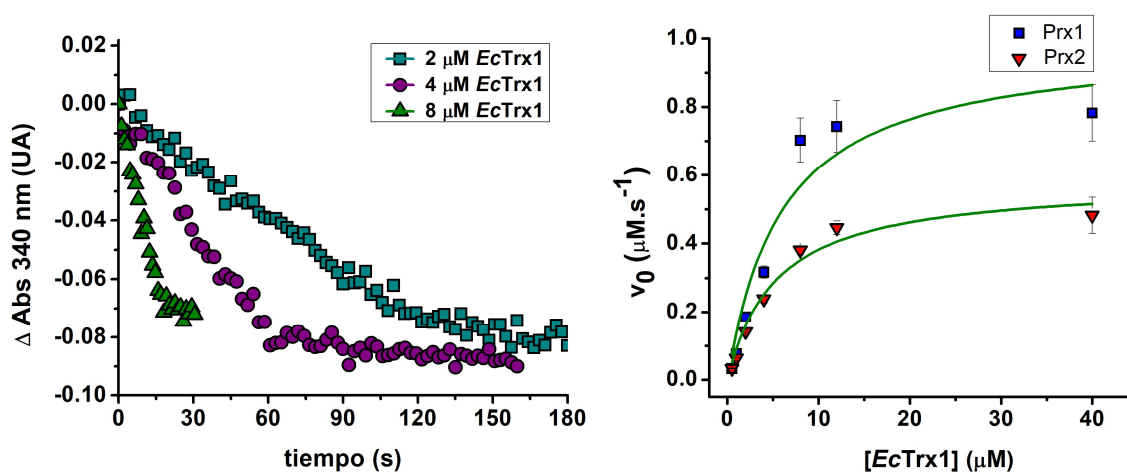


Figura 19. Determinación de parámetros cinéticos para Prx1 y Prx2 respecto a la tioredoxina de *E. coli*. A la izquierda se muestran cursos temporales representativos de la actividad peroxidasa de Prx1 en ensayo con el sistema acoplado Prx-EcTrx1-EcTR- a distintas concentraciones de EcTrx1. A la derecha la gráfica de velocidad inicial en función de la concentración de EcTrx1, tanto para Prx1 (cuadrados azules) como para Prx2 (triángulos rojos). En verde se muestra el ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten.

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ecuación 4}$$

Del ajuste se pueden determinar los parámetros K_m para la *EcTrx1*, V_{max} , y k_{cat} . Si bien las K_m para *EcTrx1* son similares ($6 \pm 2 \mu\text{M}$ para Prx1, y $5 \pm 1 \mu\text{M}$ para Prx2), las proteínas se diferencian en su comportamiento en cuanto a la V_{max} y k_{cat} . Prx1 presenta una $V_{max} = 1.0 \pm 0.1 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ y $k_{cat} = 2.0 \pm 0.2 \text{s}^{-1}$, mientras que Prx2 tiene una $V_{max} = 0.58 \pm 0.04 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ y $k_{cat} = 1.16 \pm 0.08 \text{s}^{-1}$. La constante de especificidad k_{cat}/K_m (antes llamada eficiencia catalítica) es un poco mayor para la Prx1 (0.33 vs $0.23 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) lo que indica una mayor especificidad por *EcTrx1* para esta isoforma.

ii) Espectros de emisión de fluorescencia según el estado redox del sitio catalítico

Según se reportó anteriormente [84, 103], el espectro de emisión de fluorescencia de algunas Prxs se ve afectado por el estado de oxidación de las cisteínas del sitio activo. Particularmente para Prx2 de glóbulo rojo, se reportó que la emisión de fluorescencia de la proteína en estado reducido es mayor a la de la proteína que presenta un disulfuro entre la C_p y la C_R en su sitio catalítico [84]. Confirmamos que esto mismo ocurre con las Prx1 y Prx2 humanas recombinantes, a las cuales se les realizó el espectro de emisión excitando a 295 nm (de manera de detectar específicamente la emisión de los triptófanos) como se muestra en la figura 20.

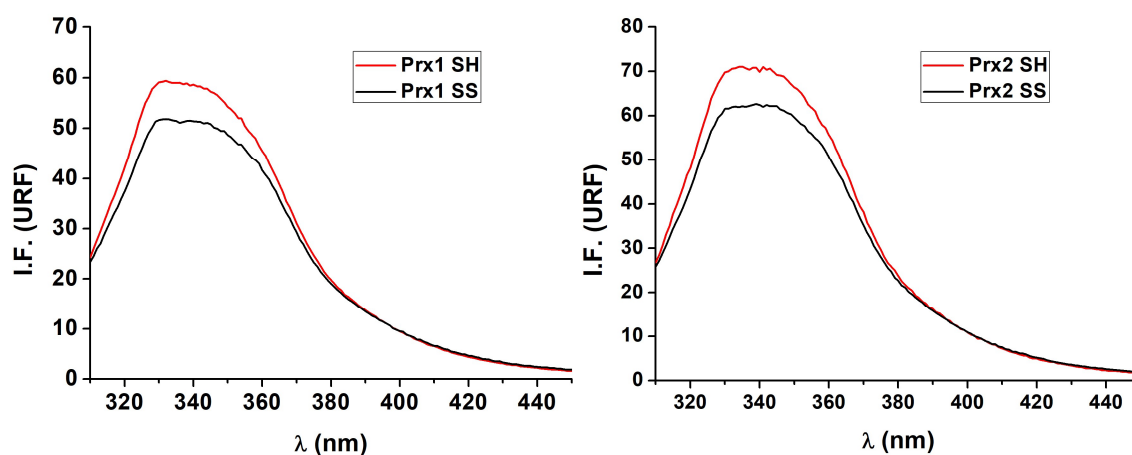


Figura 20. Espectro de emisión de fluorescencia de Prx1 y Prx2 según el estado redox de su sitio activo. $\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$. La intensidad del máximo disminuye cuando la C_p y la C_R están formando un enlace disulfuro respecto a la forma reducida.

Tanto Prx1 como Prx2 poseen dos residuos de triptófano cercanos a C_p y C_R , W87 y W177 para Prx1 y W86, W176 para Prx2, respectivamente. Randall y colaboradores plantean en [84] que la diferencia en los espectros de emisión según el estado de oxidación de la Prx2 de glóbulo rojo

humano, podría deberse principalmente a cambios en el entorno del triptófano 176. Este residuo se encuentra en la región C-terminal de la proteína que se desestructura al pasar de la conformación completamente plegada (FF) a la conformación localmente desplegada (LU) debida a la formación del disulfuro entre la C_P y la C_R. Por lo tanto, no sorprende que las proteínas recombinantes tengan el comportamiento mencionado anteriormente, atendiendo a la conservación de secuencias entre las dos isoformas.

iii) Espectros de dicroísmo circular (CD) diferenciales en el UV cercano.

Los cambios estructurales que sufre Prx al oxidarse a disulfuro también se pudieron ver en el espectro UV-cercano de dicroísmo circular. El espectro CD en la región del UV cercano de Prx2 de glóbulo rojo humano fue estudiado anteriormente por nuestro grupo [84], observándose que la formación del disulfuro en el sitio activo implica cambio importante en estructura terciaria respecto a la forma reducida. De manera similar, el espectro CD de Prx1 mostró diferencias en el mismo sentido cuando se pasa de reducida a oxidada en el sitio activo, donde el hombro entre 260 y 290 nm disminuye al formarse el disulfuro (figura 21).

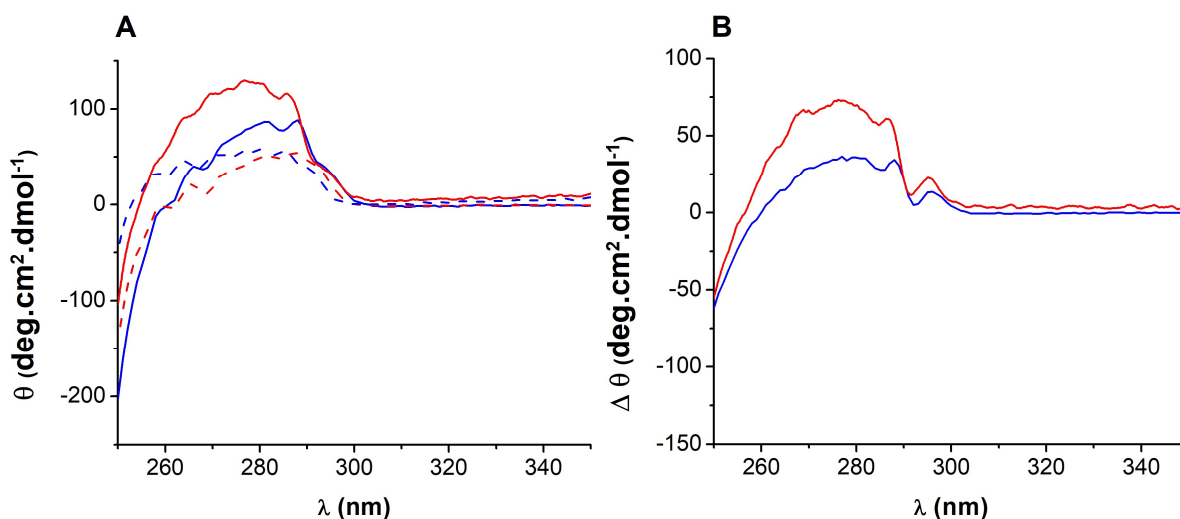


Figura 21. Comparación de espectros CD en la región UV cercano. A) 50 μ M Prx1 (azul) y 31 μ M Prx2 (rojo) en estado reducido u oxidado (trazos sólidos y discontinuos respectivamente). La formación del disulfuro del sitio activo lleva a la disminución del hombro en la región entre 260 y 290 en los dos casos, pero de manera más pronunciada para Prx2. **B)** Espectro CD diferencial entre los estados oxidados y reducidos (reducida – oxidada) para Prx1 (azul) y Prx2 (rojo).

Los espectros en esta región están influenciados por el ambiente de los residuos aromáticos y son indicativos de la estructura terciaria de la proteína. La absorción del enlace disulfuro se produce en el rango 240-290 nm, cerca de 260 nm, sin embargo, dado que las bandas de disulfuros son generalmente más anchas que las correspondientes a las cadenas laterales aromáticas, es muy difícil evaluar su contribución en el espectro proteico. Como ilustra la figura 21B, los cambios en el espectro para Prx1 son menos dramáticos que los observados para Prx2, lo que indica que existen diferencias estructurales entre ellas.

iv) Determinación de constantes cinéticas para la reacción con H_2O_2

En la sección anterior se estudió la fluorescencia de Prx1 y Prx2 en estado estacionario, con un determinado estado de oxidación de las cisteínas del sitio activo (tiol o disulfuro). Usando un equipo de mezclado rápido se puede registrar el curso temporal del cambio de fluorescencia durante la oxidación de la proteína. Por lo tanto, se realizaron experimentos en donde se estudió la cinética de reacción de la oxidación directa de las Prxs 1 y Prx2 por H_2O_2 .

En la figura 22 se muestran cursos temporales representativos de la reacción entre Prx1 y Prx2 con H_2O_2 .

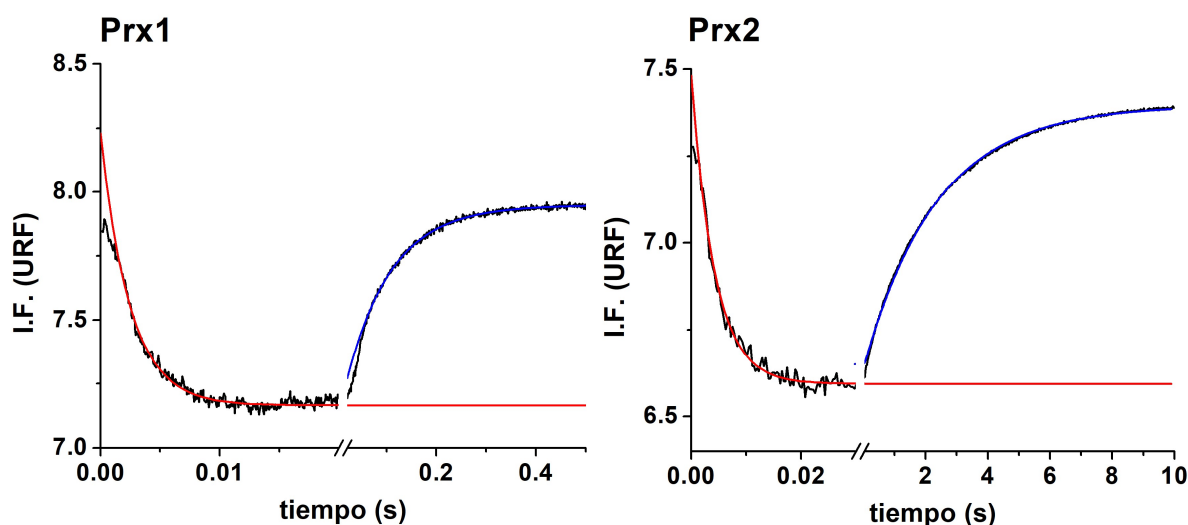


Figura 22. Oxidación de Prx1 y Prx2 por H_2O_2 en Stopped Flow a pH 7.4. Cursos temporales representativos de cambio de la emisión de fluorescencia intrínseca total de 0.25 μM Prx1 (izquierda) y 0.25 μM Prx2 (derecha) por oxidación por 1.5 μM y 1.25 μM H_2O_2 respectivamente. En rojo y en azul se muestran los ajustes a exponenciales simples para cada fase identificada. $\lambda_{ex} = 280$ nm.

El cambio de fluorescencia de las proteínas al oxidarse presenta dos fases claramente distinguibles. Primero se observa una caída rápida de la fluorescencia, en el orden de las milésimas de segundo, seguida de una fase más lenta en la cual se recupera la emisión de fluorescencia. Aunque se visualicen en ese orden, esto no significa que estas fases se den de manera secuencial, por lo que las distinguiremos como fase rápida y fase lenta. El curso temporal completo se puede ajustar a una función del tipo doble exponencial, o puede ajustarse cada fase a una exponencial simple (ecuaciones 1 y 2, en Materiales y métodos), por lo que de los ajustes se pueden determinar constantes cinéticas observadas (k_{obs}). Para procesar los datos se ajustó cada fase de manera independiente a una exponencial simple, y se estudió la relación del valor de las k_{obs} con la concentración de H_2O_2 (figura 23).

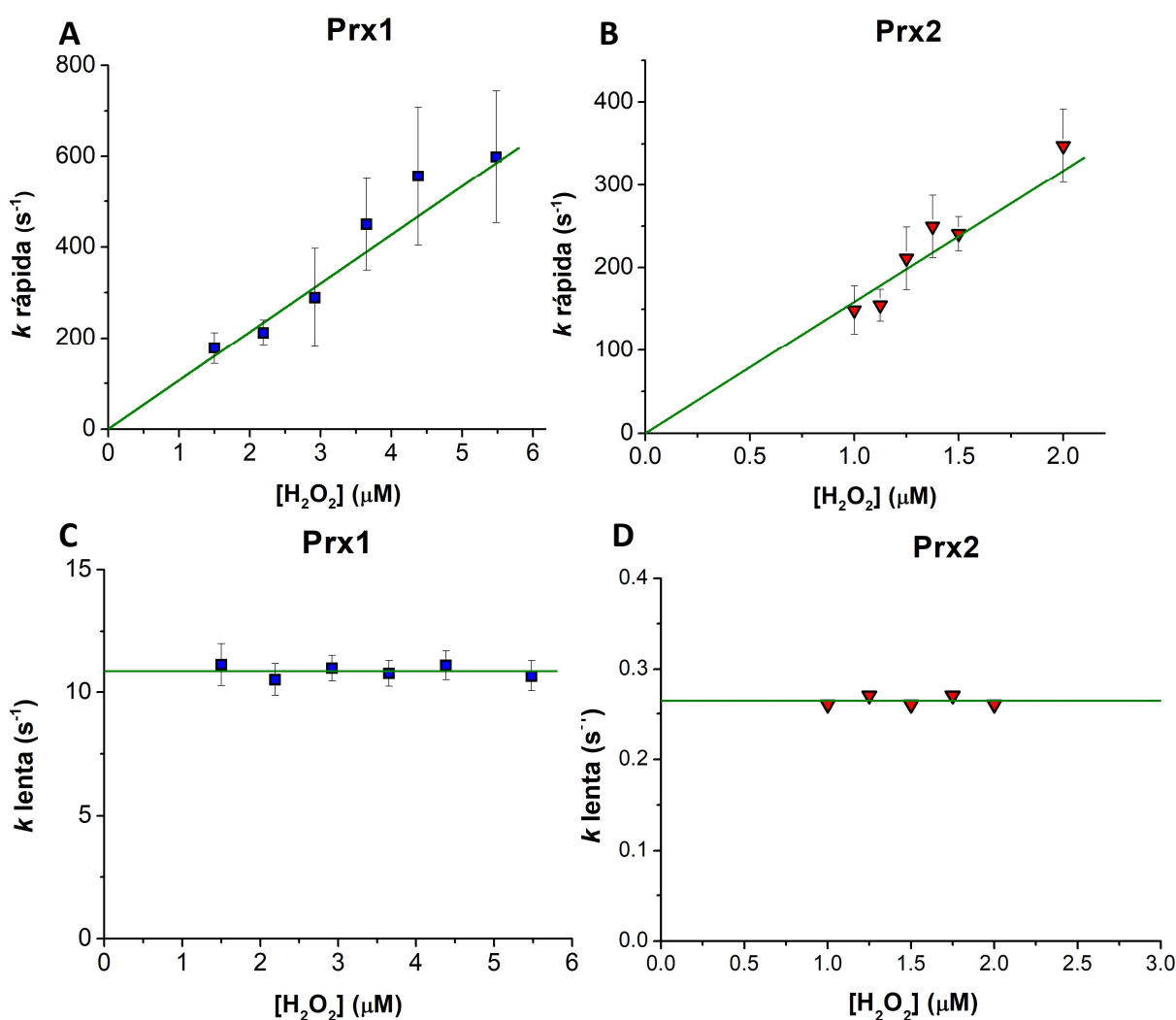


Figura 23. Dependencia del valor de las constantes cinéticas con la concentración de H_2O_2 . La k rápida, correspondiente a la fase en la cual la fluorescencia desciende, depende de manera lineal con la

concentración de H₂O₂ (**A** y **B**), mientras que la constante de la fase ascendente (*k* lenta, **C** y **D**) es independiente de la concentración de oxidante (en este rango de concentraciones de H₂O₂).

Para las dos proteínas, se obtuvieron comportamientos similares en cuanto a la dependencia entre el valor de las constantes de ambas fases y la concentración de peróxido.

Con respecto a la fase rápida, los datos de los gráficos ajustaron a rectas que cortan el eje de ordenadas en el origen ([0,0]). Si bien no estamos estrictamente en condiciones de pseudo-primer orden (exceso de 10 veces más de un reactivo respecto al otro) en todos los puntos medidos, a partir de las pendientes de los ajustes se pueden determinar constantes de reacción de orden 2 para este proceso que asociamos con la oxidación del tiol de la C_P para formar el ácido sulfénico correspondiente. Los valores obtenidos fueron $k_{\text{SOH}} = 1.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para Prx1 y $k_{\text{SOH}} = 1.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para Prx2. Debido a las altas constantes de reacción de esta fase rápida descendente, no es posible tomar medidas a concentraciones mucho más altas de peróxido, en donde el descenso de fluorescencia es tan rápido que ni siquiera se pueden seguir en el stopped-flow. Las constantes de segundo orden obtenidas están en el mismo orden que constantes cinéticas de reacción entre estas Prxs y H₂O₂ reportadas previamente en la literatura, determinadas por competencia con HRP [82].

En cuanto a la fase lenta (fluorescencia ascendente), la k_{obs} es independiente de la concentración de peróxido (figura 23 C y D) tanto para Prx1 como para Prx2. Como se reporta en el artículo [104], interpretamos este cambio de fluorescencia como lo que llamamos el paso de resolución en el ciclo catalítico de las 2-Cys Prxs (figura 2, en Introducción), que implicaría la formación del disulfuro entre el sulfénico de la C_P y el tiol de la C_R en el sitio activo (lo cual incluye la transición desde la conformación FF a la conformación LU, ver Introducción), ya que este proceso es de orden cero (independiente) respecto al H₂O₂. Si bien el disulfuro que se forma es intermolecular, el proceso se considera de orden cero ya que estas proteínas forman un dímero fuerte, tanto en el estado reducido como oxidado, no registrándose la disociación a monómeros a estas concentraciones de proteína. A partir de estos gráficos, determinamos entonces que la constante de resolución para Prx1 es $k_{\text{res}} = 10.9 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$, y para Prx2 es $k_{\text{res}} = 0.27 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4. Para el caso de Prx2, previamente se reportó el valor de la constante del cierre de disulfuro en el trabajo de Peskin y colaboradores [27], siendo $k_{\text{res}} = 2 \text{ s}^{-1}$, por lo que hay un orden de magnitud de diferencia con nuestros resultados. Para explicar esta diferencia, hay que tener en cuenta que los abordajes para estudiar esta reacción son totalmente diferentes, ya que en el trabajo de Peskin determinan la constante por resultados de WB y espectrometría de masa, siendo este último un método mucho más indirecto al propuesto en este trabajo.

Por último, hay que mencionar que durante el transcurso de esta Maestría, Carvalho y colaboradores, reportaron las constantes de valor 14.9 s^{-1} y 0.31 s^{-1} para el cierre del disulfuro de Prx1 y Prx2 respectivamente, determinados con el mismo abordaje experimental utilizado en este trabajo [88].

Los resultados mostrados más arriba sobre la determinación de las constantes cinéticas de reacción con H_2O_2 y de cierre de disulfuro por cambios de fluorescencia de las Prxs en stopped-flow, fueron publicados en [104].

v) Constante de sobreoxidación

Más adelante nos planteamos la posibilidad de utilizar los cambios de fluorescencia intrínseca de las Prx para determinar también la constante de sobreoxidación por H_2O_2 , $k_{\text{SO}_2\text{H}}$. La hipótesis que nos llevó a pensar esto, parte de la idea de que el cierre de disulfuro y la sobreoxidación son procesos que compiten entre ellos, ya que son los dos “camino” que puede seguir el ácido sulfénico de la C_p , una vez que se formó por la reacción del tiol con H_2O_2 . De ser así, y si realmente el cambio de fluorescencia en la fase lenta de los cursos temporales se debe al cierre de disulfuro, entonces deberíamos observar un aumento en la k_{obs} a medida que aumentamos la concentración de H_2O_2 debido a la competencia del proceso de sobreoxidación. Si bien esto parece contradecir los resultados publicados, en los que reportamos que la k_{obs} de la fase lenta es independiente de la concentración de H_2O_2 , hay que tener en cuenta que el rango de concentraciones de peróxido utilizados en ese experimento se mantiene en el orden de micro molar. En la referencia [27], los autores determinan las constantes de sobreoxidación para las Prx2 y Prx3 humanas, y reportan el valor $k_{\text{SO}_2\text{H}} = 12000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para ambas, por lo que se necesitarían concentraciones del orden de mili molar para que haya una contribución observable por la competencia de este proceso respecto al cierre de disulfuro.

En la figura 24 se muestran los gráficos de k_{obs} vs. $[\text{H}_2\text{O}_2]$ para Prx1 y Prx2, donde las k_{obs} se obtuvieron a partir de los ajustes a exponenciales simples de los cursos temporales de oxidación directa de las proteínas reducidas por H_2O_2 . A diferencia del experimento publicado en el artículo [104], esta vez se llegó a utilizar concentraciones del orden de mili molar de peróxido.

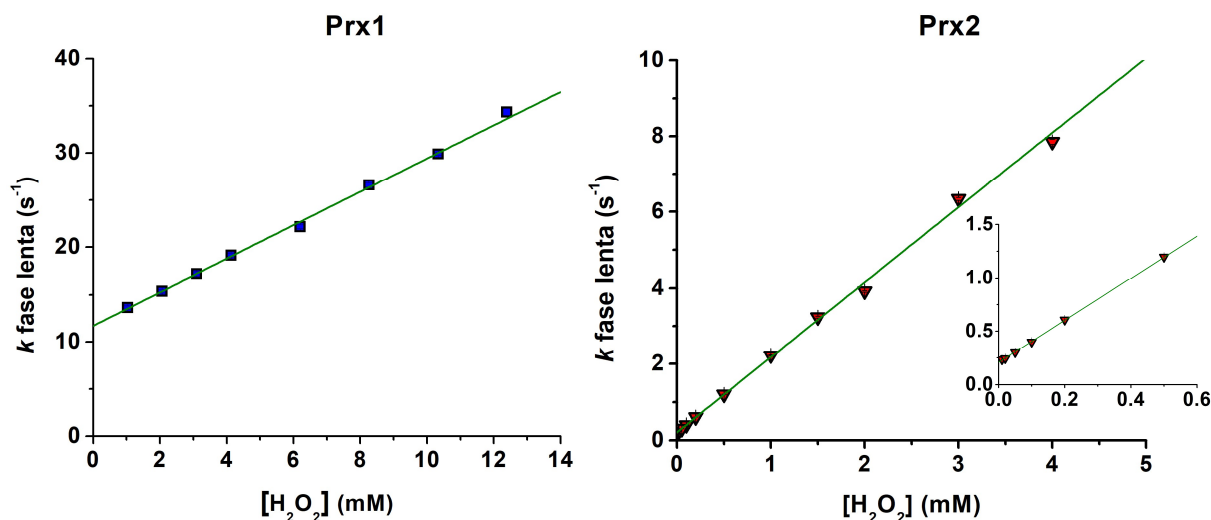


Figura 24. Determinación de la constante de sobreoxidación k_{SO_2H} . La constante observada asociada a la fase lenta de los cursos temporales de oxidación depende de manera lineal con la concentración de H_2O_2 a concentraciones en el orden de mili molar. A partir de la pendiente de la recta se determina la constante de sobreoxidación, y de la ordenada en el origen la constante de cierre del disulfuro. A la izquierda se muestran los datos para Prx1, y a la derecha los de Prx2. En el inserto de la gráfica de la derecha se muestra una ampliación del origen del gráfico, mostrando el punto de corte distinto de cero para el ajuste lineal.

Los datos presentaron una tendencia lineal, por lo que fueron ajustados a una recta. Nuestra interpretación de los parámetros de la recta, es que el valor en que ésta corta el eje de las ordenadas corresponde a la k_{res} , de acuerdo con lo que reportamos previamente. Al aumentar la concentración de peróxido, la sobreoxidación comienza a competir con el cierre del disulfuro, lo cual se refleja en el aumento de la constante observada. Proponemos que a partir de la pendiente de la recta se puede obtener la constante de reacción del sulfénico con peróxido, es decir la k_{SO_2H} . Esto tiene sentido si se tiene en cuenta además que los únicos pasos en el ciclo catalítico de las Prx de orden 1 respecto a la concentración de H_2O_2 son la formación de ácido sulfénico (oxidación) y la formación de ácido sulfínico (sobreoxidación) de la C_p . Cinéticamente, tiene sentido entonces que la pendiente de la recta los gráficos de este experimento correspondan a la sobreoxidación de la C_p . En ausencia de peróxido (o muy bajas concentraciones) donde no existe la competencia de la sobreoxidación, la constante de primer orden refleja entonces el proceso de formación del disulfuro, k_{res} . Según los datos de este experimento, las constantes cinéticas de Prx1 son $k_{res} = 11.7 \text{ s}^{-1}$ y $k_{SO_2H} = 1.77 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, mientras que las de Prx2 son $k_{res} = 0.21 \text{ s}^{-1}$ y $k_{SO_2H} = 1.97 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Estos resultados fueron publicados este año en la revista Protein Science [110].

Al igual que en el caso de la determinación de la constante de cierre de disulfuro, la constante cinética de sobreoxidación de Prx2 puede compararse con lo previamente reportado en el trabajo

de Peskin [27], $k_{SO_2H} = 1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Otra vez hay un orden de magnitud de diferencia respecto a la constante cinética aquí reportada, y una vez más, probablemente la diferencia se explique por la diferencia en los abordajes experimentales.

En la siguiente tabla se resumen los parámetros cinéticos determinados en este trabajo con este abordaje para H_2O_2 .

Tabla 2. Parámetros cinéticos determinados a partir de los experimentos de stopped-flow para la oxidación directa de Prx1 y Prx2 por H_2O_2 .

	k_{SOH}	k_{res}	k_{SO_2H}
Prx1	$1.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$11 \pm 1 \text{ s}^{-1}$	$1.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
Prx2	$1.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$0.2 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$	$2.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

vi) Susceptibilidad a la sobreoxidación por H_2O_2

Una vez oxidado a ácido sulfénico el tiol de la C_P en el sitio activo de una 2-Cys Prx típica, el mismo puede continuar su vía de reacción por dos caminos: seguir adelante con el ciclo catalítico, reaccionando con el tiol de la C_R de la subunidad adyacente, formando un puente disulfuro; o reaccionar con una segunda molécula de peróxido, reduciendo a esta última, y formando ácido sulfínico en la C_P . Por esta segunda vía, el ciclo catalítico se interrumpe, lo cual lleva a la pérdida de actividad peroxidasa de la enzima. La única manera reportada para la recuperación de la actividad enzimática es por la reducción mediada por la sulfirredoxina, enzima presente solamente en eucariotas (siendo la excepción unos pocos organismos procariotas que expresan Prx sensibles) [29]. Esta enzima reduce el sulfínico de la C_P a sulfénico, a expensas de ATP y NADPH [33]. Como se comentó en la Introducción, la susceptibilidad a la sobreoxidación entre las Prx catalogadas como sensibles presenta un amplio espectro entre las distintas Prx.

Previamente se reportó que Prx1 es una peroxidasa menos eficiente que Prx2, debido a que la primera se inactiva a concentraciones menores de H_2O_2 respecto a la última [25]. Sin embargo, en este trabajo observamos lo contrario en medidas de actividad con el ensayo acoplado (figura 25), en donde se observa que a medida que aumenta la concentración de peróxido que se utiliza para iniciar la reacción, hay una inactivación más pronunciada de Prx2 que de Prx1.

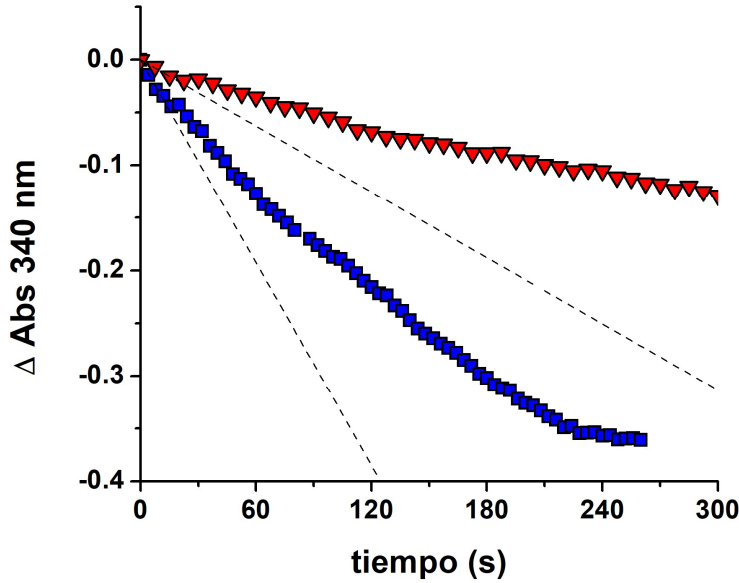


Figura 25. A altas concentraciones de H_2O_2 , la actividad peroxidasa de Prx2 se ve más afectada que la de Prx1. Cursos temporales de la actividad peroxidasa de Prx1 (cuadrados azules) y Prx2 (triángulos rojos) con el sistema acoplado NADPH-*Ec*TR-*Ec*Trx1. La reacción se inicia con la adición de 50 μ M H_2O_2 . La línea negra discontinua representa la recta que mejor se ajusta a los primeros 10 segundos de reacción.

La inactivación en el ciclo catalítico no tiene que ser necesariamente consecuencia de la sobreoxidación de la peroxirredoxina. Para evaluar la susceptibilidad a la sobreoxidación con un abordaje ortogonal al ensayo de actividad, se evaluó por inmunquímica, la formación de ácido sulfínico en la C_p de Prx1 y Prx2, tratando a cada enzima reducida, con distintos excesos de H_2O_2 . Las muestras se resolvieron por SDS-PAGE no reductor, y luego se visualizó el resultado por tinción con azul de Coomassie, y por Western blot con anticuerpo anti-Prx-SO₂H (figura 26).

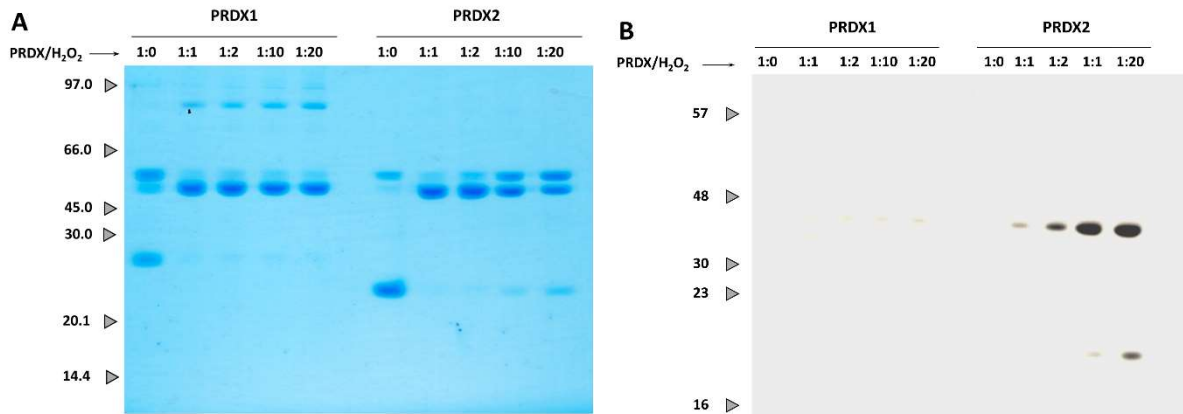


Figura 26. Prx1 es una peroxidasa más robusta que Prx2. Las proteínas reducidas fueron tratadas con excesos crecientes de H_2O_2 y resueltas por SDS-PAGE. (A) Tinción con Coomassie. La aparición de dobles bandas en la región de peso molecular correspondiente al dímero se debe a las conformaciones más compacta o desplegada del dímero según el estado redox de sus dos sitios catalíticos. (B) WB con anticuerpo α -SO₂H en Prxs.

El patrón de bandas que se observa en el experimento de la figura 26, se interpreta según las distintas conformaciones que puede adquirir la proteína en condiciones no reductoras. En el caso en que la proteína se encuentre totalmente reducida (relación Prx/H₂O₂= 1:0), se debería observar exclusivamente una banda correspondiente al monómero, ya que la presencia de SDS desestabiliza la estructura cuaternaria, y no habría disulfuros en el sitio activo de la enzima. Una vez que se empieza a agregar peróxido, el patrón comienza a modificarse, según la velocidad con la que se “cierra” el disulfuro en el sitio catalítico. En principio, a concentraciones de peróxido a las cuales no se inactiva la Prx, se da la formación de ácido sulfénico en la C_P, seguida por el cierre del disulfuro entre la C_P y la C_R de la subunidad adyacente. Cuando se forma el disulfuro en ambos sitios activos, la proteína corre como lo que llamamos dímero compacto (doble disulfuro). A concentraciones mayores, puede ocurrir que uno de los sitios llegue a formar el disulfuro, mientras que en el otro se forme ácido sulfínico en la C_P, imposibilitando el cierre a disulfuro con la C_R. Este dímero tiene una conformación más desplegada respecto al dímero con dos disulfuros, por lo que migra como una banda con menor movilidad electroforética (ofrece mayor fricción). Entonces la banda del dímero desplegado debería aparecer con mayor intensidad a medida que se incrementa el exceso de peróxido. Eventualmente, en algún punto, la concentración de peróxido es tan alta que lleva a la formación de ácido sulfínico en las dos C_P del dímero, por lo que en el gel se puede observar proteína que migra como monómero.

La figura 26A muestra el SDS-PAGE no reductor teñido por Coomassie, en el cual se comparan los tratamientos con peróxido de Prx1 y Prx2. Se observa que para Prx1, todos los excesos de peróxido usados (desde 1:1 a 1:20) llevan a la formación de manera mayoritaria del dímero compacto, notándose de manera muy leve la banda del dímero desplegado, la cual se va intensificando con el aumento de H₂O₂. Se da una particularidad en el caso de la condición 1:0, en la cual debiera aparecer solamente la banda correspondiente al monómero reducido. En este experimento, además del monómero se observa una banda intensa de dímero desplegado y una banda más tenue de dímero compacto, lo que indica que la proteína se ha oxidado algo durante el tiempo de manipulación. De todas formas, que la banda de dímero desplegado desaparezca con el agregado de peróxido, indica que se trata de dímeros que contienen un sitio catalítico oxidado a disulfuro, mientras que el segundo se encuentra reducido. Además, se descarta que se deba enteramente a proteína con un sitio catalítico sobreoxidado por lo revela el WB. Todo esto hace pensar que la presencia de esa banda en la condición 1:0 se deba a oxidación parcial de la muestra (probablemente por O₂) desde su reducción hasta que se sembró en el gel.

En contraste con Prx1, lo que se observa para Prx2 es que las concentraciones de peróxido con las que se trabajó, llevan a una transición mucho más marcada de la proporción de dímero compacto a dímero desplegado. La sobreoxidación se evidencia además con la aparición de monómero a concentraciones altas de peróxido, cosa que no ocurre con Prx1.

Todas estas mismas muestras fueron resueltas en un SDS-PAGE no reductor, transferidas a una membrana de PVDF y reveladas por WB usando anticuerpo anti-SO₂H en la C_p (anticuerpo que reconoce ácido sulfínico o sulfónico en la C_p de Prxs en general). Los resultados del WB (figura 26B) se complementan y confirman los resultados observados en los geles teñidos con Coomassie.

Los resultados de susceptibilidad a sobreoxidación van en línea con las constantes cinéticas para la reducción de H₂O₂, el cierre de disulfuro y la sobreoxidación determinadas en la sección anterior. Analizando los tres pasos del ciclo catalítico caracterizados, podemos afirmar que las reacciones del tiol y del ácido sulfénico de la C_p con H₂O₂ son similares para las dos Prx (en el orden de 10⁸ M⁻¹s⁻¹ para la primera, y 10³ M⁻¹s⁻¹ para la segunda), mientras que la velocidad a la que ocurre el cierre del disulfuro difiere en un orden de magnitud entre ambas proteínas (11 s⁻¹ para Prx1 y 0.3 s⁻¹ para Prx2). El cierre más rápido del disulfuro de la Prx1, implica que el ácido sulfénico de su C_p esté disponible por menos tiempo para poder reaccionar con una segunda molécula de H₂O₂, lo que la hace entonces más robusta a la inactivación por sobreoxidación.

En una publicación de este año, Bolduc y colaboradores [28] también observaron que Prx1 es más robusta que Prx2 (de acuerdo a lo observado en este trabajo y en contraposición a lo observado en [25]), y lograron identificar dos motivos estructurales relacionados a la diferencia en la susceptibilidad a la sobreoxidación (los denominan motivos A y B). Los residuos de estos motivos estructurales se encuentran cercanos al sitio catalítico, y en la interfase por la cual interaccionan los dímeros en el decámero de estas proteínas.

c) Prx1 y peroxinitrito

i) Actividad peroxinitrito reductasa

En la literatura suele definirse a las peroxirredoxinas como enzimas que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno, alquil hidroperóxidos y peroxinitrito. La reducción de peroxinitrito por parte de la Prx2 de glóbulo rojo fue caracterizada por [82]. En cambio, no hay reportes de la caracterización de esta reacción para la Prx1. Por esto mismo, y para poder continuar con la

comparación de estas proteínas, se determinó la constante de reacción entre Prx1 reducida y peroxinitrito.

Para esto se usaron dos abordajes diferentes; un ensayo de competencia con HRP, como fue reportado anteriormente [106, 107], en donde se sigue la reacción por absorbancia del producto formado, y un segundo abordaje en el cual se determinan los parámetros cinéticos midiendo cambios de la fluorescencia intrínseca de la Prx por la oxidación directa con peroxinitrito (de manera similar a lo que se hizo con H_2O_2).

(I) Determinación de la constante de reacción de reducción de peroxinitrito por Prx1 en ensayo de competencia con HRP

Si bien la constante de reacción entre HRP y peroxinitrito fue reportada previamente [92, 106], su valor puede variar dependiendo de las condiciones experimentales en las cuales se determine (buffer, temperatura, lote de enzima), por lo cual se procedió a determinar primeramente esta constante en nuestras condiciones experimentales (figura 27).

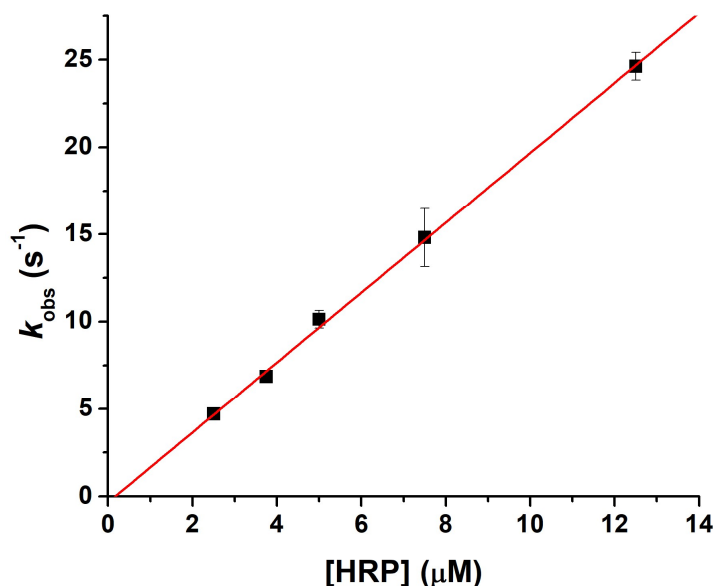


Figura 27. Determinación de constante de segundo orden para la reacción entre HRP y peroxinitrito. La constante observada para la reacción entre peroxinitrito y concentraciones crecientes de HRP varía de forma lineal. A partir de la pendiente de la recta que mejor se ajusta a los datos experimentales, se determina la constante cinética de segundo orden entre peroxinitrito y HRP para nuestras condiciones experimentales.

Para la determinación de la constante cinética de orden dos de la reacción entre HRP y peroxinitrito, se siguieron los cursos temporales de la reacción para una concentración fija de peroxinitrito (0.7

μM), frente a distintas concentraciones de HRP ($2.5 - 12.5 \mu\text{M}$). Los cursos temporales se ajustaron a exponenciales simples, y se graficaron las constantes observadas en función de la concentración de enzima (gráfico secundario, figura 27). En estas condiciones experimentales, se determinó una constante de reacción entre HRP y peroxinitrito $k_1 = (2.0 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, en acuerdo con lo previamente reportado [92].

Una vez determinada la constante de reacción entre peroxinitrito y HRP, se procedió a realizar el ensayo de competencia, fijando las concentraciones de HRP y peroxinitrito, y agregando concentraciones variables de Prx1 reducida en la jeringa que contiene HRP. En la figura 28 se muestran los registros promediados de 15 corridas para cada condición evaluada. A partir de los ajustes a exponenciales simples, se pueden determinar todos los parámetros necesarios para calcular la k_{ONOOH} utilizando la ecuación 3.

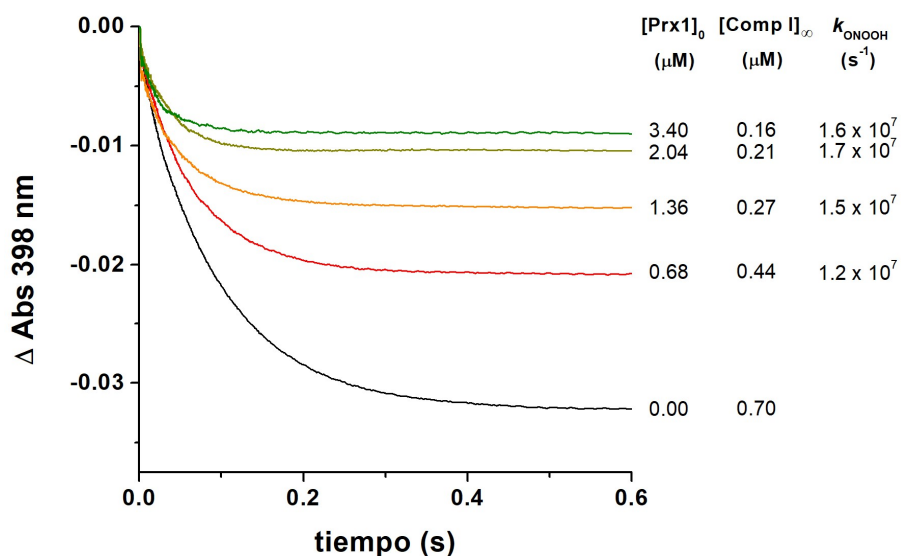


Figura 28. Determinación de constante de reducción de peroxinitrito k_{ONOOH} para Prx1 en ensayo de competencia con HRP. Para cada concentración de Prx1 evaluada se puede determinar un valor para la constante de segundo orden.

Con este abordaje experimental, se determinó que Prx1 es capaz de reducir peroxinitrito con una constante de reacción $k_{\text{ONOOH}} = (1.5 \pm 0.3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25°C .

(II) Determinación de la constante de reacción de Prx1 y Prx2 con peroxinitrito por fluorescencia.

Teniendo en cuenta los cambios en la fluorescencia intrínseca que presentan las peroxirredoxinas al oxidarse (que están bien establecidos en el caso de la oxidación por H_2O_2), nos propusimos estudiar su actividad peroxinitrito reductasa utilizando este mismo abordaje, de manera de utilizar un método directo para la determinación de la constante de reacción.

En la figura 29 se muestran los cursos temporales de oxidación de Prx1 (izquierda) y Prx2 (derecha) por concentraciones variables de peroxinitrito.

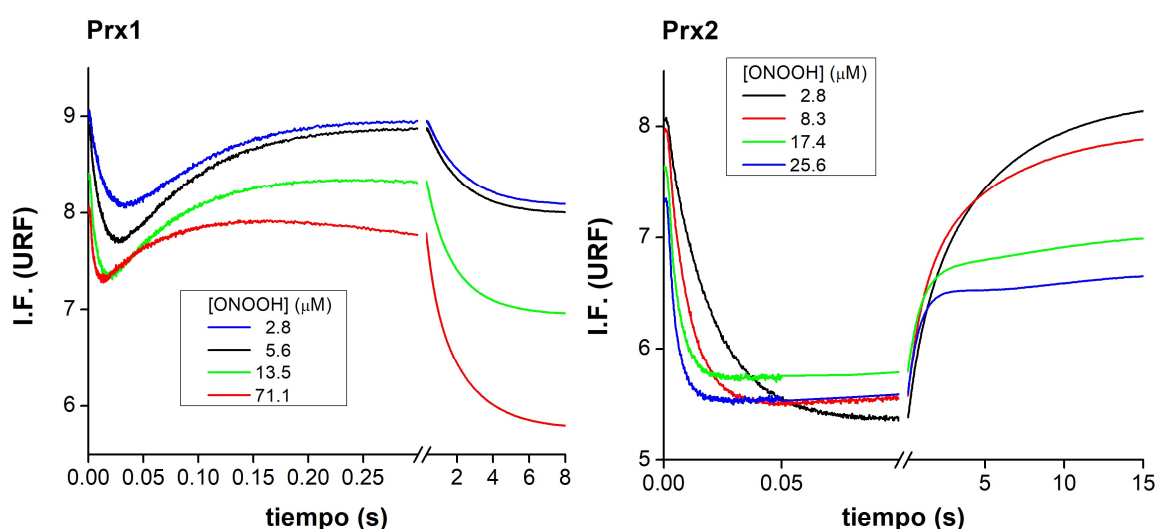


Figura 29. Cursos temporales de fluorescencia de Prx1 y Prx2 por oxidación con peroxinitrito. Registros del cambio de fluorescencia intrínseca de Prx1 (izquierda) y Prx2 (derecha) por oxidación con concentraciones variables de peroxinitrito. En Prx1 se distinguen 3 fases exponenciales, a diferencia de Prx2, en la cual se observan 2 fases claras a bajas concentraciones (2.8 y 8.3 μM peroxinitrito), mientras que a las concentraciones mayores (17.4 y 25.6 μM peroxinitrito), la contribución de un tercer proceso se hace más evidente.

Los cambios de fluorescencia que presentaron las proteínas por la oxidación con peroxinitrito difieren levemente de lo que se observa cuando la oxidación se da por peróxido de hidrógeno. La diferencia la marca la aparición de una tercera fase, que es evidente en el caso de Prx1 y un poco más sutil para Prx2. La primera fase que se distingue para ambas proteínas es la caída rápida de la señal, que la interpretamos como la reacción de orden dos entre el tiol de la C_p de la peroxirredoxina con el oxidante, seguida del aumento en la señal, que siempre es más rápido para Prx1 que para Prx2 en una misma condición (interpretado como el cierre de disulfuro, en competencia con la sobreoxidación de la proteína). Estas dos primeras fases mostraron la dependencia lineal con la

concentración de oxidante que se esperaba ver según nuestra interpretación de los cambios observados (figura 30). La tercera fase, se hace notoria en una escala de tiempo en el orden de los segundos. Como Prx1 cierra el disulfuro en el orden de los milisegundos, las tres fases se disciernen de manera clara en los registros. Sin embargo, en el caso de Prx2, el cierre de disulfuro se resuelve en el orden de los segundos, por lo cual no es posible analizar esta tercera etapa. Lo que queda claro, es que hay una dependencia con la concentración de peroxinitrito. Para Prx1, se logró ajustar la tercera fase a exponenciales simples, y a partir del gráfico secundario de k_{obs} en función de la concentración de peroxinitrito, se observa que dependen entre ellos de manera no lineal.

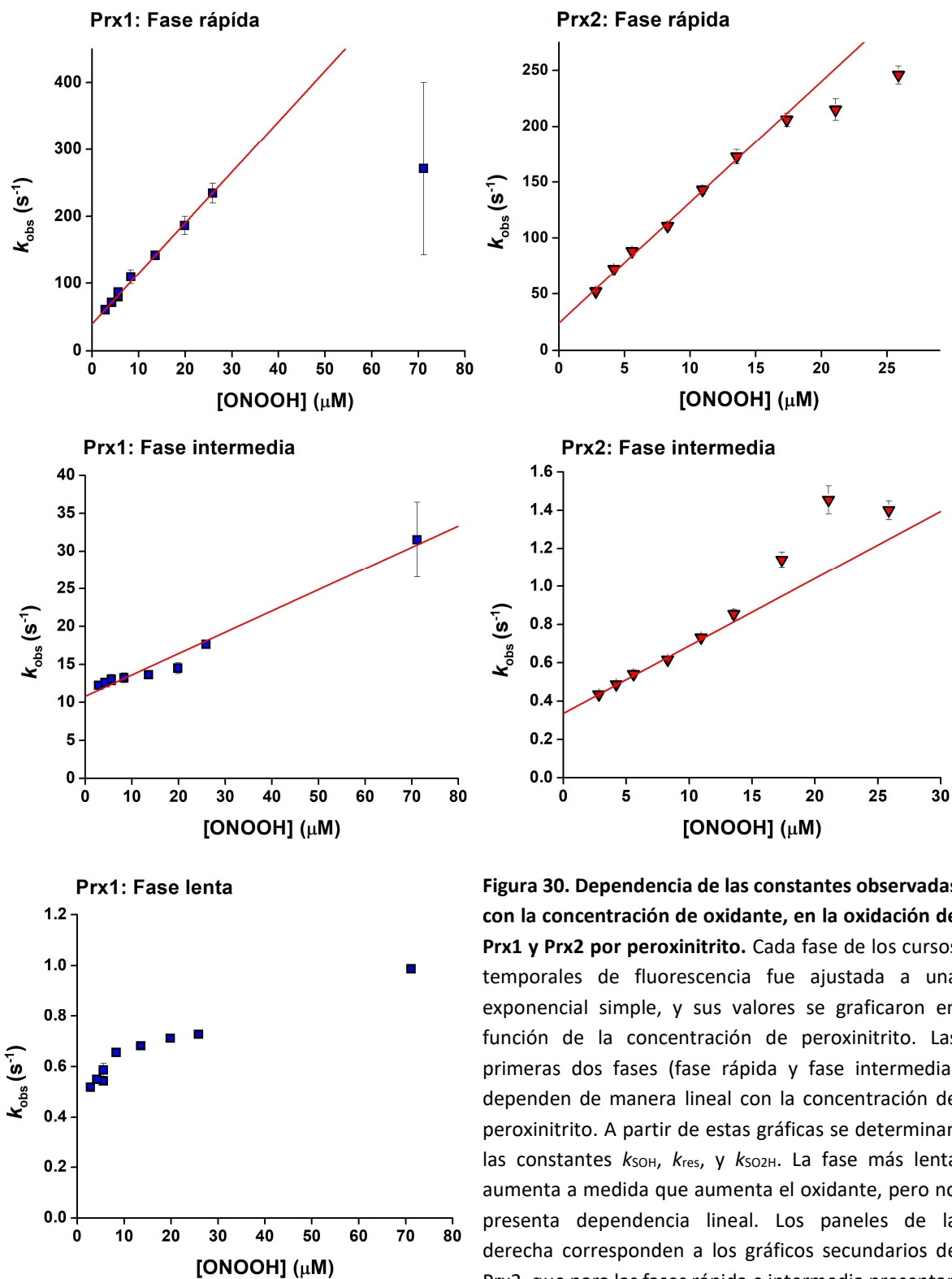


Figura 30. Dependencia de las constantes observadas con la concentración de oxidante, en la oxidación de Prx1 y Prx2 por peroxinitrito. Cada fase de los cursos temporales de fluorescencia fue ajustada a una exponencial simple, y sus valores se graficaron en función de la concentración de peroxinitrito. Las primeras dos fases (fase rápida y fase intermedia) dependen de manera lineal con la concentración de peroxinitrito. A partir de estas gráficas se determinan las constantes k_{SOH} , k_{res} , y k_{SO2H} . La fase más lenta aumenta a medida que aumenta el oxidante, pero no presenta dependencia lineal. Los paneles de la derecha corresponden a los gráficos secundarios de Prx2, que para las fases rápida e intermedia presentan una tendencia lineal de la misma manera que el caso de Prx1. La tercera fase más lenta para Prx2 no se pudo caracterizar.

A partir de los gráficos secundarios de la figura 30, y siguiendo la misma lógica de los experimentos realizados con H_2O_2 , se determinaron los parámetros cinéticos de la reacción entre la C_p de las peroxirredoxinas y peroxinitrito, los cuales se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3. Parámetros cinéticos determinados a partir de los experimentos de stopped-flow para la oxidación directa de Prx1 y Prx2 por peroxinitrito.

	k_{SOH}	k_{res}	k_{SO_2H}
Prx1	$7.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	12.02 s^{-1}	$2.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
Prx2	$1.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	0.34 s^{-1}	$3.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Al igual que lo descrito anteriormente, de la pendiente del gráfico secundario de la fase rápida se obtiene la constante de segundo orden de oxidación de la Prx por peroxinitrito, mientras que del gráfico secundario de la fase intermedia (la fase lenta en la oxidación por H_2O_2) se determinan la constante de primer orden del cierre de disulfuro de la ordenada en el origen, y la constante de sobreoxidación de la pendiente.

Las constantes de reacción entre las C_p de Prx1 y Prx2 con ONOOH son similares entre sí, y además son un orden de magnitud menores en comparación con las obtenidas para H_2O_2 , lo cual coincide con lo reportado previamente respecto a la especificidad de sustrato peróxido de las Prx de la subfamilia Prx1. En el caso de Prx1, la constante de segundo orden obtenida por este método es coherente con lo determinado en los ensayos de competencia, siendo ambos valores del orden $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. La misma comparación se puede hacer para Prx2, con la referencia de lo reportado en [82], en donde se determina esta constante por ensayo de competencia con una porfirina de manganeso. En ambos casos, también las constantes son del orden $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Estas constantes de reacción, junto a la alta concentración celular de estas enzimas, posicionan a ambas Prx como los principales sistemas de eliminación de ONOOH en el citosol. Por otra parte, como era de esperar, los valores de las constantes de cierre de disulfuro coinciden con lo observado en los experimentos con H_2O_2 tanto para Prx1 como para Prx2. En cuanto a las constantes de sobreoxidación, el ONOOH sobreoxida la C_p de estas proteínas 10 veces más rápido que el H_2O_2 , lo cual coincide con lo observado previamente por WB [82].

Sobre la tercera fase observada en los cursos temporales, hay que tener en cuenta que este proceso ocurre en la escala de tiempo en la que acontece el decaimiento espontáneo del ONOOH por isomerización ($t_{1/2} = 2.2 \text{ s}$), lo que lleva a la formación de especies radicalares, por lo que podría ser

atribuida a una combinación de procesos como la oxidación de triptófanos, y oxidación y nitración de tirosinas.

ii) Efecto del peroxinitrito en la actividad peroxidasa de Prx1.

La oxidación o sobreoxidación de la C_p, no son las únicas modificaciones post-traduccionales que se pueden generar en peroxirredoxinas por peroxinitrito. En el mismo trabajo en el que se determinó la constante de reacción de la Prx2 de glóbulo rojo humano con peroxinitrito [82], Manta y colaboradores además de la oxidación y sobreoxidación del sitio activo, observaron formación de nitrotirosinas y ditirosinas luego de tratar a la enzima con exceso de este agente oxidante. Más adelante, en el año 2013 Randall y colaboradores profundizaron en la caracterización del efecto de la nitración de tirosinas en la actividad peroxidasa y la susceptibilidad a la sobreoxidación de la misma Prx2 [83]. En este trabajo en particular, el tratamiento con peroxinitrito se realizó sobre Prx2 previamente oxidada a disulfuro, de manera de proteger las cisteínas catalíticas y estudiar el efecto de modificaciones en otros residuos aminoacídicos de la enzima. Se confirmó la nitración de tirosinas por WB y espectrometría de masa. Sorpresivamente, se observó que este tratamiento lleva a un aumento en la actividad peroxidasa de la enzima, a la vez que una disminución de la susceptibilidad a la sobreoxidación, es decir, la convierte en una peroxirredoxina más robusta. Teniendo presente la alta identidad y similitud que presentan Prx1 y Prx2 en su secuencia primaria, nos planteamos explorar el efecto de la nitración por peroxinitrito sobre Prx1, para ver si la activación y robustez observadas en Prx2 nitrada son exclusivas de esta isoforma, o si en cambio, se trata de una característica compartida.

La primera aproximación para el tratamiento de Prx1 con peroxinitrito fue en condiciones idénticas a las ensayadas con la Prx2 de glóbulo rojo. Esto es, a 100 μ L de 130 μ M Prx1 oxidada en el sitio catalítico (Prx1_{SS}), se le adicionaron 10 μ L de peroxinitrito 6.5 mM en adiciones a ritmo constante de a 1 μ L, de manera de simular un flujo de peroxinitrito (la idea es evitar una adición en forma de bolo). Cada vez que se realiza un tratamiento con peroxinitrito, se hace un tratamiento en paralelo con la misma muestra a la cual en lugar de agregarle peroxinitrito, se le adiciona un volumen igual de NaOH (la misma que se utiliza para diluir el peroxinitrito). A este tratamiento lo denominamos NT (no tratado). Se comparó la actividad peroxidasa de las proteínas tratada con peroxinitrito (5x ONOO) y NT con el ensayo acoplado, y se observó una disminución en la actividad de Prx1 5x ONOO respecto a Prx1 NT (figura 31), lo opuesto a lo reportado con Prx2.

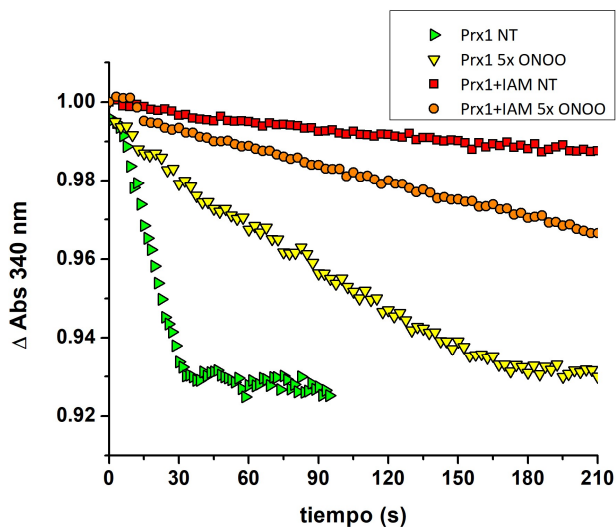


Figura 31. El tratamiento con peroxinitrito y la modificación de la C83 llevan a la disminución de la actividad peroxidasa de Prx1_{SS}. Ensayo acoplado de Prx1 NT (triángulos verdes), Prx1 5x ONOO (triángulos amarillos), Prx1 con IAM NT (cuadrados rojos), y Prx1 con IAM 5x ONOO (círculos naranjas). La reacción se dispara con la adición de 10 μ M H₂O₂.

Teniendo en cuenta que previamente se había reportado a la cisteína 83 como un residuo clave para marcar diferencias en las características de Prx1 y Prx2 [25], y siendo la cisteína un probable blanco de oxidación por peroxinitrito, se decidió realizar el tratamiento con peroxinitrito con la proteína oxidada a disulfuro en su sitio catalítico, y además con la cisteína 83 bloqueada por reacción con iodoacetamida (IAM), evitando su modificación durante el tratamiento con peroxinitrito. Las actividades registradas con el ensayo acoplado revelaron que solamente la modificación de esta cisteína (C83, que no pertenece al sitio activo) lleva a la pérdida de actividad peroxidasa de esta proteína, y que curiosamente, el tratamiento con peroxinitrito lleva a una módica recuperación de la actividad (figura 31).

Un tercer abordaje para estudiar el efecto del peroxinitrito en Prx1, fue utilizar S-Metil metanotiosulfonato (MMTS) para bloquear la C83 previo al tratamiento con peroxinitrito. La ventaja de usar este agente, es que su modificación puede ser revertida con DTT, ya que forma disulfuros mixtos con tioles [111]. Brevemente, lo que se hizo fue tratar Prx1_{SS} con un exceso de MMTS (el cual solo va a poder modificar a la C83) que es posteriormente removido, para realizar las adiciones de peroxinitrito correspondientes. Una vez oxidada la enzima por peroxinitrito (nitricación de tirosinas), se le agrega DTT a la proteína, logrando restaurar el tiol de la C83 a su vez que se reduce el disulfuro en el sitio catalítico (esquema en figura 12, en Materiales y métodos). La nomenclatura para las muestras estudiadas en esta condición fue NT para la proteína no tratada, C83-SH para la proteína que mantiene al tiol de la C83 expuesto durante el tratamiento con peroxinitrito, y C83-SS-R para la proteína que fue tratada con MMTS previo al tratamiento con peroxinitrito, y nuevamente reducida

con DTT. En la figura 32 se muestran los resultados obtenidos con los ensayos de actividad con el sistema acoplado.

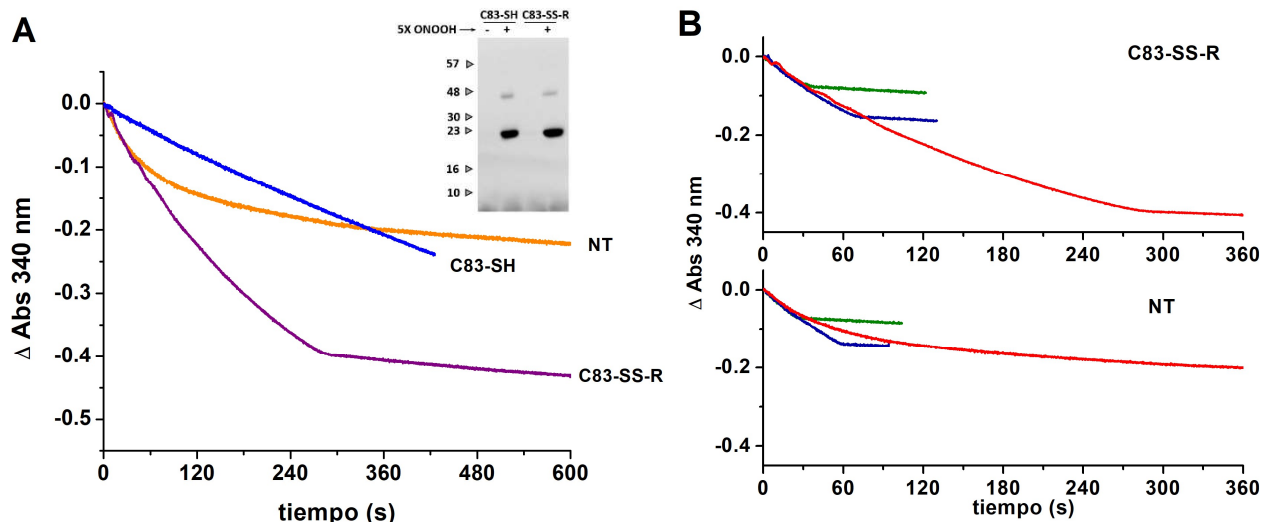


Figura 32. La protección de la C83 durante el tratamiento con peroxinitrito lleva a la disminución de la susceptibilidad a la sobreoxidación de la Prx1. A) Actividad peroxidasa con 50 μM H_2O_2 de la Prx1 no tratada NT (naranja), C83-SH tratada con peroxinitrito (azul) y C83-SS-R tratada con peroxinitrito (púrpura). En el inserto se muestra un WB anti-nitrotirosina **B)** cursos temporales de la proteína C83-SS-R (arriba) y NT (abajo) a diferentes concentraciones de H_2O_2 (10 μM , trazo verde; 20 μM , trazo azul; 50 μM trazo rojo).

Las medidas de actividad volvieron a mostrar que el tratamiento con peroxinitrito de Prx1 cuando tiene el tiol de la C83 disponible para reaccionar, lleva a su inactivación (C83-SH, comparado con NT). La novedad, es que el tratamiento C83-SS-R (es decir, con peroxinitrito teniendo a la C83 oxidada a disulfuro, o sea restaurada a tiol con DTT) resultó en una peroxirredoxina más robusta, más resistente a la sobreoxidación por peróxido (figura 32A y 32B). La nitración de tirosinas en las muestras tratadas con ONOOH se confirmó por WB y por ESI-MS, logrando la cobertura de todas tirosinas de Prx1, detectando modificación en las tirosinas Y34 y Y194.

Comparando este resultado con lo previamente reportado para la Prx2, resulta que la nitración de tirosinas también convierte a la Prx1 en una peroxirredoxina más robusta respecto a la proteína no tratada, mientras no se altere el estado de oxidación de la C83, demostrando que la C83 puede llegar a ser determinante en el funcionamiento de la Prx1, y que quizás sea crítica en las diferencias funcionales entre Prx1 y Prx2.

En los artículos que estudian la nitración de Prx2, se propone a la Y193 (Y194 en Prx1) como la modificación clave en el cambio funcional de esa Prx. Esta es la tirosina del motivo YF, que se encuentra sobre el sitio activo en la conformación FF. La relevancia biológica de esta modificación

todavía debe ser explorada más a fondo. Igual vale mencionar que la nitración de la Y194 de Prx1 fue detectada en células Jurkat tratadas con ONOOH [112].

En esta tesis no se profundizó en la caracterización de la modificación de la C83 y su modulación sobre la actividad peroxidasa. En la literatura se reporta que la glutationilación de esta cisteína [113], o que su remplazo por un residuo serina [114], tiene un efecto desestabilizador del decámero de Prx1, favoreciendo la forma dimérica. Particularmente en el trabajo donde mutan la C83 por una serina, observan que esta mutación no afecta la actividad peroxidasa de Prx1. Esto parecería indicar que modificaciones postraduccionales en este residuo puedan tener efectos drásticos en el estado oligomérico de Prx1, pero no dan mayores pistas sobre su efecto en la actividad peroxidasa. Sin embargo, los resultados preliminares en esta tesis apuntan a una pérdida de actividad peroxidasa al modificar la C83 aunque esta no participe directamente en la catálisis.

5) Conclusiones y perspectivas

Aprovechando los cambios de fluorescencia intrínseca con el estado redox de estas enzimas, se pudo estudiar comparativamente las cinéticas de reacción con dos peróxidos sustratos relevantes biológicamente (H_2O_2 y ONOOH) a la vez de comparar las dos isoformas Prx1 y Prx2. La Tabla 4 resume los parámetros cinéticos obtenidos.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de las reacciones de Prx1 y Prx2 con H_2O_2 y ONOOH

	$k_{\text{SOH}/\text{H}_2\text{O}_2}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$k_{\text{SOH}/\text{ONOOH}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{res} (s^{-1})	$k_{\text{SO}_2\text{H}/\text{H}_2\text{O}_2}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$k_{\text{SO}_2\text{H}/\text{ONOOH}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Prx1	1.1×10^8	$1.5 \times 10^{7\text{a}}$ $7.6 \times 10^{7\text{b}}$	11 - 12	1.77×10^3	$2.8 \times 10^{5\text{b}}$
Prx2	1.6×10^8	$1.1 \times 10^{7\text{b}}$	0.2 - 0.3	1.97×10^3	$3.4 \times 10^{4\text{b}}$

^a Competencia con HRP a pH 7.4. ^b Cursos temporales de fluorescencia a pH 7.3.

La oxidación de $\text{C}_\text{P}\text{-SH}$ a $\text{C}_\text{P}\text{-SOH}$ por H_2O_2 es extremadamente rápida para ambas isoformas ($\sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), 5 órdenes de magnitud mayor que las constantes de reacción reportadas para la mayoría de los residuos de cisteína proteicos, lo que marca que estas Prx son muy sensibles al H_2O_2 . Esto indica su importancia en los procesos de señalización redox, ya que darían la necesaria especificidad de señal por H_2O_2 .

Una vez que se forma el derivado sulfénico ($\text{C}_\text{P}\text{-SOH}$), el cambio conformacional y la reacción con C_R para formar el disulfuro es más lenta para Prx2 que para Prx1. Este es un punto crítico diferencial entre estas isoformas. Los datos obtenidos en esta tesis coinciden con los recientemente reportados y muestran una diferencia de un orden de magnitud entre la velocidad de cierre de disulfuro para Prx2 de 0.3 s^{-1} con respecto a 12 s^{-1} para Prx1. Recientemente reportamos medidas de pKa para $\text{C}_\text{P}\text{-SOH}$, aproximadamente 7 para ambas enzimas, mientras que pKa para $\text{C}_\text{R}\text{-SH}$ de Prx1 (7.4) es menor que el de Prx2 (8.5) [104]. Por lo tanto, al mismo pH, hay mayor concentración del tiolato nucleofílico en Prx1 que en Prx2, lo que podría contribuir a acelerar la velocidad de formación del disulfuro.

Las diferencias en la velocidad de cierre del disulfuro van de la mano con las diferencias observadas en la susceptibilidad a la sobreoxidación (tanto con exceso de H_2O_2 como en catálisis) donde Prx2 siempre resultó más fácilmente sobreoxidada e inactivada que Prx1. Es interesante observar que estas diferencias no pueden ser atribuidas a una mayor velocidad de sobreoxidación de la C_P de Prx2, ya que las $k_{\text{SO}_2\text{H}}$ son similares para ambas isoformas.

Recientemente Bolduc y colaboradores [28] han reportado nuevos motivos en la estructura de 2-Cys Prx asociados con la resistencia a la sobreoxidación, denominados motivos A y B, además de la ausencia de YF y GGLG presentes en las Prx sensibles. El hecho de que Prx1 presente solo el motivo A y en cambio Prx2 solo el motivo B, apoya la diferencia de susceptibilidad a la sobreoxidación observada, que está ligada con el proceso competitivo de resolución (cierre del disulfuro).

Nuestros resultados indican que no hay diferencia en la reactividad de C_P-SOH con H₂O₂ para ambas isoformas ($k_{\text{SO}_2\text{H}} \sim 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), por lo tanto la diferencia reside en diferencias estructurales que favorecen el cambio conformacional FF- LU necesario para formar el enlace disulfuro. En ese sentido, los espectros CD diferenciales en el UV-cercano indican menores diferencias en la estructura terciaria de la forma reducida con respecto a la oxidada para Prx1 que para Prx2.

En resumen, las dos isoformas citosólicas, Prx1 y Prx2, son eficientes sensores de H₂O₂ pero una vez el derivado sulfénico se forma, las dos toman caminos diferentes. El ácido sulfénico en la C_P de Prx2 tiene una vida media mayor, y si bien esto aumenta la chance de que se inactive por sobreoxidación, también le da la chance a que reaccione con otra cisteína de una proteína redox (formando un disulfuro mixto vía su C_P). Por otro lado, el ácido sulfénico en la C_P de Prx1 reacciona rápidamente con su propia C_R para formar el disulfuro intermolecular, por lo que va a estar en desventaja respecto a Prx2 para reaccionar con un mismo tiol de una proteína blanco. De hecho, a nivel celular, se han detectado distintos disulfuros mixtos transitorios para cada isoforma, por ejemplo Prx1 con quinasa ASK1 [66], mientras que Prx2 con factor de transcripción STAT3 [69]. Esto podría explicar además por qué el patrón de expresión de estas Prx no es homogéneo en los distintos tipos celulares. Por ejemplo, en células del tejido nervioso, Prx1 se expresa de manera exclusiva en células gliales, específicamente en astrocitos y células ependimarias, mientras que Prx2 se expresa de manera exclusiva en neuronas [115]. Esto podría indicar que cada tipo de célula, necesita responder de manera particular frente a la producción de ROS.

El panorama se torna mucho más complejo si se tiene en cuenta los potenciales cambios en estructura cuaternaria de las Prx en el ciclo catalítico y que pueden existir además proteínas accesorias “scaffold” que formen complejos ternarios que ayuden (o sean necesarias) para transmitir los equivalentes de oxidación, como es el caso de Ybp1 en el relevo entre Orp1 y Yap1 [76].

Como perspectiva, sería interesante ahondar más en los mecanismos por los cuales la C83 de Prx1 puede modular su actividad peroxidasa, ya que si bien parece jugar un rol principal en las diferencias

entre Prx1 y Prx2, no está esclarecido cómo puede su estado redox afectar dicha actividad y cómo se relaciona con su estado de oligomerización.

Por otra parte, los parámetros cinéticos determinados en esta tesis se focalizaron en los pasos oxidativos del ciclo catalítico de Prx1 y Prx2 (oxidación y resolución). Sería muy valioso poder obtener datos cinéticos de la parte reductiva del ciclo, por ejemplo de la reducción del disulfuro entre la C_P y la C_R por la tioredoxina u otras proteínas redox, así como la reacción entre el ácido sulfénico de la C_P con alguna proteína redox diana (por ejemplo Prx2 y STAT3).

6) Bibliografía

- [1] Copley SD, Novak WR, Babbitt PC. Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry*. 2004;43:13981-95.
- [2] Hall A, Karplus PA, Poole LB. Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions. *The FEBS journal*. 2009;276:2469-77.
- [3] Perkins A, Nelson KJ, Parsonage D, Poole LB, Karplus PA. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends in biochemical sciences*. 2015.
- [4] Kim K, Kim IH, Lee KY, Rhee SG, Stadtman ER. The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. *The Journal of biological chemistry*. 1988;263:4704-11.
- [5] Christman MF, Storz G, Ames BN. OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86:3484-8.
- [6] Jacobson FS, Morgan RW, Christman MF, Ames BN. An alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium* involved in the defense of DNA against oxidative damage. Purification and properties. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264:1488-96.
- [7] Chae HZ, Kim IH, Kim K, Rhee SG. Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268:16815-21.
- [8] Chae HZ, Robison K, Poole LB, Church G, Storz G, Rhee SG. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91:7017-21.
- [9] Chae HZ, Uhm TB, Rhee SG. Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91:7022-6.
- [10] Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269:27670-8.
- [11] Poole LB, Nelson KJ. Distribution and Features of the Six Classes of Peroxiredoxins. *Mol Cells*. 2016;39:53-9.
- [12] Nelson KJ, Knutson ST, Soito L, Klomsiri C, Poole LB, Fetrow JS. Analysis of the peroxiredoxin family: using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis. *Proteins*. 2011;79:947-64.
- [13] Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in biochemical sciences*. 2003;28:32-40.
- [14] Portillo-Ledesma S, Sardi F, Manta B, Tourn MV, Clippe A, Knoops B, et al. Deconstructing the catalytic efficiency of peroxiredoxin-5 peroxidatic cysteine. *Biochemistry*. 2014;53:6113-25.
- [15] Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life*. 2001;52:35-41.
- [16] Manevich Y, Feinstein SI, Fisher AB. Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101:3780-5.
- [17] Monteiro G, Horta BB, Pimenta DC, Augusto O, Netto LE. Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007;104:4886-91.
- [18] Schroder E, Littlechild JA, Lebedev AA, Errington N, Vagin AA, Isupov MN. Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution. *Structure*. 2000;8:605-15.
- [19] Hirotsu S, Abe Y, Okada K, Nagahara N, Hori H, Nishino T, et al. Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96:12333-8.
- [20] Hall A, Nelson K, Poole LB, Karplus PA. Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15:795-815.
- [21] Perkins A, Parsonage D, Nelson KJ, Ogba OM, Cheong PH, Poole LB, et al. Peroxiredoxin Catalysis at Atomic Resolution. *Structure*. 2016;24:1668-78.
- [22] Yang KS, Kang SW, Woo HA, Hwang SC, Chae HZ, Kim K, et al. Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277:38029-36.
- [23] Perkins A, Poole LB, Karplus PA. Tuning of peroxiredoxin catalysis for various physiological roles. *Biochemistry*. 2014;53:7693-705.
- [24] Wood ZA, Poole LB, Karplus PA. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*. 2003;300:650-3.
- [25] Lee W, Choi KS, Riddell J, Ip C, Ghosh D, Park JH, et al. Human peroxiredoxin 1 and 2 are not duplicate proteins: the unique presence of CYS83 in Prx1 underscores the structural and functional differences between Prx1 and Prx2. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282:22011-22.
- [26] Cox AG, Pearson AG, Pullar JM, Jonsson TJ, Lowther WT, Winterbourn CC, et al. Mitochondrial peroxiredoxin 3 is more resilient to hyperoxidation than cytoplasmic peroxiredoxins. *Biochem J*. 2009;421:51-8.
- [27] Peskin AV, Dickerhof N, Poynton RA, Paton LN, Pace PE, Hampton MB, et al. Hyperoxidation of peroxiredoxins 2 and 3: rate constants for the reactions of the sulfinic acid of the peroxidatic cysteine. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288:14170-7.
- [28] Bolduc JA, Nelson KJ, Haynes AC, Lee J, Reisz JA, Graff AH, et al. Novel hyperoxidation resistance motifs in 2-Cys peroxiredoxins. *The Journal of biological chemistry*. 2018;293:11901-12.
- [29] Pascual MB, Mata-Cabana A, Florencio FJ, Lindahl M, Cejudo FJ. Overoxidation of 2-Cys peroxiredoxin in prokaryotes: cyanobacterial 2-Cys peroxiredoxins sensitive to oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285:34485-92.
- [30] Veal EA, Underwood ZE, Tomalin LE, Morgan BA, Pillay CS. Hyperoxidation of Peroxiredoxins: Gain or Loss of Function? *Antioxid Redox Signal*. 2018;28:574-90.
- [31] Hamann M, Zhang T, Hendrich S, Thomas JA. Quantitation of protein sulfinic and sulfonic acid, irreversibly oxidized protein cysteine sites in cellular proteins. *Methods Enzymol*. 2002;348:146-56.
- [32] Woo HA, Chae HZ, Hwang SC, Yang KS, Kang SW, Kim K, et al. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science*. 2003;300:653-6.
- [33] Biteau B, Labarre J, Toledano MB. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature*. 2003;425:980-4.
- [34] Boileau C, Eme L, Brochier-Armanet C, Janicki A, Zhang CC, Latifi A. A eukaryotic-like sulfiredoxin involved in oxidative stress responses and in the reduction of the sulfinic form of 2-Cys peroxiredoxin in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *New Phytol*. 2011;191:1108-18.
- [35] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology*. 2004;55:373-99.

- [36] Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol.* 2013;1:244-57.
- [37] Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews.* 2007;87:245-313.
- [38] Sheng Y, Abreu IA, Cabelli DE, Maroney MJ, Miller AF, Teixeira M, et al. Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chem Rev.* 2014;114:3854-918.
- [39] Hopkins R. Hydrogen Peroxide in Biology and Medicine: An Overview. *Reactive Oxygen Species.* 2017;3:26-37.
- [40] Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of neurochemistry.* 2002;80:780-7.
- [41] Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:755-76.
- [42] Winterbourn CC. The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods Enzymol.* 2013;528:3-25.
- [43] Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *Journal of molecular biology.* 2000;304:55-68.
- [44] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160:1-40.
- [45] Randall L, Ferrer-Sueta G, Denicola A. Peroxiredoxins as Preferential Targets in H₂O₂-Induced Signaling. *Methods in enzymology.* 2014;527.
- [46] Ferrer-Sueta G, Campolo N, Trujillo M, Bartesaghi S, Carballal S, Romero N, et al. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Chem Rev.* 2018;118:1338-408.
- [47] Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2018;115:5839-48.
- [48] Ferrer-Sueta G, Radi R. Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem Biol.* 2009;4:161-77.
- [49] Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004;101:4003-8.
- [50] Trujillo M, Ferrer-Sueta G, Radi R. Peroxynitrite detoxification and its biologic implications. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10:1607-20.
- [51] Trujillo M, Alvarez B, Souza JM, Romero N, Castro L, Thomson L, et al. Chapter 3 - Mechanisms and Biological Consequences of Peroxynitrite-Dependent Protein Oxidation and Nitration. In: Ignarro LJ, editor. *Nitric Oxide (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2010. p. 61-102.
- [52] Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1990;87:1620-4.
- [53] Radi R. Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Accounts of chemical research.* 2013;46:550-9.
- [54] Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Archives of biochemistry and biophysics.* 1998;356:1-11.
- [55] Cassina AM, Hodara R, Souza JM, Thomson L, Castro L, Ischiropoulos H, et al. Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *The Journal of biological chemistry.* 2000;275:21409-15.
- [56] Batthyany C, Souza JM, Duran R, Cassina A, Cervenansky C, Radi R. Time course and site(s) of cytochrome c tyrosine nitration by peroxynitrite. *Biochemistry.* 2005;44:8038-46.

- [57] MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, Thompson JA. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93:11853-8.
- [58] Yamakura F, Taka H, Fujimura T, Murayama K. Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273:14085-9.
- [59] Klatt P, Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2000;267:4928-44.
- [60] Sies H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology*. 2018;7:122-6.
- [61] Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem*. 2017;86:715-48.
- [62] Brown DI, Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. *Free radical biology & medicine*. 2009;47:1239-53.
- [63] Dickinson BC, Chang CJ. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature Chemical Biology*. 2011;7:504.
- [64] Veal EA, Day AM, Morgan BA. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell*. 2007;26:1-14.
- [65] Gough DR, Cotter TG. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death & Disease*. 2011;2:e213.
- [66] Jarvis RM, Hughes SM, Ledgerwood EC. Peroxiredoxin 1 functions as a signal peroxidase to receive, transduce, and transmit peroxide signals in mammalian cells. *Free radical biology & medicine*. 2012;53:1522-30.
- [67] Lee SR, Yang KS, Kwon J, Lee C, Jeong W, Rhee SG. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277:20336-42.
- [68] Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC, Rhee SG. Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- α . *The Journal of biological chemistry*. 1998;273:6297-302.
- [69] Sobotta MC, Liou W, Stocker S, Talwar D, Oehler M, Ruppert T, et al. Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling. *Nat Chem Biol*. 2015;11:64-70.
- [70] Young D, Pedre B, Ezerina D, De Smet B, Lewandowska A, Tossounian MA, et al. Protein Promiscuity in H₂O₂ Signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2018.
- [71] Georgiou G, Masip L. Biochemistry. An overoxidation journey with a return ticket. *Science*. 2003;300:592-4.
- [72] Woo HA, Yim SH, Shin DH, Kang D, Yu DY, Rhee SG. Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H₂O₂ accumulation for cell signaling. *Cell*. 2010;140:517-28.
- [73] Rhee SG, Woo HA, Kil IS, Bae SH. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287:4403-10.
- [74] Day AM, Brown JD, Taylor SR, Rand JD, Morgan BA, Veal EA. Inactivation of a peroxiredoxin by hydrogen peroxide is critical for thioredoxin-mediated repair of oxidized proteins and cell survival. *Mol Cell*. 2012;45:398-408.
- [75] Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, Toledano MB. A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*. 2002;111:471-81.
- [76] Bersweiler A, D'Autreaux B, Mazon H, Kriznik A, Belli G, Delaunay-Moisan A, et al. A scaffold protein that chaperones a cysteine-sulfenic acid in H₂O₂ signaling. *Nat Chem Biol*. 2017;13:909-15.
- [77] Veal EA, Findlay VJ, Day AM, Bozonet SM, Evans JM, Quinn J, et al. A 2-Cys peroxiredoxin regulates peroxide-induced oxidation and activation of a stress-activated MAP kinase. *Mol Cell*. 2004;15:129-39.

- [78] Stocker S, Maurer M, Ruppert T, Dick TP. A role for 2-Cys peroxiredoxins in facilitating cytosolic protein thiol oxidation. *Nat Chem Biol.* 2018;14:148-55.
- [79] Tavender TJ, Sheppard AM, Bulleid NJ. Peroxiredoxin IV is an endoplasmic reticulum-localized enzyme forming oligomeric complexes in human cells. *Biochem J.* 2008;411:191-9.
- [80] Seo MS, Kang SW, Kim K, Baines IC, Lee TH, Rhee SG. Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *The Journal of biological chemistry.* 2000;275:20346-54.
- [81] Kang SW, Baines IC, Rhee SG. Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *The Journal of biological chemistry.* 1998;273:6303-11.
- [82] Manta B, Hugo M, Ortiz C, Ferrer-Sueta G, Trujillo M, Denicola A. The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. *Archives of biochemistry and biophysics.* 2009;484:146-54.
- [83] Randall LM, Manta B, Hugo M, Gil M, Batthyany C, Trujillo M, et al. Nitration transforms a sensitive peroxiredoxin 2 into a more active and robust peroxidase. *The Journal of biological chemistry.* 2014;289:15536-43.
- [84] Randall L, Manta B, Nelson KJ, Santos J, Poole LB, Denicola A. Structural changes upon peroxynitrite-mediated nitration of peroxiredoxin 2; nitrated Prx2 resembles its disulfide-oxidized form. *Archives of biochemistry and biophysics.* 2016;590:101-8.
- [85] Moore RB, Mankad MV, Shriver SK, Mankad VN, Plishker GA. Reconstitution of Ca(2+)-dependent K⁺ transport in erythrocyte membrane vesicles requires a cytoplasmic protein. *The Journal of biological chemistry.* 1991;266:18964-8.
- [86] Neumann CA, Krause DS, Carman CV, Das S, Dubey DP, Abraham JL, et al. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature.* 2003;424:561-5.
- [87] Lee TH, Kim SU, Yu SL, Kim SH, Park DS, Moon HB, et al. Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood.* 2003;101:5033-8.
- [88] Carvalho LAC, Truzzi DR, Fallani TS, Alves SV, Toledo JC, Jr., Augusto O, et al. Urate hydroperoxide oxidizes human peroxiredoxin 1 and peroxiredoxin 2. *The Journal of biological chemistry.* 2017;292:8705-15.
- [89] Romero N, Radi R, Linares E, Augusto O, Detweiler CD, Mason RP, et al. Reaction of human hemoglobin with peroxynitrite. Isomerization to nitrate and secondary formation of protein radicals. *The Journal of biological chemistry.* 2003;278:44049-57.
- [90] Alvarez B, Demicheli V, Duran R, Trujillo M, Cervenansky C, Freeman BA, et al. Inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidinyl radical. *Free radical biology & medicine.* 2004;37:813-22.
- [91] Wang PF, Veine DM, Ahn SH, Williams CH, Jr. A stable mixed disulfide between thioredoxin reductase and its substrate, thioredoxin: preparation and characterization. *Biochemistry.* 1996;35:4812-9.
- [92] Floris R, Piersma SR, Yang G, Jones P, Wever R. Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase. *European journal of biochemistry / FEBS.* 1993;215:767-75.
- [93] Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25° C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Analytical biochemistry.* 1972;49:474-8.
- [94] Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *The Journal of biological chemistry.* 1991;266:4244-50.

- [95] Grassetti DR, Murray JF. Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1967;119:41-9.
- [96] Dyballa N, Metzger S. Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *J Vis Exp*. 2009.
- [97] Engelman R, Weisman-Shomer P, Ziv T, Xu J, Arner ES, Benhar M. Multilevel regulation of 2-Cys peroxiredoxin reaction cycle by S-nitrosylation. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288:11312-24.
- [98] van den Berg S, Lofdahl PA, Hard T, Berglund H. Improved solubility of TEV protease by directed evolution. *Journal of biotechnology*. 2006;121:291-8.
- [99] Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein expression and purification*. 2005;41:207-34.
- [100] Santos J, Marino-Buslje C, Kleinman C, Ermacora MR, Delfino JM. Consolidation of the thioredoxin fold by peptide recognition: interaction between E. coli thioredoxin fragments 1-93 and 94-108. *Biochemistry*. 2007;46:5148-59.
- [101] Mulrooney SB. Application of a single-plasmid vector for mutagenesis and high-level expression of thioredoxin reductase and its use to examine flavin cofactor incorporation. *Protein expression and purification*. 1997;9:372-8.
- [102] Nelson KJ, Parsonage D. Measurement of peroxiredoxin activity. *Curr Protoc Toxicol*. 2011;Chapter 7:Unit7 10.
- [103] Trujillo M, Clippe A, Manta B, Ferrer-Sueta G, Smeets A, Declercq JP, et al. Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2007;467:95-106.
- [104] Portillo-Ledesma S, Randall LM, Parsonage D, Dalla Rizza J, Karplus PA, Poole LB, et al. Differential Kinetics of Two-Cysteine Peroxiredoxin Disulfide Formation Reveal a Novel Model for Peroxide Sensing. *Biochemistry*. 2018;57:3416-24.
- [105] Feld K, Geissel F, Liedgens L, Schumann R, Specht S, Deponte M. Tyrosine substitution of a conserved active site histidine residue activates Plasmodium falciparum peroxiredoxin 6. *Protein Sci*. 2018.
- [106] Reyes AM, Vazquez DS, Zeida A, Hugo M, Pineyro MD, De Armas MI, et al. PrxQ B from Mycobacterium tuberculosis is a monomeric, thioredoxin-dependent and highly efficient fatty acid hydroperoxide reductase. *Free radical biology & medicine*. 2016;101:249-60.
- [107] Trujillo M, Ferrer-Sueta G, Radi R. Kinetic studies on peroxynitrite reduction by peroxiredoxins. *Methods Enzymol*. 2008;441:173-96.
- [108] Wood ZA, Poole LB, Hantgan RR, Karplus PA. Dimers to Doughnuts: Redox-Sensitive Oligomerization of 2-Cysteine Peroxiredoxins. *Biochemistry*. 2002;41:5493-504.
- [109] Cao Z, Bhella D, Lindsay JG. Reconstitution of the Mitochondrial PrxIII Antioxidant Defence Pathway: General Properties and Factors Affecting PrxIII Activity and Oligomeric State. *Journal of molecular biology*. 2007;372:1022-33.
- [110] Dalla Rizza J, Randall LM, Santos J, Ferrer-Sueta G, Denicola A. Differential parameters between cytosolic 2-Cys peroxiredoxins, PRDX1 and PRDX2. *Protein Sci*. 2018.
- [111] Winther JR, Thorpe C. Quantification of thiols and disulfides. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1840:838-46.
- [112] Ghesquiere B, Colaert N, Helsens K, Dejager L, Vanhaute C, Verleysen K, et al. In vitro and in vivo protein-bound tyrosine nitration characterized by diagonal chromatography. *Mol Cell Proteomics*. 2009;8:2642-52.
- [113] Park JW, Piszczek G, Rhee SG, Chock PB. Glutathionylation of peroxiredoxin I induces decamer to dimers dissociation with concomitant loss of chaperone activity. *Biochemistry*. 2011;50:3204-10.

- [114] Matsumura T, Okamoto K, Iwahara S, Hori H, Takahashi Y, Nishino T, et al. Dimer-oligomer interconversion of wild-type and mutant rat 2-Cys peroxiredoxin: disulfide formation at dimer-dimer interfaces is not essential for decamerization. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283:284-93.
- [115] Sarafian TA, Verity MA, Vinters HV, Shih CC, Shi L, Ji XD, et al. Differential expression of peroxiredoxin subtypes in human brain cell types. *J Neurosci Res*. 1999;56:206-12.