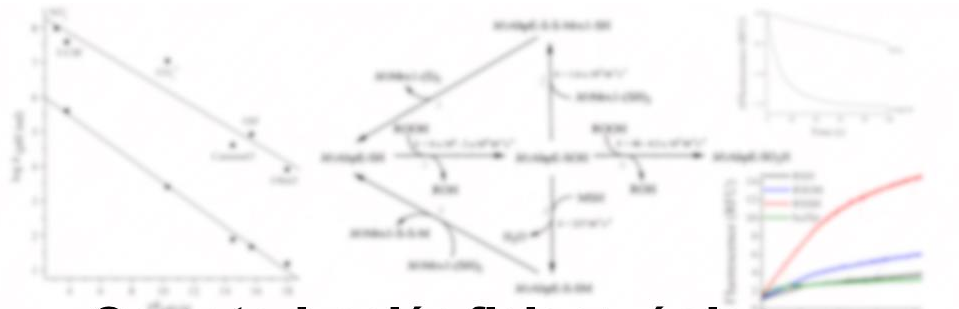
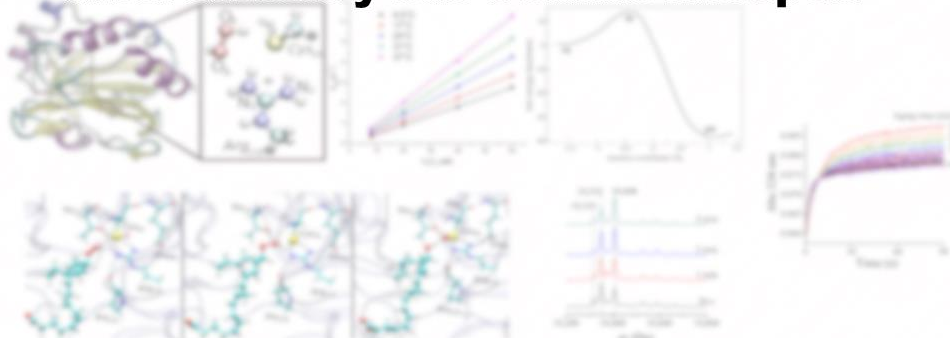




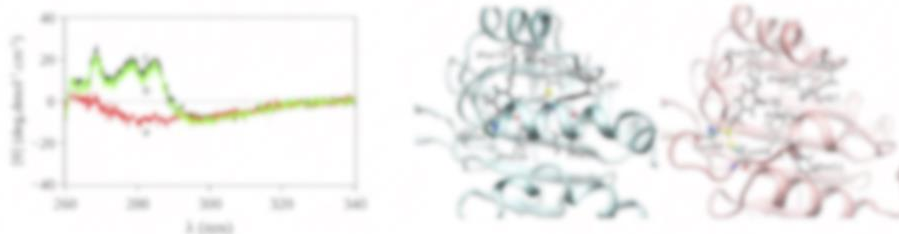
Tesis de Doctorado PEDECIBA Biología



**Caracterización fisicoquímica y funcional de peroxirredoxinas de *Mycobacterium tuberculosis* y sus células huésped**



**Lic. Aníbal M. Reyes**





**Tesis de Doctorado PEDECIBA Biología**

Estudiante: Lic. Aníbal M. Reyes

Directora de Tesis: Dra. Madia Trujillo

Realizada en el Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO) y Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay.

Defensa Oral: Diciembre 2019

Tribunal: Dra. Andrea Villarino  
Dr. Marcelo Martí  
Dra. Daniela Ramos Truzzi



## Agradecimientos

Primeramente, quiero agradecer a la Dra. Madia Trujillo, que me permitió iniciar mi trabajo de finalización de Licenciatura en el Departamento de Bioquímica y Centro de Investigaciones biomédicas (CEINBIO) de la Facultad de Medicina (UDELAR) siendo esta Tesis una continuación directa de ese trabajo. Ella me ha inculcado la formación como “científico”, haciendo hincapié en el sacrificio, la humildad y el poder sobrellevar de manera mentalmente pacífica algo tan recurrente como el fracaso de los experimentos que uno realiza.

También, quiero agradecer al Dr. Martín Hugo que me ayudó mucho en la dinámica de laboratorio al comienzo de mi carrera y al Dr. Ari Zeida con él que desde el inicio del Doctorado hemos venido colaborando de manera muy activa desarrollando una metodología sinérgica entre experimentos y simulaciones computacionales. Además, quiero agradecer al Msc. Mauricio Mastrogiovanni por la ayuda en los experimentos de espectrometría de masa y a los colaboradores más jóvenes directamente involucrados en la Tesis, la Dra. María Inés de Armas, el Br. Nicolás Viera y la Lic. Romina Esteves.

Quiero agradecer al Dr. Ernesto Cuevasanta y a la Dra. Beatriz Álvarez de Facultad de Ciencias (UDELAR) con los cuales colaboramos de manera muy eficiente durante el último tramo de la Tesis, aprendiendo acerca de la química del sulfuro de hidrógeno y los persulfuros proteicos.

Además, quiero agradecer a la Dra. M. Dolores Piñeyro y la Dra. María Laura Chiribao del Departamento de Bioquímica y del Instituto Pasteur de Montevideo, por toda la ayuda que me brindaron en aspectos de Biología Molecular relacionados a mutantes en proteínas recombinantes.

Quiero agradecer a nuestros colaboradores argentinos, el Dr. Diego S. Vazquez y el Dr. Javier Santos, así como el Dr. Luis González Flecha de la UBA, por la ayuda con los experimentos relacionados a la caracterización fisicoquímica de la AhpE y PrxQ B. También, al Dr. Darío Estrin de la UBA por

la colaboración en la discusión de los resultados de las simulaciones computacionales y el diseño experimental.

También quiero agradecer a nuestros colaboradores brasileños, el Msc. Thiago Alegria y el Dr. Luis Eduardo Soares Netto de la USP, por la ayuda con los experimentos relacionados a la caracterización fisicoquímica de la Prx3, así como la Dra. Maximilia Frazao de Souza y del Dr. Cristiano Oliveira de la USP por la ayuda con los experimentos de SAXS.

Por último, quiero agradecer al Dr. Rafael Radi por la contribución activa a la discusión de resultados asociados a los trabajos científicos derivados de esta Tesis de Doctorado.

Personalmente, quiero agradecer a todos los compañeros y amigos del Departamento de Bioquímica y CEINBIO por la buena onda a lo largo de los años y a mi familia por el aguante y las oportunidades.

It's better to burn out than to fade away

Hey Hey My My

Neil Young

## Resumen

*Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) es el patógeno causante de la enfermedad Tuberculosis, que causa la muerte de 1.3 millones de personas por año. El macrófago es la célula blanco más importante de la infección por *Mtb*. Estas células son capaces de fagocitar a los patógenos que se ven expuestos a diferentes especies citotóxicas, incluyendo oxidantes tales como peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos de ácidos grasos y peroxinitrito. El objetivo general de esta Tesis es la caracterización funcional de diferentes componentes del sistema antioxidante dependiente de tioles del *Mtb* que facilitarían su supervivencia en el fagosoma del macrófago activado. En particular realizamos la caracterización cinética y fisicoquímica de la alquilhidroperóxido reductasa E (AhpE) y la peroxirredoxina Q B (PrxQ B), dos de las cinco peroxirredoxinas (peroxidasas dependientes de tioles) codificadas en el genoma de *Mtb*. Realizamos un estudio que complementa experimentos cinéticos con simulaciones computacionales que nos permitió dilucidar las bases moleculares de la especificidad por sustrato oxidante de la AhpE. Por otro lado demostramos que el sulfuro de hidrógeno puede actuar como sustrato reductor de esta peroxirredoxina, en un mecanismo que procede a través de la formación de un persulfuro. Predicciones cinéticas indican que el sulfuro de hidrógeno podría competir como reductor con el sistema micotiol/micorredoxina-1, que reportáramos en estudios previos. Adicionalmente, realizamos una caracterización funcional de la PrxQ B, evaluando diferentes sustratos oxidantes y reductores, así como estudios fisicoquímicos que nos permitieron demostrar cambios estructurales de la enzima vinculados a su estado redox. Por último, y teniendo en cuenta reportes que indican que macrófagos infectados por cepas virulentas de *Mtb* expresan menos peroxirredoxina 3, único miembro de esta familia exclusivamente mitocondrial, estudiamos modificaciones nitro-oxidativas de dicha enzima, que cumple un rol clave en la reducción de hidroperóxidos y peroxinitrito en la mitocondria.

## Abreviaturas

Tuberculosis (TB), bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), cepas multirresistentes a drogas (MDR-TB, Multidrug-Resistant Tuberculosis), interferón gama (INF- $\gamma$ ), necrosis tumoral (TNF, Tumoral Necrosis Factor), especies reactivas del oxígeno (ROI, Reactive Oxygen intermediates), especies reactivas del nitrógeno (RNI, Reactive Nitrogen Intermediates), NADPH oxidasa (Nox2), radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical perhidroxilo ( $HO_2^{\cdot}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) superóxido dismutasas (SODs), glutatión peroxidasa (GPxs), peroxirredoxinas (Prxs), radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), óxido nítrico ( $\cdot NO$ ), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), lipopolisacárido (LPS), dióxido de nitrógeno radical ( $\cdot NO_2$ ), peroxinitrito anión ( $ONOO^-$ ), ácido peroxinitroso (ONOOH), radical carbonato ( $CO_3^{\cdot-}$ ), tiol (RSH), ácido sulfénico (RSOH), hidroperóxido de ácido graso (AG-OOH), fosfolipasa  $A_2$  ( $PLA_2$ ), lipoarabinomano (LAM), factor de cordón o trehalosa dimicolato (CF), trehalosa monomicolato (TMM); dimicoserosato de tiocerol (PDIM); lipomonano (LM), sulfolípidos (SL), regulón de dormencia (regulón Dos), triacilglicéridos (TAG), tioredoxina (Trx), tioredoxina reductasa (TR), glutatión (GSH), micotiol (MSH), ergotioneína (ERG), micotiol disulfuro reductasa (MR), disulfuro del MSH (MSSM), glutarredoxinas (Grxs), micoredoxina-1 (Mrx-1), potencial redox del par MSH/MSSM ( $E_{MSH}$ ), hemoglobina truncada N (trHbN), catalasa-peroxidasa (KatG), sulfirredoxinas (Srxs), cisteína peroxidática ( $C_P$ ), cisteína resolutive ( $C_R$ ), ácido sulfénico formado en la  $C_P$  ( $C_P-SOH$ ), la totalmente plegada (FF, Fully Folded), localmente desplegada (LU, Locally Unfolded), proteínas disulfuro isomerasas (PDI, Protein Disulfide Isomerase), alquil hidroperóxido reductasa C de *Mtb* (AhpC), alquil hidroperóxido reductasa D (AhpD), dihidrolipoamida aciltransferasa (DaIT), dihidrolipoamida deshidrogenasa (LpD), Bacillus Calmette-Guérin (BCG), tiol peroxidasa (Tpx), alquil hidroperóxido reductasa E (AhpE), proteínas comigratorias con bacterioferritina (BCP, Bacterioferritin Comigratory Protein), 1,4-diotreitól (DTT), dispersión dinámica de luz (DLS, Dynamic Light Scattering), dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS, Small Angle X-ray Scattering), sustitución nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ), mecánica cuántica/mecánica clásica (QM/MM, Quantum Mechanics/Molecular Mechanics), 15S-hidroperóxido-5Z,8Z,11Z,13E

eicosatetraenoico (15-HpETE), 15-HETE (ácido 15S-hidroxi-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoico), hidroperóxido de tert-butilo (*t*-bOOH); hidroperóxido de cumeno (Cu-OOH), 1-anilino-8 naftaleno sulfonato (ANS), 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB), pentaacetato de dietilentriamina (DTPA), 12S-hidroperóxido-5Z,8Z,10E,14Z eicosatetraenoico (12-HpETE), 4-hidroperóxido-2E-nonenal (4-HpNE), 4-hidroxi-2E-nonenal (4-HNE), constantes de velocidad observadas ( $k_{obs}$ ), transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET, Förster resonance energy transfer), dinámica molecular clásica (DM), área superficial accesible al solvente (SASA, solvent accessible surface area), enzima de resistencia a hidroperóxidos orgánicos (Ohr, organic hydroperoxide resistance), raíz cuadrada de la fluctuación cuadrática media (rmsf, root mean square fluctuation), sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ), cistationina  $\beta$ -sintasa (CBS), cistationina  $\gamma$ -liasa (CGL o también conocida como cistationasa, CSE), mercaptopiruvato sulfurotransferasa (MST), persulfuros (forma protonada RSSH/ forma desprotonada  $RSS^-$ ), butil hidroxitolueno (BHT), sulfato de amonio ferroso ( $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ ), 3,3'-Bis[N,N-bis(carboximetil)-aminometil] orto-cresol sulfonftaleína (naranja de xilenol), 4,4'-ditiopiridina (DTDPy), sonda de azufre sulfano 4 (SSP4, sulfane sulfur probe 4), ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB), persulfuro de la *MtAhpE* (*MtAhpE*-SSH), peso molecular (PM), peroxidasa de rábano (HRP, horseradish peroxidase), Tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP, Tris(2-carboxyethyl)phosphine), hidroperóxido de colesterol conjugado a ácido linoleico (Co-OOH), ácido borónico de cumarina (CBA, coumarin boronic acid), HRP-compuesto 1 (HRP-1), dispersión de luz multiangular (MALS, multiangle lighth scattering), cromatografía de exclusión molecular (Size-exclusion chromatography, SEC-FPLC), dicroísmo circular (DC), glutatión reductasa (GR), proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV, Tobacco Etch Virus), N-etilmaleimida (NEM), radio hidrodinámico ( $R_H$ ), radio de giro ( $R_g$ ).



# Índice

## **A. Introducción General**

A.I. TUBERCULOSIS	10
A.I.1. Ciclo de patogénesis	10
A.I.2. Situación actual de la TB	11
A.II. INMUNIDAD MEDIADA POR CÉLULAS	13
A.II.1. Fagocitosis y generación de ROIs y RNIs por el macrófago	15
A.III. FISIOLÓGÍA DEL <i>Mtb</i>	20
A.III.1. Características del <i>Mtb</i>	20
A.III.2. Estrategias de supervivencia del <i>Mtb</i>	22
A.III.3. Sistemas antioxidantes del <i>Mtb</i>	25
A.III.3.a. Tioles de bajo peso molecular	25
A.III.3.b. Proteínas antioxidantes	27
A.IV. PEROXIRREDOXINAS	29
A.IV.1. Prxs de <i>Mtb</i>	37
A.IV.2. Prxs del macrófago y la infección por <i>Mtb</i>	39

## **B. Objetivos** 41

## **C. Bases Moleculares de la Especificidad por Hidroperóxidos en Prxs, el Caso de la *MtAhpE***

C.I. INTRODUCCIÓN	44
C.II. MATERIALES Y MÉTODOS	53
C.III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
C.IV. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	73

## **D. Cinética de la Formación y la Reactividad del Persulfuro de la *MtAhpE***

D.I. INTRODUCCIÓN	75
D.II. MATERIALES Y MÉTODOS	84
D.III. RESULTADOS	92
D.IV. DISCUSIÓN	102
D.V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	107

## **E. La *MtPrxQ B* es una Reductasa, Dependiente de Trx, Altamente Eficiente por AG-OOH**

E.I. INTRODUCCIÓN	109
E.II. MATERIALES Y MÉTODOS	112
E.III. RESULTADOS	124
E.IV. DISCUSIÓN	139
E.V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	144

## **F. Estudios de las Modificaciones Nitro-oxidativas de la *HsPrx3***

F.I. INTRODUCCIÓN	146
F.II. MATERIALES Y MÉTODOS	152
F.III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	159
F.IV. PERSPECTIVAS	167

## **G. Conclusiones Generales**

## **H. Referencias**

# A. Introducción General

## A.I. TUBERCULOSIS

### A.I.1. Ciclo de patogénesis

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Este patógeno puede infectar cualquier órgano del cuerpo, pero son frecuentemente los pulmones los más afectados. La TB se transmite por vía aérea, producto de la exposición repetida a la tos de una persona con infección activa (Figura A1) (1). Los bacilos son eliminados por mecanismos de inmunidad mediada por células o son fagocitados y contenidos dentro de macrófagos alveolares y/o granulomas. El *Mtb* es un patógeno altamente exitoso capaz de evadir el sistema de defensa del macrófago y además puede persistir en el huésped en un estado de escasa actividad metabólica (dormencia) en el cual las drogas antituberculosas son poco efectivas (2-4). Sin embargo, algunos bacilos pueden mantener un estado metabólico activo, por lo que, en algunos casos el progreso de la enfermedad puede detenerse con farmacoterapia, como la isoniazida (Figura A1). La TB latente es el estado de la enfermedad en el cual se establece un balance entre el huésped y el patógeno sin causar los síntomas típicos de la infección activa (fiebre y sudor, tos persistente, pérdida de apetito y cansancio, dificultades para respirar y dolor torácico) (5). La TB latente puede durar la vida del individuo infectado (6) o en cerca de 5 a 10% de los casos, puede progresar a TB activa mediante la reactivación de la infección existente implicando riesgo de vida. Esto se ve incrementado por factores de inmunodepresión como el VIH-SIDA, la diabetes, malnutrición y exposición al humo del tabaco (7). La reactivación de TB puede ser revertida mediante farmacoterapia. Sin embargo, la ausencia de o el tratamiento erróneo puede conducir a la formación de lesiones en el pulmón, provocando la licuefacción del tejido, un tipo de necrosis que da como resultado una transformación del tejido en una masa líquida viscosa. Además, el desarrollo de cavidades cercanas a los espacios de las vías aéreas permite una nueva difusión del bacilo a través de la vía aérea. De esta manera, el *Mtb*

se transmite a otros individuos para establecer una nueva infección primaria. A su vez, los macrófagos infectados pueden permanecer en el pulmón o se pueden diseminar a otros órganos y tejidos (TB extrapulmonar).

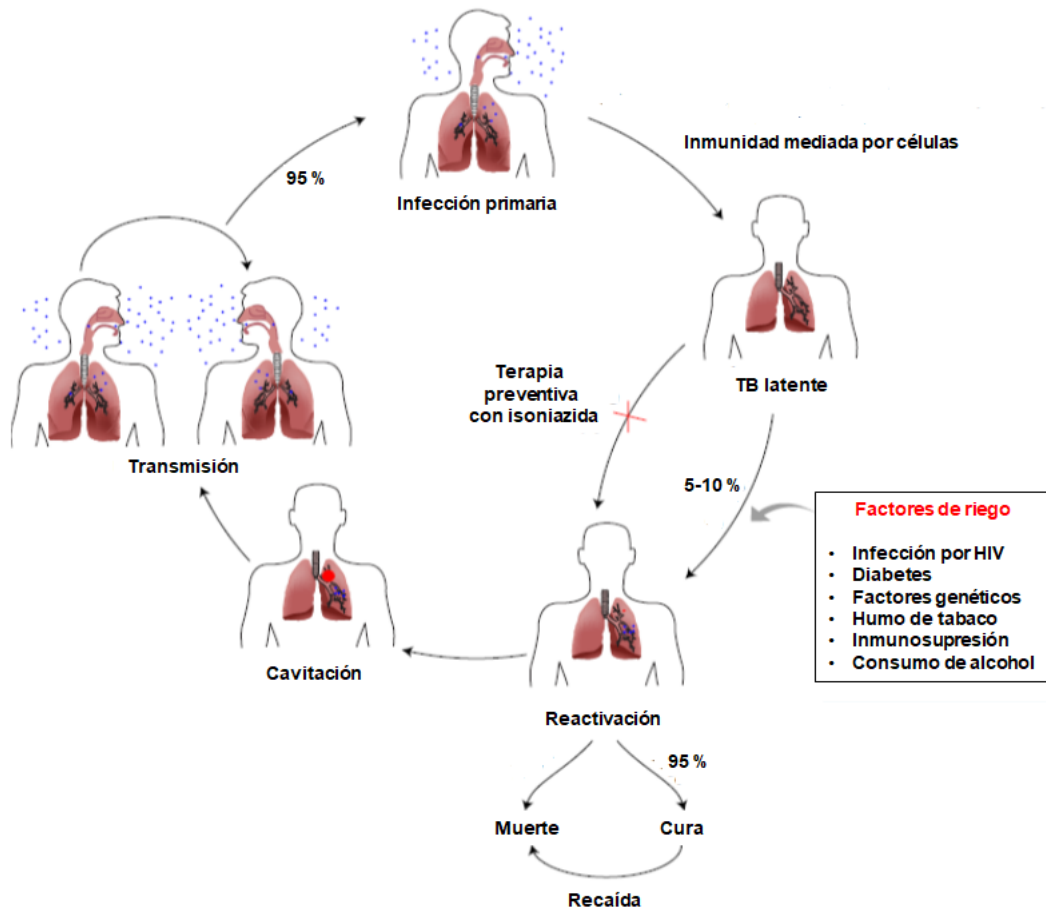
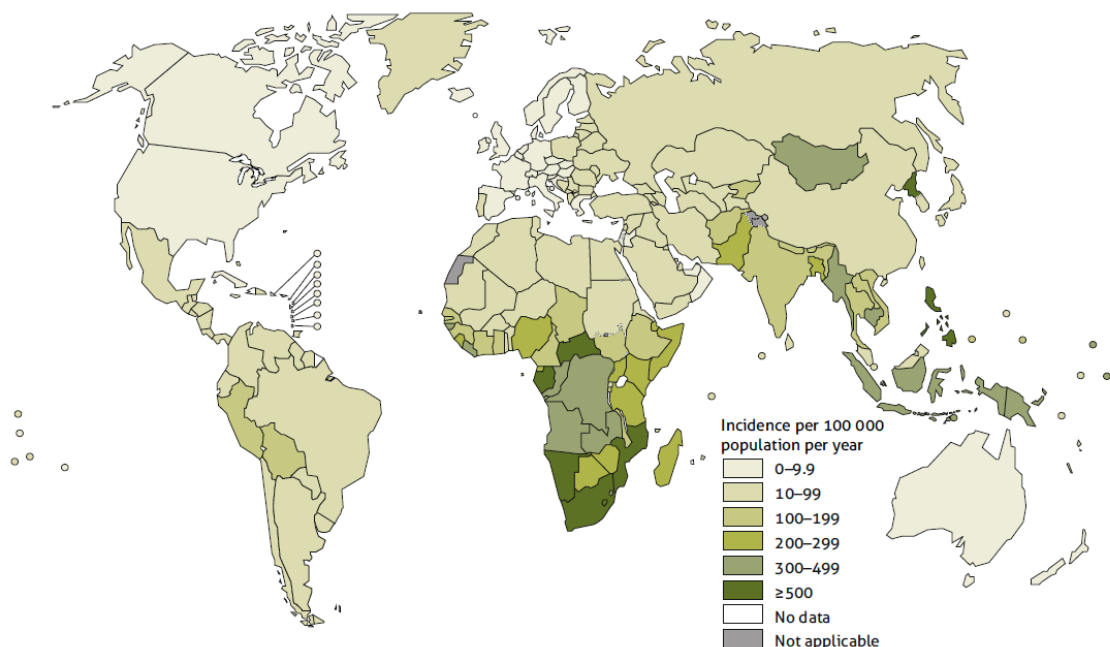


Figura A1. Ciclo de Patogénesis del *Mtb*. Esquema modificado de (8)

### A.1.2. Situación actual de la TB

Actualmente, la TB es una de las 10 causas más comunes de muerte y la principal causa de muerte por un agente infeccioso (situándose por encima del HIV/AIDS) a nivel global. Según el informe anual de la OMS sobre el control de la TB publicado en el 2019, se estima que en 2018 ocurrieron 1.2 millones de muertes causadas por TB incluyendo unas 251.000 muertes de pacientes HIV-positivos. A su vez, se estima que 10 millones de personas desarrollaron TB en 2018 de los cuales 5.7 millones fueron hombres adultos, 3.2 millones mujeres adultos y 1.1 millón niños. Los casos de TB por infección de cepas multirresistentes a drogas (MDR-TB, multidrug-resistant tuberculosis) altamente patogénicas, continúa siendo un problema de salud pública. Se estima que en

el año 2018, 500.000 personas desarrollaron TB por cepas resistentes a la rifampicina, una droga de primera línea y el 78% de estos casos resultaron ser MDR-TB a las drogas de primera línea. ([https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)).



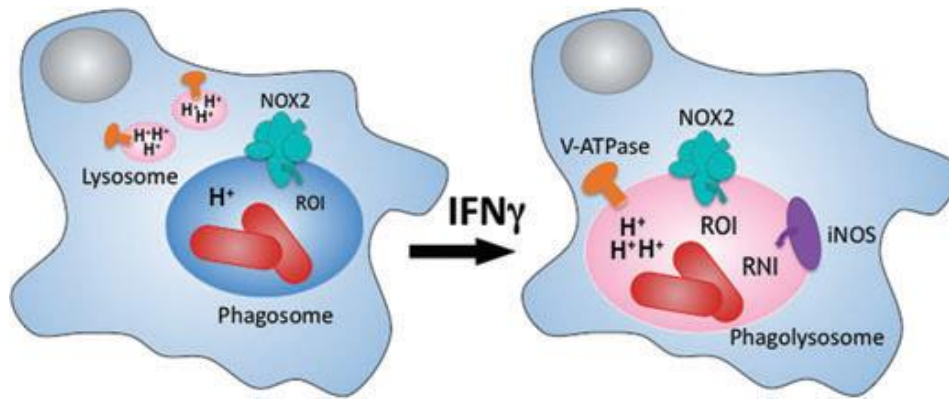
**Figura A2. Velocidad de incidencia de los casos de TB estimada en 2018.** Figura tomada de ([https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)).

Esta estimado que cerca de 1.7 billones de personas (un 23% de la población mundial) tiene TB latente y están en riesgo de desarrollar TB activa.

En Uruguay la incidencia está estimada en unos 26.7 casos nuevos cada 100.000 personas en 2017, aunque este número ha ido aumentando lentamente desde el año 2000 según datos aportados por la Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes. Entre estos datos de nuestro país se destaca un aumento en el número de casos en la población carcelaria de 2016 a 2017, número que venía en descenso desde el 2013 al 2016, ([http://www.chlaep.org.uy/descargas/diaTB2018/1Situacion\\_actual\\_TB\\_Uruguay\\_DrArrieta.pdf](http://www.chlaep.org.uy/descargas/diaTB2018/1Situacion_actual_TB_Uruguay_DrArrieta.pdf)).

## A.II. INMUNIDAD MEDIADA POR CÉLULAS

La eliminación o contención del *Mtb* depende de la respuesta inmune innata y adaptativa del huésped. La llegada al pulmón es mediada por la inhalación de pequeñas gotas (aerosol) que contienen un número bajo de bacilos (1). Una vez en el epitelio alveolar, el *Mtb* se encuentra con su célula blanco primaria, el macrófago alveolar, además de las células dendríticas y neutrófilos, que son atraídas al sitio de infección. El epitelio alveolar es un ambiente particular por lo que el macrófago alveolar está adaptado a minimizar el daño en el pulmón (9). El macrófago y otras células mieloides censan la presencia del *Mtb* mediante receptores de reconocimiento de patógenos o de reconocimiento de opsoninas unidas al *Mtb*. Estos receptores reconocen patrones moleculares asociados a patógenos, como por ejemplo, lípidos que componen la pared celular del *Mtb* (10). El reconocimiento promueve el proceso de fagocitosis para la internalización del *Mtb* en fagosomas y su posterior maduración, que involucra la fusión con lisosomas, que contienen proteasas y lipasas antimicrobianas. Las células infectadas con el *Mtb* migran a los ganglios linfáticos pulmonares, donde la respuesta inmune adaptativa se inicia con la producción de interferón gama (INF- $\gamma$ ) por las células T y de anticuerpos por las células B (11, 12). El modelo clásico de una respuesta inmune exitosa a *Mtb* incluye la activación de los macrófagos por INF- $\gamma$  para eliminar el *Mtb* (Figura A3). Dicha activación, conduce a la fusión entre el fagosoma con el lisosoma, con la concomitante acidificación del fagolisosoma promovida por la bomba de protones V-ATPasa, secreción de citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF, Tumoral Necrosis Factor), IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , interleuquina-6, -12 e -1  $\beta$ , y producción de especies reactivas del oxígeno (ROI, Reactive Oxygen intermediates) y especies reactivas del nitrógeno (RNI, Reactive Nitrogen Intermediates) (mecanismo que describiremos en la siguiente sección) que junto con las proteasas y lipasas, promoverán la eliminación del *Mtb* (13).



**Figura A3.** En los macrófagos en reposo, el *Mtb* detiene la maduración de fagosoma e inhibe la fusión del fagosoma con el lisosoma. Como consecuencia, *Mtb* reside en un compartimento ligeramente ácido y está expuesto a ROIs generados por la NADPH oxidasa 2 (NOX2). Tras la activación con IFN- $\gamma$ , el fagosoma madura y se fusiona con lisosomas. Esto expone a *Mtb* a un ambiente ácido generado por la V-ATPasa, RNIs derivados de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y ROI de NOX2. Figura tomada de (14).

La autofagia es un proceso a través del cual las células degradan y reciclan contenido citoplasmático utilizando lisosomas. El contenido incluye macromoléculas y orgánulos, así como patógenos intracelulares como el *Mtb* (proceso llamado xenofagia (15)). La autofagia es estimulada por IFN- $\gamma$  (16) y el proceso incluye la formación de un fagoporo, alargamiento y cierre del autofagosoma, seguido de fusión con lisosomas para formar autolisosomas para degradar su contenido. Durante una efectiva respuesta del huésped, el fagosoma que contiene el *Mtb* madura en autolisosomas para eliminarlo (17).

El TNF media muchos procesos importantes durante la respuesta inmune, como la activación de las células inmunes, diferenciación y muerte celular. El mecanismo de acción del TNF la regulación de la supervivencia del *Mtb* es parcialmente atribuido a la activación de macrófagos con aumento de la fagocitosis y la producción de ROIs y RNIs. Usando la infección del modelo del pez cebra con *Mycobacterium marinum*, Roca y colaboradores demostraron que el TNF induce la producción de ROIs por las mitocondrias, que inicialmente conduce a un aumento de la muerte del *Mtb* pero también culmina en necrosis de macrófagos, favoreciendo así la supervivencia del patógeno (18).

Cuando la respuesta inmune no tiene éxito, el *Mtb* continúa creciendo intracelularmente hasta que lisa la célula y reinfecta nuevas células o se replica extracelularmente. Cuando la respuesta inmune es parcialmente exitosa, los macrófagos activados y otras células huésped (células T, B y fibroblastos)

rodean células infectadas con *Mtb* en un granuloma, creando condiciones hipóxicas, ácidas, pobres en nutrientes que son menos permisivas para la replicación del *Mtb*. El granuloma puede beneficiar al huésped al contener y restringir la propagación de la infección y generar una respuesta inmune localizada. Sin embargo, este mecanismo no siempre tiene un efecto esterilizador, ya que el *Mtb* emplea numerosas estrategias para garantizar su supervivencia (19).

### **A.II.1. Fagocitosis y generación de ROIs y RNIs por el macrófago**

Describiremos las vías de generación (Figura A4) y la química de los ROI y RNI (que son “actores” fundamentales en la realización de esta Tesis) involucrados en la eliminación de patógenos en general.

Tras el reconocimiento y la fagocitosis de los patógeno se desencadena el ensamblaje y activación de la NADPH oxidasa 2 (Nox2) de macrófagos, un complejo enzimático que comprende componentes citoplasmáticos reguladores (p47phox y p67phox) y el heterodímero, gp91<sup>phox</sup>-gp22<sup>phox</sup> unido a la membrana. La formación del complejo activo conduce a la reducción univalente del O<sub>2</sub> al radical anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (20). Los equivalentes de reducción requeridos para esta reacción provienen del NADPH, que se genera fundamentalmente en la vía de las pentosas fosfato, permitiendo la generación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> que puede durar de 10 a 90 minutos (21-23). A medida que los electrones fluyen de NADPH a O<sub>2</sub>, los protones se mueven a través de canales dependientes de protones activados por voltaje, manteniendo así la actividad de la Nox2 (20). El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ( $E^{\circ} \text{O}_2/\text{O}_2^{\bullet-} = -0.33 \text{ V}$ ) puede actuar como un oxidante univalente o como reductor (24, 25). La forma protonada del O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, el radical perhidroxilo (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>), es un ácido débil ( $pK_a = 4.75$  (26)) y un oxidante más potente ( $E^{\circ} \text{O}_2^{\bullet-}, \text{H}^+/\text{HO}_2^{\bullet} = 1.0 \text{ V}$ ) comparado con el O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, que a diferencia de este último, puede atravesar fácilmente membranas biológicas debido a su neutralidad. Debido a la disminución del pH fagosomal, la relación de concentraciones entre el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y el HO<sub>2</sub><sup>•</sup> y la relevancia de sus reacciones son dependientes de ese cambio en el pH. El HO<sub>2</sub><sup>•</sup> reacciona rápidamente con ácidos grasos poliinsaturados ( $k \sim 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), iniciando reacciones de peroxidación lipídica (27). El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> puede oxidar centros Fe-S (4Fe-4S;  $k = 10^6$  a



$10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) en el sitio activo de deshidratasas como la aconitasa (28, 29) y fumarasas (30, 31), lo que resulta en la liberación de Fe de estos grupos y la concomitante inactivación enzimática (29, 32).

El  $\text{O}_2^{\cdot-}$  puede dismutar a peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y  $\text{O}_2$  en una reacción catalizada por superóxido dismutasas (SODs, (25, 33)). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es un oxidante fuerte ( $E^\circ \text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O} = 1.77 \text{ V}$ ), pero sus reacciones con la mayoría de las biomoléculas son lentas debido a que presentan una alta energía de activación. Las excepciones son los centros Fe-S presentes en deshidratasas, enzimas que contienen grupos hemo y los tioles/selenoles peroxidáticos, es decir de peroxidasas que precisan de dichos grupos funcionales para su actividad, en su mayoría pertenecientes a la familia de las glutatión peroxidasas (GPxs) o peroxirredoxinas (Prxs) (34, 35). El  $\text{pK}_a$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  es  $\sim 11.6$ , por lo que a pH fisiológico se encuentra en forma protonada. Tanto el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede liberar el Fe de los centros Fe-S y pueden generar el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) a través de las reacciones de Fenton (36). El  $\cdot\text{OH}$  es el oxidante más reactivo ( $E^\circ \cdot\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 2.33 \text{ V}$ ) y reacciona prácticamente con la totalidad de las biomoléculas. En vista a su alta reactividad, el  $\cdot\text{OH}$  generado en el fagosoma es poco probable que cause daño selectivo a los patógenos internalizados. La generación sitio específica de  $\cdot\text{OH}$  se ha propuesto como el mecanismo subyacente al daño del ADN y la toxicidad resultante de liberación de Fe intracelular (que se une a la carga negativa del ADN; (37, 38)).

Los macrófagos sintetizan óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) a partir de L-arginina y  $\text{O}_2$  en presencia de NADPH, reacción catalizada por el complejo de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). La activación de la iNOS depende de citoquinas, incluyendo  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{IL-1}\beta$  y factores derivados de patógenos, como el lipopolisacárido (LPS). La activación de enzimas relacionadas a la iNOS y de transportadores favorece el aporte sustancial de sustrato (rango de mM) y duradero (horas) para la producción de  $\cdot\text{NO}$  (39, 40). La iNOS se localiza en el citosol cercana al fagosoma (41). El máximo nivel de expresión de la iNOS en macrófagos murinos se alcanza 4–5 h después de la estimulación con  $\text{IFN-}\gamma$  y LPS, generándose flujos  $\cdot\text{NO}$  que duran cerca de 24 horas (22, 42, 43). El  $\cdot\text{NO}$  es un radical libre relativamente estable y un pobre oxidante por un electrón ( $E^\circ \cdot\text{NO}, \text{H}^+/\text{HNO} = -0.8 \text{ V}$ , (44, 45)). La naturaleza no cargada de esta

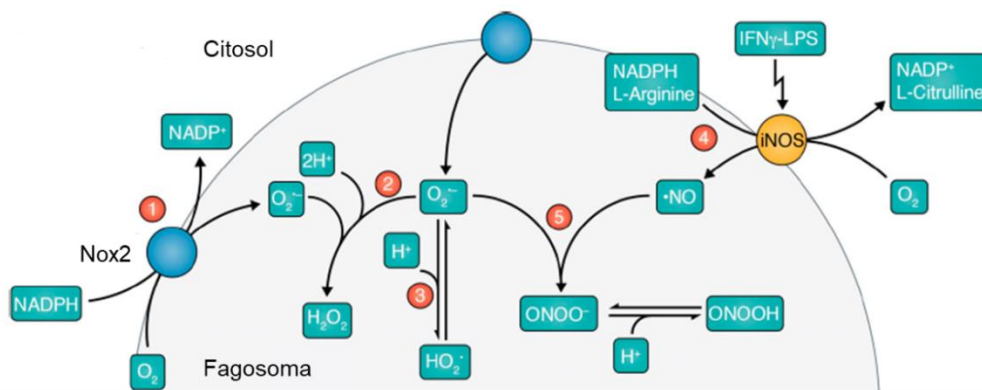
pequeña molécula le da un carácter lipofílico, por lo que puede difundir hacia el fagosoma (46-48), donde puede lograr concentraciones del orden de  $\mu\text{M}$ . Aunque es un oxidante débil, el  $\cdot\text{NO}$  puede reaccionar con radicales biológicamente relevantes, por ejemplo, el  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , dióxido de nitrógeno radical ( $\cdot\text{NO}_2$ ); radicales tiilo, peroxilo y tirosilo, con constantes de velocidad cercanas a las controladas por difusión ( $1-3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , (49-51)). Es importante destacar que el efecto citostático del  $\cdot\text{NO}$  en las células tumorales y patógenos dependen en parte de la inhibición de la ribonucleótido reductasa (una enzima crucial para síntesis de ADN), lograda mediante la reacción del  $\cdot\text{NO}$  con el radical tirosilo estable y catalíticamente esencial (42, 52, 53). El  $\cdot\text{NO}$  también puede reaccionar e inhibir al hemo terminal de la citocromo C oxidasa de la cadena respiratoria, iniciando la generación sitio específica de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , derivando en la formación peroxinitrito<sup>a</sup> (54), un especie con capacidad de oxidar y nitrar moléculas. La reacción entre el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y el  $\cdot\text{NO}$  para formar el peroxinitrito es muy rápida ( $k = 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , (49, 55, 56)) y puede competir con la dismutación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por la SOD (57). Como vimos arriba, la fagocitosis conduce a la activación de la Nox2 produciendo  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , que en presencia de  $\cdot\text{NO}$  lleva a la generación de peroxinitrito en el fagosoma (22).

El peroxinitrito es un oxidante fuerte, capaz de oxidar por uno o dos electrones diferentes biomoléculas ( $E^\circ \text{ ONOO}^-/\cdot\text{NO}_2 = 1.4 \text{ V}$  y  $E^\circ \text{ ONOO}^-/\text{NO}_2^- = 1.2 \text{ V}$ ). Gran parte de la citotoxicidad del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y el  $\cdot\text{NO}$  es debido a la formación de peroxinitrito, que deteriora las respiración celular y desencadena la muerte celular mediada por reacciones de oxidación y nitración (56). El peroxinitrito anión ( $\text{ONOO}^-$ ) y su ácido conjugado, el ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ) ( $\text{p}K_a = 6.8$ , (58)) difieren en estabilidad, reactividad y capacidad de difusión, por lo que la bioquímica de peroxinitrito en los sistemas biológicos dependen mucho del pH (59). En ausencia de blancos el  $\text{ONOOH}$  sufre homólisis dando  $\cdot\text{OH}$  y  $\cdot\text{NO}_2$ . A su vez, el  $\text{ONOO}^-$  puede reaccionar con  $\text{CO}_2$  ( $k = 5.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ ) para producir el aducto de nitrosoperoxocarboxilato ( $\text{ONOOCO}_2^-$ ) que sufre una rápida homólisis, produciendo  $\cdot\text{NO}_2$  y radical

---

<sup>a</sup> Los nombres recomendados por la IUPAC para el peroxinitrito anión ( $\text{ONOO}^-$ ) y su ácido conjugado, el ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ), son oxoperoxonitrato (1-) e oxoperoxonitrato de hidrógeno, respectivamente. El término peroxinitrito se usa para referirse a la suma de  $\text{ONOO}^-$  y  $\text{ONOOH}$ . Los nombres recomendados para el óxido nítrico y el radical carbonato anión son monóxido de nitrógeno u oxidonitrógeno ( $\cdot$ ) y trioxidocarbonato ( $\cdot$  1-), respectivamente.

carbonato ( $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ) (60, 61). Sin embargo, las pequeñas distancias de difusión ( $<1 \mu\text{m}$ ) requeridas para que las especies reactivas alcancen a los patógenos dentro de los fagosomas de los macrófagos aseguran que la mayor parte del peroxinitrito alcance su blanco antes de que pueda ser consumido por la rápida reacción con el  $\text{CO}_2$  (62). El  $\text{CO}_3^{\bullet-}$  generado por esta reacción, así como el  $\cdot\text{OH}$  y el  $\cdot\text{NO}_2$  derivados de homólisis de  $\text{ONOOH}$  pueden oxidar aminoácidos, tales como la Tyr dando radical tirosilo, que se recombina rápidamente con el  $\cdot\text{NO}_2$  para generar 3-nitrotirosina en proteínas (56, 63), cuya formación, si bien no específica para el peroxinitrito, refleja la generación de oxidantes derivados del  $\cdot\text{NO}$  (64). Esta modificación pos-traducciona oxidativa de proteínas puede afectar la integridad estructural o el metabolismo del patógeno llevando a su muerte (56). El peroxinitrito también puede oxidar tioles ( $\text{RSH}$ ) a sus correspondientes ácidos sulfénicos ( $\text{R-SOH}$ ) (56, 65) y puede reaccionar con metales de transición presentes en proteínas (por ejemplo,  $\text{Cu/Zn}$ ,  $\text{Mn}$  y  $\text{Fe-SODs}$ ), produciendo complejos oxo-metal y  $\cdot\text{NO}_2$  los cuales pueden conducir a la nitración e inactivación de proteínas (66). Otro blanco del peroxinitrito son los centros Fe-S con los cuales reacciona rápidamente, lo que lleva a la liberación del Fe e inactivación de proteínas que contienen estos grupos (67).



**Figura A4. Formación de ROIs y RNI en el fagosoma del macrófago activado.** La activación de la Nox2 (esfera azul) conduce a la generación de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (1) hacia el fagosoma que tiene un  $\text{pH} \leq 5$ . El  $\text{O}_2^{\bullet-}$  dismuta a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2) y/o protona para generar el radical  $\text{HO}_2^{\bullet}$  (3). A su vez el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  puede llegar al patógeno por medio de canales aniónicos, mientras que tanto  $\text{H}_2\text{O}_2$  como  $\text{HO}_2^{\bullet}$  pueden difundir a través de las membranas. Los macrófagos activados que expresan iNOS (esfera roja) produce  $\cdot\text{NO}$  (4), que difunde al fagosoma y reacciona rápido con el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (5) produciendo peroxinitrito anión ( $\text{ONOO}^-$ ). Este se puede protonar a ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ,  $\text{pK}_a = 6.8$ );  $\text{ONOO}^-$  también puede reaccionar con  $\text{CO}_2$  para producir los radicales  $\cdot\text{NO}_2$  y  $\text{CO}_3^{\bullet-}$  con rendimientos cercanos al 35%. El peroxinitrito puede oxidar directamente proteínas fundamentalmente en sus grupos tiol/selenol o en grupos prostéticos y a través de

radicales derivados u oxidación de centros metálicos, puede conducir a modificaciones nitro-oxidativas de proteínas o lípidos de membrana. Modificado de (68).

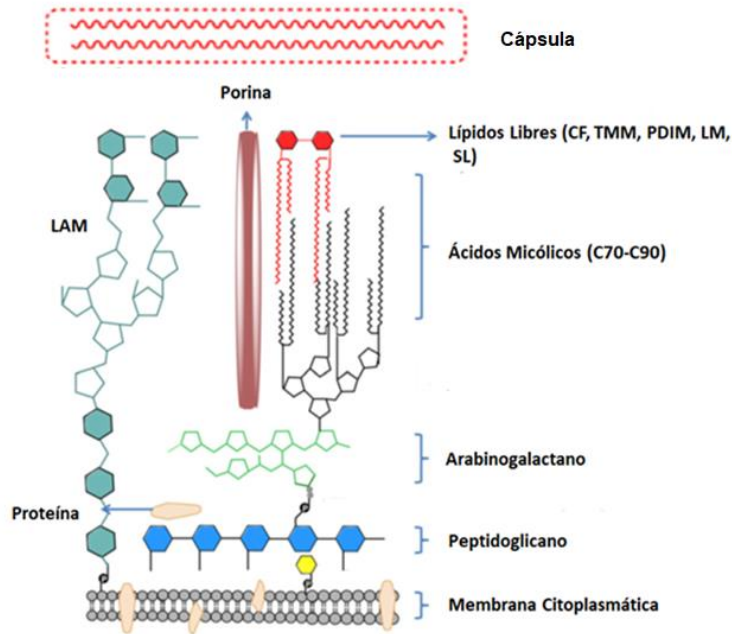
Los radicales  $\cdot\text{OH}$  y  $\cdot\text{NO}_2$  pueden participar en reacciones de peroxidación lipídica, lo que resulta en la formación de hidroperóxidos derivados de ácido grasos (AG-OOH) en las membranas celulares (69, 70). Estos también pueden ser sintetizados por mecanismos enzimáticos (71). Los AG-OOH pueden ser liberados de las membranas por la acción de la fosfolipasa  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) (72). Akaki y colaboradores reportaron que el ácido araquidónico libre es tóxico para el *Mtb* actuando de manera sinérgica con RNI (73). Aunque este mecanismo de toxicidad no se ha sido resuelto, el hecho de que la toxicidad de los ácidos grasos insaturados libres contra *Helicobacter pylori* aumenta en cepas deficientes en Prxs, peroxidasas dependiente de tioles que reducen dichas especies, sugiere que los AG-OOH pueden ser las especies citotóxicas (74).

Existen varias terapias antituberculosas utilizando drogas que promueven formación de ROI y RNI citotóxicos (75-78). Además, el metabolismo de compuestos azufrados en *Mtb* (será descrito brevemente en el Capítulo 2) es una vía importante para la supervivencia, patogénesis y su defensa antioxidante. Drogas inhibitoras de estas vías mostraron una potente actividad micobactericida contra cepas de *Mtb* de tipo salvaje, MDR-TB y cepas extremadamente resistentes a drogas aisladas de muestras clínicas (79). Esta estrategia supone la disminución de la capacidad antioxidante del sistema dependiente de tioles, en lugar de generar un aumento de especies oxidantes. Otra estrategia involucra la modificación redox de ciertos blancos importantes para la supervivencia del microorganismo (80, 81). Dado que los mecanismos enzimáticos que permiten la desintoxicación de ROI y RNI, en general, y la reducción de hidroperóxidos, en particular, constituyen una de las estrategias que permiten al bacilo infectar y persistir en el interior del fagosoma de los macrófagos activados, su conocimiento podría facilitar el desarrollo racional de drogas.

## A.III. FISIOLOGÍA DEL *Mtb*

### A.III.1. Características del *Mtb*

El *Mtb* es un aerobio obligatorio, aunque, se ha demostrado que puede sobrevivir más de una década con condiciones *in vitro* bajo anaerobiosis, manteniendo la virulencia (82). Pertenece al filo de las Actinobacterias y al género *Mycobacterium*, siendo los miembros de este género bacilos no móviles y no esporulados que tienen un alto contenido de citosina y guanina en su ADN (83). Una característica del *Mtb* es la peculiar estructura de la envoltura celular, que proporciona una barrera excepcionalmente fuerte y juega un papel fundamental en la patogenia. La composición de la pared hace que las células sean impermeables a la tinción de Gram, debido a la presencia del ácido micólico que inhibe la absorción de la tinción. En cambio, tinciones como la Ziehl-Neelsen o fluorescentes como la auramina-rodamina son utilizadas para detectar el *Mtb* (84). La pared celular de las micobacterias contiene peptidoglicano, arabinogalactano, ácidos micólicos y lipoarabinomanano como se muestra en la Figura A5. Todas las especies de micobacterias producen ácidos grasos del tipo  $\alpha$ -alquil,  $\beta$ -hidroxil de alto peso molecular (60-90 carbonos), por lo que el alto contenido de lípidos representa el 40% del peso de la pared celular (85). Los ácidos micólicos y ácidos grasos de cadena larga del tipo 2-alquil, 3-hidroxi son característicos en la pared celular de *Mtb*. Los ácidos micólicos se disponen en forma de bicapa en asociación con lípidos de la pared celular para servir como una barrera de permeabilidad de baja fluidez. Una variedad de lípidos únicos, como el lipoarabinomanano (LAM), están anclados no covalentemente con la pared y parecen jugar un papel importante en la virulencia del *Mtb* (86).



**Figura A5. Diagrama de la envoltura celular del *Mtb*.** La membrana citoplasmática de las micobacterias está encapsulada por una capa de peptidoglicano. El peptidoglicano está unido al arabinogalactano a través de enlace covalente que involucra un disacárido y un grupo fosfato. El arabinogalactano es un polisacárido de cadena ramificada que consiste en una cadena de galactosa proximal unida a una cadena de arabinosa distal. Los ácidos micólicos son un componente esencial de la pared celular, están unidos covalentemente al copolímero de arabinogalactano-peptidoglicano. Los lípidos libres se muestran en rojo. Otro componente principal asociado no covalentemente a la pared celular micobacteriana es el lipoarabinomano (LAM), que está unido a la membrana citoplasmática mediante un fosfatidilinositol. La porina, MspA, media la absorción de nutrientes pequeños e hidrofílicos, tales como azúcares y fosfatos, mientras que los compuestos hidrofóbicos se difunden directamente a través de la pared celular; CF, factor de cordón (o trehalosa dimicolato); TMM, trehalosa monomicolato; PDIM, dimicoserosato de tiocerol; LM, lipomonoano, SL: sulfolípidos. La capa más externa es la cápsula que está compuesta principalmente de proteínas y cantidades menores de carbohidratos y lípidos. Esquema modificado de (87).

Aunque el genoma del *Mtb* es menor al de *Escherichia coli*, este es muy versátil, codificando para todas las vías anabólicas y catabólicas típicas en bacterias, así como la síntesis y degradación de aminoácidos. Sin embargo, un aspecto interesante que diferencia al *Mtb* de otras bacterias es que de aproximadamente 4000 genes del genoma, la mayoría codifica enzimas involucradas en la lipólisis (para la supervivencia del patógeno en el huésped) y lipogénesis (para la síntesis de la envoltura celular). Este patógeno tiene alrededor de 250 enzimas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos. Además, codifica para enzimas requeridas para la glucólisis, vía de las pentosas fosfato y los ciclos del ácido cítrico y glioxilato, lo que demuestra el metabolismo dinámico del bacilo.

### A.III.2. Estrategias de supervivencia del *Mtb*

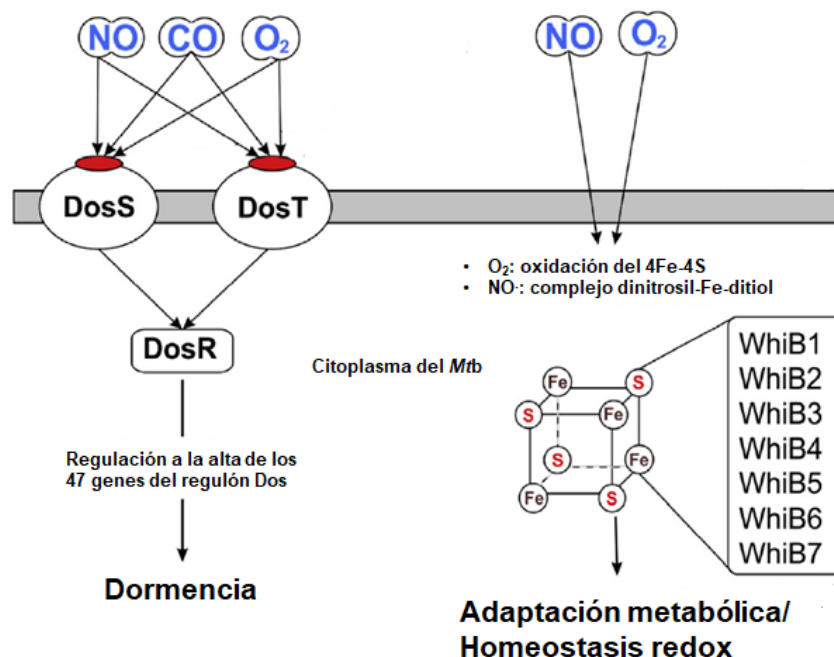
Existe una extensa literatura sobre los mecanismos de supervivencia del *Mtb* frente a la respuesta del macrófago (88-90). Estos incluyen la capacidad de *Mtb* de dañar el fagosoma (91) en etapas tempranas de la fagocitosis, inhibir la maduración del fagosoma (92), inhibir su acidificación (93, 94), la inhibición de la autofagia en macrófagos infectados (95), siendo importantes los mecanismos implicados a la adaptación del *Mtb* al estrés redox, que describiremos a continuación.

Durante diferentes etapas de la infección, el *Mtb* puede estar libre, dentro del fagosoma de macrófago o en el granuloma. Es decir, el bacilo está expuesto a diferentes microambientes lo que conlleva a una respuesta heterogénea en cuanto a la expresión génica, estado de replicación y cambios metabólicos. Es importante para el *Mtb* censar y adaptarse a las diferentes condiciones, por ejemplo, a la hipoxia y al estrés redox, al que puede verse expuesto durante el proceso infeccioso.

El *Mtb* no posee los sensores clásicos empleados por varias especies de bacterias para censar el estrés oxidativo, como OxyR en el caso de *Salmonella* u *Escherichia coli*, que regula la respuesta antioxidante bacteriana al estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (96, 97). A pesar de ello, el *Mtb* posee sistemas sensores que le permiten sobrellevar el dinámico escenario redox con éxito. DosT y DosS son dos sistemas sensores que contienen grupos hemo y que se ubican en la membrana citoplasmática (Figura A6). Se propone que DosS actúa como un sensor redox y DosT primeramente como un sensor de hipoxia, ya que los gases fisiológicamente relevantes como el O<sub>2</sub>, el \*NO y el CO son ligandos o pueden oxidar a los átomos de Fe de los hemo (98). Ambos sistemas son capaces de activar un factor de transcripción, DosR, llevando a la inducción de genes cruciales en el regulón Dos (conocido como regulón de dormencia), involucrados en la supervivencia en anaerobiosis provocando el cambio metabólico característico en el estado de latencia del bacilo (99). La consecuencia de este cambio incluye regulación a la alta de la capacidad de utilización de aceptores de electrones alternativos como nitrato y fumarato

(100, 101), regulación a la baja del metabolismo basal (102, 103), regulación a la alta de la producción de triacilglicéridos (TAG) (104, 105) y engrosamiento de la pared celular del bacilo (106). A su vez, es capaz de promover la rápida recuperación de la capacidad de replicarse del bacilo una vez que prevalecen las condiciones favorables de crecimiento (103). Estos sistemas no tienen homólogos en bacterias, lo que sugiere que la capacidad de censar los niveles de O<sub>2</sub>, NO y CO por parte del *Mtb* podría conferir una ventaja evolutiva para este patógeno altamente exitoso.

Otro sistema sensor redox conocido en el *Mtb* son la familia de las WhiB (1-7), en particular WhiB3 (107). Son proteínas con centros 4Fe-4S (Figura A6), los cuales pueden unir NO y desensamblarse por O<sub>2</sub> (107). En cuanto al WhiB3, se demostró que dependiendo de la presencia y condiciones redox del centro 4Fe-4S, este se puede unir con diferente afinidad al ADN diana para iniciar la expresión génica. Recientemente, se reportó que el WhiB3 actúa mediante la detección de cambios en el estado redox del micotiol, principal tiol de bajo peso molecular de estas bacterias, que se describirá posteriormente (108, 109).



**Figura A6. Esquema de los sensores redox del *Mtb*.** Las proteínas quinasas DosS y DosT que contienen hemo detectan el NO, CO y O<sub>2</sub> durante la infección y activan la respuesta del regulador DosR que induce el regulón Dos. También, se muestra la interacción de O<sub>2</sub> o NO con miembros de la familia de proteínas WhiB que contienen un clúster de 4Fe-4S que regulan la homeostasis redox intracelular de *Mtb*,



así como la adaptación metabólica en condiciones de estrés generado por el huésped. Esquema modificado de (110).

El WhiB3 tiene un rol en la virulencia del bacilo en modelos de infección en ratones y cobayos (111). Se sugiere que este factor causa cambios intracelulares redox asociados a la hipoxia y favorece la utilización de ácidos grasos en lugar de azúcares (107). El WhiB3 regula de manera redox dependiente, la producción de lípidos, incluyendo TAG (112) fuente de carbono para el estado persistente del *Mtb* (113). Como ya mencionamos, la síntesis de TAG está también regulada por DosT/S/R por lo que se establece un enlace entre las dos vías de señalización redox, una extracelular (DosT/S) y una intracelular (WhiB3). WhiB3 también modula la asimilación de propionato para la síntesis de lípidos libres de la pared celular (CF, PDIM y SL, Figura A5) (112).

Los factores sigma ( $\sigma$ ) son responsables de gran parte de la especificidad de la expresión génica a nivel celular (114, 115). Se ha demostrado que de los trece factores  $\sigma$  expresados en *Mtb* (115), SigH, SigE, SigL, SigF, así como el factor de respuesta general al estrés SigB están involucrados en la respuesta al estrés redox (116-120). Estos factores  $\sigma$  que son controlados por los factores anti- $\sigma$  (o por otros factores  $\sigma$  para el caso del SigB), proteínas que coordinan Zn y que son capaces de detectar las señales de estrés. Tras la activación, los factores  $\sigma$  se unen a sus respectivas promotores e inducen la transcripción de genes de homeostasis redox que incluyen tiorredoxinas (Trxs), Prxs, así como también otros factores de transcripción (121).

Uno de los factores  $\sigma$  más importantes en la respuesta al estrés y la supervivencia del *Mtb* es SigH, un regulador global que se ha demostrado que regula a la alta casi 40 genes involucrados en la respuesta al estrés general (122). El SigH se activa durante la entrada a los macrófagos, que sugiere un rol en la patogénesis y supervivencia dentro del huésped (123, 124). El SigH confiere protección del estrés redox al regular la expresión de varios genes, tales como, Trxs, junto con la tiorredoxina reductasa (TR), y otros dos factores  $\sigma$ , SigE y SigB (122, 125). El SigH es regulado por el factor anti- $\sigma$ , la RshA (126). Similar a SigH, el SigE ha demostrado ser vital para la supervivencia del

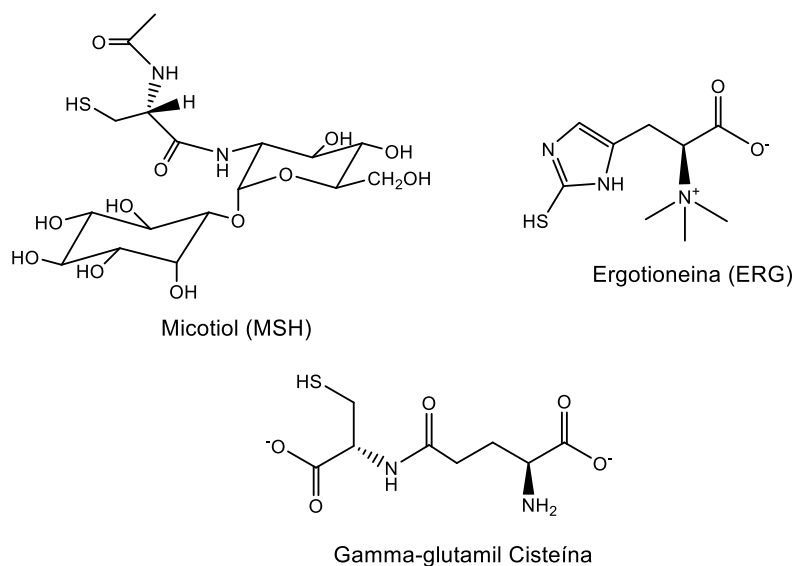
*Mtb* dentro del macrófago activado, lo que lo implica como un importante factor de virulencia (127-129). SigE se regula mediante su factor anti- $\sigma$ , RseA, que detecta la presencia de ROIs y otros agentes oxidantes de tioles (116).

### **A.III.3. Sistemas antioxidantes del *Mtb***

Describiremos brevemente los sistemas antioxidantes implicados directamente en la detoxificación de RNIs y ROIs a los que está expuesto el *Mtb* durante la infección, haciendo hincapié luego en las Prxs que son el objetivo de estudio de esta Tesis.

#### **A.III.3.a. Tioles de bajo peso molecular**

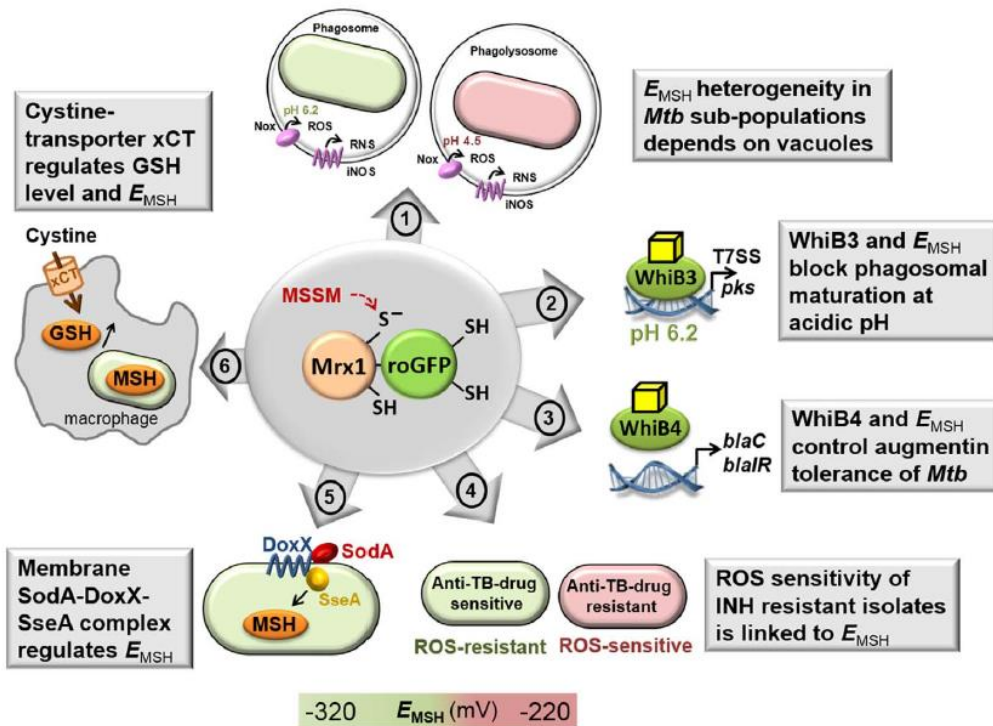
En la mayoría de los eucariotas y bacterias, el glutatión (GSH) es el tiol de bajo peso molecular principal responsable de mantener la homeostasis redox. El *Mtb* carece de GSH y en su lugar utiliza micotiol (MSH, 1-D-myo inositol-2-N-acetilcisteína-amino-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido, Figura A7) como principal tiol de bajo peso molecular (130). La biosíntesis de MSH es un proceso complejo que procede a través de cinco pasos utilizando L-inositol-1-fosfato y UDP-N-acetilglucosamina como sustratos iniciales (131). Cepas de *Mtb* deficientes en MSH son hipersensibles a oxidantes, condiciones ácidas y drogas (132-134). El *Mtb* también puede sintetizar ergotioneína (ERG, betaína de la 2-mercapto-L-histidina) (135) y gamma-glutamil cisteína (136) (Figura A7), la interacción entre estos tres tioles de bajo peso molecular asegura protección óptima del bacilo contra las hidroperóxidos (137, 138). Las vías metabólicas del azufre del *Mtb* (requeridas para la síntesis de cisteína, MSH y ERG), como ya se mencionó, son esenciales para la virulencia y supervivencia, siendo reguladas a la alta en condiciones de estrés oxidativo (139).



**Figura A7. Estructura de los principales tioles de bajo peso molecular presentes en *Mtb*.**

La micotiol disulfuro reductasa (MR) es una flavoenzima responsable de reducir la forma oxidada a disulfuro del MSH (MSSM) y es esencial para la supervivencia del *Mtb* (140). Durante la exposición a oxidantes, varias proteínas forman disulfuros mixtos con MSH y estos disulfuros se reducen luego por la proteína análoga a las glutarredoxinas (Grxs), la microredoxina-1 (Mrx-1; (141, 142)). La Mrx-1 a su vez es reducida por MSH/MR usando los equivalentes de reducción del NADPH (141). En condiciones de estrés oxidativo, el *Mtb* aumenta (a través de los factores  $\sigma$  SigH, SigE y SigB) la expresión del sistema Trx/TR junto con enzimas involucradas en la síntesis del MSH (125, 131). Como ya se mencionó, el WhiB3, regula la expresión génica del *Mtb*, detectando cambios en el estado redox del MSH (108, 109). Curiosamente, las cepas del *Mtb* que carecen de WhiB3 o SigH tienen virulencia atenuada en modelos animales (108, 143), subrayando la importancia de la regulación de los sistemas implicados en la homeostasis redox en bacterias patógenas.

Un punto a destacar, es la utilización de la Mrx-1 acoplada a una sonda fluorescente roGFP (sensor redox genéticamente codificado) como herramienta para evaluar el estado redox celular y en particular del par MSH/MSSM en tiempo real en *Mtb* (144). La Figura A8, esquematiza los estudios que hicieron uso de la sonda para medir el potencial redox del par MSH/MSSM ( $E_{\text{MSH}}$ ) en *Mtb* bajo diferentes condiciones.

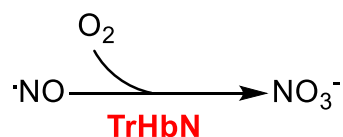


**Figura A8. Resumen de los estudios en los cuales se midió el cambio en el  $E_{MSH}$  en *Mtb* utilizando el biosensor, Mrx1-roGFP2.** Este sensor contribuyó a una comprensión más profunda de la patogenicidad, mecanismos de supervivencia y resistencia a drogas antimicobacterianas. Por ejemplo: 1- Se mostró una heterogeneidad redox mediante el  $E_{MSH}$  en subpoblaciones de *Mtb* que depende de la ubicación diferentes estadios de la maduración del fagosoma (144). 2- El sensor WhiB3 y el  $E_{MSH}$  controlan la inducción de sistemas de secreción tipo VII y policétidos lipídicos (derivados de propionato) bajo condiciones ácidas en el fagosoma inhibiendo su maduración (108). 3- El sensor WhiB4 y el  $E_{MSH}$  controlan la expresión de  $\beta$ -lactamasa que induce la tolerancia a la droga augmentina en la población de *Mtb* en la cual el  $E_{MSH}$  es más negativo y viceversa (145). 4- Cepas aisladas de *Mtb* resistentes a isoniazida tienen un  $E_{MSH}$  menos negativo y son altamente sensibles a ROI y viceversa (146). 5- El complejo oxidorreductasa asociado a la membrana (SodA-DoxX-SseA) regula la desintoxicación de  $O_2^{\cdot-}$  y el balance redox mediado por MSH en condiciones de infección (147). 6- El transportador de cistina-glutamato, xCT regula el ingreso de cistina en los macrófagos, lo que resulta en el aumento de la biosíntesis de GSH en el huésped y un  $E_{MSH}$  más negativo involucrado en la virulencia en un modelo de infección en ratones (148). Esquema tomado de (149).

### A.III.3.b. Proteínas antioxidantes

*Mtb* expresa diferentes enzimas antioxidantes. La protección contra el  $\cdot NO$  depende principalmente de la hemoglobina truncada N (trHbN), la cual está asociada a la membrana plasmática del *Mtb* a través de las hélice- $\alpha$  H, G y pre-A, conservada en trHbN de cepas patógenas (150). La trHbN protege la respiración aeróbica de la inhibición mediada por  $\cdot NO$ , metabolizando

rápidamente el  $\cdot\text{NO}$  a nitrato mediante una mecanismo de una  $\cdot\text{NO}$  dioxigenasa, como se muestra en la siguiente reacción,



Esta reacción tiene una constante de velocidad de segundo orden determinada de  $7.45 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , correspondiente a un velocidad que se acerca al límite de difusión, siendo la  $\cdot\text{NO}$  dioxigenasa más eficiente descrita hasta ahora (151). La pre-A esta ubicada en la región N-terminal y está implicada en la gran eficiencia de esta enzima (152). La trHbN del *Mtb* es altamente expresada durante la infección a macrófagos y mantiene su actividad  $\cdot\text{NO}$  dioxigenasa incluso a bajas concentraciones de  $\text{O}_2$  (153).

En *Mtb*, la dismutación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  es llevada a cabo por dos tipos de SOD, llamadas SODA y SODC, como se muestra en la siguiente reacción,



La SODA depende de Fe y es secretada en grandes cantidades por cepas de *Mtb* virulentas (154). La SODC depende de Cu y está asociada al exterior de la membrana plasmática. Ambas protegen al *Mtb* de la acción del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  generado por el macrófago activado (155, 156). Se reportó que la SODA es esencial para el crecimiento del *Mtb* y las cepas con menor contenido de SODA son atenuadas (157). Tanto la SODA como la SODC pueden inhibir las funciones inmunes y la apoptosis en macrófagos, lo que sugiere que mecanismos independientes de la dismutación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  contribuyen a su rol en la virulencia (158).

El genoma del *Mtb* codifica varias peroxidasa hemo y no hemo-dependientes (83). La catalasa-peroxidasa (KatG) es una peroxidasa que contiene hemo que actúa como catalasa o peroxidasa, utilizando una amplia gama de sustratos oxidantes y reductores (159, 160). La KatG es requerida para la activación de la prodroga isoniazida, por lo que las mutaciones que la

inactivan están asociadas a resistencia a la misma (161, 162). La activación de isoniazida implica su oxidación de un electrón por el compuesto I de la KatG, generando un aducto de isoniazida-NAD que inhibe a la reductasa de la proteína portadora del enoil-acilo, alterando la biosíntesis de ácidos grasos, como el ácido micólico (162). Las cepas que carecen de KatG son atenuadas cuando se infecta a ratones de tipo salvaje e iNOS<sup>-/-</sup>, pero se replican y persisten en ratones que carecen de gp91<sup>phox</sup>, lo que indica una contribución importante de KatG a la patogénesis a través de la reducción de hidroperóxidos derivados de la Nox2 tal como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (163) siendo menos importante su capacidad de reducir peroxinitrito (160), como se muestra en la siguiente reacción,

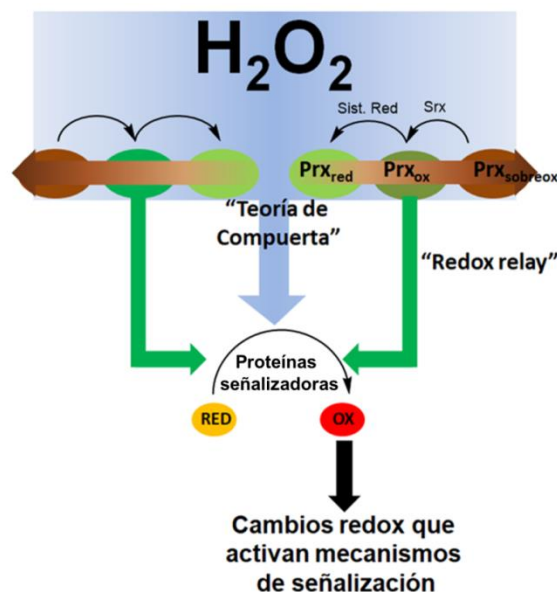


El *Mtb*, también expresa Prxs, dos de las cuales son objetivo de estudio de esta Tesis por lo que en la siguiente sección se describirá en detalle las características de estas proteínas antioxidantes.

## A.IV. PEROXIRREDOXINAS

Las peroxirredoxinas (Prx) son una familia de peroxidasa dependientes de tioles ampliamente distribuidas en los diferentes dominios de los seres vivos (164). Pueden catalizar la reducción de diferentes hidroperóxidos y peroxinitrito con constantes de velocidad de reacción en el rango de 10<sup>4</sup>-10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> (165-167). Además, generalmente tienen altos niveles de expresión en las células (por ejemplo, el 1% de las proteínas celulares de los mamíferos (168)). Estas dos características han posicionado a las Prxs como un fuerte sistema antioxidante en comparación con los otros sistemas caracterizados previamente, como, peroxidasa dependientes de hemo (ej. catalasa) y dependientes de selenocisteína (GPxs) (169, 170). Es más, el análisis global de la cinética de reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el peroxinitrito (que se forman en el citosol y la mitocondria de células eucariotas) por diferentes sistemas, predice que las Prxs serían las encargadas principales de la detoxificación de estos oxidantes (56, 171-173).

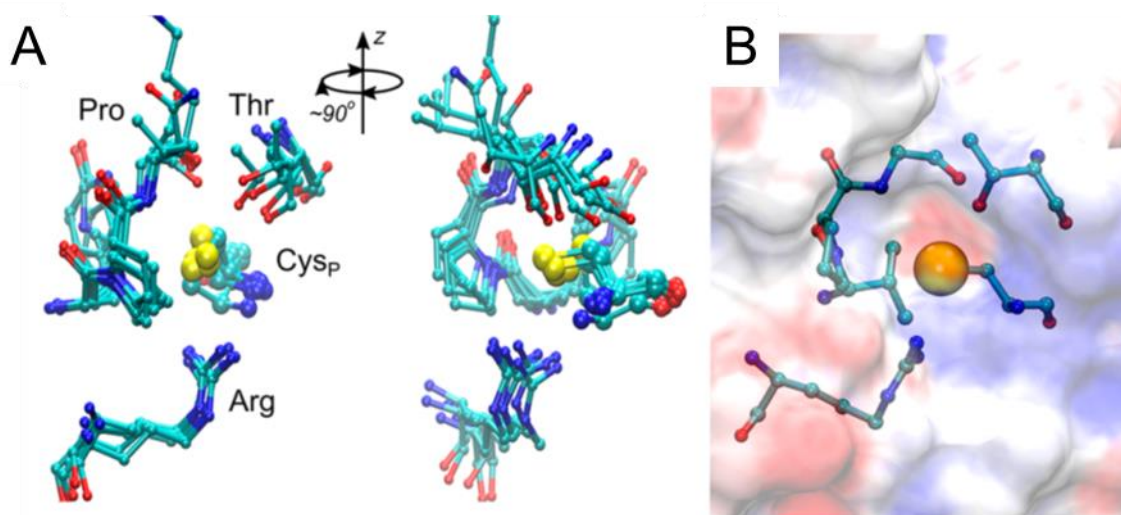
Además, se han descrito otros roles para las Prxs, ya que pueden actuar como chaperonas moleculares (174, 175), participar en la regulación del ciclo circadiano (176-178) y en procesos inflamatorios y procesos que involucran a la inmunidad innata (179). Una de las funciones más estudiadas de estas enzimas aparte de su rol antioxidante, es su participación como sensores y reguladores en la señalización redox, principalmente la mediada por  $H_2O_2$  (180-182). El  $H_2O_2$  aparte de su rol citotóxico, ya descrito, participa como un mediador en la señalización redox y la regulación de ciertas funciones celulares (183-186). Se han descrito dos modelos del mecanismo que involucra la participación de las Prxs en la señalización mediada por  $H_2O_2$  (Figura A9). Uno es la “teoría de compuerta”, en la que se presentan a las Prxs como una compuerta que contiene la oxidación de diferentes blancos por  $H_2O_2$  donde la apertura de esa compuerta implica la inactivación de las Prxs por sobreoxidación, lo que posteriormente permitiría al  $H_2O_2$  oxidar los diferentes blancos cuya reacción con el oxidante es más lenta (187). El otro modelo es denominado “redox relay” en la que una vez oxidadas las Prxs por el  $H_2O_2$ , estas son capaces de oxidar otros blancos transmitiendo la señal (182, 188, 189). Estos dos mecanismos son aceptados y han estado sujetos repetidamente a revisión, (por una revisión reciente ver (190)).



**Figura A9. Modelos que implican la participación de las Prxs como mediadores en la señalización redox mediada por  $H_2O_2$ .** Las Prxs reducidas ( $Prx_{red}$ , verde claro) actúan como “una compuerta” a la oxidación de segundos mensajeros por  $H_2O_2$ . Las Prxs van a ser sus blancos preferenciales, lo que causa

la oxidación ( $\text{Prx}_{\text{ox}}$ ) y la sobreoxidación ( $\text{Prx}_{\text{sobreox}}$ ) (flecha marrón). Esto "abre la compuerta" para que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  actúe directamente proteínas de señalización cuyos residuos de Cys reaccionan más lentamente, cuyos cambios redox que activan mecanismos de señalización. Los sistemas de reducción de  $\text{Prx}_{\text{ox}}$  y  $\text{Prx}_{\text{sobreox}}$  (sulfiredoxinas,  $\text{Srxs}$ ) vuelven a conducir al cierre de la compuerta y restauración del estado original. A su vez, las  $\text{Prx}_{\text{ox}}$  pueden interactuar directa o indirectamente con proteínas de señalización promoviendo su oxidación, bajo forma de un "redox relay", afectando su función.

La estructura de las Prxs se basa en un clásico plegamiento del tipo Trx, ya que habrían evolucionado de antecesor tipo Trx (191), que consiste en un núcleo central conformado por hojas- $\beta$  y rodeado por hélices- $\alpha$ . Hay 4 residuos aminoacídicos ampliamente conservados entre las Prxs (conocidos como la tétrada catalítica, ver Figura A10), 3 de estos se encuentran en un motivo de 8 residuos PxxxTxxC generalmente localizado en la primera vuelta de la hélice- $\alpha_2$ . La Cys y la Pro son totalmente conservadas y ocasionalmente la Thr alterna la posición con Ser. Esta cisteína es el sitio de reacción con el hidroperóxido, sustrato oxidante para estas enzimas, por lo que se la denomina cisteína peroxidática ( $\text{C}_\text{P}$ ). El otro residuo conservado es una Arg que si bien es lejana en secuencia, espacialmente se encuentra cerca del motivo anterior, ubicada generalmente al principio de la hoja- $\beta_6$ . La importancia de estos residuos en la catálisis ha sido comprobada en diferentes Prxs por estudios de mutagénesis sitio dirigida (192-195).

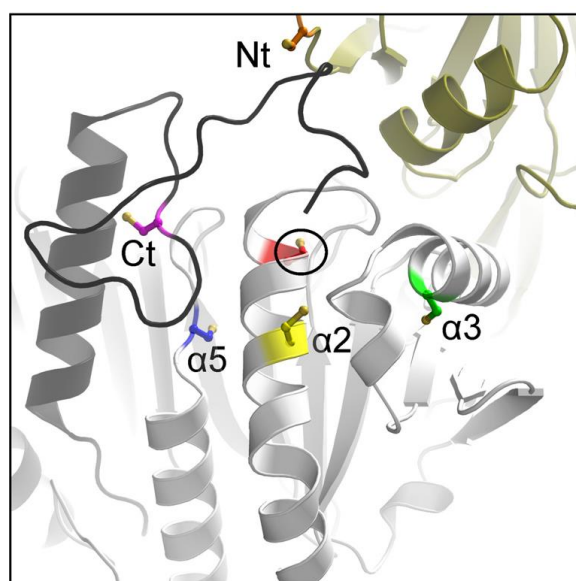


**Figura A10. Estructura del sitio activo de Prxs.** (A) Dos vistas de la tétrada catalítica de Prxs. Las estructuras derivan de la alineación de 1 miembro de cada una de las subfamilias de Prxs: *HsPrx2* (PDB<sub>ID</sub> 1QMV); *XcPrxQ* (PDB<sub>ID</sub> 3GKK), *EcTpx* (PDB<sub>ID</sub> 3HVV), *HsPrx5* (PDB<sub>ID</sub> 1HD2), *PyPrx6* (PDB<sub>ID</sub> 1XCC), *MtAhpE* (PDB<sub>ID</sub> 4X0X). (B) Vista del potencial electrostático generado por los residuos del sitio activo. Las regiones positivas y negativas se representan en escalas azul y roja, respectivamente. Modificada de



(190). *Hs*=*Homo sapiens*, *Xc*= *Xanthomonas campestris*, *Ec*= *Escherichia coli*, *Py*=*Plasmodium yoelli*, *Mt*=*Mycobacterium tuberculosis*.

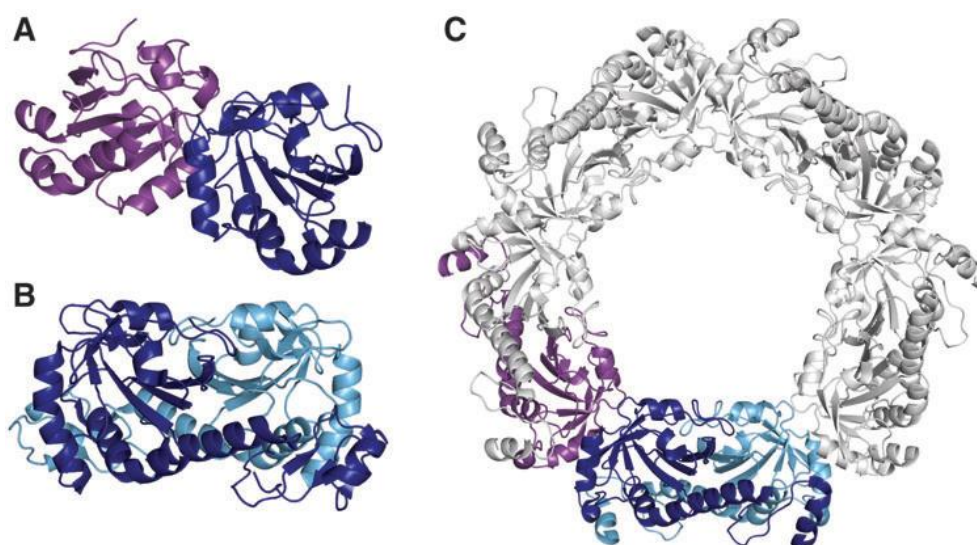
En el año 2011, el grupo de la Dra. Poole realizó un análisis informático tomando en consideración las secuencias y estructuras disponibles hasta ese momento, a partir del cual se identificaron 6 subfamilias de Prxs (196, 197): PrxI/AhpC, PrxVI, PrxV, Tpx, PrxQ/BCP y AhpE. El porcentaje de identidad entre los miembros de cada subfamilia es >30% y entre miembros de otras subfamilias el valor se encuentra en el rango de 15 a 30%. También, las Prxs pueden ser clasificadas según la presencia o ausencia y la localización de un segundo residuo de cisteína que participa en el mecanismo catalítico formando un disulfuro con la  $C_P$ , conocido como cisteína resolutive ( $C_R$ ). Por lo que encontramos: Prxs de 1-cisteína, que no poseen  $C_R$ ; Prxs de 2-cisteínas atípicas en las que la  $C_R$  se encuentra en alguna de 3 posiciones conservadas en la misma subunidad proteica que la  $C_P$  (Figura A11) y Prxs de 2-cisteínas típicas en las que la  $C_R$  se encuentra en una subunidad adyacente (en una de 2 posiciones conservadas, N- o C- terminal, Figura A11) en un oligómero, decámero o dodecámero. Esta clasificación se realiza en base al destino del ácido sulfénico formado en la  $C_P$  ( $C_P$ -SOH) durante la reducción del hidropéroxido y sugiere un posible agente reductor que tiene que interactuar con la enzima oxidada para completar el ciclo catalítico.



**Figura A11. Localización variable de la  $C_R$  en la Prxs en general.** Se muestran varias posiciones en donde se puede encontrar la  $C_P$  (espacios coloreados) en relación a la  $C_P$  del sitio activo (marcada con un

círculo y en rojo). Los disulfuros intramoleculares  $C_P-C_R$  se pueden dar entre la posición  $\alpha_2$  (amarillo),  $\alpha_3$  (verde),  $\alpha_5$  (azul) y los disulfuros intermoleculares en la posición N-terminal (Nt, naranja en la cadena de color dorado) y C-terminal (Ct, magenta en la cadena color negro). Representación tomada de (164).

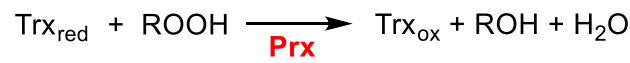
En cuanto a la estructura cuaternaria, las Prxs se presentan como monómeros, dímeros del tipo-A o -B y decámeros o dodecámeros formados por 5 o 6 dímeros del tipo B, respectivamente, que se asocian en anillos por interacciones entre interfaces tipo A (Figura A12). Los dímeros tipo B se asocian por interacción entre los extremos de las hojas- $\beta$  (198), mientras que en los dímeros tipo A (de antiguo o alternativo) se dan asociaciones entre giros al final de la zona C-terminal de las hojas- $\beta$  paralelas (198, 199). En varias Prxs el estado oligomérico está influenciado por diferentes factores como pueden ser el pH, la concentración de la proteína, la fuerza iónica a la cual está expuesta la proteína, modificaciones pos-traduccionales, como la fosforilación, y el estado redox (200).



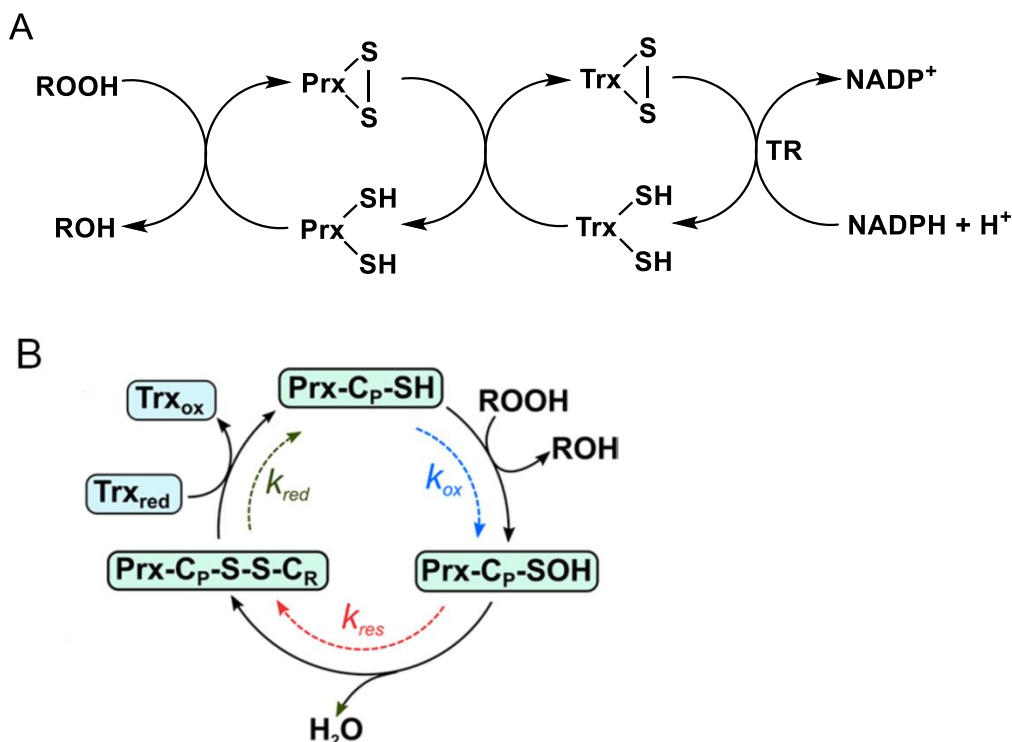
**Figura A12. Estructuras cuaternarias de Prxs.** Para algunos Prxs, la estructura monomérica básica con un plegamiento del tipo Trx puede formar (A) dímeros tipo A (las subunidades se representan en púrpura y azul oscuro), o (B) dímeros de tipo B (azul oscuro y claro). (C) Algunos miembros de la subfamilia PrxI/AhpC y PrxVI forman estructuras decámicas a través de la interacción de cinco dímeros tipo B a través de la asociación de interfaces tipo A. Los colores de las subunidades en los dímeros tipos A y B se utilizan en el decámero para mostrar cómo se genera a partir de estos dos tipos de interacciones. Modificada de (201).

Estas enzimas catalizan reacciones bisustráticas por mecanismos cinéticos de tipo ping-pong (169). Para representarlo, se puede considerar que

la mayoría de las Prxs de 2-cisteínas son reducidas por Trxs, por lo que se puede describir la reacción catalizada por las Prxs de la siguiente manera,



donde la Trx oxidada ( $\text{Trx}_{\text{ox}}$ ) puede ser reducida ( $\text{Trx}_{\text{red}}$ ) por la TR a expensas de NADPH como fuente de electrones Figura A13A. El proceso global que comprende la reacción catalizada por las Prxs involucra 3 pasos en el ciclo catalítico (Figura A13B): 1. la reducción del hidroperóxido con la concomitante formación del  $\text{C}_P\text{-SOH}$ , (Oxidación), 2. la condensación del  $\text{C}_P\text{-SOH}$  con la  $\text{C}_R$  formando un disulfuro (Resolución) y 3. la reducción del disulfuro por la Trx. Hasta el momento hay escasos reportes experimentales sobre la formación de un complejo enzima-sustrato durante el proceso de oxidación (202, 203) y mediante análisis de datos cinéticos en condiciones catalíticas de diferentes Prxs se considera que la formación de un complejo enzima-sustrato, si se produce, es efímero (169, 204).



**Figura A13. Ciclo catalítico de Prxs.** (A) Descripción completa del flujo de electrones durante la reducción de hidroperóxido catalizada por las Prxs. Se representa el sistema Trx/TR/NADPH que es capaz de reducir a las Prxs de 2-cisteínas, aunque no todas las Prx son reducidas por este sistema. (B) Ciclo catalítico: oxidación, la reacción de  $\text{C}_P$  con hidroperóxidos, produciendo el  $\text{C}_P\text{-SOH}$ ; resolución, la formación de disulfuro entre  $\text{C}_P$  y  $\text{C}_R$  (este proceso difiere en las Prxs de 1-cisteína donde no está

presente la C<sub>R</sub>, por lo que se forma un enlace disulfuro mixto); reducción por la Trx completa el ciclo. Figuras modificadas de (190).

Todas la Prxs comparten el primer paso del ciclo catalítico en el cual el tiolato en la C<sub>P</sub> es oxidado a C<sub>P</sub>-SOH, siendo las especies reactivas de esta reacción la forma aniónica de la C<sub>P</sub> y la forma protonada del hidroperóxido. La presencia de la Arg y la Thr/Ser de la tétrada catalítica provoca la formación de una red de interacciones polares que estabilizan el tiolato de la C<sub>P</sub> y disminuyen su pK<sub>a</sub> significativamente (165, 166) en comparación al pK<sub>a</sub> de una Cys proteica usual. Los valores de pK<sub>a</sub> determinados para las C<sub>P</sub> de diferentes Prxs están en el rango de 5 a 6.3 por lo que a pH fisiológico existe más de un 90% de la C<sub>P</sub> como tiolato (205-207). En el capítulo 1, se realizará una descripción de los factores implicados en la aceleración de este paso del ciclo catalítico de las Prxs.

La resolución, como la formación del enlace disulfuro entre la C<sub>P</sub> y la C<sub>R</sub>, es exclusivo de las Prxs de 2-cisteínas. El estado más favorable de las especies reaccionantes es el C<sub>P</sub>-SOH y el C<sub>R</sub>-S<sup>-</sup>, aunque es muy poco probable que coexistan en proporciones importantes debido a que los pK<sub>a</sub>s reportados para C<sub>P</sub>-SOH son más ácidos que para C<sub>R</sub>-SH (208). A su vez, la formación del disulfuro implica además de la reacción, un cambio conformacional. Generalmente, el C<sub>P</sub>-SOH se encuentra por lo menos a 15 Å del C<sub>R</sub>-SH, lo que equivale a una concentración molar efectiva de 0.94 M, asumiendo que cada una se mueve en un radio de 7.5 Å. Si asumimos que la velocidad de condensación es controlada por difusión, se esperaría una constante de velocidad aparente para este proceso  $\geq 10^8 \text{ s}^{-1}$ , considerando la concentración molar efectiva y ausencia de impedimento estérico (208). Las constantes de velocidad de la formación del disulfuro determinadas por nuestro grupo (171, 206) y otros grupos (208-211) muestran valores constante de velocidad del orden de  $10^{-1}$  a  $10^2 \text{ s}^{-1}$ , mucho menores a los esperados. Como la resolución involucra una transición entre dos conformaciones, la totalmente plegada (FF, Fully Folded) y la localmente desplegada (LU, Locally Unfolded), si este cambio conformacional es lento explicaría la lentitud en el paso de resolución. La conformación FF se compone de un sitio activo bien definido (201) como el que se representa en la Figura A10, que no favorece la formación de un disulfuro. Esta conformación debe existir para todos las Prxs tengan una actividad

peroxidasa sustancial, ya que es la que promueve la reacción con el hidroperóxido. Por otro lado, la característica esencial de la conformación LU es que la estructura del sitio activo cambia, lo que favorece la formación de un disulfuro. El único estudio experimental por resonancia magnética nuclear de la cinética de este equilibrio de conformaciones mostró que es un proceso rápido (212). Sin embargo, siempre que el equilibrio entre las conformaciones favorezca a la conformación FF, incluso a una gran velocidad de intercambio entre conformaciones igual se puede explicar la baja constante de velocidad de resolución (208). La constante de velocidad medida sería una constante aparente, producto de la constante de reacción una vez alcanzada la conformación reactiva (FF) por la probabilidad de que la enzima se encuentre en dicha conformación (lo que depende de los equilibrios LU/FF).

El lento paso de resolución es un factor que contribuye a la sensibilidad de las Prxs a ser inactivada por sobreoxidación, es decir, la oxidación del C<sub>P</sub>-SOH a ácido sulfínico por una segunda molécula de hidroperóxido. A través de la determinación de constantes de velocidad de sobreoxidación de Prxs se observó que este proceso es usualmente ~1000 veces más lento que la oxidación (170, 210, 213). La resolución y la sobreoxidación son reacciones que compiten por el C<sub>P</sub>-SOH. Como consideración general, aunque el paso de resolución es lento, dado que la reacción es unimolecular, será favorable ante la mayoría de las reacciones bimoleculares alternativas a menos que sean muy rápidas debido a una alta constante de velocidad y/o elevada concentración de reactivo. Se considera que cuando la C<sub>P</sub> se encuentra como ácido sulfínico, la Prx es irreversiblemente inactiva, aunque se encontró que en eucariotas las Srxs eran capaces de revertir esta modificación volviendo al C<sub>P</sub>-SOH (214, 215). Más recientemente, se reportó que las Srxs pueden también reducir formas oxidadas a sulfínico de otras proteínas, además de Prxs (216).

La reacción de reducción depende del número de cisteínas involucradas en ciclo catalítico. El C<sub>P</sub>-SOH en las Prxs de 1-cisteína puede ser reducido por una amplia variedad de agentes tales como tioles de bajo peso molecular GSH, MSH y H<sub>2</sub>S asistidos o no por enzimas (142, 217-222), ascorbato (223) y Grxs (224). En el caso de la Prxs de 2-cisteínas, hay menos variabilidad en cuanto al agente reductor, ya que por lo general son reducidas por Trxs o proteínas de la superfamilia de las Trxs (225) (como triparredoxinas en tripanosomátidos o

plasmaredoxinas en *Plasmodium*), proteínas que contienen un dominio Trx, como la AhpF en bacterias (226) y NTRC en plantas (227) o miembro de la familia de las proteínas disulfuro isomerasas (PDI, Protein Disulfide Isomerase) en arqueas (228). La reacción consiste en dos intercambios tiol-disulfuro consecutivos. En el primero, la Cys en sentido N-terminal del motivo CXXC de la Trx, ataca el disulfuro de Prx, generando el tiolato de C<sub>P</sub> y un disulfuro mixto entre la Trx y la C<sub>R</sub> de la Prx. El segundo involucra el ataque de la otra Cys en sentido C-terminal del sitio activo Trx en la Cys N-terminal formando un disulfuro intramolecular en la Trx y regenerando a la Prx reducida (166).

#### **A.IV.1. Prxs de *Mtb***

El genoma de *Mtb* codifica para 5 Prxs, y para todas ellas existe evidencia de expresión a nivel proteico (229).

La alquil hidroperóxido reductasa C de *Mtb* (*MtAhpC*, Rv2428) pertenece a la subfamilia Prxl/AhpC (196, 197). En base a estudios de cromatografía de exclusión molecular y cristalografía, se reportó que la forma reducida de la enzima es dodecamérica y la forma oxidada es mayoritariamente un dímero (230). Funciona como una Prx de 2-cisteínas típica y que cataliza la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hidroperóxidos orgánicos y peroxinitrito (205, 231). La *MtAhpC* se reduce por el sistema *MtTrx C/MtTR* a expensas de NADPH (232, 233); también puede ser reducida por una proteína similar a Trx, la alquil hidroperóxido reductasa D (*MtAhpD*), que a su vez es reducida por dihidrolipoamida aciltransferasa (DaIT) y dihidrolipoamida deshidrogenasa (LpD) a expensas de NADH (234, 235). Por lo general, en diferentes bacterias la expresión de AhpC está regulada y asociada a la expresión de otros genes relacionados a su función en lo que se conoce como el sistema Ahp (236). En *Mtb* el sistema Ahp comprende a la AhpD y sus agentes reductores. Cepas de *Mtb* en que los componentes de este sistema están mutados son susceptibles a la eliminación por macrófagos murinos que generan nitrito acidificado y expresan iNOS (235, 237), acentuando la importancia de esta enzima para la desintoxicación de RNI por parte del *Mtb*. Además, la persistencia del Bacillus Calmette-Guérin (BCG) en macrófagos infectados disminuye cuando la AhpD

micobacteriana está inactiva (238). Muestras clínicas de cepas de *Mtb* resistentes a isoniazida frecuentemente compensan la pérdida actividad de la KatG aumentando la expresión de AhpC (239, 240). Las cepas de *Mtb* que carecen de AhpC muestran una mayor susceptibilidad a los hidroperóxidos orgánicos (241) y a peroxinitrito, presentando una disminución de la supervivencia en macrófagos no activados, pero este efecto no se detectó cuando se estimularon con INF- $\gamma$  (242).

La *Mtb* expresa una tiol peroxidasa (Tpx, Rv1932), que pertenece a la subfamilia Tpx de Prxs (232). Tiene un mecanismo de reacción correspondiente a una Prx de 2-cisteínas atípica, aunque se reportó que puede funcionar como una Prx de 1-cisteína (243). Es un dímero en solución y en la forma cristalizada (244, 245). Es más eficiente que la AhpC en cuanto a la reducción de peroxinitrito ( $k = 1.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4 and 25 °C (232) vs  $k = 1.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a pH 6.85 para la *MtAhpC* (205)) y también reduce  $\text{H}_2\text{O}_2$  y a diferentes hidroperóxidos orgánicos usando las *MtTrx* B/C como sustratos reductores (232). Cepas de *Mtb* que carecen de Tpx son hipersensibles a  $\text{H}_2\text{O}_2$  y a  $\cdot\text{NO}$ , siendo rescatadas cuando son complementadas por el gen de la Tpx. Estas cepas mutantes no pueden crecer y sobrevivir en macrófagos murinos activados y muestran una atenuación en modelos de TB desarrollada en ratones (246).

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación reportamos que la alquil hidroperóxido reductasa E (AhpE, Rv2238c) del *Mtb* es capaz de reducir una amplia variedad de sustratos oxidantes, siendo más eficiente en la reducción de hidroperóxidos de ácidos grasos y peroxinitrito (213, 247). Durante la realización de esta Tesis, participé en el trabajo que demostró que la *MtAhpE* oxidada puede ser reducida utilizando MSH/Mrx-1 como sustrato reductor, siendo posteriormente el MSSM reducido por la MR a expensas de NADPH (142). Esto proporcionó una explicación mecanística a la observación de que la capacidad de sintetizar MSH es de importancia en la detoxificación de peróxidos (132), ya que fue el primer reporte de una peroxidasa que utiliza el sistema MSH/Mrx-1/MR como reductor. Como la *MtAhpE* es uno de los objetos de estudio de esta Tesis, en el capítulo 1 se realizará una descripción detallada de dicha enzima.

Por último, el *Mtb* expresa 2 proteínas comigratorias con bacterioferritina, la Bcp (Rv2125) y la BcpB (Rv1608c), las cuales son clasificadas en la subfamilia PrxQ/BCP por estudios de homología de secuencia. Hasta la fecha de la realización de esta Tesis, no había datos ni sobre la estructura ni sobre la funcionalidad de estas Prx. En el transcurso de la misma, otro grupo publicó la estructura cristalográfica de la PrxQ B<sup>b</sup> de *Mtb* en estado reducido (PDB<sub>ID</sub>=5EPF). En el capítulo 3 de esta Tesis describe la caracterización funcional de la PrxQ B.

#### **A.IV.2. Prxs del macrófago y la infección por *Mtb***

Existen seis isoformas diferentes de Prxs en mamíferos (248), las cuales se ubican en diferentes compartimentos celulares, la Prx1 y la Prx2 se localizan principalmente en el citosol, aunque también en el núcleo; la Prx3 es exclusivamente mitocondrial (predominantemente en la matriz pero también en el espacio intermembrana (249)), Prx4 se localiza en el citosol, retículo endoplasmático, lisosoma y es secretada, Prx5 se presenta en citosol, mitocondria, peroxisomas y núcleo, mientras que la Prx6 se localiza en el citosol, en lisosomas y también en secretada.

La interacción entre la Prx1 del macrófago con la infección por *Mtb* es el caso más estudiado, observándose resultados contradictorios. Por un lado, a través de estudios de infección de *Mtb* ratones deficientes en Prx1, se observó que estos eran más susceptibles, sugiriéndose que la Prx1 contribuye a la defensa, ya que regula positivamente la producción de IL-12 al inducir el factor c-Rel (miembro de la familia de factores de transcripción del factor nuclear κB, NF-κB) y activando la vía p38 MAPK y regulando la producción de <sup>•</sup>NO ya que regula la expresión de Arginasa-1 (enzima que utiliza arginina que compite con la iNOS) (250). Por otro lado, se determinó que en macrófagos J774 infectados con *Mtb* o que sobreexpresen el factor de virulencia ESAT-6 del *Mtb* se da un aumento en la expresión de Prx1 mediada por la activación de p38 MAPK. La Prx1 como defensa antioxidante se considera un factor anti-apoptótico considerándose crítica para la infección del *Mtb* (251).

---

<sup>b</sup> Para clarificar, utilizaremos el término PrxQ en lugar del término menos informativo Bcp para nombrar a los miembros de la subfamilia PrxQ/Bcp como se recomendó en (404) *MtPrxQ A* y *MtPrxQ B* se han denominado anteriormente *MtBcp* y *MtBcp B*, respectivamente.



Alternativamente, la expresión de varias proteínas cambia en macrófagos infectados por cepas patogénicas y no patogénicas avirulentas de *Mtb*, destacándose que la expresión de Prx3 disminuye en forma significativa durante la infección por cepas patogénicas a diferencia de la causada por cepas no-patogénicas, por un mecanismo que no ha sido aclarado (252). Además, el peroxinitrito es un potente agente oxidante y capaz de nitrar residuos de Tyr proteicos y como modificaciones nitro-oxidativas proteicas podrían estar asociadas con incrementos en la velocidad de degradación (253, 254), en el capítulo 4 de esta Tesis abordamos el estudio de las posibles modificaciones nitro-oxidativas de *HsPrx3* recombinante y en mitocondrias aisladas.

## B. Objetivos

**Objetivo General:** Contribuir a la comprensión de los sistemas antioxidantes que permiten la detoxificación de hidroperóxidos citotóxicos en *Mycobacterium tuberculosis* y en sus células huéspedes.

**Objetivos particulares:**

- 1) Determinar las bases moleculares de la especificidad por sustrato oxidante de la *MtAhpE*.
- 2) Determinar la participación del sulfuro de hidrógeno en el ciclo catalítico de la *MtAhpE*.
- 3) Caracterizar funcionalmente a la *MtPrxQ* B.
- 4) Estudiar las modificaciones nitro-oxidativas de la Prx3 humana.

Uno de los objetivos específicos de la Tesis planteados en el proyecto original, fue demostrar el rol de la *AhpE* en la detoxificación de hidroperóxidos *in vivo*, utilizando cepas no patogénicas (*Mycobacterium smegmatis*) carentes de *AhpE* (MSMEG\_4320). Estas cepas se generarían en colaboración con la Dra. Fabiana Bigi, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires, Argentina. Lamentablemente, después de varios intentos no se pudieron obtener cepas carentes de *AhpE* viables. En cambio, si bien la participación del sulfuro de hidrógeno en el ciclo catalítico de la *MtAhpE* y la formación de un persulfuro como intermediario no había sido planteada en el proyecto original, surgió la necesidad de estudiarlo durante el transcurso de esta Tesis. Por lo que este nuevo objetivo derivó en un proyecto de iniciación en la investigación financiado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), que realizamos en colaboración con el Dr. Ernesto Cuevasanta y la Dra. Beatriz Álvarez (Facultad de Ciencia, Universidad de la República, Uruguay).

Lista de Artículos publicados en los cuales participé durante la realización del posgrado:

- Referidos al Capítulo de “Bases Moleculares de la Especificidad por Hidroperóxidos en Prxs, el Caso de la *MtAhpE*”

Zeida, A., Reyes, A.M., Lebrero, M.C., Radi, R., Trujillo, M. and Estrin, D.A., 2014. The extraordinary catalytic ability of peroxiredoxins: a combined experimental and QM/MM study on the fast thiol oxidation step. *Chemical communications*, 50(70), pp.10070-10073.

Zeida, A., Reyes, A.M., Lichtig, P., Hugo, M., Vazquez, D.S., Santos, J., González Flecha, F.L., Radi, R., Estrin, D.A. and Trujillo, M., 2015. Molecular basis of hydroperoxide specificity in peroxiredoxins: the case of AhpE from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, 54(49), pp.7237-7247.

- Referidos al Capítulo “Cinética de la Formación y la Reactividad del Persulfuro de la *MtAhpE*”

Cuevasanta, E., Reyes, A.M., Zeida, A., Mastrogiovanni, M., De Armas, M.I., Radi, R., Alvarez, B. and Trujillo, M., 2019. Kinetics of formation and reactivity of the persulfide in the one-cysteine peroxiredoxin from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 294(37), pp.13593-13605.

- Referidos al Capítulo “La *MtPrxQ B* es una Reductasa, Dependiente de Trx, Altamente Eficiente por AG-OOH”

Reyes, A.M., Vazquez, D.S., Zeida, A., Hugo, M., Piñeyro, M.D., De Armas, M.I., Estrin, D., Radi, R., Santos, J. and Trujillo, M., 2016. PrxQ B from *Mycobacterium tuberculosis* is a monomeric, thioredoxin-dependent and highly efficient fatty acid hydroperoxide reductase. *Free Radical Biology and Medicine*, 101, pp.249-260.

- Referidos al Capítulo “Estudios de las Modificaciones Nitro-oxidativas de la *HsPrx3*”

De Armas, M.I., Esteves, R., Viera, N., Reyes, A.M., Mastrogiovanni, M., Alegria, T.G., Netto, L.E., Tórtora, V., Radi, R. and Trujillo, M., 2019. Rapid peroxynitrite reduction by human peroxiredoxin 3: Implications for the fate of oxidants in mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*, 130, pp.369-378.

- Otros Artículos:

Crawford, M.A., Tapscott, T., Fitzsimmons, L.F., Liu, L., Reyes, A.M., Libby, S.J., Trujillo, M., Fang, F.C., Radi, R. and Vázquez-Torres, A., 2016. Redox-active sensing by bacterial DksA transcription factors is determined by cysteine and zinc content. *MBio*, 7(2), pp.e02161-15.

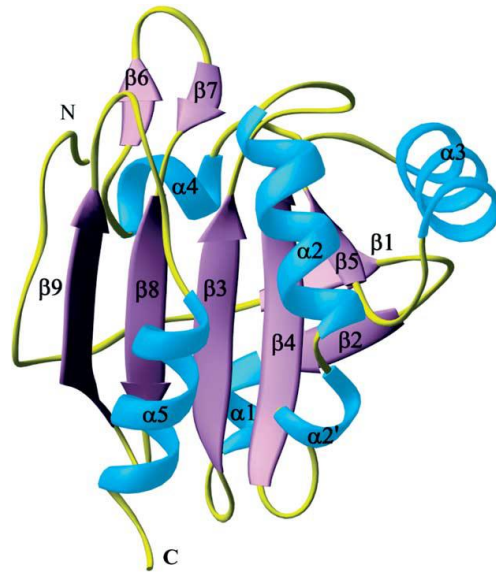
Reyes, A.M., Pedre, B., De Armas, M.I., Tossounian, M.A., Radi, R., Messens, J. and Trujillo, M., 2018. Chemistry and redox biology of mycothiol. *Antioxidants & redox signaling*, 28(6), pp.487-504.

# C. Bases Moleculares de la Especificidad por Hidroperóxidos en Prxs, el Caso de la *MtAhpE*

## C.I. INTRODUCCIÓN

La AhpE de *Mtb* es el miembro más caracterizado de la subfamilia AhpE de Prxs, que son expresados en bacterias Gram positivas del orden Actinomycetos (196, 197). Esta enzima se identificó por espectrometría de masa en el filtrado del cultivo y en el lisado celular y no así en la fracción de proteínas de membrana del *Mtb* H37Rv, mostrando que se localiza en el citosol y además puede secretarse (255). Adicionalmente, se demostró que la expresión de *MtAhpE*, en condiciones *in vitro* donde el bacilo es expuesto a un ambiente ácido y en un modelo de infección de macrófago, se encuentra regulada por genes del locus *aprABC* (Acid and Phagosome Regulated) involucrados en la adaptación del patógeno al fagosoma luego de la fagocitosis (256). Recientemente, un análisis del perfil transcripcional del *Mtb* en un modelo *in vitro* de TB intraocular, mostró que uno de los genes que estaba regulado a la alta correspondía la *MtAhpE* (257). Finalmente, se observó que, en cepas de BCG que fueron alternadas de un cultivo *in vitro* en condiciones aeróbicas a anaeróbicas, la expresión de AhpE disminuía (258). Existen estudios en la literatura que reflejan el rol en la defensa antioxidante de la *MtAhpE*. Por ejemplo, Voskuil y colaboradores analizaron la respuesta transcripcional de cultivos de *Mtb* aisladas del esputo de pacientes exponiéndolas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y a un dador de <sup>•</sup>NO, DETA/NO (aducto de dietilentriamina/óxido nítrico) o espermidina NONOato y comparándolo con la condición sin exposición (259). Ellos encontraron que los genes que codifican varias proteínas antioxidantes y particularmente el gen de la *MtAhpE*, tenían un nivel de expresión alto en la condición del cultivo sin tratar y que no había una mayor inducción ante al tratamiento con oxidantes, probablemente, debido a la ya alta tasa de transcripción de dicho gen en el patógeno aislado de muestras biológicas (259).

Por estudios de homología de la secuencia aminocídica, los miembros de la subfamilia AhpE podrían comportarse como Prxs de 1-cisteína (ya que no presentan la  $C_R$ ) o de 2-cisteínas, encontrándose la  $C_R$  en la hélice- $\alpha_5$  (164). Además, comparten un 30% y 25% de identidad de secuencia con la subfamilias Prx1 y PrxQ/BCP, respectivamente (201). Para el caso de la *MtAhpE*, su secuencia es más similar a las Prxs de 2-cisteínas típicas que a las Prxs de 1-cisteína de mamífero (197, 260), que pertenecen a otra subfamilia (Prx6). La estructura cristalográfica para el monómero de la *MtAhpE* fue definida por primera vez por Li y colaboradores (261), describiendo un estructura globular, compacta con un clásico domino Trx definido por un arreglo central de hojas- $\beta$  antiparalelas ( $\beta_4$ - $\beta_3$ - $\beta_8$ - $\beta_9$ ) la cuales se encuentran rodeadas por hélices- $\alpha$  ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ) como se muestra en la Figura C1, siendo destacable de esta estructura el extremo N-terminal extendido antiparalelo a la hoja- $\beta_9$ . La  $C_P$  es la Cys45 (única en la secuencia) del sitio activo que se encuentra en la hélice- $\alpha_2$ . Más adelante se realizará una descripción detallada del sitio activo de esta Prx. Las estructuras depositadas en el PDB por Li y colaboradores, corresponden el estado reducido (PDB<sub>ID</sub>= 1XXU) y oxidado (PDB<sub>ID</sub>= 1XVW) de la *MtAhpE* y nosotros las utilizamos en trabajos científicos que involucraron simulaciones computacionales para determinar las bases moleculares de la reactividad de esta enzima con diferentes sustratos oxidantes (262, 263) (incluyendo este objetivo de la Tesis). Si bien después de la publicación de estos resultados, se publicó un nuevo refinamiento de las estructuras previamente reportadas depositadas como PDB<sub>ID</sub>= 4XOX y 4X1U (264), simulaciones computacionales llevadas a cabo por el Dr. Ari Zeida (de Facultad de Medicina y CEINBIO, Universidad de la República, Uruguay) mostraron que las estructuras revisadas eran muy similares a las originales.

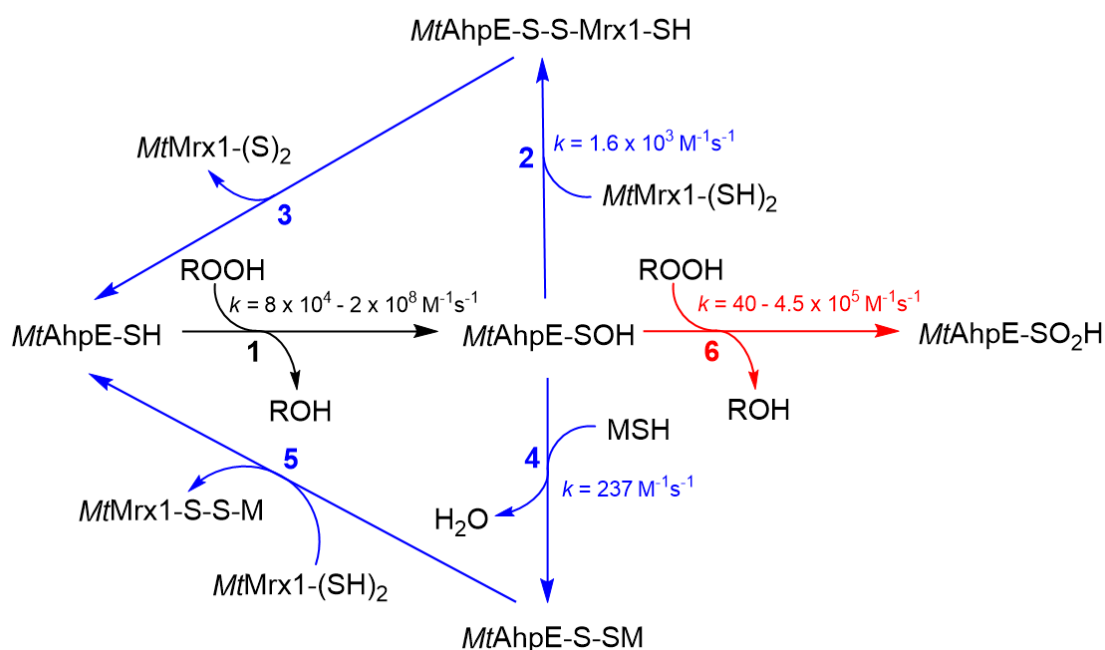


**Figura C1. Estructura cristalográfica del monómero de la *MtAhpE* derivada del PDB<sub>ID</sub>= 1XXU.** Los elementos de la estructura secundaria están etiquetados y se indican los extremos C- y N-terminal como C y N, respectivamente. Imagen tomada de (261).

En base al análisis del empaquetamiento de las moléculas en el cristal y por estudios de cromatografía de exclusión molecular de la *MtAhpE*, Li determinó que la *MtAhpE* se presentaba como dímero de tipo-A y octámero en solución. Más tarde, nosotros demostramos que la estructura cuaternaria de la *MtAhpE* en solución estaba influenciada por el estado de oxidación de la C<sub>P</sub>, siendo la enzima reducida un dímero no covalente y que al oxidarse con concentraciones equimolares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es inicialmente dimérica (por minutos) y forma lentamente especies de mayor peso molecular (247). Este efecto fue reversible ante al agregado del agente reductor, 1,4-ditiotreitol (DTT) (247). Estos resultados fueron reproducidos por otros autores utilizando diferentes técnicas de biofísica de proteínas como dispersión dinámica de luz (DLS, Dynamic Light Scattering) y dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS, Small Angle X-ray Scattering) (222).

El ciclo catalítico de la *MtAhpE* fue descrito por nosotros (142, 213, 247) siendo específico para esta Prx, ya que no existen generalidades en cuanto al paso de reducción para Prxs de 1-cisteína (265). El ciclo se muestra en la Figura C2, en donde se puede observar la oxidación de la C<sub>P</sub> de la enzima (*MtAhpE*-SH) a ácido sulfénico (*MtAhpE*-SOH) por diferentes hidroperóxidos y peroxinitrito. Esta forma modificada de la enzima es reducida

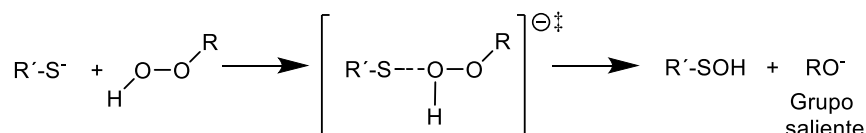
directamente por la *MtMrx1* mediante un mecanismo ditiólico de intercambio tiol-disulfuro (142). Alternativamente, el *MtAhpE*-SOH puede formar un disulfuro mixto con el MSH y este disulfuro ser resuelto por *MtMrx1* constituyendo un mecanismo monotiólico de intercambio tiol-disulfuro (142). Como se verá en el capítulo que sigue, el sulfuro de hidrógeno puede actuar como sustrato reductor alternativo (221). Además, describimos un mecanismo de inactivación de esta enzima por sobreoxidación de la  $C_P$  a ácido sulfínico (*MtAhpE*-SO<sub>2</sub>H) que ocurre por la reacción de la *MtAhpE*-SOH con una segunda molécula de hidroperóxido en presencia de un exceso de dicho sustrato, los valores de constantes para estas reacciones se muestran en la Tabla C1 (213, 247). Como ya mencionamos, la inactivación por sobreoxidación en Prxs de mamíferos puede ser revertida por *Srxs* (266), sin embargo, estas enzimas solo se han encontrado en eucariotas y cianobacterias (267).



**Figura C2. Mecanismo propuesto del ciclo catalítico de la *MtAhpE*.** La *MtAhpE* es oxidada por hidroperóxidos (ROOH) a *MtAhpE*-SOH (1, en negro). Este se reduce directamente por *MtMrx1* (2 y 3, en azul), o mediante una formación de un disulfuro mixto con MSH (4 en azul), seguido de reducción por *MtMrx1* (5 en azul). Los productos secundarios de la reducción del *MtAhpE*-SOH (los disulfuro *MtMrx1*-(S<sub>2</sub>) y *MtMrx1*-SS-M) se reducen por una segunda molécula de MSH, formando MSSM y *MtMrx1* reducida. El MSSM se reduce en MR. Ambas vías reductoras pueden competir con la sobreoxidación a *MtAhpE*-SO<sub>2</sub>H (6 en rojo). Modificado de (142).

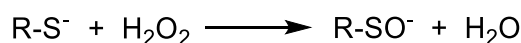


El primer paso del ciclo catalítico de la *MtAhpE* corresponde a la oxidación del tiolato de la  $C_P$  por el hidroperóxido mediante un mecanismo de sustitución nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ). Generalmente, este mecanismo implica el ataque nucleofílico del tiolato sobre uno de los átomos del oxígeno del grupo peróxido y se alcanza un estado de transición con una carga negativa parcial distribuida entre los átomos de azufre y los dos oxígenos, como se muestra en el esquema a continuación,



para completar la reacción el enlace peróxido debe romperse para liberar el grupo saliente (el alcohol, formado como producto de reducción del hidroperóxido) dejando al tiolato oxidado a ácido sulfénico ( $R'-SOH$ ).

La oxidación de tioles de bajo peso molecular por oxidantes, como el  $H_2O_2$  y el peroxinitrito ocurre por un mecanismo similar,  $S_N2$ , en el que las especies reaccionantes son el tiolato y los hidroperóxidos protonados (34, 65). Estudios de simulaciones computacionales híbridas mecánica cuántica/mecánica clásica (QM/MM, Quantum Mechanics/ Molecular Mechanics) de esta reacción, utilizando  $H_2O_2$  como oxidante, indicaron que el mecanismo  $S_N2$  de la reacción es modificado por la transferencia de un protones de uno de los átomos de oxígeno al otro para que el agua y el sulfenato ( $R-SO^-$ ) sean productos directos de la reacción, como se muestra a continuación,



Sin embargo, esta transferencia ocurre después de la formación del estado de transición de la reacción y, por lo tanto, carece de consecuencias cinéticas significativas (268-271). En esta reacción, el solvente juega un papel clave en el posicionamiento de los reactivos y ayuda a la redistribución de carga que tiene lugar en las primeras etapas de la reacción.

Debido a que los tiolatos y los hidroperóxidos protonados son las especies reaccionantes, las constantes de velocidad aparente de las reacciones se ven afectadas por el pH de acuerdo a,

$$k_{ap} = k_{pH-ind} \times \frac{K_a^{RSH}}{K_a^{RSH} + [H^+]} \times \frac{[H^+]}{K_a^{ROOH} + [H^+]}$$

donde  $k_{ap}$  es la constante aparente de la reacción determinada a cierto pH,  $k_{pH-ind}$  es la constante de velocidad independiente del pH y  $K_a^{RSH}$  y  $K_a^{ROOH}$  son las constante de ionización del tiol y del hidroperóxido, respectivamente. Por lo que, los términos  $\frac{K_a^{RSH}}{K_a^{RSH} + [H^+]}$  y  $\frac{[H^+]}{K_a^{ROOH} + [H^]}$  indican la disponibilidad de tiolato y de hidroperóxido protonados, a cierto pH. Por ejemplo, como el  $pK_a$  del  $H_2O_2$  es 11.6, más del 99.9% está protonado a pH fisiológico; en el caso del peroxinitrito ( $pK_a= 6.8$  (58)) existe una fracción cercana al 20% protonado a pH 7.4. A su vez, ya que los valores  $pK_a$  de los tioles suelen ser relativamente cercanos al pH fisiológico, la fracción de tiolato a un pH dado también afecta la constante de velocidad aparente. Las  $k_{pH-ind}$  reportadas para la oxidación de tioles de bajo peso molecular por  $H_2O_2$  y por peroxinitrito, varían en un rango de  $10^1$  a  $10^2$   $M^{-1}s^{-1}$  y en un rango de  $10^4$  a  $10^6$   $M^{-1}s^{-1}$ , respectivamente (190).

Los valores de las constantes de velocidad determinados para el paso de oxidación del ciclo catalítico de las Prxs son mayores en comparación a los tioles de bajo peso molecular, y en varios casos se aproximan al límite de difusión. Por ejemplo, la constante de velocidad de segundo orden para la oxidación de la  $C_P$  por  $H_2O_2$  y por peroxinitrito es hasta  $10^7$  y  $10^4$  veces mayor, respectivamente, en comparación a la oxidación de la cisteína libre en solución acuosa (190). Los factores implicados en la aceleración de esta reacción catalizada por las Prxs, en general, han sido abordados por nosotros y otros investigadores, utilizando diferentes estrategias experimentales que incluyen cristalografía, simulaciones computacionales y datos cinéticos. Estos estudios mostraron que los residuos de la tétrada catalítica estabilizan el tiolato en la  $C_P$  (como ejemplo, el  $pK_a$  de la  $C_P$  de la *MtAhpE* es 5.2 (247)) de manera que el grupo de alcohol de Thr/Ser forma un enlace de hidrógeno con el tiolato y el grupo guanidinio de la Arg actúa como un donador de hidrógeno para formar otro enlace de hidrógeno con el tiolato y mantener así, la arquitectura del sitio

activo (192-194, 203, 272-274). La presencia de estos grupos cerca del tiolato de la  $C_P$  promueve un entorno de parcialmente positivo adyacente a la  $C_P$ , que asiste a la unión efectiva de los átomos de oxígeno parcialmente negativos de la molécula del hidropéroxido (193, 194, 262, 272, 274). Simulaciones computacionales mostraron que una vez que el hidropéroxido ingresa al sitio activo, la reacción ocurre de acuerdo a un mecanismo  $S_N2$ ; el estado de transición es lineal con un ángulo (S-O-O) de  $180^\circ$ , el enlace de peróxido O-O se alarga hasta romperse y se va formando el nuevo enlace S-O (194, 262). El proceso es favorecido por las interacciones entre el hidropéroxido y los residuos del sitio activo, ya que la red enlaces de hidrógeno en el tiolato de la  $C_P$  se interrumpe por la entrada del hidropéroxido, lo que resulta en una desestabilización del tiolato aumentando su nucleofilicidad antes de la formación del estado de transición (194, 262). También, se observó la transferencia de un protón desde el átomo de oxígeno que sufre el ataque del tiolato al oxígeno del grupo saliente, en forma similar a lo observado para tioles de bajo peso molecular, probablemente asistido por el grupo amida del residuo de la  $C_P$  o por el grupo guanidinio de la Arg (194, 262). Luego la reacción continúa hacia la formación del  $R-SO^-$  en la  $C_P$ .

Otro aspecto interesante a evaluar es la especificidad de las Prxs por los hidropéroxidos. Como la oxidación de los tiolatos transcurre mediante un mecanismo  $S_N2$ , se espera que la reacción sea más rápida para aquellos hidropéroxidos con mejores grupos salientes, es decir, aquellos con grupos salientes más ácido (165, 275). De hecho, esta tendencia ocurre para la oxidación del GSH y del único tiol libre de la albúmina sérica bovina por diferentes hidropéroxidos (276, 277). Sin embargo, el microambiente al que está expuesto un residuo de cisteína en la proteína puede afectar notablemente su reactividad (165, 186, 278). En el caso de las  $C_P$  de las Prxs, los sustratos oxidantes preferidos varían y no siguen la tendencia mencionada anteriormente (206). En el caso de la *MtAhpE*, realizamos previamente un estudio de especificidad por sustrato oxidante por el cual determinamos constantes de velocidad de oxidación de su  $C_P$  por diferentes hidropéroxidos, mostradas en la Tabla C1 (213, 247).

**Tabla C1. Cinética de la oxidación y sobreoxidación de la *MtAhpE* por varios hidroperóxidos.**

ROOH	pK <sub>a</sub>	pK <sub>a</sub> grupo saliente	k <sub>ox</sub> pH 7.4 (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	k <sub>ox</sub> pH-ind (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	k <sub>sobreox</sub> pH 7.4 (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	k <sub>sobreox</sub> pH ind (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Ref.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	11.7	15.7	8.2 × 10 <sup>4</sup>	8.2 × 10 <sup>4</sup>	40	46	(247)
ONOOH	6.8	3.15	1.9 × 10 <sup>7</sup>	9.5 × 10 <sup>7</sup>	ND	ND	(247)
<i>t</i> -bOOH	12.8	18	8.0 × 10 <sup>3</sup>	8.0 × 10 <sup>3</sup>	12	14	(213)
Cu-OOH	12.6	14.5	4.0 × 10 <sup>4</sup>	4.0 × 10 <sup>4</sup>	60	70	(213)
3-CPBA	7.57	3.82	2.4 × 10 <sup>7</sup>	3.9 × 10 <sup>7</sup>	1.96 × 10 <sup>5</sup>	3.8 × 10 <sup>5</sup>	(213)
HCO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	> 9	10.3	1.1 × 10 <sup>6</sup>	1.1 × 10 <sup>6</sup>	2.5 × 10 <sup>3</sup>	2.8 × 10 <sup>3</sup>	(213)
15-HpETE	>10 <sup>A</sup>	> 10 <sup>A</sup>	1.8 × 10 <sup>B</sup>	1.8 × 10 <sup>B</sup>	4.5 × 10 <sup>5</sup>	4.5 × 10 <sup>5</sup>	(213)
Hidroperóxidos de ácido α-linolénico <sup>B</sup>	>10 <sup>A</sup>	> 10 <sup>A</sup>	2.7 × 10 <sup>B</sup>	2.7 × 10 <sup>B</sup>	3.7 × 10 <sup>5</sup>	4.0 × 10 <sup>5</sup>	(213)

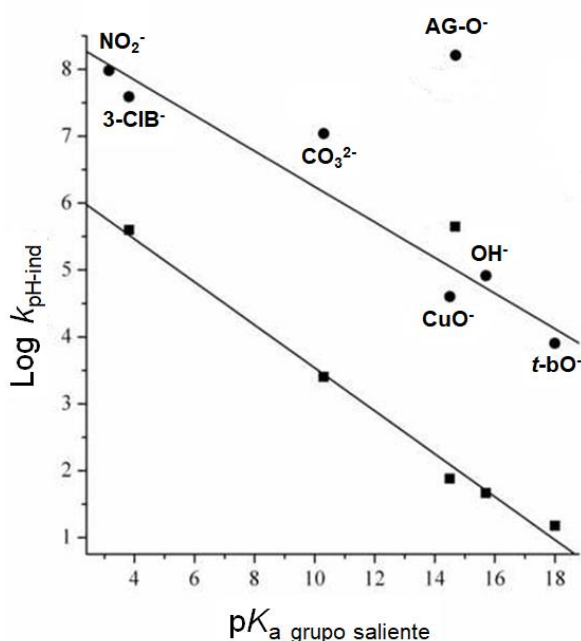
El pK<sub>a</sub> indica el valor pK<sub>a</sub> del peróxido (ROOH). El pK<sub>a</sub> grupo saliente corresponde al pK<sub>a</sub> del ácido conjugado del grupo saliente (ROH) para cada hidroperóxido. Las k<sub>ox</sub> y k<sub>sobreox</sub> pH 7.4 son las constantes de velocidad de oxidación y sobreoxidación de la *MtAhpE* a pH 7.4 y 25 °C, respectivamente; k<sub>ox</sub> y k<sub>sobreox</sub> pH-ind son las constantes de oxidación y sobreoxidación de la *MtAhpE* independiente del pH a 25 °C, respectivamente. ONOOH, ácido peroxinitroso; *t*-bOOH, hidroperóxido de *tert*-butilo; Cu-OOH, hidroperóxido de cumeno; 3-CPBA, ácido 3-cloroperoxibenzoico; HCO<sub>4</sub><sup>-</sup>, peroximonocarbonato; 15-HpETE, 15S-hidroperóxido-5Z,8Z,11Z,13E eicosatetraenoico.

<sup>A</sup> Aunque los valores de pK<sub>a</sub> para el grupo hidroperóxido del 15-HpETE o el grupo de alcohol en 15-HETE no se han determinado, deben ser similares a los de otros grupos alquilo hidroperóxidos y alcoholes, respectivamente, y por lo tanto se puede suponer que es >10.

<sup>B</sup> Mezcla de hidroperóxidos producto de la reacción catalizada por la lipooxigenasa.

Se destaca que para la mayoría de los hidroperóxidos la oxidación de C<sub>P</sub> en *MtAhpE* muestra la tendencia esperada con el pK<sub>a</sub> del grupo saliente, reaccionando más rápidamente con aquellos hidroperóxidos cuyos productos de reducción tienen pK<sub>a</sub> menores, como se muestra en el gráfico de Brønsted, Figura C3. En el caso del ácido 15S-hidroperóxido-5Z,8Z,11Z,13E eicosatetraenoico (15-HpETE), las constantes de velocidad de oxidación y la sobreoxidación de la *MtAhpE* (Tabla C1) fueron mucho más altas de lo esperado (Figura C3). Aunque el pK<sub>a</sub> del 15-HETE (ácido 15S-hidroxi-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoico, el producto de la reducción del 15-HpETE) no se ha reportado, debe estar en el rango de otros alcoholes alifáticos y similares a los de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *t*-bOOH y Cu-OOH (es decir, >10). Desviaciones esperadas en el gráfico de Brønsted son frecuentes en las reacciones de reducción de hidroperóxidos mediadas por Prxs. Por ejemplo, miembros de la subfamilia AhpC/Prxl (o Prxs de 2-cisteínas típicas) generalmente reaccionan extremadamente rápido con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con constantes de velocidad en el orden de

$10^7$ - $10^8$   $M^{-1}s^{-1}$ , siendo esta reacción más rápida que con peroxinitrito ( $k = 10^6$ - $10^7$   $M^{-1}s^{-1}$ ) (207, 279).



**Figura C3. Gráfico de Brønsted de la oxidación y sobreoxidación de la *MtAhpE* por varios peróxidos.** Se muestra la dependencia del logaritmo de la  $k_{ox}$   $pH-ind$  (círculos) y la  $k_{sobreo}$   $pH-ind$  (cuadrados) vs los valores de  $pK_a$  de los grupos salientes ( $pK_a$  grupo saliente). Los peróxidos utilizados fueron peroxinitrito ( $NO_2^-$ , como grupo saliente), ácido 3-cloroperoxibenzoico, 3-CPBA (3-clorobenzoato, 3-CIB<sup>-</sup> como grupo saliente), peroximonocarbonato,  $HCO_4^-$  ( $CO_3^{2-}$ , como grupo saliente), hidroperóxido de cumeno, Cu-OOH ( $Cu-O^-$ , como grupo saliente), 15-HpETE (15-HETE o AG-O<sup>-</sup>, como grupo saliente),  $H_2O_2$  ( $OH^-$ , como grupo saliente),  $t$ -bOOH ( $t$ -bO<sup>-</sup>, como grupo saliente).

La alta reactividad de la *MtAhpE* con hidroperóxidos derivados de ácidos grasos (AG-OOH) nos llamó la atención. Si bien en nuestro trabajo previo (213) discutimos los resultados indicando la existencia de un surco hidrofóbico en la superficie de la enzima que podría contribuir al posicionamiento correcto del sustrato en el complejo de reactivos, las bases moleculares de esta especificidad no se establecieron. Así que mediante en la colaboración con el Dr. Ari Zeida (en ese momento trabajando en el grupo dirigido por el Dr. Darío Estrin, Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química-Física and INQUIMAE-CONICET de la Universidad de Buenos Aires, Argentina) abordamos esta cuestión desde el punto de vista experimental y computacional, siendo los resultados publicados en el año 2015 en la revista "Biochemistry" (263) de la cual compartimos la primera autoría. En dicho trabajo, la mayor parte de las determinaciones experimentales fueron

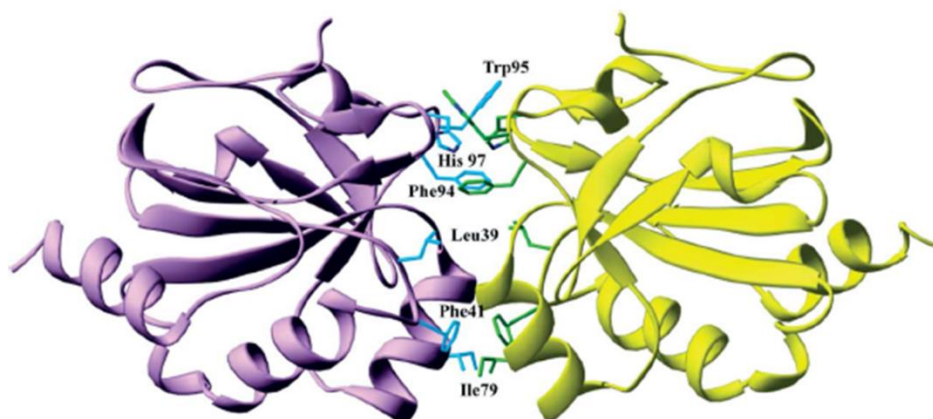
realizadas por mí, y las computacionales por Ari Zeida, si bien ambos estuvimos involucrados en la planificación y en la discusión de todos los resultados.

## C.II. MATERIALES Y MÉTODOS

**Químicos.** El 1-anilino-8 naftaleno sulfonato (ANS) fue obtenido de Molecular Probes. El 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB), el DTT y el pentaacetato de dietilentriamina (DTPA) fueron comprados de Sigma–Aldrich. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue obtenido de Mallinckrodt Chemicals. Los AG-OOH, el ácido 12S-hidroperóxido-5Z,8Z,10E,14Z eicosatetraenoico (12-HpETE, pureza ≥96%) y el 4-hidroperóxido-2E-nonenal (4-HpNE, pureza ≥95%), el 4-hidroxi-2E-nonenal (4-HNE, pureza ≥98%) fueron obtenidos de químicos Cayman.

**Expresión y purificación de la proteína.** La *MtAhpE* fue expresada en la cepa *Escherichia coli* BL21(DE3) (en el vector de expresión pDEST17) como una proteína acoplada a cola de 6 residuos de His y purificada por cromatografía de afinidad utilizando una columna cargada con Niquel (HiTrap Chelating® GE Healthcare) como se describió previamente en (261). La concentración por subunidad de la proteína fue determinada espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 280 nm ( $\epsilon_{280} = 23,950 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), valor calculado de acuerdo a la secuencia de aminoácidos del monómero utilizando la herramienta ProtParam del servidor ExPASy, (<http://web.expasy.org/protparam/>) (280). En colaboración con la Dra. M. Dolores Piñeyro del Instituto Pasteur de Montevideo, se generaron versiones por mutagénesis sitio dirigida de la *MtAhpE* en las cuales los residuos de Phe41 o Phe97, que están presentes en la interface dimérica de la proteína (Figura C4), fueron reemplazados individualmente por Ser o Glu, respectivamente. La generación de estas mutantes radica en que las interacciones hidrofóbicas que forman estos residuos de Phe estabilizan la estructura dimérica de la enzima (261) y nuestro objetivo al cambiar estos residuos es debilitar el dímero esperando que tenga un efecto en la reactividad de la enzima contra los AG-OOH, ya que partimos de la hipótesis de que la existencia de un surco hidrofóbico que involucra a la interfase dimérica, podría contribuir al posicionamiento correcto del sustrato en el complejo de reactivos

(213). La expresión y purificación de estas proteínas fue realizada como se describió previamente para la *MtAhpE* tipo salvaje.



**Figura C4. Representación de la interfase dimérica de la *MtAhpE*.** Esta se caracteriza por interacciones principalmente hidrófobas entre los aminoácidos etiquetados. Los principales contribuyentes a la interfaz son las dos hélices- $\alpha_3$  y las dos giros  $\beta_6$ - $\beta_7$ . Cada monómero se muestra en diferentes color.

**Reducción del tiol proteico y cuantificación.** La *MtAhpE* fue reducida mediante preincubación con DTT (2 mM) durante 30 minutos a 4 °C inmediatamente antes de los ensayos. El exceso del agente reductor fue removido por gel filtración usando una columna de desalado HiTrap (Amersham Bioscience) detectando a la proteína por absorbancia a 280 nm. La medida del contenido de tiol de la proteína se llevó a cabo utilizando DTNB midiendo absorbancia a 412 nm ( $\epsilon_{412} = 14,150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , (281)). De acuerdo a lo esperado para la enzima reducida (*MtAhpE*-SH), se midió una concentración que corresponde a un tiol por subunidad proteica.

**Determinaciones cinéticas de la oxidación de la *MtAhpE* y la *MtAhpE* F41S.** Las constantes de velocidad de oxidación de la *MtAhpE* por 4-HpNE y 12-HpETE se determinaron siguiendo la disminución de la intensidad de fluorescencia intrínseca de la proteína ( $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$ , emisión de fluorescencia total) que se produce durante la oxidación de la *MtAhpE*, como fuera reportado previamente en nuestro laboratorio (213, 247). La *MtAhpE* reducida (0.1  $\mu\text{M}$ ) se mezcló rápidamente con concentraciones de hidroperóxido en exceso en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) más DTPA (0.1 mM), pH 7.4 y 25 °C, utilizando un fluorímetro de flujo detenido SX20 Applied. Estos sustratos oxidantes reaccionaron con la enzima con constantes de velocidad de reacción

extremadamente altas (ver resultados). Debido a ello, aun trabajando a las menores concentraciones de enzima que permitieron obtener señales de cambio de fluorescencia de suficiente amplitud (0.1  $\mu\text{M}$ ), las concentraciones de sustrato oxidante en exceso no siempre siguieron condiciones de pseudoprimer orden estrictas, si bien siempre fueron de al menos 5 veces mayores que la concentración de enzima. Concentraciones mayores hacen que la reacción ocurra mayoritariamente en el tiempo de mezcla del aparato, por lo que no puede seguirse. A partir del ajuste de los datos experimentales a un decaimiento exponencial se obtuvieron los valores de constantes de velocidad observadas ( $k_{\text{obs}}$ ). Estas constantes se graficaron en función de la concentración de hidroperóxido en exceso y de la pendiente del ajuste lineal se obtuvo la constante de velocidad de segundo orden para la reacción de oxidación. Como el 4-HpNE es un aldehído que podría reaccionar como un electrófilo con cisteína u otros residuos nucleofílicos en proteínas (282), se realizaron controles evaluando la reacción entre *MtAhpE* con 4-HNE.

La constante de velocidad para la oxidación de la *MtAhpE* F41S por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se determinó como se describe arriba y como se determinó para la reacción de la *MtAhpE* previamente (247).

Con el objetivo de determinar los parámetros termodinámicos de activación de la oxidación de la *MtAhpE* por el 12-HpETE, se repitió el experimento descrito arriba a cuatro temperaturas diferentes (desde 8 hasta 25  $^{\circ}\text{C}$ ). El rango de temperatura fue  $\leq 25$   $^{\circ}\text{C}$ , debido al hecho de que la velocidad de la reacción a mayores temperaturas era demasiado rápida para ser seguida en nuestro equipo de flujo detenido (tiempo de mezcla  $< 1.1$  milisegundos), incluso utilizando pequeñas concentraciones de reactivos (0.1  $\mu\text{M}$  de enzima y  $\leq 2$   $\mu\text{M}$  de 12-HpETE). Determinamos constantes de velocidad a diferentes temperaturas como se muestra en el inserto de la Figura C6, y se realizaron los gráficos de Arrhenius e Eyring (Figura C6) a partir de las ecuaciones de Arrhenius e Eyring que se muestran a continuación, respectivamente,

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a^\ddagger}{R} \times \frac{1}{T}$$

$$\ln \frac{k}{T} = - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \times \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} + \ln \frac{R}{N_A \times h}$$



en donde  $E_a^\ddagger$  es la energía de activación del estado de transición, la constante A representa la probabilidad de la reacción por lo que involucra factores de frecuencia de colisión y orientación de las partículas que colisionan, R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta (en Kelvin).  $N_A$  es el número de Avogadro y h es la constante de Planck.  $\Delta S^\ddagger$  y  $\Delta H^\ddagger$  son la entropía y la entalpía de activación del estado de transición, respectivamente. De los gráficos se obtuvieron los valores de  $E_a^\ddagger$ ,  $\Delta S^\ddagger$ ,  $\Delta H^\ddagger$  y calculamos el valor de energía libre de activación del estado de transición,  $\Delta G^\ddagger$ , para compararlos con los parámetros reportados por nosotros previamente para la oxidación de la MtAhpE con  $H_2O_2$  (262), como se muestra en la Tabla C3.

**Ensayos fluorimétricos con ANS.** Las mediciones de fluorescencia se realizaron utilizando un espectrofluorímetro Jasco FP-6500 con una cubeta de cuarzo de 3 x 3 mm. Los anchos de banda de excitación y de emisión se fijaron en 4 nm. La excitación se realizó a 295 nm (para excitar los residuos de TRP de la proteína) y/o a 380 nm (para excitar al ANS). La eficiencia de la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET, Förster resonance energy transfer) se evaluó mediante la determinación de la intensidad de fluorescencia total de los residuos de Trp de MtAhpE (en presencia de DTT, 1 mM) después de añadir concentraciones crecientes de ANS. El experimento se repitió a tres concentraciones diferentes de MtAhpE (1.5  $\mu$ M, 3  $\mu$ M y 8  $\mu$ M). Asumiendo un modelo de n sitios de unión idénticos e independientes, la disminución relativa de fluorescencia total puede ser descrita por:

$$1 - \frac{F}{F_0} = \frac{-1 - K_a[MtAhpE]_T x - nK_a[MtAhpE]_T - \sqrt{(1 + K_a[MtAhpE]_T x + nK_a[MtAhpE]_T)^2 - 4nK_a^2[MtAhpE]_T^2 x}}{-2K_a[MtAhpE]_T}$$

Ec. 1

donde F es la fluorescencia total,  $F_0$  corresponde a la intensidad de fluorescencia de MtAhpE en ausencia de ANS,  $K_a$  es la constante de asociación, n es el coeficiente estequiométrico de ANS por monómero de MtAhpE y  $x = \frac{[ANS]_T}{[MtAhpE]_T}$ . La Ec. 1 fue inicialmente ajustada de forma independiente para cada concentración de MtAhpE, y después se realizó un ajuste global (donde la Ec. 1 se ajustó a todo el conjunto de datos). Estos experimentos así como el análisis de los datos fueron realizados en

colaboración con el Dr. Luis González Flecha (IQUIFIB y Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina).

**Docking y dinámica molecular clásica.** La estructura cristalográfica del dímero *MtAhpE* en el estado reducido (PDB<sub>ID</sub>= 1XXU) (261) fue utilizada como estructura de partida. Se configuró C<sub>P</sub> (pK<sub>a</sub> = 5.2) (247) en la forma reactiva desprotonada. El sistema fue solvatado con las moléculas de agua TIP3P, en una caja octaédrica de 12 Å de dimensión (283). Todos los parámetros de los residuos utilizados corresponden al campo de fuerza AMBER parm99 (284), a excepción de los sustratos, que fueron desarrollados por un procedimiento estándar. Las cargas parciales se calcularon utilizando el método de potencial electrostático restringido (RESP) y los cálculos DFT de estructura electrónica con el funcional PBE y el conjunto de bases dzvp. Las distancias y ángulos de equilibrio, así como las constantes de fuerza, se calcularon utilizando los mismos métodos y conjunto de bases utilizados para el cálculo de las cargas. Con el fin de obtener las estructuras iniciales del complejo *MtAhpE*:hidroperóxido, se realizó un experimento de docking sesgado (285) para 15-HpETE como sustrato utilizando la información obtenida previamente para la interacción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el sitio activo de la enzima (262). Por lo tanto, la posición del grupo peróxido fue fijado y el resto de la molécula fue “dockeado”. Las estructuras iniciales para los complejos *MtAhpE*:*t*-bOOH y *MtAhpE*:4-HpNE se obtuvieron a partir de estructuras obtenidas del complejo *MtAhpE*:15-HpETE. Todas las simulaciones se realizaron bajo condiciones periódicas de contorno utilizando el método de partículas de Ewald (PME) para el tratamiento de las interacciones electrostáticas con un valor de corte de 10 Å. Las longitudes de enlace de hidrógeno se mantuvieron en su distancia de equilibrio utilizando el algoritmo SHAKE, mientras que la temperatura y la presión se mantuvieron constantes con un termostato y barostato de Langevin, respectivamente, tal como se aplica en el programa AMBER. En todos los casos, el sistema se optimizó durante 1000 pasos. Luego, se termostató lentamente de 0 K a 300 K durante 20 picosegundos a presión constante, con el termostato de Berendsen, y la presión se equilibró a 1 bar por 5 picosegundos. Después de estos dos pasos, se realizó una simulación de

dinámica molecular clásica (DM) de 10 nanosegundos a temperatura (300 K) y volumen constante. También se realizaron simulaciones de DM en el ensemble NTP para cada sustrato libre (es decir, 15-HpETE, 4-HpNE, *t*-bOOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Posteriormente, se realizaron dos trayectorias de 100 nanosegundos en las que se aplicó una restricción “tipo muro” para las distancias entre el átomo de azufre y el átomo de oxígeno electrófilo a un valor menor a 3.5 o a 10 Å. Los cálculos de energía libre de asociación se realizaron en el nivel MM/GBSA (286), seleccionando 200 estructuras con una distancia entre los átomos reactivos menor o igual a 3.5 Å. Se utilizó el mismo conjunto de estructuras para calcular la diferencia en el área superficial accesible al solvente (SASA, solvent accessible surface area) tras la unión de los sustratos, definidos como:

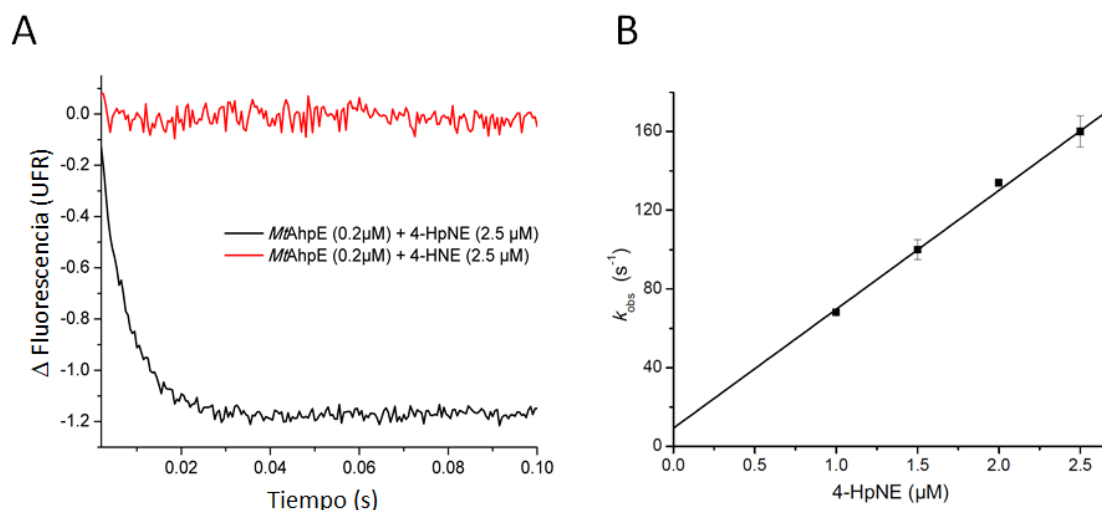
$$\Delta SASA = SASA_{MtAhpE:ROOH} - (SASA_{MtAhpE} + SASA_{ROOH})$$

**Simulaciones híbridas QM/MM.** Las simulaciones de QM/MM fueron llevadas a cabo con protocolos y parámetros similares que se utilizaron anteriormente (262, 271). Este escenario fue construido mediante la partición del sistema en subsistemas QM y MM. El sistema QM consistió en el grupo H<sub>3</sub>COOH del 15-HpETE (dos de los átomos de hidrógeno del grupo metilo son link atoms con el sistema MM) junto con las cadenas laterales de C<sub>P</sub> y Arg116. Se empleó el método de posición escalada para describir los límites QM/MM (287). Para la región QM, los cálculos se realizaron en el nivel de aproximación de gradiente generalizado (GGA), utilizando la combinación de funcionales PBE de intercambio y correlación, con una base *dzvp* para la expansión de los orbitales de un electrón (288) La densidad electrónica también se expandió en un conjunto de bases auxiliar y los coeficientes para el ajuste se computaron minimizando el error en la energía de repulsión de Coulomb. Con el objeto de explorar la energía libre y el mecanismo de la reacción, empleamos un esquema de muestreo Umbrella Sampling, eligiendo como coordenada de reacción la diferencia entre las distancias O<sub>A</sub>-O<sub>B</sub> y S-O<sub>A</sub>, que fue muestreada de -1.7 a 1.4 Å, dividido en 31 ventanas de simulación, utilizando un potencial armónico con una constante de 200 Kcal/mol Å<sup>2</sup>. La selección de la región QM y la coordenada de reacción, ha proporcionado una representación realística del mecanismo de reacción en trabajos previos (262, 271). Específicamente, en cuanto a la base de las consideraciones estructurales y energéticas, hemos

demostrado que las moléculas de agua no están directamente involucradas en la reacción. Las configuraciones iniciales se generaron a partir de equilibrios previos clásicos de 2 nanosegundos en la que el soluto se trató clásicamente como un sistema rígido, seguido por una simulación QM/MM de 2 picosegundos. Para cada ventana, las simulaciones QM/MM se llevaron a cabo durante al menos 10 picosegundos. Se empleó el algoritmo de Verlet para integrar las ecuaciones de Newton con un intervalo de tiempo de 1 femtosegundo. Durante las simulaciones, la temperatura se mantuvo constante a 300 K usando el termostato Langevin. El perfil de energía libre se obtuvo utilizando tanto métodos de reponderación sencilla e integración con Umbrella (289), obteniéndose resultados casi idénticos. Los errores estadísticos de las  $\Delta G^\ddagger$  y la  $E_a^\ddagger$  se calcularon según lo sugerido por Kästner y colaboradores (290). La visualización de las dinámicas y las representaciones moleculares fueron realizadas con el programa VMD 1.9.1. (291).

### C.III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Oxidación de la *MtAhpE* por hidroperóxidos orgánicos.** Con el fin de evaluar si la reactividad de los AG-OOH es dependiente de la longitud de la cola alifática, determinamos la constante de velocidad de segundo orden de la oxidación de *MtAhpE* por 4-HpNE y como lo hicimos previamente en (213, 247). El curso temporal del cambio de fluorescencia intrínseca de *MtAhpE* se muestra en la Figura C5A, junto con la dependencia de la  $k_{obs}$  con la concentración de hidroperóxido (Figura C5B). Como control, se incubó *MtAhpE* reducida con 4-HNE y no se observó cambio de fluorescencia intrínseca de la enzima en un lapso de tiempo comparable a la de oxidación por el hidroperóxido (Figura C5A). Esto es consistente con el hecho de que las reacciones de este electrófilo con residuos de Cys son mucho más lentas, y por ejemplo, la constante de velocidad de oxidación de la Cys libre de albúmina de suero humano por 4-HNE ha sido reportada como  $30 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (292).



**Figura C5. Cinética de la oxidación de *MtAhpE* por 4-HpNE.** (A) Cursos temporales de los cambios de fluorescencia intrínseca de la *MtAhpE* (0.2 μM) cuando se mezclan con 4-HpNE (2.5 μM, trazo negro) o 4-HNE (2.5 μM, trazo rojo) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) más DTPA (0.1 mM), pH 7.4, 25 °C. Los datos para 4-HpNE fueron ajustados a exponenciales simples de los que se obtienen los valores de  $k_{obs}$ . (B) Gráfico de la dependencia de los valores de  $k_{obs}$  en función de la concentración de 4-HpNE. De la pendiente del ajuste lineal se obtiene la constante de velocidad de segundo orden de la oxidación de la *MtAhpE* de este AG-OOH.

La constante de velocidad resultante fue  $(6.0 \pm 0.1) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , 3 veces menor que la determinada para 15-HpETE (Tabla C2) (213) pero 3–4 órdenes de magnitud mayor en comparación con la reactividad de *t*-bOOH o Cu-OOH (Tabla C2) reportadas por nosotros previamente (213, 247). Estos datos confirman la preferencia significativa de la *MtAhpE* por estos sustratos, sugiriendo que la longitud de la cola alifática juega un rol en la modulación de la reactividad, siendo mayor cuanto más larga es cadena de carbono. Alternativamente, la posición del grupo hidropéroxido en la cola alifática no parece ser tan importante para la reactividad, ya que nosotros también determinamos la constante de velocidad de oxidación de la *MtAhpE* por el 12-HpETE siendo  $3.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , muy similar a la determinada para el 15-HpETE por nosotros y la determinada para el 5-HpETE por Alegria y colaboradores (293) (Tabla C2). En este último trabajo se utilizó a la *MtAhpE* para desarrollar un método cinético de competencia para determinar la constante de velocidad de la reacción entre diferentes AG-OOH con una peroxidasa de *Xylella fastidiosa* específica para estos sustratos, la enzima de resistencia a hidropéroxidos orgánicos (Ohr, organic hydroperoxide resistance). Cabe

destacar que el *Mtb* carece de esta clase sistema de reducción de hidroperóxidos orgánicos (Ohr y su regulador OhrR) que si está presente en *Mycobacterium smegmatis* (137, 294). Aunque, el *Mtb* presenta una proteína de estrés osmótico, OsmC, que pertenece a la familia de las Ohr y mostró participar en defensa contra el estrés oxidativo mediado por *t*-bOOH y Cu-OOH (295), pero no se estudió su especificidad por AG-OOH.

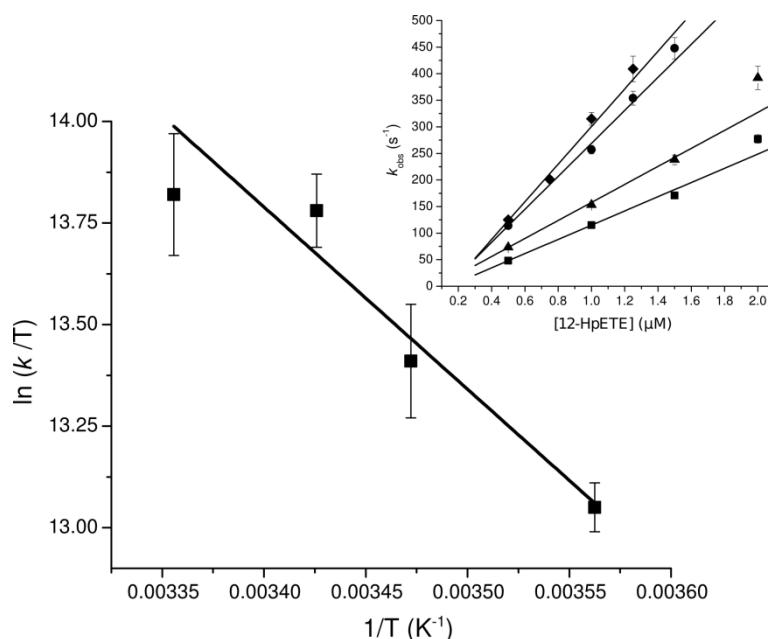
**Tabla C2. Constantes de velocidad de la oxidación de la *MtAhpE* por diferentes hidroperóxidos orgánicos.**

Hidroperóxido	$k_{ox\ pH\ 7.4,\ 25\ ^\circ C}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	Ref.
<i>t</i> -bOOH	$8.0 \times 10^3$	(213)
Cu-OOH	$4.0 \times 10^4$	(213)
4-HpNE	$6.0 \times 10^7$	Este trabajo
OAOOH	$4.0 \times 10^8$	(293)
5-HpETE	$2.9 \times 10^8$	(293)
15-HpETE	$1.8 \times 10^8$	(213)
12-HpETE	$3.5 \times 10^8$	Este trabajo
Hidroperóxidos de ácido $\alpha$ -linolénico <sup>A</sup>	$2.7 \times 10^8$	(213)

OAOOH= hidroperóxido del ácido oleico, 5-HpETE= 5S-hidroperóxido-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoico.

<sup>A</sup> Mezcla de hidroperóxidos producto de la reacción catalizada por la lipooxigenasa.

Un aspecto interesante a analizar para esta reacción preferencial con estos sustratos, es la comparación de los parámetros termodinámicos de activación de la reacción con los AG-OOH con los reportados previamente utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato oxidante (262). Para calcular dichos parámetros determinamos las constantes de velocidad de oxidación de la *MtAhpE* por 12-HpETE a diferentes temperaturas. En la Figura C6, se representa el gráfico de Eyring que muestra la dependencia entre la constante de velocidad de la reacción con la temperatura.



**Figura C6. Determinación de los parámetros termodinámicos de activación de la oxidación de la *MtAhpE* por el 12-HpETE.** Se calcularon los parámetros termodinámicos de activación a partir del gráfico de Eyring que muestra la dependencia entre las constantes de velocidad y la temperatura. Recuadro:  $k_{\text{obs}}$  ( $\text{s}^{-1}$ ) en función de la concentración de 12-HpETE a diferentes temperaturas ( $T = 7.7\text{ }^{\circ}\text{C}$  (■),  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  (▲),  $18.9\text{ }^{\circ}\text{C}$  (●) y  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  (◆)).

En la Tabla C3 mostramos los valores de los parámetros termodinámicos de activación obtenidos por el análisis de los datos utilizando la ecuación de Eyring (Materiales y Métodos), comparando con los determinados para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en nuestro trabajo (262).

**Tabla C3. Comparación de los parámetros termodinámicos de activación de la oxidación de la *MtAhpE* por 12-HpETE y  $\text{H}_2\text{O}_2$ .**

Hidroperóxido	$\Delta H^{\ddagger}$ (Kcal/mol)	$\Delta S^{\ddagger}$ (cal/Kmol)	$\Delta G^{\ddagger}$ (Kcal/mol) <sup>A</sup>
$\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>B</sup>	$4.8 \pm 0.5$	$-19.1 \pm 1.9$	10.5
12-HpETE	$8.2 \pm 0.3$	$8.0 \pm 1.0$	5.8

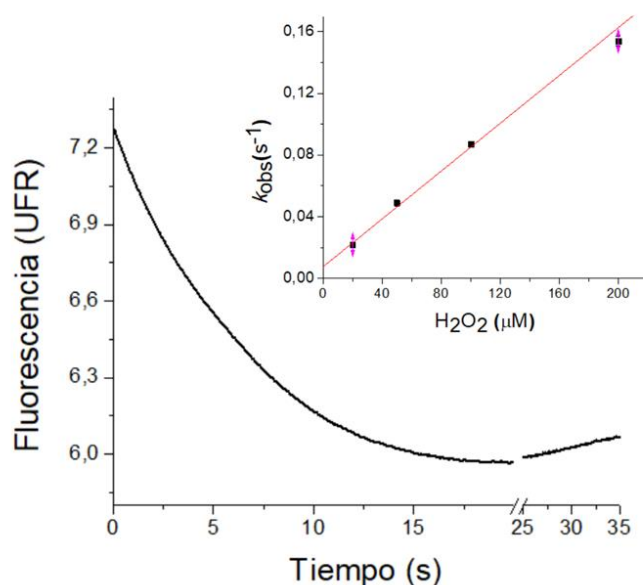
<sup>A</sup> Determinado a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

<sup>B</sup> Tomado de (262).

Curiosamente, la disminución neta en  $\Delta G^{\ddagger}$  para la reacción con los hidroperóxidos alquílicos se debe a un efecto entrópico, que compensa el mayor valor observado para la  $\Delta H^{\ddagger}$  comparado con el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esto es probablemente debido a una combinación de efectos que implican cambios en

las interacciones proteína-hidroperóxido, dinámica de la proteína (ver abajo) y efectos del solvente, entre otros.

Por otra parte, en la Figura C7 se muestra la reactividad de la *MtAhpE* F41S (mutante en el residuo de Phe41 por Ser) con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , obteniéndose una constante de velocidad de oxidación de  $800 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , 2 órdenes de magnitud menor que la tipo salvaje ( $8.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , (247)) y el mismo comportamiento se vio cuando usamos como oxidante el 15-HpETE ( $\sim 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  vs  $1.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , no mostrado) por lo que parece que la estabilidad del dímero es importante para la reactividad.



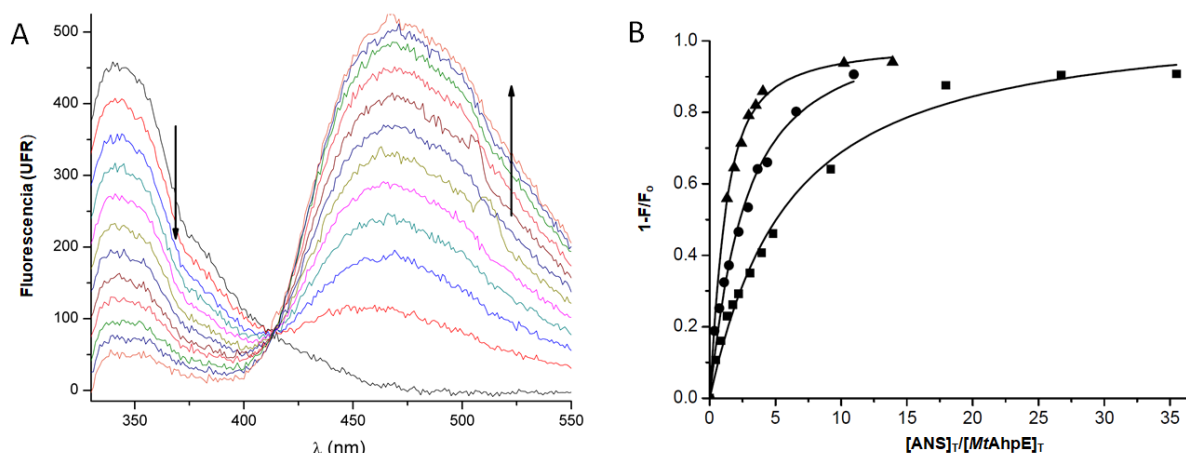
**Figura C7. Cinética de la oxidación de *MtAhpE* F41S por  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** Cursos temporales de los cambios de fluorescencia intrínseca de la *MtAhpE* F41S ( $0.2 \mu\text{M}$ ) cuando se mezclan con  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $100 \mu\text{M}$ ) en amortiguador fosfato de sodio ( $100 \text{ mM}$ ) más DTPA ( $0.1 \text{ mM}$ ), pH 7.4,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Los datos para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  fueron ajustados a exponenciales simples de los que se obtienen los valores de  $k_{\text{obs}}$ . Inserto: Gráfico de la dependencia de los valores de  $k_{\text{obs}}$  en función de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . De la pendiente del ajuste lineal se obtiene la constante de velocidad de segundo orden de la oxidación de la *MtAhpE* por  $\text{H}_2\text{O}_2$  de  $800 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

Dado que observamos que el largo de la cola alifática tiene una influencia en la reactividad, estudiamos el efecto de la adición de ácido araquidónico, en concentraciones por debajo de la concentración micelar crítica (296), sobre la reactividad de la *MtAhpE* con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Este efecto ha sido reportado en el caso de la sirtuina 6, una desacetilasa, que hidroliza preferentemente grupos acilo de cadena larga en vez de acetilos, y cuya



actividad catalítica como desacetilasa se ve incrementada en presencia de ácidos grasos de cadena larga (297). Determinamos las constantes de velocidad para la oxidación de la *MtAhpE* por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en ausencia o presencia de ácido araquidónico (20  $\mu\text{M}$ ) como  $8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y  $6.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , respectivamente. Estos valores son similares, por lo que no observamos un incremento de la reactividad en presencia del ácido graso.

**Caracterización del parche hidrofóbico en la *MtAhpE*.** Una caracterización estructural y dinámica de la *MtAhpE* reducida mostró una región hidrofóbica expuesta ubicada en la interfaz del dímero. Esta comprende cadenas laterales no polares de ambas subunidades, que fueron señaladas como posibles mediadores de la interacción con hidroperóxidos alquílicos formando un complejo enzima-sustrato en el que el grupo peroxilo se ubica en posición reactiva (213). Para caracterizar esta región, analizamos la interacción de la enzima reducida con el ANS (298, 299). El uso de esta sonda fluorescente ha proporcionado información valiosa sobre la existencia de bolsillos hidrofóbicos accesibles desde el solvente y con una carga positiva cercana (298). Estos sitios de unión promueven el aumento del rendimiento cuántico del ANS con un concomitante desplazamiento en la emisión hacia el azul. Entre las proteínas nativas que exhiben este comportamiento, podemos mencionar proteínas de membrana y algunas pocas proteínas de unión a ácidos grasos (u otros ligandos hidrófobos) solubles en agua (300, 301). En la Figura C8, observamos la disminución de fluorescencia intrínseca de la *MtAhpE* tratada con concentraciones crecientes de ANS, a la vez que se produce un aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia ANS, siendo ambos fenómenos dependientes de la concentración de ANS. Utilizamos estas propiedades para determinar parámetros de unión para esta interacción como se describe en Materiales y Métodos.



**Figura C8. Unión entre el ANS y la *MtAhpE* utilizando FRET con Trps.** (A) Registros de emisión de fluorescencia total ( $\lambda_{exc}= 295$  nm) cuando se incubó *MtAhpE* ( $4 \mu\text{M}$ ) con concentraciones crecientes de ANS ( $0-88 \mu\text{M}$ ) en presencia de DTT ( $2$  mM) en amortiguador fosfato de sodio ( $100$  mM) más DTPA ( $0.1$  mM), pH  $7.4$ ,  $25$  °C. La dilución total se mantuvo por debajo del  $15\%$ . Las flechas indican la disminución (en el entorno de  $350$  nm, que correspondería a la fluorescencia intrínseca de la proteína) y el aumento (en el entorno de  $460$  nm, que correspondería al ANS en el entorno proteico) de la fluorescencia al aumentar la concentración de ANS. (B) Se muestran las curvas de unión entre la *MtAhpE* ( $1.5 \mu\text{M}$  (■),  $3 \mu\text{M}$  (●) y  $8 \mu\text{M}$  (▲)) cuando se incubó con el ANS. Se grafica la disminución relativa de la fluorescencia total de emisión de los Trps ( $\lambda_{em}\sim 335$  nm) en función de  $[\text{ANS}]_T/[\text{MtAhpE}]_T$ .

La Figura C8 muestra las curvas de unión utilizando 3 concentraciones diferentes de *MtAhpE* y el ajuste de los datos experimentales a la Ec. 1 de Materiales y Métodos. No se observaron diferencias significativas entre los ajustes a cada serie de datos por separado, y el ajuste global a todo el conjunto de datos (Tabla C4).

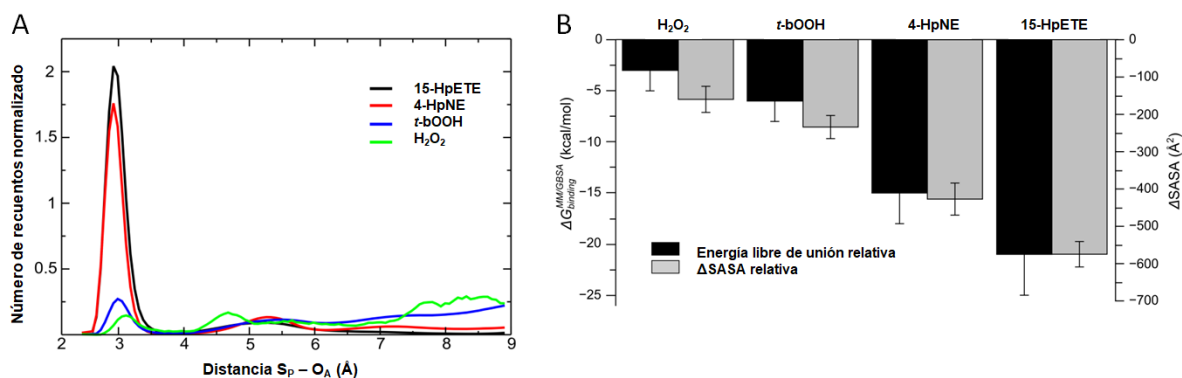
**Tabla C4. Parámetros de unión obtenidos de los experimentos interacción entre el ANS y la *MtAhpE*.**

	n	$K_a$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	$R^2$
$[\text{MtAhpE}] = 1.5 \mu\text{M}$	$1.07 \pm 0.03$	$0.13 \pm 0.01$	0.99
$[\text{MtAhpE}] = 3.0 \mu\text{M}$	$1.07 \pm 0.05$	$0.16 \pm 0.02$	0.98
$[\text{MtAhpE}] = 8.0 \mu\text{M}$	$1.00 \pm 0.01$	$0.20 \pm 0.01$	0.99
Ajuste global	$1.04 \pm 0.01$	$0.16 \pm 0.02$	0.99

El análisis de curvas de unión mostró una estequiometría de una molécula de ANS por monómero enzimático con una constante de asociación ( $K_a$ ) de  $(0.16 \pm 0.02) \mu\text{M}^{-1}$ . Estos resultados confirman la presencia de un parche hidrofóbico expuesto. Además, la  $K_a$  determinada está en el orden de

los valores determinados para proteínas de unión a ácidos grasos como la albúmina de suero bovino ( $0.32 \mu\text{M}^{-1}$ , (299)) pero no está dentro del rango de valores que se atribuye generalmente a la unión de ANS a estados de glóbulos fundidos ( $(1-5) \times 10^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ , (302)) que sugieren fuertemente la presencia de un sitio de unión bien definido.

**Análisis de la interacción del sustrato con la *MtAhpE*.** Con el fin de obtener información a nivel microscópico sobre la interacción de diferentes sustratos (como  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *t*-bOOH, 4-HpNE y 15-HpETE) con la enzima, se llevaron a cabo estudios de simulaciones computacionales de DM en combinación con simulaciones de Docking. En concreto, se realizaron simulaciones de 100 nanosegundos, después de realizar un análisis de Docking sesgado para obtener estructuras de complejos iniciales como se describió en Materiales y Métodos. En el complejo de enzima-sustrato, el grupo peróxido interactúa directamente con diferentes elementos estructurales del sitio activo de la enzima, estableciendo una compleja red de enlaces de hidrógeno que involucra principalmente a la  $\text{C}_P$ , la Thr42 y la Arg116. Estas interacciones ubican el átomo de oxígeno electrófilo del  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\text{O}_A$ ) en contacto muy estrecho con el átomo de azufre nucleófilo de la  $\text{C}_P$  ( $\text{S}_P$ ), aspecto que se observó para los diferentes sustratos. Sin embargo, la parte no reactiva de los sustratos de cadena más larga que interactúa con la enzima, también puede jugar un papel importante en la reactividad diferencial observada (consistente con el llamado "Efecto Circe" descrito inicialmente por Jencks al analizar el mecanismo catalítico de varias enzimas (303-305)). Por otra parte, como la reactividad se correlaciona con la longitud de la cadena alifática de los hidroperóxidos, analizamos cómo este hecho estructural podría modificar la interacción del sustrato. Una comparación del comportamiento de estos hidroperóxidos se presenta en la Figura C9.



**Figura C9. Interacción entre la *MtAhpE* y diferentes hidroperóxidos.** (A) Distribuciones de la distancias entre el S<sub>P</sub> y el O<sub>A</sub> para diferentes hidroperóxidos. El número normalizado de recuentos obtenidos a partir de la dinámica de 100 nanosegundos se representa frente a la distancia S<sub>P</sub>-O<sub>A</sub> en Å. Los resultados para 15-HpETE, 4-HpNE, *t*-bOOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se representan en líneas negras, rojas, azules y verdes, respectivamente. (B) Se muestran los valores de energía libre de unión obtenidos en el nivel MM/GBSA en Kcal/mol (barras negras, eje izquierdo) y los valores de ΔSASA calculado en Å<sup>2</sup> (barras grises, eje derecho). Los valores promedio y la desviación estándar se calcularon a partir de un conjunto de 200 estructuras.

La distribución de la distancia S<sub>P</sub>-O<sub>A</sub> se representa en la Figura C9A. Aunque todos los hidroperóxidos considerados muestran una probabilidad máxima de posicionamiento a aproximadamente 3 Å, que es la distancia reactiva para este par en el complejo de enzima-sustrato, tanto de 15-HpETE como de 4-HpNE presentan distribuciones muy marcadas, con frecuencia casi nula para cualquier distancia superior a 3.5 Å, mientras que los hidroperóxidos más pequeños como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el *t*-bOOH mostraron otras conformaciones probables de complejos no reactivos. Esta tendencia se debe principalmente a la interacción colectiva de la larga cola alifática del 4-HpNE y del 15-HpETE con el surco hidrofóbico de *MtAhpE*, lo que permite que el grupo peróxido se coloque firmemente en el activo sitio. Como para mostrar una cuantificación aún más este fenómeno, calculamos las energías libres de unión con el esquema MM/GBSA (286). Incluso si el valor en sí mismo puede exhibir errores sistemáticos, típicamente predicciones sobrestimadas, la comparación de valores para el mismo sistema con diferentes sustratos es significativa (306). Los resultados muestran que las energías libres de unión son 5 y 7 veces más grandes para 4-HpNE y 15-HpETE que para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente (Figura C7B). Además, como se esperaba para este tipo de interacciones hidrofóbicas

colectivas, la energía libre de unión se correlaciona con el área de superficie que no es accesible al agua después de la unión ( $\Delta$ SASA, Figura C9B).

La  $C_P$  de la *MtAhpE* se encuentra en el extremo N-terminal de la hélice- $\alpha_2$ , que coloca al átomo de azufre a aproximadamente 10 Å de la interfaz entre subunidades del dímero. Según lo descrito por Li y colaboradores (261) esta interfaz se caracteriza por una serie de interacciones hidrofóbicas entre residuos de ambas subunidades. Además, la región de la interfaz cercana  $C_P$  presenta varios residuos no polares, dando lugar a la superficie del surco hidrofóbico antes mencionada. El análisis estructural y dinámico de la interacción de 4-HpNE y 15-HpETE con la proteína muestra cómo las cadenas de carbono alifáticas se acomodan dentro del surco, interaccionando con residuos no polares como la Ile13, la Pro38 y la Leu39 de la subunidad que contiene a la  $C_P$  y la Pro74, Pro75 y Phe94 de la segunda subunidad (Figura C10). La proximidad entre esta región hidrofóbica a la  $C_P$  permite que este tipo de sustratos acomoden la mayor parte de sus cadenas alifáticas de carbono sobre el surco, facilitando la interacción directa del grupo peróxido con el tiolato reactivo.

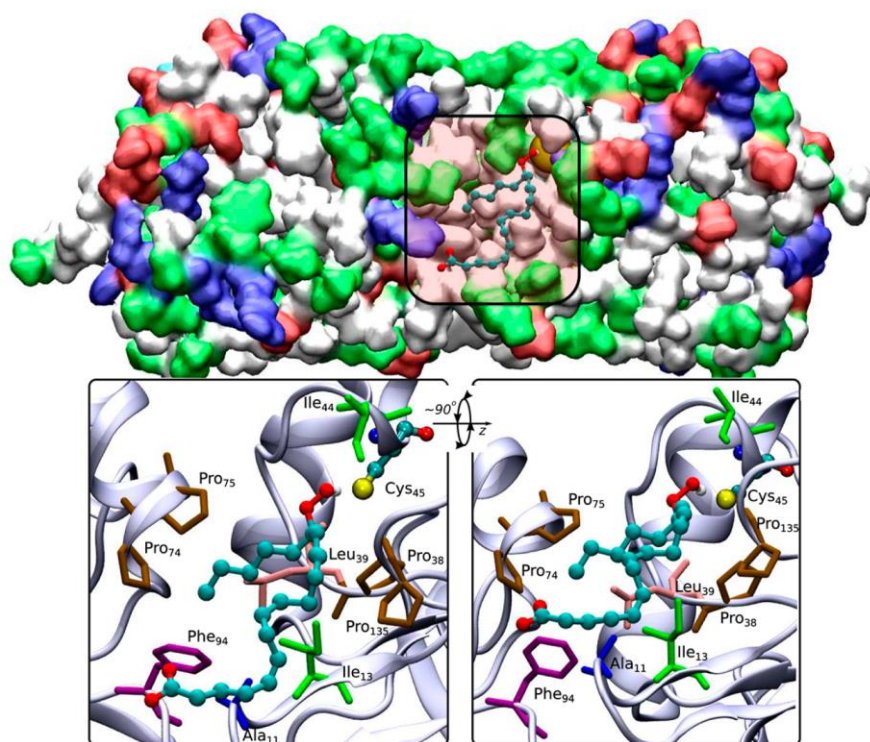
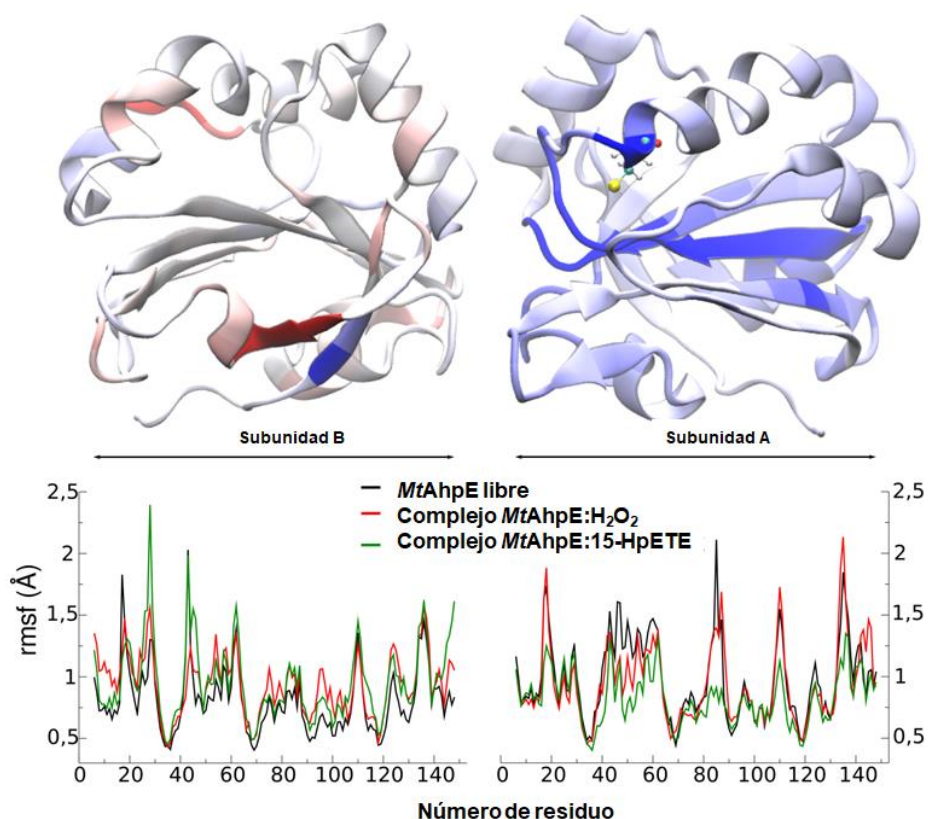


Figura C10. Representación del complejo entre la *MtAhpE* y el 15-HpETE obtenido por simulaciones de DM. En la parte superior se muestra la superficie molecular de la *MtAhpE* reducida

coloreada según el tipo de residuo (azul: básico, rojo: ácido, verde: polar, blanco: no polar) y la C<sub>P</sub> (Cys45) se muestra en amarillo. Los átomos de carbono de 15-HpETE se muestran en celeste y los oxígenos en rojo. En la parte inferior se muestran dos vistas detalladas de la interacción del sustrato dentro del surco hidrofóbico. Los residuos no polares importantes de la proteína en la interfaz del dímero se muestran coloreados de acuerdo con su identidad. Sólo se muestra el átomo de hidrógeno del grupo hidroperóxido para mayor claridad de la figura.

En la estructura de miembros de las subfamilias PrxV y Tpx de la Prxs, se han identificado una serie de residuos apolares que rodean a la C<sub>P</sub> (que se ha dado a llamar collar hidrofóbico) al que se ha postulado como responsable de la preferencia por hidroperóxidos orgánicos de estas enzimas (307), dado que la reacción con hidroperóxidos orgánicos modelo como *t*-bOOH o Cu-OOH es 10<sup>1</sup>-10<sup>2</sup> veces más rápida que con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (206, 308). Este no es el caso de la *MtAhpE*, ya que la selectividad parece estar dirigida a AG-OOH y no a peróxidos orgánicos modelo (ver Tabla C2), debido a la presencia del surco hidrofóbico, que involucra residuos apolares cercanos a la C<sub>P</sub> y hasta 15 Å de distancia. Además la ubicación del sustrato en una conformación reactiva, es decir la interacción del AG-OOH con el surco hidrofóbico afecta el comportamiento dinámico de la enzima. La Figura C11 muestra la raíz cuadrada de la fluctuación cuadrática media (rmsf, root mean square fluctuation) para la enzima libre y para los complejos, *MtAhpE*:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y *MtAhpE*:15-HpETE. Las fluctuaciones medias de los residuos en la enzima libre y en *MtAhpE*:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es muy similar, excepto por cambios sutiles que incluyen la reducción de la movilidad de algunos residuos alrededor de C<sub>P</sub> (residuos 43–55 de la subunidad A). Sin embargo, cuando la unión se da con el 15-HpETE, se observan cambios significativos, no sólo involucrando el entorno de C<sub>P</sub>, que se vuelve mucho más inmóvil pero también la disminución de la flexibilidad de las partes centrales de la enzima como el sistema central de hojas-β antiparalelas, en su mayoría la hoja-β<sub>3</sub> (Figura C11 arriba, áreas azules), lo que sugiere que esta interacción modifica significativamente aspectos dinámicos de la proteína.



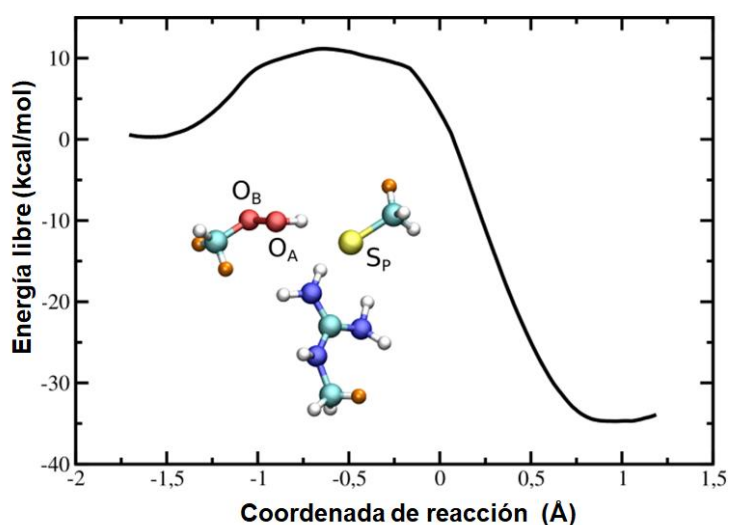
**Figura C11. Análisis de fluctuación de la enzima al formar complejo con los diferentes sustratos.** En la parte inferior de muestra los valores rmsf en función del número de residuos para ambas subunidades del dímero *MtAhpE* libre (negro), el complejo *MtAhpE*:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (rojo) y el complejo *MtAhpE*:15-HpETE (verde). En la parte de arriba se muestra la estructura del dímero. La diferencia entre los valores de rmsf para el complejo *MtAhpE*:15-HpETE y *MtAhpE* libre ( $MtAhpE:15-HpETE_{rmsf} - MtAhpE_{libre_{rmsf}}$ ) se colorean en rojo (valores positivos) o azul (valores negativos).

Cabe destacar también son apreciables algunos cambios en la movilidad de la subunidad B al unirse a 15-HpETE, que no es sorprendente ya que el surco hidrofóbico involucra residuos de ambas subunidades. El comportamiento de fluctuación de la subunidad B es mucho más complejo, ya que no se observó una reducción general de su movilidad después de la unión del sustrato como la subunidad A, sino que algunos residuos ganan flexibilidad. Este hecho está relacionado con la asimetría entre las subunidades frecuentemente presentes en este tipo de sistemas oligoméricos de subunidades equivalentes (309-312).

**Análisis del mecanismo de la oxidación de la *MtAhpE* por el 15-HpETE.** Las simulaciones computacionales DM proporcionan detalles valiosos con respecto a la interacción entre la enzima y el sustrato, pero no una



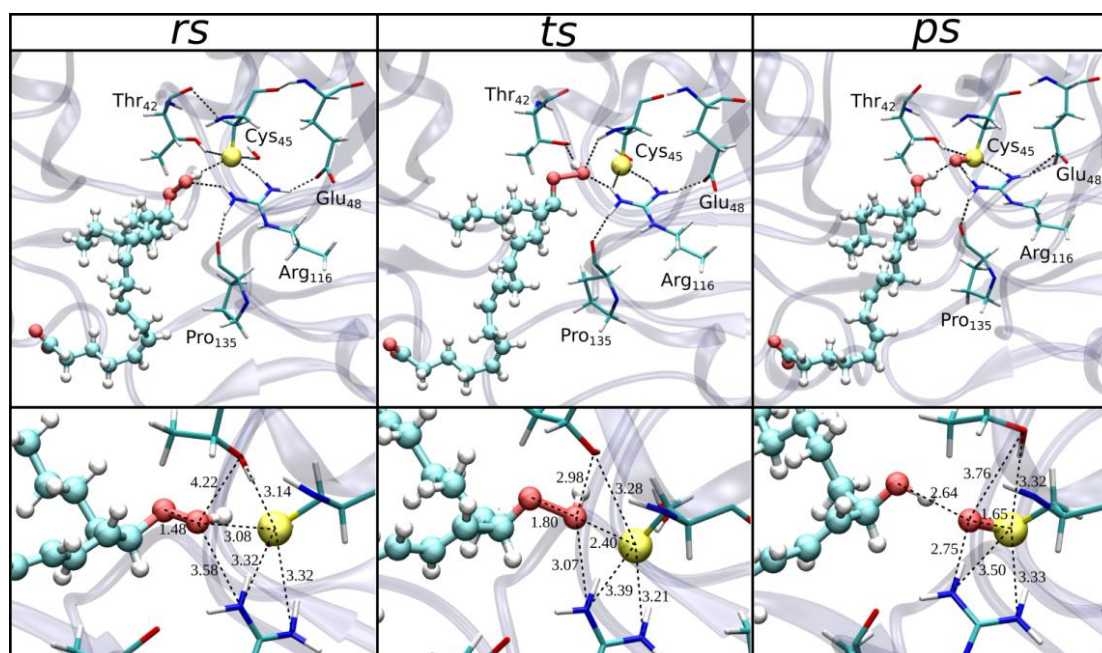
descripción molecular de la química involucrada en la reacción. Por lo cual, recurrimos a un método más sofisticado de simulaciones como lo son las simulaciones QM/MM. Específicamente, se estudió la base molecular de la reacción de oxidación de la *MtAhpE* por el 15-HpETE por simulaciones QM/MM, utilizando el esquema de muestreo Umbrella Sampling para determinar el perfil de energía libre de la proceso (Figura C12) como se describe en Materiales y Métodos.



**Figura C12.** Perfil de energía libre de la oxidación de la *MtAhpE* por el 15-HpETE obtenido por muestreo Umbrella Sampling QM/MM. Se presenta el subsistema QM; los átomos de hidrógeno en naranja representan los link atoms. La coordenada de reacción se definió como la diferencia entre la distancia  $O_A-O_B$  y la distancia  $S_P-O_A$ , y fue muestreada de  $-1.7$  a  $1.2$  Å.

Esta metodología fue probada previamente por nuestro grupo en colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Darío Estrin, en sistemas similares, tanto la reacción en solución como catalizada (262, 271). Vale la pena notar que la estimación del error estadístico para las energías libres de activación y de reacción (313) es de cerca de 1 Kcal/mol. Representaciones de los estados reactivo, de transición y de producto (rs, ts y ps, reactive state, transition state y product state, respectivamente) se muestran en la Figura C13.





**Figura C13. Paneles superiores:** Representaciones de los estados *rs*, *ts* y *ps* para la oxidación de la *MtAhpE* por el 15-HpETE, obtenido mediante muestreo Umbrella Sampling QM/MM. Además de la  $C_P$  (Cys45) y el peróxido, se muestra todo el sitio activo y se representan los enlaces de hidrógeno relevantes. **Paneles inferiores:** vistas ampliadas de los tres estados, donde se indican las distancias relevantes (Å).

La reacción es exergónica, con un cambio de energía libre de reacción de  $(-35 \pm 1)$  Kcal/mol, de acuerdo con lo informado anteriormente para las reacciones catalizada y no catalizada para otros hidroperóxidos (262, 271). La energía libre de activación de  $(11 \pm 1)$  Kcal/mol, resultó 3 Kcal/mol más bajo que el obtenido con la misma metodología para la reacción con el  $H_2O_2$  (262), consistente con el valor de  $\Delta\Delta G^\ddagger$  determinado experimentalmente (ver Tabla C3). Esto indica que no solo la formación del complejo es importante para explicar esta reactividad diferencial entre la enzima y el AG-OOH, sino que la reacción después de la formación del complejo enzima-sustrato, también presenta diferencias significativas en términos de barreras de energía libre.

El *rs* se caracteriza por la interacción del grupo de hidroperóxido con los residuos del sitio activo a través de enlaces de hidrógeno, principalmente con la Thr42, la Cys45 y la Arg116, de acuerdo a lo reportado por estudios cristalográficos para varios miembros de esta familia de proteínas (202, 272). A medida que la reacción avanza, el enlace peróxido O–O se alarga con un concomitante alineamiento continuo entre los átomos de  $O_B$ ,  $O_A$  y  $S_P$ , hasta

alcanzar el ts, donde el ángulo  $O_B-O_A-S_P$  es prácticamente de  $180^\circ$ , el enlace  $O_B-O_A$  es  $0.6 \text{ \AA}$  más largo, y la distancia  $O_A-S_P$  es  $0.4 \text{ \AA}$  más corta. En el ts, la compleja red de enlaces de hidrógeno es sutilmente redefinida. La principal diferencia es el establecimiento de una fuerte interacción entre la Thr42 y el  $O_A$  por un enlace de hidrógeno (ver Figura C13). Como se discutió anteriormente, las numerosas interacciones que están presentes en el ts son capaces de estabilizar este estado en comparación con su homólogo en solución acuosa siendo responsables de la catálisis (201, 272).

Adicionalmente, también observamos que el mecanismo de reacción para este AG-OOH es equivalente al reportado para el  $H_2O_2$  tanto en solución como por las Prxs (es decir la reacción ocurre con la misma secuencia de ruptura y formación de enlaces covalentes) (262, 271) que implica una transferencia de protones del  $O_A$  al  $O_B$  que ocurre después del ts. Como resultado, en el ps se observa la Cys45 oxidada en la forma no protonada ( $C_P-SO^-$ ) y la forma protonada del 15-HETE (Figura C13). El hecho de que el mecanismo general de reducción para este tipo de sustrato sea equivalente al descrito para  $H_2O_2$  (262), está de acuerdo con la idea de que la reactividad diferencial de la enzima hacia diferentes hidroperóxidos es debida a la influencia de la parte "no reactiva" del sustrato, que puede afectar las propiedades dinámicas de la enzima (Figura C11).

## C.IV. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Utilizando una combinación de herramientas experimentales y computacionales se investigó las bases moleculares de la rápida reducción de AG-OOH por la *MtAhpE*. Una comparación de los parámetros termodinámicos de activación determinados experimentalmente utilizando diferentes sustratos indicó que el aumento de la entropía de activación es un contribuyente importante a la mayor reactividad con los AG-OOH en comparación con el  $H_2O_2$ . Además, los cálculos QM/MM indicaron que el mecanismo general de la reducción de estos hidroperóxidos es similar al anteriormente reportado por nosotros para el  $H_2O_2$ , si bien la energía libre de activación es menor para AG-OOH. Por lo tanto, las razones principales de la especificidad de *MtAhpE* hacia los AG-OOH, incluyen el posicionamiento correcto del sustrato cerca de la sitio

activo de la enzima a través de interacciones hidrofóbicas entre su cadena lateral alifática y el surco hidrofóbico cercano al sitio activo, encontrándose además diferencias en la dinámica del complejo enzima-sustrato.

La familia Prxs exhibe un comportamiento complejo en términos de selectividad por los sustrato, con algunos miembros que son más reactivos hacia  $H_2O_2$ , peroxinitrito o hidroperóxidos orgánicos (190). Aunque se ha avanzado mucho en la descripción en la estructura y función de las Prxs, las bases moleculares subyacentes a esta variabilidad, siguen sin estar claras. Este estudio presenta nuevas perspectivas sobre la comprensión de los factores moleculares que determinan la selectividad por el sustrato oxidante de las Prxs. Por otra parte, la pregunta puede extenderse a otras familias de peroxidasas dependientes de tioles, es decir GPxs y Ohrs, que muestran especificidades por sustrato oxidante cuyas bases moleculares no son claras (190).

Alternativamente, sería interesante conocer si la especificidad por sustrato oxidante mostrada por *MtAhpE in vitro* se correlaciona con su funcionalidad en la micobacteria. Es decir, ¿son las cepas de *Mtb* con menor contenido en esta enzima selectivamente más sensibles a la toxicidad por AG-OOH en comparación con  $H_2O_2$ ?

# D. Cinética de la Formación y la Reactividad del Persulfuro de la *MtAhpE*

## D.I. INTRODUCCIÓN

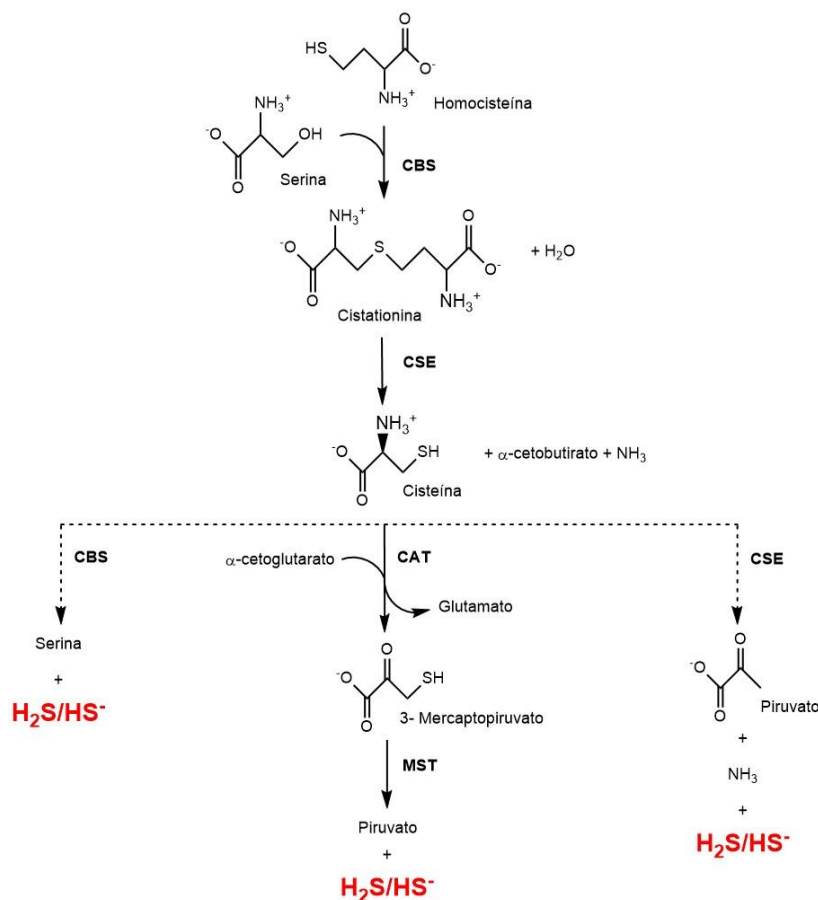
El sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}^c$ ) ha sido relacionado con el origen y la evolución de la vida en nuestro planeta y numerosos organismos pueden producir o utilizar el  $\text{H}_2\text{S}$  en diversos procesos metabólicos. Históricamente, se consideró al  $\text{H}_2\text{S}$  como una molécula tóxica capaz de inhibir la cadena de transporte de electrones asociada a la respiración celular. En la década de los 40s aparecieron las primeras evidencias de la formación de  $\text{H}_2\text{S}$  en mamíferos, considerándose residual. Desde la década de los 90s hasta la actualidad ha ido en aumento la evidencia de posibles efectos moduladores y señalizadores de esta molécula, involucrándola en múltiples procesos fisiológicos como la vasodilatación, neuro-modulación y inmuno-regulación (314-316).

La formación de  $\text{H}_2\text{S}$  en mamíferos (Figura D1) se da a partir de la homocisteína y la Cys por acción de enzimas dependientes de piridoxal fosfato que participan en la transulfuración, que es una vía metabólica alternativa de síntesis de Cys a partir de la Met y la Ser pasando por homocisteína como intermediario metabólico (317). Estas enzimas son la cistationina  $\beta$ -sintasa (CBS) y la cistationina  $\gamma$ -liasa (CGL o también conocida como cistationasa, CSE). Estas enzimas están presentes principalmente en el citosol, aunque en algunas situaciones se ha reportado su localización en otros compartimientos como núcleo o mitocondria (316). Alternativamente, la mercaptopiruvato sulfurotransferasa (MST) también puede generar  $\text{H}_2\text{S}$ , y se localiza principalmente en la mitocondria pero también puede expresarse en el citosol (316). Las células en los distintos tejidos usualmente expresan estas enzimas diferencialmente. De hecho, la CSE y la CBS son las principales responsables

---

<sup>c</sup> El término " $\text{H}_2\text{S}$ " se usa en todo este texto para referirse a la mezcla de  $\text{H}_2\text{S}$  (sulfano o sulfuro de hidrógeno) y  $\text{HS}^-$  (sulfanuro o hidrógeno(sulfuro) (1-)) en rápido equilibrio ( $\text{p}K_{a1} = 6.98$  o  $6.76$  a  $25^\circ\text{C}$  o  $37^\circ\text{C}$ , (340), a menos que se especifique lo contrario.

de la producción de H<sub>2</sub>S en el sistema cardiovascular (315, 318) y el sistema nervioso (314, 319), respectivamente.



**Figura D1. Formación de H<sub>2</sub>S en mamíferos.** Se muestran las reacciones catalizadas canónicamente por la CBS y CSE (flechas continuas) y las reacciones no canónicas de estas enzimas utilizando cisteína como sustrato (flechas punteadas). También, se muestra la reacción catalizada por la MST, siendo el 3-mercaptopiruvato producto de la reacción de la cisteína aminotransferasa (CAT) que depende de piridoxal fosfato. Este esquema fue modificado de (320)

En cuanto al sistema respiratorio, Madurga y colaboradores demostraron la importancia de la producción de H<sub>2</sub>S, por parte de la CBS y la CSE, en la alveolarización y el desarrollo vascular pulmonar, así como en su homeostasis (321). Bazhanov y colaboradores resumen el importante rol que cumple el H<sub>2</sub>S en el desarrollo de las vías respiratorias, la fisiopatología de las enfermedades respiratorias y en la defensa antiviral (322). Como el pulmón es el primer órgano blanco del *Mtb* y donde este patógeno puede establecerse por décadas, algunos autores plantean que el H<sub>2</sub>S generado por el hospedero podría tener un rol en la fisiología de este patógeno (110). Esta teoría sería un aspecto a estudiar, ya que no tiene sustento experimental pero la base de la hipótesis

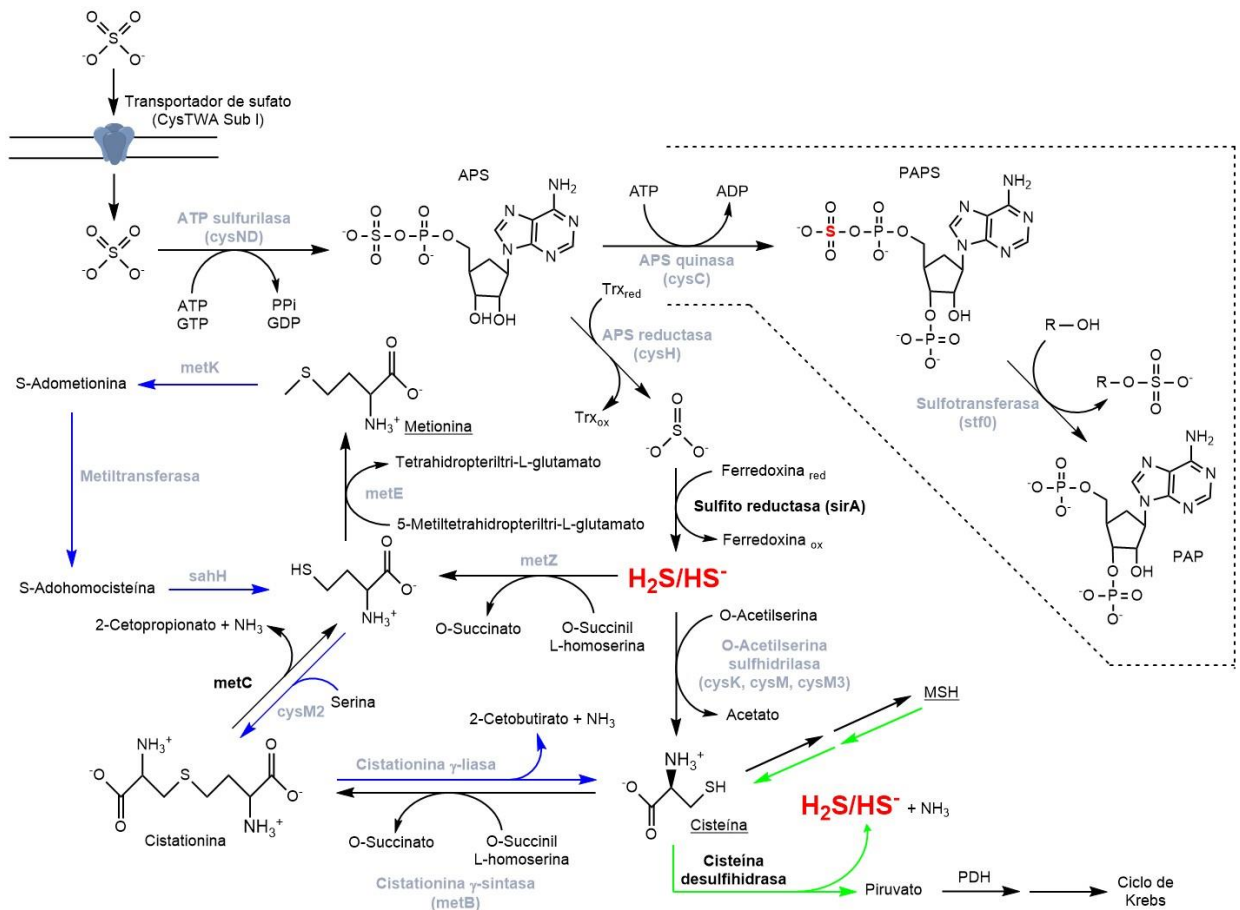
sería la evidencia de que la administración de bajas concentraciones de H<sub>2</sub>S a ratones puede inducir un estado de animación suspendida reversible disminuyendo la tasa metabólica (323, 324) y este estado podría ser análogo con la fase de dormencia del *Mtb* (110). Este aporte del hospedero, no tendría impedimentos desde el punto de vista fisicoquímico ya que como hablaremos más adelante, la química del H<sub>2</sub>S hace que este pueda difundir y atravesar membranas lipídicas (325).

Por otra parte, el propio bacilo es capaz de generar H<sub>2</sub>S como intermediario del metabolismo de compuestos azufrados que participan en diferentes funciones fisiológicas. Entre estos metabolitos con átomos de azufre en estado reducido podemos destacar a la Cys y la Met. La cisteína es incorporada en biomoléculas como proteínas, coenzimas y MSH. Otro metabolito importante de este grupo es la coenzima A, utilizada en el metabolismo lipídico y síntesis de ácidos micólicos (326).

Describiremos brevemente el metabolismo del azufre en el *Mtb* destacando las vías de generación de H<sub>2</sub>S. El bacilo puede obtener azufre a partir de la asimilación de sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), que es un anión abundante en el plasma humano llegando a concentraciones entre 300 a 500 μM (327). Existen transportadores de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> asociados a endosoma (327) que facilitarían el acceso a este anión al fagosoma infectado. Una vez allí, el sulfato atraviesa la membrana citoplasmática del bacilo mediante transporte activo utilizando el complejo CysTWA Subl ABC. El gen que codifica este transportador es esencial (328) y es robustamente regulado a la alta en condiciones de estrés oxidativo (128), en la adaptación a la fase de dormencia (329) y cuando el patógeno infecta macrófagos (330). En el citosol el sulfato se activa al condensarse al ATP y formar adenosina 5'-fosfosulfato (APS), en una reacción catalizada por la ATP sulfurilasa (cysD) (331). La formación de APS es un proceso energéticamente desfavorable, por lo que esta acoplada a la hidrólisis de GTP, catalizada por la GTPasa (cysN). Esta última forma un heterodímero con cysD y el ATP, conocido como cysND (331). El APS es una encrucijada metabólica en el *Mtb* (332), por ejemplo, cuando se necesita incorporar SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> a proteínas, lípidos y polisacáridos, el APS se fosforila por acción de una quinasa (cysC) en el hidroxilo en posición 3' dando 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato

(PAPS) el donador universal de grupo sulfato para las sulfotransferasas (332). La transferencia de grupos sulfato a grupos hidroxilo o amino de estas biomoléculas juega un rol muy importante en la regulación de la comunicación célula-célula y el metabolismo (333) (Figura D2 recuadro en punteado).

Alternativamente, la reductasa de APS (cysH) cataliza el primer paso comprometido para la biosíntesis de compuestos con azufre en estado reducido (334). En esta reacción el APS es reducido a sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) dando adenosina 5'-fosfato (AMP) (335, 336). El sistema Trx/TR/NADPH aporta el poder reductor necesario para esta reducción por dos electrones. CysH es expresada activamente durante la fase de dormencia y cuando el patógeno se encuentra en el macrófago (329, 330). Luego el  $\text{SO}_3^{2-}$  es reducido por 6 electrones a  $\text{H}_2\text{S}$  (Figura D2, líneas negras) en una reacción catalizada por la sulfito reductasa (sirA). Esta enzima contiene un centro 4Fe-4S y un grupo sirohemo (337). Los electrones vienen de la ferredoxina que se une transitoriamente a la sirA y transfiere uno a uno los electrones al centro 4Fe-4S. SirA es esencial (328) y su expresión es activa durante la fase de dormencia (329, 330). El  $\text{H}_2\text{S}$  es utilizado como fuente de azufre para la biosíntesis de novo de Cys, Met, coenzimas y MSH (338-340). La regulación transcripcional de varios genes involucrados en el metabolismo del azufre está a cargo del factor SigH (124).



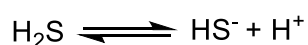
**Figura D2. Metabolismo del azufre en micobacterias.** La vía de sulfonilación se encuentra en el recuadro punteado. La vía de asimilación de sulfato, producción de  $H_2S$  por sirA y la formación de cisteína, metionina y MSH, se muestran con flechas negras. La vía de transulfuración reversa se muestra como flechas azules. El paso de formación  $H_2S$  por la cisteína desulfhidrasa se marca por flechas verdes. Figura modificada de (139).

El exhaustivo estudio del metabolismo del azufre con el objetivo del desarrollo de nuevas drogas contra el *Mtb* demostró la importancia de esta vía para la sobrevivencia del patógeno. Aunque, una observación interesante fue realizada por Wheeler y colaboradores al mostrar que cepas con defectos en el transporte y reducción de  $SO_4^{2-}$  podían ser rescatadas por el suplemento de Met marcada describiendo una vía de transulfuración reversa en micobacterias, utilizada para producir Cys a partir de Met (Figura D2, flechas azules) (341). También, en este trabajo se describió la existencia de actividad enzimática de una cisteína desulfhidrasa que ellos sugieren es encargada de la eliminación del exceso de Cys (341), que sería tóxico porque lleva a la producción de  $H_2O_2$  por autooxidación (342). Más tarde, Bzymek y colaboradores demostraron que cepas de *Mycobacterium smegmatis* deficientes en enzimas involucradas en la



síntesis de MSH, eran capaces de importar MSH proveniente del medio de cultivo suplementado en MSH y cuando estas cepas cargadas eran transferidas a un medio libre de MSH, este se catabolizaba a 1-O-(2-amino-2-deoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosil)-D-mio-inositol y acetil-cisteína que por acción de una desacetilasa daba Cys (343). Esta podría ser convertida en piruvato y H<sub>2</sub>S por la acción de la cisteína desulfhidrasa (Figura D2, flechas verdes). El piruvato es utilizado posteriormente para la generación de energía.

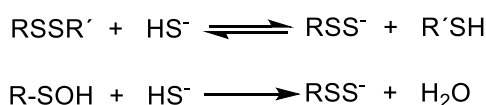
Observando la fórmula química del H<sub>2</sub>S se podría realizar un paralelismo con la molécula de agua (H<sub>2</sub>O). Primeramente, el átomo de azufre es más voluminoso y menos electronegativo que el átomo de oxígeno (344, 345), implicando un momento dipolar menor que el del H<sub>2</sub>O por lo que no se forman enlaces de hidrógeno por parte del H<sub>2</sub>S (345), lo cual explica que sea un gas a temperatura ambiente y presión atmosférica. Aun así, tiene una alta solubilidad en agua (100 mM/atm a 25 °C (325)), siendo la solvatación dominada por fuerzas dispersivas (345). El H<sub>2</sub>S posee una alta solubilidad en membranas lipídicas lo que resulta en una rápida difusión a través de las membranas celulares sin la asistencia de canales proteicos (325, 346, 347). En solución acuosa el H<sub>2</sub>S se comportara como un ácido diprótico débil con un pK<sub>a1</sub> = 6.98 o 6.76 a 25 °C o 37 °C (348), respectivamente,



por lo que a pH 7.4 encontramos se encuentra mayoritariamente como HS<sup>-</sup>. La segunda desprotonación tiene un pK<sub>a</sub> muy alto que no tiene relevancia a nivel biológico (316, 348). En cuanto a su reactividad, el H<sub>2</sub>S puede interaccionar con centros metálicos, ya sea coordinando iones metálicos (preferentemente como HS<sup>-</sup>), reduciendo el centro metálico y generando especies más oxidadas del sulfuro o modificando los grupos hemo de forma covalente (349). Además, el H<sub>2</sub>S puede reaccionar con oxidantes, el potencial de reducción por un electrón (E°' (HS<sup>-</sup>, H<sup>+</sup>/ H<sub>2</sub>S)) es +0.91 V (350) y el potencial de reducción por dos electrones (E°' (HSS<sup>-</sup>, H<sup>+</sup>/ 2HS<sup>-</sup>)) es -0.27 V (351).

La reacción de H<sub>2</sub>S con diferentes oxidantes por dos electrones, peroxinitrito, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hipoclorito, taurina cloramina, da como producto el ácido

sulfénico correspondiente (HSOH) siendo un intermediario inestable (352). Al realizar la comparación de la reactividad con oxidantes por dos electrones a pH 7.4 del H<sub>2</sub>S y tioles de bajo peso molecular biológicamente relevantes, como la Cys y el GSH, se puede observar que el HS<sup>-</sup> tiene una reactividad parecida y en algunos casos menor (353). Cabe destacar que el valor de pK<sub>a1</sub> del H<sub>2</sub>S es menor que el de la Cys y el GSH, 8.3 y 8.94, respectivamente (194), lo que se traduce en una mayor disponibilidad de la forma desprotonada del H<sub>2</sub>S a pH fisiológico, aspecto que contribuye a la paridad en las reactividades con respecto a los otros tioles. Sin embargo, la concentración de tioles de bajo peso molecular, como el GSH o MSH, en células es del orden de mM, mayor que la concentración de H<sub>2</sub>S por lo que se esperaría que la reacción directa de oxidantes por dos electrones con H<sub>2</sub>S pase a un segundo plano, poniendo en tela de juicio su rol "antioxidante". Finalmente, el H<sub>2</sub>S puede reaccionar con especies oxidadas de tioles como ácidos sulfénicos (R-SOH) y disulfuros (RSSR) formando persulfuros (RSSH/RSS<sup>-</sup>)<sup>d</sup>, como se muestra a continuación,



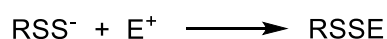
Los persulfuros son compuestos azufre sulfano, lo que significa que tienen un átomo de azufre unido a dos sulfuros o a un sulfuro y un hidrógeno ionizable. La formación de estas especies en proteínas ha ganado notoriedad ya que cada vez hay más evidencia en la literatura de que esta modificación pos-traducciona participa en la señalización y regulación celular (316, 354). Los persulfuros son considerados como intermediarios importantes en el metabolismo del azufre en bacterias, donde se producen en ciclos catalíticos enzimáticos (355, 356). Varias enzimas, algunas también presentes en los mamíferos, producen o transfieren estos grupos funcionales; estas incluyen, la CGL, la CBS (357), la MST (358), la sulfuro:quinona oxidorreductasa (359, 360) y la tiosulfato sulfurotransferasas (361, 362). Se ha propuesto que la persulfuración en ciertas cisteínas podría desencadenar cambios en la actividad de las proteínas efectoras, como la inhibición de la papaína (una

---

<sup>d</sup> En este texto, "persulfuro" se usa para la mezcla de RSSH y RSS<sup>-</sup> en rápido equilibrio al pH de la solución, a menos que se especifique lo contrario. RSSH, generalmente denominado hidropersulfuro o hidrodissulfuro en la bibliografía, se denomina hidrurodissulfuro, disulfanilo o ditióhidroperóxido por IUPAC.

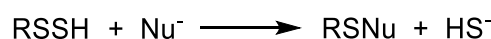
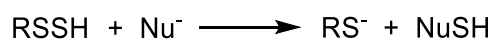
proteasa dependiente de Cys) (363), PTEN (fosfatasa lipídica) (364) y acuoporina-8 (canal de membrana) (365), entre otras. Alternativamente, se ha reportado que la persulfuración *in vivo* aumenta la polimerización de la actina (366) y la actividad de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, aunque este último efecto está aún en discusión (367). La persulfuración de parkina (ligasa de ubiquitina), aumenta su actividad (368) y esta modificación se encuentra disminuida en cerebros de individuos con enfermedad de Parkinson.

Químicamente, los persulfuros tienen propiedades ácido-base, la forma protonada (RSSH) puede ionizarse en agua a la forma aniónica correspondiente (RSS<sup>-</sup>) y se estima que la acidez de los persulfuros es mayor que la de los tioles del cual derivan. Hasta ahora, solo hay un valor de pK<sub>a</sub> estimado para el persulfuro de bajo peso molecular, el 2-[(3-aminopropil)amino]etano (pK<sub>a</sub>= 6.2) siendo más bajo que el tiol análogo (pK<sub>a</sub>= 7.6) (369). Datos no publicados en colaboración entre nuestro grupo, el dirigido por la Dra. Beatriz Álvarez de Facultad de Ciencias (Universidad de la República, Uruguay) y por el Dr. Darío Estrin de la Universidad de Buenos Aires indican que el pK<sub>a</sub> del persulfuro del GSH es de 5.5 (Benchoam y colaboradores, manuscrito en preparación). En cuanto a su reactividad, existe una dualidad funcional ya que pueden actuar como nucleófilos y electrófilos. La forma RSS<sup>-</sup> puede actuar como un nucleófilo, considerándose que tienen una mayor nucleofilicidad que el tiol análogo (363, 370),



La posible explicación a este comportamiento radica en el efecto alfa que atribuye el aumento de reactividad en un átomo debido a la presencia de un par de electrones desapareados en el átomo adyacente (275, 371). Este efecto sumado a la mayor disponibilidad de RSS<sup>-</sup> vs RSSH a pH fisiológico debido a su mayor acidez, hace que se considere a los persulfuros mejores nucleófilos que los tioles análogos (372).

A su vez, la forma RSSH se comporta como un electrófilo débil. Este puede reaccionar con nucleófilos dando como producto tioles cuando se ataca el azufre externo del persulfuro o H<sub>2</sub>S cuando el ataque es el azufre interno,



La dependencia sobre cual tiol sufrirá el ataque está determinada por efectos estéricos (373, 374) y la acidez del grupo saliente, siendo los mejores grupos salientes aquellos que tienen menor  $pK_a$ . En el caso de que el nucleófilo sea un tiol y el ataque sea en el átomo de azufre externo estaríamos frente a una reacción de transpersulfuración, dando como producto un tiol y el azufre sulfano transferido resulta en un nuevo persulfuro en el tiol atacante. La reducción de persulfuros proteicos por tioles puede constituir un mecanismo para prevenir la modificación irreversible de cisteínas en condiciones de estrés oxidativo (375-377). Incluso, se ha sugerido que los sistema Grxs y Trx tienen roles como despersulfurasas, en el caso de la Trx hay una transferencia del azufre sulfano a su tiol nucleofílico formando el persulfuro de Trx y regenerando el tiol original. Posteriormente, se generaría la Trx oxidada y  $\text{H}_2\text{S}$  (378-380). Alternativamente, cuando un tiol ataca el átomo de azufre interno del persulfuro, se libera  $\text{H}_2\text{S}$  y se forma un disulfuro mixto (381-383).

En este objetivo de la Tesis abordamos la formación y la reactividad de un persulfuro proteico, utilizando la *MtAhpE* como modelo. El hecho de que la enzima se purifique en cantidades importantes, haya sido estudiada en profundidad en nuestro laboratorio (142, 213, 247, 262, 263) y que el ácido sulfénico en la  $C_P$  de la *MtAhpE* (*MtAhpE*-SOH) sea relativamente estable (247, 261), facilitó el uso de esta Prx como modelo de persulfuro proteico. En concreto, nos enfocamos en la caracterización cinética de la reacción entre *MtAhpE*-SOH y  $\text{H}_2\text{S}$  para formar un persulfuro. Evaluamos la posibilidad de que el  $\text{H}_2\text{S}$  pueda actuar como un sustrato reductor de la *MtAhpE* y la contribución relativa de este posible rol fisiológico como reductor con respecto al sistema de reducción fisiológico de la *MtAhpE*, MSH/*MtMrx*-1 previamente descrito en nuestro grupo (142). Comparamos la reactividad del tiol y del persulfuro en la  $C_P$  de la *MtAhpE*, evaluando la cinética con sustratos específicos y reactivos inespecíficos de Prxs. Además, se exploró la posibilidad de la participación de las Prxs en las reacciones de transpersulfuración. Estos estudios formaron parte del proyecto de iniciación a la investigación financiado por CSIC, del que

fui, conjuntamente con el Dr. Ernesto Cuevasanta (Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay), investigador responsable. Los resultados fueron publicados en una revista "The Journal of Biological Chemistry" (221), en la que el Dr. Cuevasanta y yo somos primeros autores y compartimos la autoría de correspondencia.

## D.II. MATERIALES Y MÉTODOS

**Químicos.** El sulfuro de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) fue comprado a J.T. Baker o a Carlo Erba. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue obtenido de Mallinckrodt Chemicals. El DTNB, DTT, iodoacetamida, DTPA, butil hidroxitolueno (BHT) y sulfato de amonio ferroso ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ) fueron comprados a Sigma–Aldrich. La sal tetrasódica de 3,3'-Bis[N,N-bis(carboximetil)-aminometil] orto-cresol sulfonftaleína (naranja de xilenol) fue obtenida de AppliChem. La 4,4'-ditiodipiridina (DTDPy) fue obtenida de Acros Organics. La sonda de azufre sulfano 4 (SSP4, sulfane sulfur probe 4) y el  $\text{Na}_2\text{S}_2$  fueron obtenidos de Dojindo Molecular Technologies.

**Preparación de reactivos.** Las soluciones de  $\text{H}_2\text{S}$  fueron preparadas por pesada al disolver  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  en agua ultrapura con DTPA (0.1 mM) previamente degaseada por burbujeo con Argón en viales sellados en la oscuridad, y fueron usadas inmediatamente. Las soluciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fueron preparadas por dilución de una solución stock en agua ultra pura. El peroxinitrito fue sintetizado a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y ácido nitroso como se describió anteriormente en (55, 58) y se trató con dióxido de manganeso ( $\text{MnO}_2$ ) granular para eliminar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  remante (384). La contaminación con nitrito fue típicamente <30% de la concentración de peroxinitrito. Las soluciones del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) fueron preparadas como se describió previamente en (385). Las soluciones stock de DTDPy fueron preparadas por pesada en etanol 95%. La solución stock de SSP4 fue preparada en DMSO.

**Expresión y purificación de la proteína.** Fue realizada como se describió en el capítulo anterior.

**Determinación de la concentración de peróxidos.** La concentración de la solución stock de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue determinada espectrofotométricamente a 240 nm

( $\epsilon_{240} = 39.4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , (386)). La concentración de peroxinitrito fue determinada a pH alcalino espectrofotométricamente a 302 nm ( $1,705 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (387)).

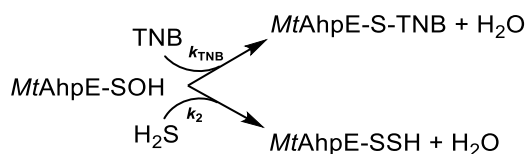
**Reducción de tioles proteicos y cuantificación.** La *MtAhpE* fue reducida mediante la preincubación con DTT (2 mM) durante 30 minutos a 4 °C inmediatamente antes de usar en los ensayos. El exceso del agente reductor fue removido por gel filtración usando una columna de desalado HiTrap (Amersham Bioscience) equilibrada con el amortiguador en el cual se iba a hacer el experimento. La elución de la *MtAhpE* reducida se realizó siguiendo la absorbancia a 280 nm de la proteína. La medida del contenido de tiol de la proteína se llevó a cabo utilizando DTNB midiendo absorbancia a 412 nm ( $\epsilon_{412} = 14,150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , (281)) o DTDPy midiendo absorbancia a 324 nm ( $\epsilon_{324} = 21,400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , (388)). Como se esperaba para la enzima reducida (*MtAhpE*-SH), se midió una concentración que se corresponde con un tiol por subunidad proteica.

**Preparación de los derivados de la *MtAhpE*.** La forma de la *MtAhpE* oxidada a ácido sulfénico (*MtAhpE*-SOH) fue obtenida por el tratamiento de la enzima reducida con una concentración equimolar de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) con DTPA (0.1 mM), pH 7.4 y 25 °C. Los tiempos de incubación requeridos para que la reacción se completara en las condiciones experimentales empleadas se determinaron mediante simulaciones cinéticas utilizando Gepasi (389) a partir de la constante de oxidación reportada previamente (247). El derivado del persulfuro de la *MtAhpE* (*MtAhpE*-SSH) se preparó adicionando  $\text{H}_2\text{O}_2$  a *MtAhpE*-SH en presencia de  $\text{Na}_2\text{S}$ , en condiciones equimolares (1  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 1 *MtAhpE*-SH: 1  $\text{Na}_2\text{S}$ ). Dado que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  reacciona varios órdenes de magnitud más rápido con *MtAhpE*-SH que con  $\text{H}_2\text{S}$  ( $8.2 \times 10^4$ , (247) vs  $0.35 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , (390) a pH 7.4 y 25 °C, respectivamente), se forma *MtAhpE*-SOH, que a su vez reacciona con  $\text{H}_2\text{S}$  para formar *MtAhpE*-SSH.

**Detección de *MtAhpE*-SSH por espectrometría de masas ESI-Q.** La detección del persulfuro se llevó a cabo en mezclas de *MtAhpE*-SH (10  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{Na}_2\text{S}$  (10  $\mu\text{M}$ ) tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10  $\mu\text{M}$ ) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) con DTPA (0.1 mM), pH 7.4 y 25 °C. En diferentes tiempos de incubación, se añadió iodoacetamida (40 mM) y se incubó durante 30 minutos a 25 °C. El

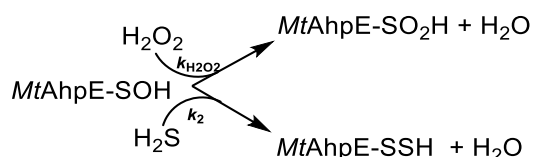
exceso de agente alquilante se eliminó por gel filtración utilizando mini columnas de filtración en gel, PD SpinTrap G-25 (GE), equilibradas en amortiguador bicarbonato de amonio (20 mM) a pH 7.4 y 25 °C. Después de esta etapa de gel filtración, algunas muestras se trataron adicionalmente con DTT (2 mM) (capaz de reducir disulfuros formados como productos de alquilación de persulfuros pero no a los productos de alquilación de tioles) antes del análisis. Todas las muestras se cargaron en una columna C4 (GraceVydac 214MS5115) para la separación por HPLC. La fase móvil consistió en 0.1% de ácido fórmico en agua ultrapura (solvente A) y 0.1% de ácido fórmico en CH<sub>3</sub>CN (solvente B) y la elución de la proteína se realizó con un gradiente lineal de 10 min de solvente B (5-50%) seguido de 10 min adicionales a 50% de disolvente B a 100 µL/min. Se empleó un espectrómetro de masas ESI-triple cuádruplo (QTrap4500, ABSciex) para la detección. El espectrómetro se ajustó en modo positivo Q1 en el rango de 500-2000 m/z con una velocidad de escaneo de 200 Da/s y la resolución Q1 en UNIDAD. Los parámetros utilizados fueron: IS: 5000; TEM: 300; DP: 120; EP: 10; CUR: 20; GS1: 30; GS2: 20. La adquisición de datos se realizó utilizando el software Analyst 1.6.2 (ABSciex) y PeakView 2.2 para el análisis de datos y la desconvolución de todos los espectros. Las determinaciones de espectrometría de masa se llevaron a cabo en colaboración con el Msc. Mauricio Mastrogiovanni del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina y CEINBIO, Universidad de la República, Uruguay.

**Cinética de la reacción entre el H<sub>2</sub>S con *MtAhpE*-SOH.** La cinética de esta reacción fue determinada por 2 ensayos de competencia utilizando un espectrofotómetro/fluorímetro de flujo detenido SX20 Applied Photophysics con detectores de absorbancia o fluorescencia. En el primer ensayo se evaluó la competencia entre el sulfuro de hidrógeno y el “tiol amarillo” TNB por el *MtAhpE*-SOH, como se ejemplifica en el siguiente esquema de reacciones,



El *MtAhpE*-SOH (1.4  $\mu\text{M}$ ) fue mezclado con soluciones de  $\text{Na}_2\text{S}$  (0-50  $\mu\text{M}$ ) y TNB (30  $\mu\text{M}$ ) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) con DTPA (0.1 mM), pH 7.4 y 25  $^\circ\text{C}$ , y se siguió la absorbancia a 412 nm ( $\epsilon_{412} = 14,150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (281)). Los registros de absorbancia mostraron cursos temporales bifásicos, una primera fase de caída de absorbancia siguió a otra más lenta de recuperación de la misma. Ajustando estos cambios de absorbancia, en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de  $\text{Na}_2\text{S}$ , a decaimientos exponenciales más recta se obtuvieron ls  $k_{\text{obs}}$ . Para determinar la constante de segundo orden ( $k_2$ ) de la reacción entre el *MtAhpE*-SOH y el  $\text{H}_2\text{S}$ , se graficó la  $k_{\text{obs}}$  vs la concentración de este último, utilizada en las mezclas y de la pendiente de este gráfico obtenida por un ajuste lineal se determinó el valor de la  $k_2$ .

En el segundo ensayo se analizó la competencia entre el  $\text{H}_2\text{S}$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  por el *MtAhpE*-SOH siguiendo la intensidad de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}}$  295 nm, emisión de fluorescencia total), como se ejemplifica en el siguiente esquema de reacciones,



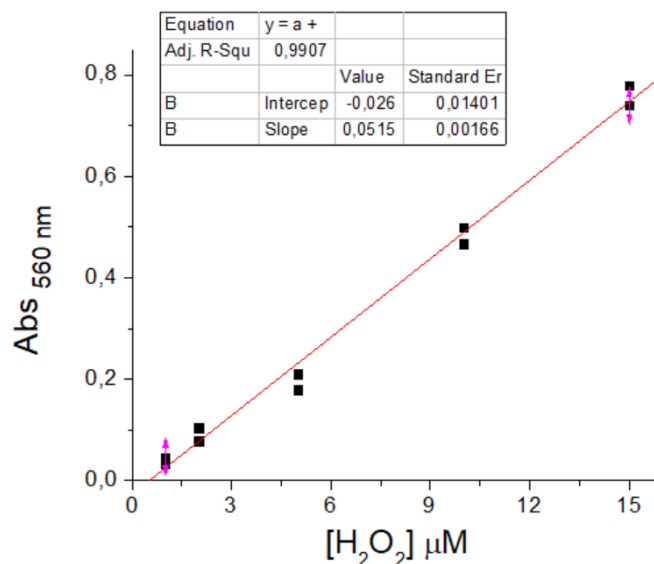
En trabajos previos, demostramos que durante la oxidación de *MtAhpE*-SH a *MtAhpE*-SOH ocurre una disminución de la fluorescencia intrínseca de la proteína, mientras que durante la sobreoxidación a *MtAhpE*-SO<sub>2</sub>H dicha fluorescencia vuelve a aumentar (247). Se mezcló *MtAhpE*-SH (1  $\mu\text{M}$ ) en ausencia o presencia de  $\text{Na}_2\text{S}$  (1  $\mu\text{M}$ ) con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10, 100, 250  $\mu\text{M}$ ) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) con DTPA (0.1 mM), pH 7.4 y 25  $^\circ\text{C}$ . El curso temporal del cambio de fluorescencia fue ajustado a un modelo de reacciones usando el programa de simulación computacional DynaFit (391) considerando las concentraciones iniciales de los reactivos y la constante de velocidad de oxidación de la *MtAhpE*-SH previamente reportada (247). La constante de sobreoxidación y de la reacción entre el  $\text{H}_2\text{S}$  frente con al *MtAhpE*-SOH fueron obtenidas como resultado de la simulación.



**Reactividad de *MtAhpE*-SSH hacia DTDPy.** Se utiliza este disulfuro sintético porque tiene una alta reactividad intrínseca, ya que la reacción se puede seguir por absorbancia la aparición del producto de la reacción (4-tiopiridona) y se puede usar en condiciones de pseudo primer orden, de modo que la concentración de persulfuro no necesita ser conocida exactamente y porque antes se utilizó para estudiar la reactividad del persulfuro de la HSA (HSA-SSH) (372). Además, constituye un "sustrato" inespecífico para *MtAhpE*, que permitiría evaluar la reactividad del tiol y del persulfuro en ausencia de aspectos de especificidad. Se preparó *MtAhpE*-SOH (1.3  $\mu\text{M}$ ) como se describe anteriormente en una jeringa del espectrofotómetro de flujo detenido. Luego, se agregó  $\text{Na}_2\text{S}$  (1.3  $\mu\text{M}$ ) para iniciar la formación de *MtAhpE*-SSH. Esta solución se mezcló a diferentes tiempos de envejecimiento con DTDPy (100-700  $\mu\text{M}$ ) y se registró la absorbancia a 324 nm ( $\epsilon_{324} = 21,400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (388)). Los datos se ajustaron a funciones exponenciales dobles para obtener los valores de  $k_{\text{obs}}$  y las amplitudes de las fases. La constante de velocidad de la reacción de *MtAhpE*-SSH con DTDPy se calculó a partir de la pendiente de la gráfica de las  $k_{\text{obs}}$  para la fase rápida vs la concentración de DTDPy obtenida para mezclas de *MtAhpE*-SH,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{Na}_2\text{S}$  envejecido durante al menos 900 s. Este tiempo fue suficiente para que se completara la reacción de persulfuración de la enzima en las condiciones experimentales ensayadas, de acuerdo a la constante obtenida por nosotros por los métodos de competencia descritos más arriba.

**Reactividad de *MtAhpE*-SSH frente a peroxinitrito y  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** Se siguió el decaimiento de peroxinitrito (12  $\mu\text{M}$ ) espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 310 nm en ausencia o en presencia de *MtAhpE*-SH, *MtAhpE*-SOH o *MtAhpE*-SSH (14.6  $\mu\text{M}$ ) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) con DTPA (0.1 mM), pH 7.4 y 25 °C, usando un espectrofotómetro de flujo detenido. A su vez se siguió la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por las diferentes formas de la *MtAhpE* utilizando el método de FOX (213, 392). Brevemente, se mezcló *MtAhpE*-SH, *MtAhpE*-SOH o *MtAhpE*-SSH (45  $\mu\text{M}$ , en cada condición) con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) en amortiguador fosfato de sodio (50 mM) pH 7.4 y 25 °C. Se tomaron alícuotas (100  $\mu\text{L}$ ) a diferentes tiempos y se las incubó con el reactivo de FOX (900  $\mu\text{L}$ ) durante 30 minutos a temperatura ambiente para luego medir

absorbancia a 560 nm. El  $\epsilon_{560}$  para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se determinó a través de una curva de calibración utilizando concentraciones conocidas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dando un valor de  $51,520 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Figura D3) que es cercano al previamente reportado en (213).

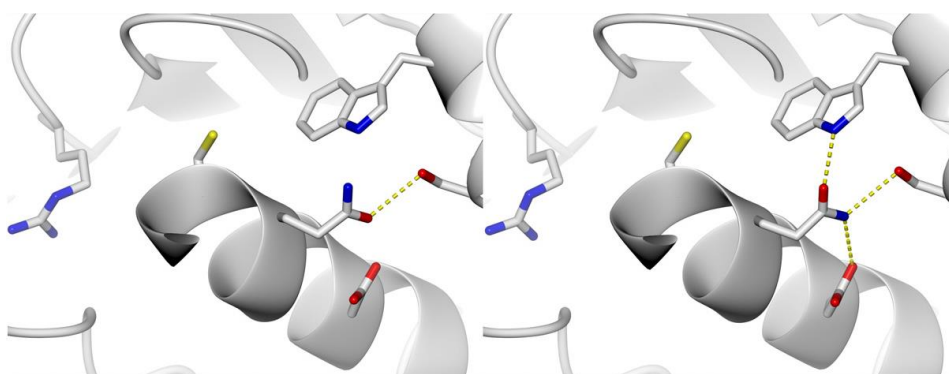


**Figura D3. Cuantificación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por método de FOX.** Se representa la curva de calibración donde se representa la absorbancia del complejo que forma el naranja de xilenol con el  $\text{Fe}^{3+}$  en función de concentraciones conocida de  $\text{H}_2\text{O}_2$  preparadas de un stock previamente cuantificado. De la pendiente del grafico se obtiene el  $\epsilon_{560}$  para el  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Las constantes de velocidad de segundo orden de la reducción de estos oxidantes por las diferentes formas de la *MtAhpE* se estimaron a partir de las velocidades iniciales de la reacciones (393).

**Consumo catalítico de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{S}$  por *MtAhpE*.** Se mezclaron en viales sellados  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $125 \mu\text{M}$ ) y  $\text{Na}_2\text{S}$  ( $250 \mu\text{M}$ ) en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de *MtAhpE*-SH ( $5$ - $29 \mu\text{M}$ ) en amortiguador fosfato de sodio ( $100 \text{ mM}$ ) con DTPA ( $0.1 \text{ mM}$ ), pH  $7.4$  y  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Se extrajeron muestras con jeringas herméticas y el  $\text{H}_2\text{S}$  remanente se determinó mediante el método del azul de metileno (394). Alternativamente, las mismas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{Na}_2\text{S}$  utilizadas en el experimento anterior se mezclaron en ausencia o presencia de *MtAhpE*-SH ( $2.9 \mu\text{M}$ ) en amortiguador fosfato de sodio  $50 \text{ mM}$ , pH  $7.4$  y  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y se determinó el  $\text{H}_2\text{O}_2$  remanente por el método de FOX como se describe arriba.

**Dinámica molecular de *MtAhpE*-SH y *MtAhpE*-SSH.** La DM del dímero *MtAhpE* se realizó a partir de las estructuras del tiolato de *MtAhpE*-SH (*MtAhpE*-S<sup>-</sup>) y del persulfuro (*MtAhpE*-SS<sup>-</sup>). Se utilizó como estructura inicial, la estructura cristalográfica recientemente revisada de *MtAhpE* (PDB<sub>ID</sub>= 4X0X, (264)) para la *MtAhpE*-S<sup>-</sup>. Esta estructura fue depositada por el grupo del Dr. Joris Messens, la cual se determinó realizando un análisis de los datos de la estructura cristalográfica de la *MtAhpE* depositada por Li (PDB<sub>ID</sub>= 1XXU, (261)) utilizando un software más moderno (395). La justificación de este grupo para realizar el nuevo refinamiento de la estructura era que durante simulaciones de DM de 30 nanosegundos de duración ocurría una desestabilización del sitio activo de la enzima (264). En nuestros experimentos de DM con la estructura 1XXU de 100 nanosegundos de duración, nunca observamos una desestabilización del sitio activo. Si bien nuestra posición es contradictoria a lo visto por este grupo, reconocemos que el nuevo refinamiento de la estructura de la *MtAhpE* es adecuado, como el ejemplo que se puede ver en la Figura D4 donde se reasigna la posición de la Gln46.



**Figura D4. Sitio activo de la *MtAhpE* con Cys45 en estado reducido.** Izquierda: representación de la hélice- $\alpha_2$  en la estructura 1XXU (261). Derecha: la estructura 4X0X, (264), la cadena lateral Gln46 invertida optimiza la red local de enlace de hidrógeno con Asp50, Trp80 y Ser84. Figura tomada de (395)

El modelo inicial de persulfuro se generó mediante una modificación de la estructura de la *MtAhpE* oxidada (PDB<sub>ID</sub>= 4X1U) (264) en la que el ácido sulfénico se transformó *in silico* a la forma *MtAhpE*-SS<sup>-</sup>. Los parámetros clásicos para simular el persulfuro de la C<sub>P</sub> se desarrollaron utilizando protocolos estándar (396). Se ejecutó el mismo protocolo de DM para ambos modelos iniciales que hemos realizado anteriormente para esta y otras enzimas relacionadas (262, 263, 397). Brevemente, el sistema se solvató con una caja

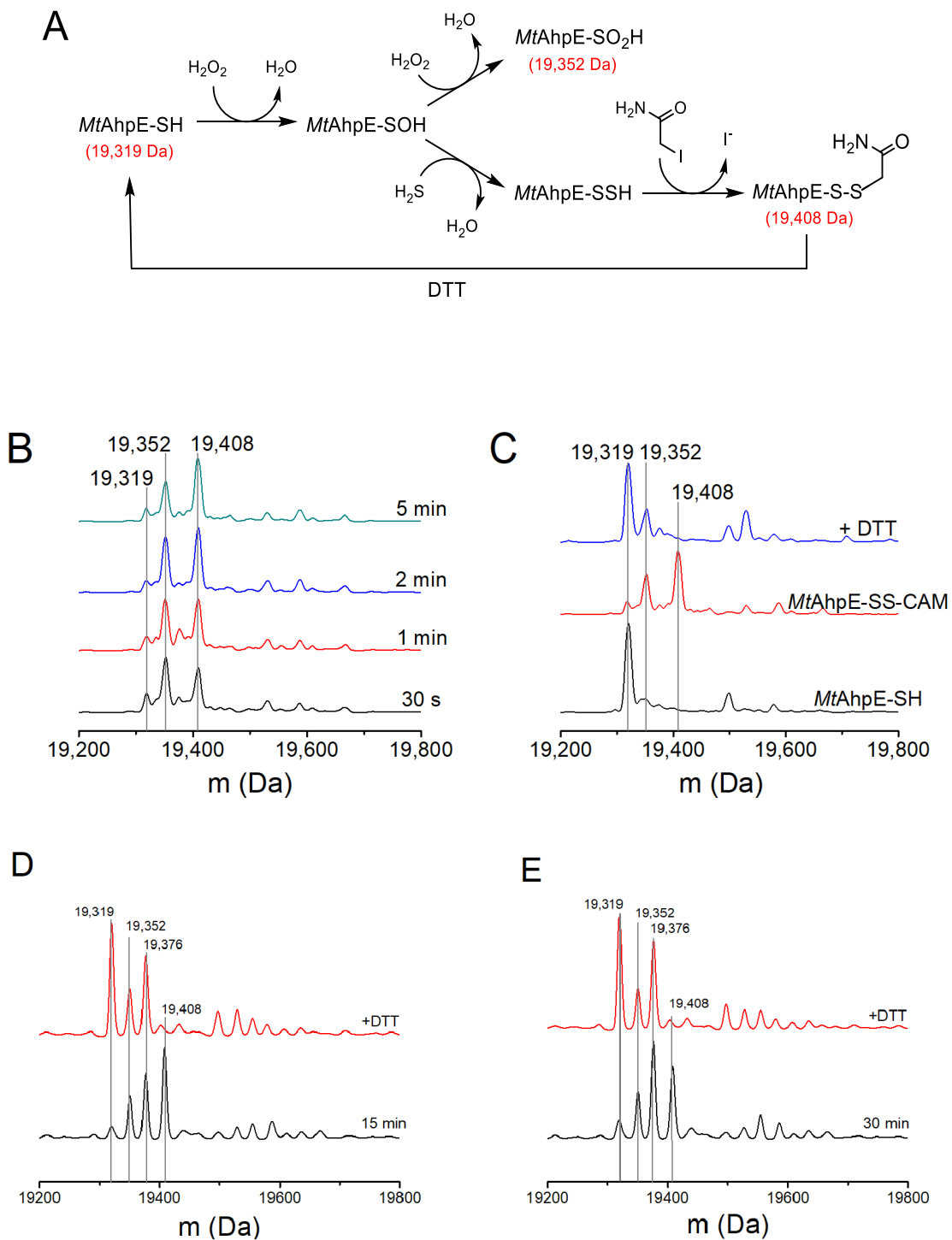
octaédrica de 12 Å de radio con moléculas de agua TIP3P (283). Con la excepción del persulfuro de C<sub>P</sub> en el modelo *MtAhpE-SS*<sup>-</sup>, los parámetros de residuos aminoacídicos corresponden al campo de fuerza Ambar parm14SB (398). Todas las simulaciones se realizaron en condiciones periódicas de frontera con un valor de corte de 10 Å y el método de sumas de Ewald (PME) para el tratamiento de las interacciones electrostáticas. Las longitudes de enlace de hidrógeno se mantuvieron en su distancia de equilibrio utilizando el algoritmo SHAKE, mientras que la temperatura y la presión se mantuvieron constantes con un termostato y baróstato de Langevin, respectivamente, tal como se aplica en el programa AMBER14. El sistema fue optimizado en 1000 pasos (10 en gradiente en pasos y el resto con gradiente conjugado). Entonces, fue lentamente calentado de 0 a 300 K durante 20 picosegundos a presión constante, con el termostato de Berendsen, y la presión se equilibró a 1 bar por 5 picosegundos. Después de estos dos pasos, se realizó una simulación de DM larga de 10 nanosegundos a temperatura constante (300 K) y volumen constante. También se llevaron a cabo simulaciones de DM sin restricciones de 700 nanosegundos en el *ensemble* NTP. Todas las visualizaciones de las dinámicas y las representaciones de las moléculas fueron realizado con VMD 1.9.1 (291). Estos estudios fueron llevados a cabo en colaboración con el Dr. Ari Zeida.

**Transferencia del azufre sulfano del *MtAhpE-SSH* al tiol de SSP4.** El *MtAhpE-SOH* se preparó mediante la incubación de *MtAhpE-SH* (4 µM) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4 µM) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) con DTPA (0.1 mM), pH 7.4 y 25 °C durante 2 min. El *MtAhpE-SSH* se formó mediante la adición de Na<sub>2</sub>S (4 µM) a las preparaciones de ácido sulfénico. Luego de un tiempo de incubación de 15 minutos, las muestras se diluyeron dos veces y se añadió SSP4 (20 µM) (DMSO al 4% después de la dilución). La transferencia del azufre sulfano a un tiol de la sonda conduce a la formación de un persulfuro, que se somete a una ciclación espontánea para liberar un fluoróforo (399, 400). La emisión de fluorescencia a 515 nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 482$  nm) se registró en un lector de placas Varioskan Flash (Thermo). Las curvas de calibración se realizaron con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> asumiendo la equimolaridad entre azufre sulfano y Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> en soluciones de referencia. El rendimiento de la transferencia del azufre sulfano a la sonda

se estimó en función de la amplitud del ajuste del aumento de fluorescencia a una función exponencial.

### D.III. RESULTADOS

**Detección del persulfuro de la *MtAhpE*.** La formación del *MtAhpE*-SSH a partir de la reacción entre  $H_2S$  y *MtAhpE*-SOH se reveló mediante la detección del producto de la reacción alquilado por iodoacetamida y su posterior reducción a *MtAhpE*-SH por DTT (Figura D5A). Se detectó una especie con un peso molecular (PM) de 19,408 Da, consistente con el derivado S-carbamidometilo del persulfuro de la  $C_P$  (*MtAhpE*-SS-CAM), cuando se mezclaron concentraciones equimolares de *MtAhpE*-SH (19,319 Da),  $H_2S$  y  $H_2O_2$  en diferentes tiempos de incubación. La especie ya estaba presente luego de 30 segundos después del agregado del alquilante a la mezcla y los rendimientos máximos se obtuvieron después de 2 a 5 minutos (Figura D5B). El *MtAhpE*-SSH fue relativamente estable, ya que aún podía detectarse después de tiempos de incubación de 15 y 30 minutos antes del agregado del alquilante (Figura D5D), aunque la señal del derivado *MtAhpE*-SS-CAM disminuyó, mientras que la correspondiente a *MtAhpE* reducida alquilada (*MtAhpE*-S-CAM, 19,376 Da) aumentó en comparación a los tiempos de incubación más cortos. No se detectaron derivados de polisulfuro de la *MtAhpE* modificados (es decir, *MtAhpE*-SS<sub>n</sub>S-CAM, con  $n \geq 1$ ) en estas condiciones experimentales. El *MtAhpE*-SS-CAM, un disulfuro asimétrico, se redujo mediante tratamiento con DTT para formar el tiol original (19,319 Da) (Figura D5C, D, E). Dado que el DTT es agregado luego de la remoción del exceso de alquilante por gel filtración, no se detectó enzima reducida alquilada en estas condiciones. Además, se detectó un pico correspondiente a 19,352 Da en todas las muestras, y fue particularmente evidente en aquellas en las que *MtAhpE*-SH se incubó con  $H_2S$  y  $H_2O_2$ . Dado que esta especie se mantuvo después de la adición de la DTT, lo más probable es que refleje la presencia de la proteína sobreoxidada del ácido sulfínico (*MtAhpE*-SO<sub>2</sub>H) y no una forma persulfuro sin alquilar (*MtAhpE*-SSH), ya que ambas especies coinciden en el PM.

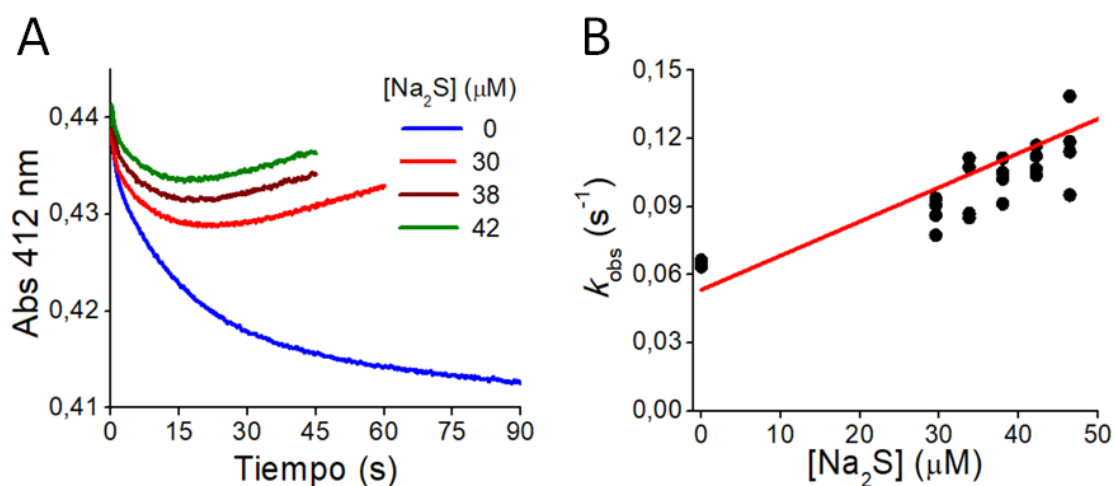


**Figura D5. Detección de persulfuro en *MtAhpE*.** (A) Esquema de la formación del persulfuro y la derivatización con iodoacetamida. Las especies están representadas en su estado protonado por simplicidad. (B) Deconvolución de los espectros de masas de las mezclas de reacción de *MtAhpE*-SH (10  $\mu$ M),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10  $\mu$ M) y  $\text{Na}_2\text{S}$  (10  $\mu$ M) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) más DTPA (0.1 mM), pH 7.4, 25  $^\circ\text{C}$ . Después de los tiempos de incubación indicados (30s, 1, 2, 5 min), las muestras se trataron con iodoacetamida (40 mM) durante 30 min y el exceso de fue descartado por gel filtración. (C) Deconvolución de los espectros de masas de la *MtAhpE*-SH solo (negro) o incubados con  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{Na}_2\text{S}$  durante 5 min y tratados con iodoacetamida y gel filtrado como en (A), antes (rojo) o después del tratamiento con DTT (2 mM) (azul). (D) y (E). Deconvolución de los espectros de masas de la *MtAhpE*-SH

incubado con  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{Na}_2\text{S}$  durante 15 min (D) y 30 min (E) tratados con iodoacetamida y gel filtrado como en (A), antes (negro) o después del tratamiento con DTT (2 mM) (rojo).

### Cinética de la reacción del $\text{H}_2\text{S}$ con el ácido sulfénico de *MtAhpE*.

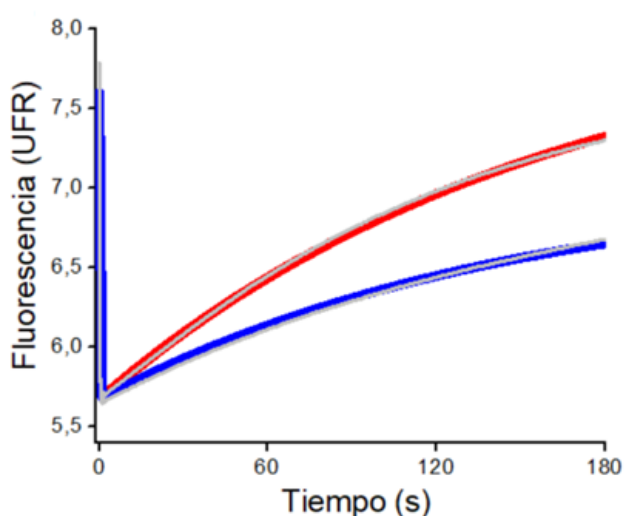
Para evaluar la cinética de la reacción de la formación del persulfuro, se llevaron a cabo dos ensayos de competencia. En el primero  $\text{H}_2\text{S}$  y TNB compiten por el *MtAhpE*-SOH, como se representa en Materiales y Métodos. La incubación de *MtAhpE*-SOH con el TNB en condiciones de pseudo-primer orden en ausencia de  $\text{H}_2\text{S}$  (Figura D6A, trazo azul) reprodujo observaciones previas y confirmó la constante de velocidad de segundo orden de la reacción directa entre *MtAhpE*-SOH y TNB,  $(2.2 \pm 0.3) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (247). La reacción da como producto un disulfuro mixto (*MtAhpE*-S-TNB) que reaccionó lentamente con una segunda molécula de TNB regenerando la enzima reducida, como se reportó anteriormente (247). Cuando el *MtAhpE*-SOH se mezcló con TNB en presencia de  $\text{H}_2\text{S}$ , las constantes de velocidad observadas de la descomposición de TNB ( $k_{\text{obs}}$ ) aumentaron linealmente con la concentración de  $\text{H}_2\text{S}$  mientras que las amplitudes disminuyeron (Figura D6A y D6B), como se espera para la cinética de la competencia. Se obtuvo una constante de velocidad de segundo orden de  $(1.4 \pm 0.2) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para la reacción de  $\text{H}_2\text{S}$  con *MtAhpE*-SOH (pH 7.4, 25 °C). El *MtAhpE*-S-TNB reaccionó con el  $\text{H}_2\text{S}$  en exceso y produjo TNB, lo que explica los aumentos lineales en la absorbancia después de los decaimientos exponenciales de TNB en la Figura D6A.



**Figura D6. Ensayo de competencia de  $\text{H}_2\text{S}$  y TNB hacia *MtAhpE*-SOH.** (A) Cursos temporales de la disminución de la absorbancia del TNB (30  $\mu\text{M}$ ) cuando se mezclan con *MtAhpE*-SOH (1.4  $\mu\text{M}$ , trazo azul) y concentraciones crecientes de  $\text{Na}_2\text{S}$  (30  $\mu\text{M}$  trazo rojo, 38  $\mu\text{M}$  trazo bordo, 42  $\mu\text{M}$  trazo verde) en

amortiguador fosfato de sodio (100 mM) mas DTPA (0.1 mM), pH 7.4, 25 °C. (B)  $k_{obs}$  obtenidas del ajuste a un decaimiento exponencial de la fase de caída de la absorbancia en función de la concentración de  $\text{Na}_2\text{S}$ .

Un segundo enfoque para determinar la cinética de la reacción de  $\text{H}_2\text{S}$  con *MtAhpE*-SOH consistió en un ensayo de competencia con la reacción de sobreoxidación a *MtAhpE*-SO<sub>2</sub>H cuando la enzima es expuesta a un exceso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La sobreoxidación provoca cambios en la emisión de fluorescencia intrínseca en la enzima (213, 247). La rápida oxidación de *MtAhpE*-SH produjo un rápido descenso de la fluorescencia debido a la formación de *MtAhpE*-SOH, que es consistente con la constante de velocidad anteriormente reportada de  $8.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4 y 25 °C (247). Una segunda fase de la reacción mostró una recuperación lenta de la emisión debido a la sobreoxidación a *MtAhpE*-SO<sub>2</sub>H por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  remanente (247). La presencia de  $\text{H}_2\text{S}$  produjo cambios en la amplitud y en las constantes de velocidad observadas en esta segunda fase (Figura D7). El ajuste global de los cambios de fluorescencia de acuerdo con un modelo de competencia simple, como se describe en Materiales y Métodos, indica una constante de velocidad de  $(1.0 \pm 0.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para la reacción de  $\text{H}_2\text{S}$  con *MtAhpE*-SOH, que es similar al valor determinado utilizando la competencia con TNB. Además, la constante de velocidad de sobreoxidación producida por el ajuste global fue de  $60 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , que si bien es algo mayor, es cercano al valor reportado anteriormente (247).

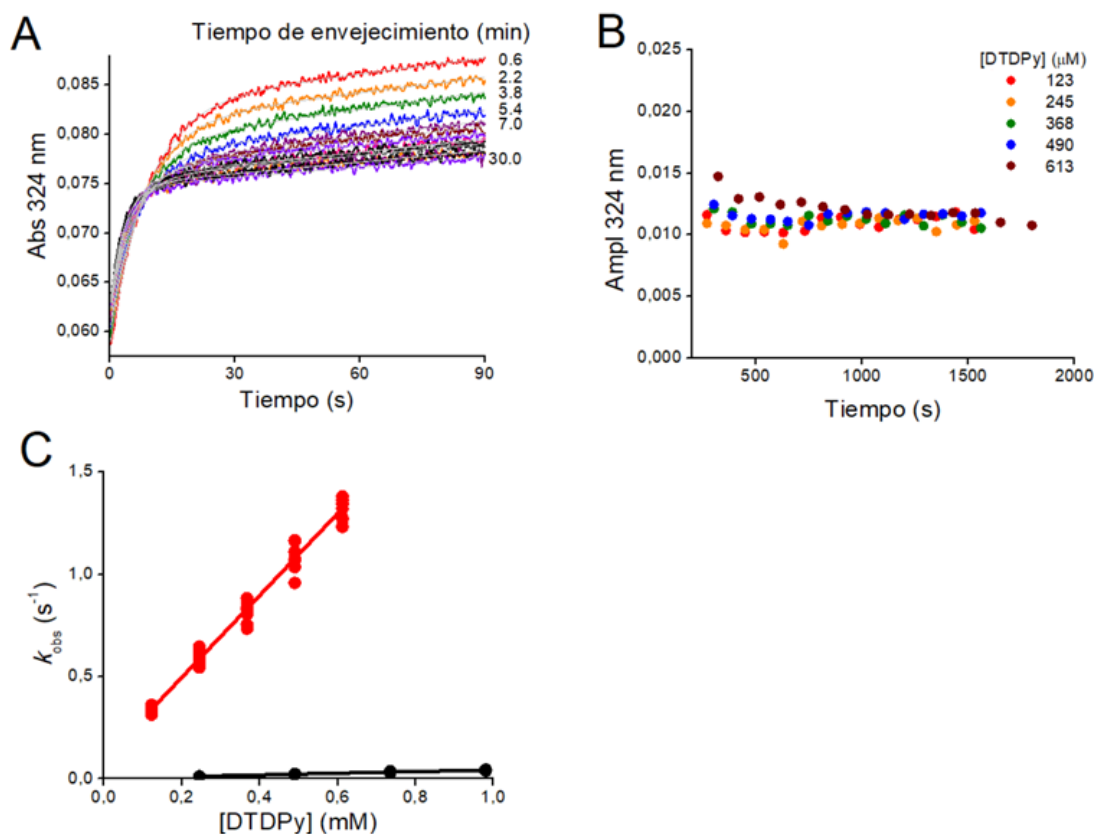


**Figura D7. Ensayo de competencia de  $\text{H}_2\text{S}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  por el *MtAhpE*-SOH.** Cursos temporales de los cambios de fluorescencia intrínseca de la *MtAhpE*-SH ( $1 \mu\text{M}$ ) cuando se mezclan con  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $100 \mu\text{M}$ ) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) más DTPA (0.1 mM), pH 7.4, 25 °C (rojo). El trazo azul muestra



el efecto del agregado de Na<sub>2</sub>S (1 μM) en la mezcla de reacción. Los datos obtenidos de los cursos temporales fueron ajustados al modelo de reacciones descriptos en Materiales y Métodos para determinar la constante de velocidad (trazos en gris).

**Reactividad del persulfuro *MtAhpE* con un reactivo no específico, DTDPy.** La estabilidad relativa del derivado de persulfuro de esta Prx facilitó el estudio de su reactividad. Se evaluó la cinética de la reacción del persulfuro hacia el disulfuro electrófilo, DTDPy. Una mezcla de *MtAhpE*-SOH y H<sub>2</sub>S se envejeció durante períodos de tiempo crecientes y se mezcló con DTDPy en condiciones de pseudo-primer orden (Figura D8). Se siguió la absorbancia a 324 nm de la 4-tiopiridona liberada por reacción de DTDPy con H<sub>2</sub>S y *MtAhpE*-SSH y la cinética mostró un perfil bifásico. La fase rápida, atribuible a la reacción de *MtAhpE*-SSH con DTDPy, aumentó su amplitud durante los primeros 5 minutos mientras se producía lentamente *MtAhpE*-SSH, como se esperaba de las concentraciones de *MtAhpE*-SOH y H<sub>2</sub>S, y la constante de velocidad de  $(1.4 \pm 0.2) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  reportada en este trabajo. Después de aproximadamente 400 s, la amplitud de la fase rápida se hizo constante, lo que demuestra que todo el persulfuro se formó y se mantuvo estable durante al menos 30 minutos en estas condiciones experimentales (Figura D8B). A partir de la amplitud de la fase rápida, la cantidad de *MtAhpE*-SSH formada se calculó como 1.1 μM, representando el 81% del total de *MtAhpE*. La fase lenta que disminuyó en amplitud con el tiempo, se atribuyó a la reacción de H<sub>2</sub>S con DTDPy, y tuvo una constante de velocidad de  $545 \pm 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4 y 25 °C. Dado que a aproximadamente 900 s, la formación de *MtAhpE*-SSH había alcanzado una meseta mientras se había agotado el H<sub>2</sub>S, se realizaron experimentos con concentraciones variables de DTDPy después de este período de envejecimiento. Las  $k_{\text{obs}}$  para la fase rápida aumentaron linealmente con la concentración de DTDPy (Figura D8C). A partir de la pendiente, se calculó la constante de velocidad de segundo orden para la reacción de *MtAhpE*-SSH con DTDPy como  $(1.8 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4 y 25 °C. En comparación, la constante de velocidad para la reacción de *MtAhpE*-SH con DTDPy fue de  $42 \pm 8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  en las mismas condiciones (Figura D8C).

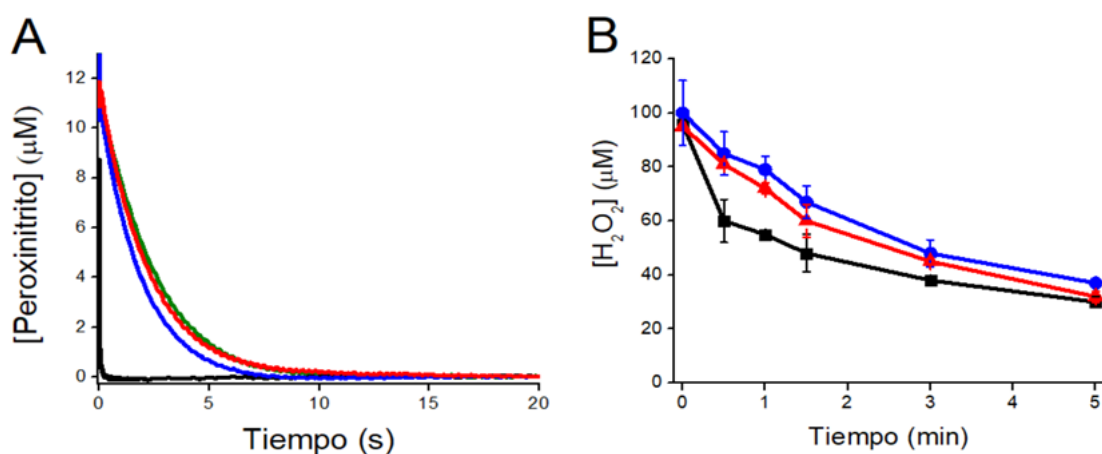


**Figura D8. Reactividad del *MtAhpE-SSH* hacia el electrófilo, DTDPy.** (A) El persulfuro se preparó mediante la incubación de *MtAhpE-SH* (1.30  $\mu\text{M}$ ) con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1.29  $\mu\text{M}$ ) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) más DTPA (0.1 mM) (pH 7.4, 25 °C) durante 3 min. Luego, se agregó  $\text{Na}_2\text{S}$  (1.29  $\mu\text{M}$ ) y se mezcló con DTDPy (123  $\mu\text{M}$ ) cada 1.5 min en un espectrofotómetro de flujo detenido. (B) Se muestra la amplitud de los experimentos realizados en A pero con concentraciones crecientes de DTDPy. Las variaciones en la amplitud de la fase rápida revelan el tiempo para la formación de *MtAhpE-SSH*. (C) Después de envejecer mezclas de *MtAhpE-SH*,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{Na}_2\text{S}$  durante aproximadamente 900 s, las muestras se mezclaron con concentraciones variables de DTDPy y se determinaron las  $k_{\text{obs}}$  en la fase rápida. A partir de la correlación lineal con la concentración de DTDPy, se obtuvo una constante de velocidad de segundo orden para la reacción con *MtAhpE-SSH* (círculos rojos). Las  $k_{\text{obs}}$  para la reacción de *MtAhpE-SH* con DTDPy se muestran en círculos negros.

**Reactividad del *MtAhpE-SSH* por los sustratos oxidantes específicos de las Prxs, peroxinitrito y  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** La descomposición del peroxinitrito (12  $\mu\text{M}$ ) se aceleró en gran medida en presencia de *MtAhpE-SH* reducida 15  $\mu\text{M}$  (Figura D9A, trazo negro) y se produjo principalmente en el tiempo de mezcla del aparato (<1.1 milisegundos), de acuerdo con la reacción rápida anteriormente reportada ( $1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4 y 25 °C (247)). Por el contrario, tanto la *MtAhpE-SOH* como la *MtAhpE-SSH* causaron incrementos modestos en la velocidad de decaimiento del peroxinitrito (Figura D6A, trazo

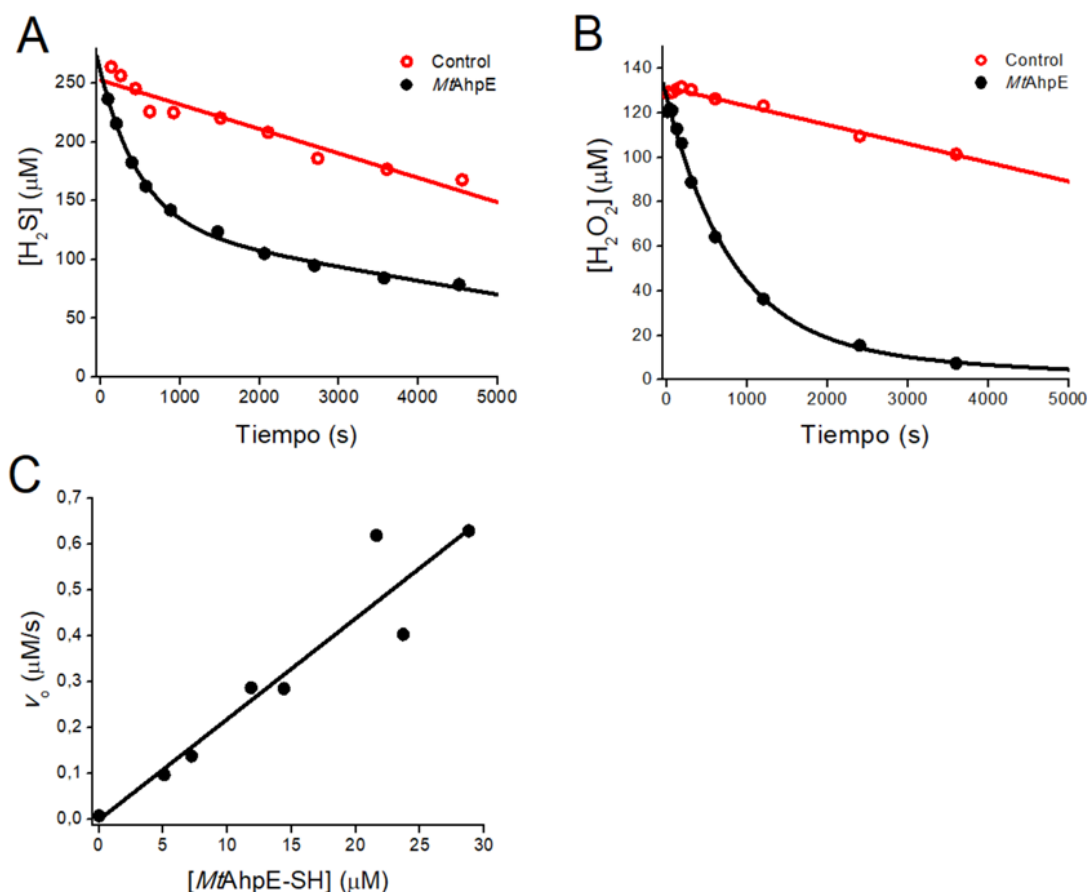
azul y roja, respectivamente). Considerando un rendimiento de formación del *MtAhpE*-SSH de aproximadamente 80%, como se determinó anteriormente (Figura D8A), la constante de velocidad de la reacción con peroxinitrito se estimó en  $\sim 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4 y 25 °C.

En el caso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el consumo por *MtAhpE*-SH (45  $\mu\text{M}$ ) fue casi 1 a 1 durante los primeros 30 segundos, como ya se describió (213) y de acuerdo con la constante de velocidad reportada de  $8.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4 (247) (Figura D9B, cuadrados negros). En presencia de *MtAhpE*-SOH (círculos azules), el decaimiento del  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue más lento estimándose una constante de velocidad de  $78 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a partir del método de velocidad inicial del decaimiento, lo que concuerda con la baja constante de velocidad para la reacción entre *MtAhpE*-SOH y  $\text{H}_2\text{O}_2$  determinada previamente ( $40 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) (247). La velocidad de consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por el *MtAhpE*-SSH (triángulos rojos) fue similar a la de *MtAhpE*-SOH. A partir de la velocidad inicial del decaimiento de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y considerando un rendimiento de formación de persulfuro de aproximadamente 80%, la constante de velocidad de la oxidación de *MtAhpE*-SSH por  $\text{H}_2\text{O}_2$  se estimó en  $109 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4 y 25 °C.



**Figura D9. Reactividad de *MtAhpE*-SSH con peroxinitrito y  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** (A) Se siguió el decaimiento de peroxinitrito (12  $\mu\text{M}$ ) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) más DTPA (0.1 mM), pH 7.4, 25 °C, midiendo la absorbancia a 310 nm en un espectrofotómetro de flujo detenido (trazo verde) o en presencia de una concentración de 15  $\mu\text{M}$  de *MtAhpE*-SH (trazo negro), *MtAhpE*-SOH (trazo azul) o *MtAhpE*-SSH (trazo rojo). (B) consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en amortiguador fosfato de sodio (50 mM) (pH 7.4, 25 °C) en presencia de 45  $\mu\text{M}$  de *MtAhpE*-SH (cuadrados negros), *MtAhpE*-SOH (círculos azules) o *MtAhpE*-SSH (triángulos rojos). La concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se determinó utilizando el método de FOX.

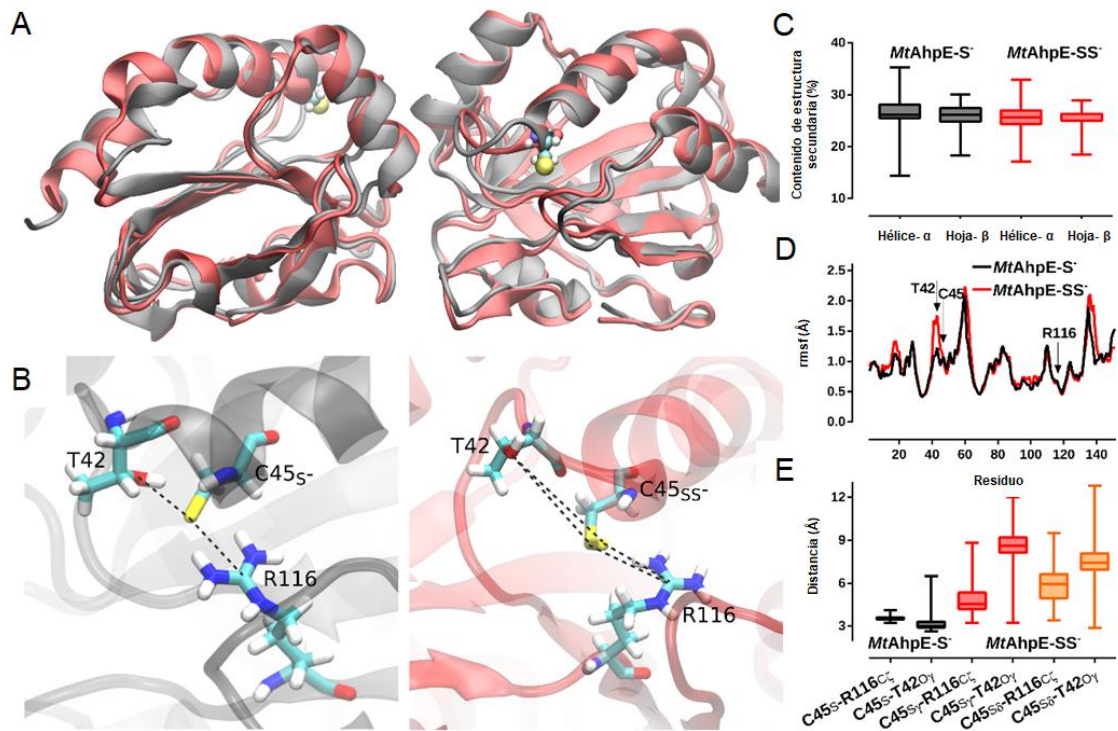
**Consumo de H<sub>2</sub>S y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalizado por *MtAhpE*.** Para estudiar si el H<sub>2</sub>S es capaz de completar el ciclo catalítico de la enzima, se agregó *MtAhpE*-SH a una mezcla de H<sub>2</sub>S y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tomándose alícuotas durante la incubación para determinar concentraciones de H<sub>2</sub>S y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aunque el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es capaz de consumir H<sub>2</sub>S en ausencia de catalizadores, de acuerdo con la reacción lenta ya reportada ( $0.35 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4 y 25 °C (390)), se observó un incremento en la velocidad de consumo de H<sub>2</sub>S y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cuando se agregó concentraciones subestequiométricas de la enzima (Figuras D10A y D10B). Las velocidades iniciales de descomposición del H<sub>2</sub>S mostraron una dependencia lineal de la concentración de *MtAhpE*-SH con una pendiente de  $2.2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  en las concentraciones de sustrato analizadas (Figura D10C), lo que confirma la actividad catalítica de la *MtAhpE*.



**Figura D10. Consumo catalítico de H<sub>2</sub>S por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de *MtAhpE*.** (A) Se incubaron mezclas de Na<sub>2</sub>S (250 μM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (125 μM) en presencia (negro) o ausencia (rojo) de *MtAhpE*-SH (2.9 μM) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) más DTPA (0.1 mM), pH 7.4, 25 °C. La concentración de H<sub>2</sub>S se determinó utilizando el método del azul de metileno. (B) El mismo experimento que en A, pero las mezclas se realizaron en amortiguador fosfato de sodio (50 mM) pH 7.4, 25 °C y la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se

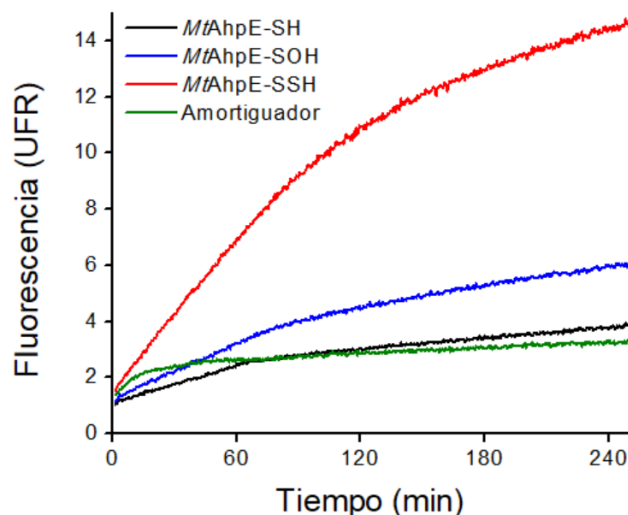
determinó utilizando el método de FOX. (C) Velocidades iniciales de consumo de H<sub>2</sub>S obtenidas a diferentes concentraciones de *MtAhpE* en soluciones de Na<sub>2</sub>S (125 μM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (127 μM).

**Dinámica molecular de *MtAhpE*-SSH.** Para evaluar el efecto estructural y dinámico de la persulfuración se realizaron DM de las formas tiolato (*MtAhpE*-S<sup>-</sup>) y persulfuro (*MtAhpE*-SS<sup>-</sup>) de la C<sub>P</sub> (Cys45). Como se muestra en las Figuras D11A y D11C, en 700 nanosegundos de simulaciones de DM, no se detectaron reordenamientos globales ni grandes cambios conformacionales al comparar las formas tiolato y persulfuro en el dímero *MtAhpE*, como se desprende de la comparación de las distribuciones de contenido de la estructura secundaria (Figura D11C). Sin embargo, al observar de cerca los sitios activos, se identificaron interrupciones significativas en las interacciones del tiolato en Cys45 con los residuos del sitio activo Thr42 y Arg116, que se destacaron previamente como esenciales para el reconocimiento y la reducción de hidroperóxidos, no solo para esta Prx (192, 262, 263), sino también para toda la familia Prxs (193-195, 201, 272, 274). Específicamente, se observó una ganancia en la flexibilidad de la región que contiene a Thr42 tras la persulfuración (Figura D11D). Además, las interacciones entre Cys45 y ambos, Thr42 y Arg116, se interrumpieron en el modelo del persulfuro: los átomos de S<sub>γ</sub> y S<sub>δ</sub> del persulfuro en Cys45 no interactuaron fuertemente con Thr42 y Arg116 (Figuras D11B y D11D), siendo interacciones fuertes que se establecen con el tiolato de la *MtAhpE* (262). En resumen, las simulaciones de DM sugieren que la persulfuración de *MtAhpE* conduce a una alteración significativa en la topología del sitio activo que altera las interacciones clave involucradas en la catálisis de sustratos.



**Figura D11. Cambios estructurales tras la persulfuración en el sitio activo de *MtAhpE*.** (A) Se muestra el solapamiento de estructuras representativas del dímero *MtAhpE* obtenido de simulaciones de DM con Cys45 como tiolato (negro) o como persulfuro (rojo). (B) Comparación del sitio activo de la *MtAhpE* cuando la Cys45 esta como tiolato y persulfuro, mostrando los residuos Thr42, Cys45 y Arg116. (C) Distribución del contenido de hélice- $\alpha$  y hoja- $\beta$  (en %) para ambas simulaciones. (D) Comparación de la rmsf por residuo calculados de la DM a partir de la Cys45 como tiolato (negro) y persulfuro (rojo). (E) Distribución de las interacciones relevantes del sitio activo. Las distancias seleccionadas son las mismas que se destacan en B.

**Transferencia del azufre sulfano del *MtAhpE*-SSH a una sonda de tiol.** Con el objetivo de determinar si *MtAhpE*-SSH es capaz de transferir su azufre sulfano a otros tioles, se incubó *MtAhpE*-SSH con la sonda SSP4 que contiene tiol no fluorescente utilizado como una sonda para azufre sulfano. La incubación de SSP4 con *MtAhpE*-SSH condujo a un aumento de la emisión de fluorescencia (Figura D12). Este aumento se produjo en un grado mucho mayor que en los controles con *MtAhpE*-SH o *MtAhpE*-SOH. De acuerdo con las curvas de calibración que utilizan  $\text{Na}_2\text{S}_2$ , el rendimiento del proceso de transulfuración fue de  $95 \pm 5\%$  luego de 4.5 horas de tiempo de incubación. El pequeño incremento de fluorescencia obtenido para *MtAhpE*-SOH probablemente se deba a que los RSOH pueden comportarse como electrófilos, por lo que también podrían reaccionar con los tioles de la sonda con posible formación de sus productos fluorescentes.



**Figura D12. Transferencia del azufre sulfano de *MtAhpE-SSH* al tiol del SSP4.** *MtAhpE-SOH* se preparó mediante la incubación de *MtAhpE-SH* (4  $\mu\text{M}$ ) con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (4  $\mu\text{M}$ ) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) más DTPA (0.1 mM) (pH 7.4, 25 °C) durante 2 min. El persulfuro se formó agregando  $\text{Na}_2\text{S}$  (4  $\mu\text{M}$ ) a las preparaciones de *MtAhpE-SOH* y envejeciendo durante 15 minutos, tiempo en el que se espera que se complete la reacción. Luego, las muestras se diluyeron dos veces, se agregó SSP4 (20  $\mu\text{M}$ ) y se siguió la emisión de fluorescencia en presencia de *MtAhpE-SH* (trazo negro), *MtAhpE-SOH* (trazo azul), *MtAhpE-SSH* (trazo rojo) y amortiguador (trazo verde).

## D.IV. DISCUSIÓN

Un destino plausible para el  $\text{H}_2\text{S}$  en las células está representado por sus reacciones con los ácidos sulfénicos de cisteínas (372, 378). Las  $\text{C}_\text{P}$  constituyen un blanco preferencial para hidroperóxidos debido a su alta reactividad y abundancia celular (172, 401). Esta reacción es una fuente de RSOH, que luego son reducidos por varias vías. La viabilidad de la reacción entre el  $\text{H}_2\text{S}$  con un RSOH está determinado por aspectos cinéticos y es favorecida cuando este último es estable. Nosotros nos centramos particularmente en la *MtAhpE* como modelo, ya que el  $\text{C}_\text{P-SOH}$  es relativamente estable debido a la ausencia de tioles en la vecindad del sitio activo (142).

El *MtAhpE-SOH* reacciona con  $\text{H}_2\text{S}$  para formar un persulfuro. Se determinó que la constante de velocidad para esta reacción como  $(1.4 \pm 0.2) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4 y 25 °C. Teniendo en cuenta que las especies reactivas son el *MtAhpE-SOH* protonado y el  $\text{HS}^-$  ionizado (208) y como los valores de  $\text{pK}_\text{a}$  reportados son 6.6 para *MtAhpE-SOH* (247) y 6.9 para  $\text{H}_2\text{S}$  (348), la constante

de velocidad independiente del pH calculada es  $1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ <sup>e</sup>. Estos valores obtenidos de constantes pueden compararse con los obtenidos para la reacción de otro RSOH proteico relativamente estable, el formado en albúmina de suero humano (HSA-SOH, human serum albumin) con H<sub>2</sub>S previamente reportado (372). La constante de velocidad para HSA-SOH fue  $(2.7 \pm 0.8) \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4 y 25 °C, mientras que la constante de velocidad independiente del pH fue calculada como  $\sim 4 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (asumiendo que la HSA-SOH se encuentra mayoritariamente protonada a pH 7.4<sup>f</sup>). Por lo tanto, se puede establecer razonablemente que el *MtAhpE*-SOH es cerca de 30 veces más reactivo que HSA-SOH con HS<sup>-</sup>.

Concentraciones subestequiométricas de *MtAhpE* fueron capaces de consumir H<sub>2</sub>S y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalíticamente, lo que sugiere que *MtAhpE*-SH se puede regenerar y comenzar un nuevo ciclo catalítico. Como precedente, se propuso que la Prx6 de *Bos taurus*, otra Prx de 1-cisteína de una subfamilia PrxVI, es capaz de consumir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usando H<sub>2</sub>S como sustrato reductor mediante la formación de un persulfuro en su C<sub>P</sub> (217). Por el contrario, no se obtuvo evidencia de la participación de H<sub>2</sub>S en el ciclo catalítico de la Prx6 de *Arenicola marina* (402). En el caso de la *MtAhpE*, en presencia de exceso de H<sub>2</sub>S y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la catálisis podría proceder por una variedad de vías. Con toda seguridad la reacción inicial sea rápida oxidación de *MtAhpE*-SH por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $8.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , pH 7.4 (247), R1) para producir *MtAhpE*-SOH, seguido de la reacción con H<sub>2</sub>S para formar *MtAhpE*-SSH ( $(1.4 \pm 0.2) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , pH 7.4, R2). Luego, *MtAhpE*-SSH puede reaccionar con H<sub>2</sub>S para recuperar el tiol original y producir HSSH y otros subproductos como polisulfuros (R3). Alternativamente, el *MtAhpE*-SSH puede reaccionar con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formar un ácido pertiosulfénico (R-SSOH) y otros estados más oxidados (R-SSO<sub>2</sub>H, R-SSO<sub>3</sub>H), que luego pueden reducirse a tiol o persulfuro por el H<sub>2</sub>S. La vía preferida está determinada por aspectos cinéticos que quedan por aclarar. En

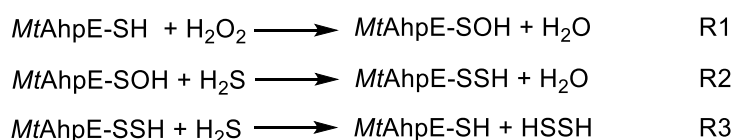
---


$$^e k_{\text{pH}} = k_{\text{pH-ind}} \times \frac{K_{\text{a H}_2\text{S}}}{K_{\text{a H}_2\text{S}} + [\text{H}^+]} \times \frac{[\text{H}^+]}{K_{\text{a AhpE-SOH}} + [\text{H}^+]}$$

<sup>f</sup> el pK<sub>a</sub> de HSA-SOH no ha sido determinado, pero siendo que en general los sulfénicos son más ácidos que sus respectivos tioles, y siendo el pK<sub>a</sub> del tiol de la albúmina de 8.1 (398), se considera muy probable que el pK<sub>a</sub> de HSA-SOH sea <7.1. De cualquier manera, en algunas proteínas con pK<sub>a</sub> de tiol bajo, tales como las Prxs, los pK<sub>a</sub> de sus derivados sulfénicos no son menores sino que mayores que los del respectivo tiol (207, 246).



todo caso, la pendiente de la gráfica de velocidad vs la concentración de *MtAhpE-SH* indicó una regeneración de  $2.2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  a las concentraciones de  $\text{H}_2\text{S}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizadas (Figura D10C). Suponiendo que el paso limitante de la velocidad es una reacción de segundo orden, ya sea la reacción de *MtAhpE-SSH* con  $\text{H}_2\text{S}$  o con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y considerando que las concentraciones de  $\text{H}_2\text{S}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  fueron 125 y 127  $\mu\text{M}$ , respectivamente, se puede calcular que la constante de velocidad para la reacción de segundo orden que limita la velocidad es  $\sim 170 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Claramente, la reacción de *MtAhpE-SOH* con  $\text{H}_2\text{S}$ , que tiene una constante de velocidad 8 veces mayor ( $(1.4 \pm 0.2) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , pH 7.4), no es limitante de la velocidad en el proceso catalítico. Además, la velocidad de la reacción de *MtAhpE-SSH* con  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\sim 109 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) está por debajo de la constante de velocidad del paso limitante esperada, lo que lleva a la reacción de la R3 como la más probable a suceder durante el ciclo catalítico.



En un contexto celular, la reacción del  $\text{H}_2\text{S}$  con  $\text{C}_\text{P-SOH}$  podría ser relevante en las Prxs de 1-cisteína, donde la  $\text{C}_\text{R}$  está ausente y el  $\text{C}_\text{P-SOH}$  podría ser estable. También podría ser relevante en Prxs de 2-cisteínas eucariotas, particularmente en aquellos casos en los que la reacción de resolución es relativamente lenta, por lo que el  $\text{C}_\text{P-SOH}$  tendría una vida media significativa, no siendo el caso de las Prxs de 2-cisteínas típicas bacterianas que son más robustas frente a la sobreoxidación (187).

Por otra parte, la constante de velocidad de segundo orden de la reacción de *MtAhpE-SOH* con  $\text{H}_2\text{S}$  ( $(1.4 \pm 0.2) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) es 6 veces más alta que la reportada para la reacción del *MtAhpE-SOH* con MSH y similar al reportado para la Mrx-1 (237 y  $1.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , respectivamente (142)), que son los sustratos reductores endógenos conocidos en *Mtb* hasta la fecha. El destino principal del *MtAhpE-SOH* en un contexto celular está dictado no solo por las constantes cinéticas sino también por la concentración de los blancos. Aunque todavía faltan reportes sobre los valores de la concentración en estado estacionario de Mrx-1 en *Mtb*, los niveles de MSH (1–8 mM (130)) son más

altos que los estimados para el H<sub>2</sub>S (~370 μM (130, 403)). Por lo tanto, el H<sub>2</sub>S podría representar un sustrato reductor eficiente alternativo al sistema MSH/Mrx-1 en el *Mtb*. Los mecanismos de regulación de la síntesis de MSH y H<sub>2</sub>S en la bacilo están comenzando a describirse (404, 405), y por lo tanto, se requiere más trabajo para establecer su contribución relativa para la reducción de *MtAhpE* durante diferentes condiciones metabólicas. Además, las funciones de H<sub>2</sub>S y MSH/Mrx-1 como donantes de electrones para las proteínas similares a *AhpE* en otros Actinomicetos ([csb.wfu.edu/prx.test/prxInfo.php?subfamily=6](http://csb.wfu.edu/prx.test/prxInfo.php?subfamily=6)) (196) que difieren en el contenido de MSH (403) y que, dependiendo de su hábitat, puede estar expuesto a altas concentraciones de H<sub>2</sub>S, merece una investigación exhaustiva. De hecho, se demostró que la suplementación con H<sub>2</sub>S complementa el defecto de crecimiento de las cepas con una capacidad disminuida para regenerar MSH (147). Este objetivo de la Tesis proporciona información sobre los posibles mecanismos de comunicación cruzada entre el patógeno y su huésped en una unión entre la señalización de H<sub>2</sub>S y los sistemas de defensa antioxidantes.

La reactividad de *MtAhpE*-SSH hacia un blanco electrófilo inespecífico se probó utilizando DTDPy. Se obtuvieron constantes de velocidad de segundo orden de  $(1.8 \pm 0.1) \times 10^3$  y  $(42 \pm 8) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4 para el *MtAhpE*-SSH y el *MtAhpE*-SH, respectivamente. El valor obtenido para el persulfuro fue 43 veces mayor que el del tiol. Teniendo en cuenta que las especies reactivas están ionizadas, ya que el p*K*<sub>a</sub> de la *MtAhpE*-SH es 5.2 (247) y el p*K*<sub>a</sub> de *MtAhpE*-SSH también es probable que sea muy inferior a 7.4 (369), los datos obtenidos a pH 7.4 probablemente reflejen valores independientes del pH. Por lo tanto, la mayor reactividad de *MtAhpE*-SSH con respecto a *MtAhpE*-SH no puede atribuirse a cambios en la disponibilidad de las especies ionizadas. Más bien, pueden atribuirse a un aumento en la reactividad intrínseca. Previamente se reportaron las constantes de velocidad para la reacción de DTDPy con el HSA-SSH o tiol (HSA-SH) como  $(1.7 \pm 0.1) \times 10^4$  y  $(7.6 \pm 0.4) \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  respectivamente, a pH 7.4 y 25 °C (372) (Tabla D1). Estos valores se traducen en constantes de velocidad independientes del pH de  $\sim 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para HSA-SSH y  $7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para HSA-SH, que tiene un p*K*<sub>a</sub> de 8.1 (406). Por lo tanto, la formación de un persulfuro produjo un aumento de 20 veces en la

reactividad a pH 7.4 y sólo un aumento de 3 veces en las constantes de velocidad independientes del pH. El aumento de la reactividad intrínseca con DTDPy del persulfuro en relación con el tiolato puede deberse al efecto alfa, a los cambios en la solvatación, a las alteraciones en las interacciones débiles en el entorno de la C<sub>P</sub> o a una combinación de estos efectos.

**Tabla D1. Constantes de velocidad de reacciones de tioles y persulfuros proteicos.**

	<i>k</i> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )		
	DTDPy	ONOOH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<i>MtAhpE</i> -SH	42 <sup>A, B</sup>	1.9 × 10 <sup>7A</sup> (247)	8.2 × 10 <sup>4A</sup> (247)
<i>MtAhpE</i> -SSH	1.8 × 10 <sup>3A, B</sup>	~ 10 <sup>4A, B</sup>	~ 109 <sup>A, B</sup>
HSA-SH	7.6 × 10 <sup>2A</sup> (372)	2.7 × 10 <sup>3C</sup> (372)	2.1 <sup>D</sup> (406)
HSA-SSH	1.7 × 10 <sup>4A</sup> (372)	1.2 × 10 <sup>4C</sup> (372)	N.D.

<sup>A</sup> Valor determinado a pH 7.4 y 25 °C.

<sup>B</sup> Valor determinado en esta Tesis.

<sup>C</sup> Valor determinado a pH 7.4 y 20 °C.

<sup>D</sup> Valor determinado a pH 7.4 y 37 °C.

N.D. Valor no determinado

Cabe destacar que la reactividad de *MtAhpE*-SH hacia DTDPy a pH 7.4 fue un orden de magnitud menor que la de HSA-SH. En contraste, la reactividad frente a los hidroperóxidos, sustratos específicos de las Prxs, es varios órdenes de magnitud más alta para *MtAhpE*-SH que para HSA-SH (Tabla 1D). Este es otro ejemplo de la baja reactividad de Prxs hacia compuestos no específicos y contribuye al concepto de que no existe una cisteína reactiva general (194, 407). El microentorno de C<sub>P</sub> en Prxs acelera específicamente la reacción con sus sustratos oxidantes, los hidroperóxidos.

En contraste con el aumento de la reactividad del *MtAhpE*-SSH en comparación con *MtAhpE*-SH frente a la DTDPy, la reactividad de *MtAhpE*-SSH hacia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y peroxinitrito fue varios órdenes de magnitud menor que la del *MtAhpE*-SH. La leve reactividad de *MtAhpE*-SSH con estos sustratos específicos de las Prxs podría ser un efecto de distorsión geométrica del sitio

catalítico, el cual parece ser requisito para la correcta interacción de los hidroperóxidos con la C<sub>P</sub> en estado tiolato a través de enlaces de hidrógeno con la Arg116 y la Thr42 durante la formación del complejo con el sustrato y alcanzándose el estado de transición (262, 263). Además de cambiar la reactividad de este sitio debido a los cambios en las distancias, la formación de un persulfuro también podría cambiar el valor del pK<sub>a</sub>. La acidez parece ser menor en los persulfuros de bajo peso molecular con respecto a sus tioles análogos (369). Sin embargo, no es fácil predecir el pK<sub>a</sub> del persulfuro en el caso de una Prx debido al entorno especial del sitio activo. Además, se espera que los persulfuros mejoren la reactividad como bases débiles (372), lo que los hace más propensos a reaccionar con disulfuros que con hidroperóxidos.

Una vez formado un persulfuro en una Prx, ¿qué destino podría tener? Si bien puede producirse una reacción adicional con H<sub>2</sub>S o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro*, en condiciones fisiológicas es probable que predominen las reacciones con tioles, considerando las altas concentraciones de tioles de alto y bajo peso molecular a nivel celular. De hecho, se ha demostrado que las proteínas de las familia de Trxs y Grxs reaccionan con proteínas persulfuradas (378, 379). La posibilidad de ataque directo del tiolato de una proteína en el átomo de azufre externo del persulfuro de una Prx sería promovida por la acidez relativamente alta del tiol como grupo saliente y podría resultar en la formación de un persulfuro en la proteína atacante. Esto constituiría un mecanismo de transpersulfuración que podría contribuir a los niveles relativamente altos de persulfuración detectados (378, 379, 408). Como prueba de este concepto, MtAhpE-SSH pudo transferir el grupo persulfuro a un tiol de bajo peso molecular con alto rendimiento (Figura D12).

## D.V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

De los resultados presentados podemos concluir que la reacción de MtAhpE-SOH con H<sub>2</sub>S conduce a una forma persulfurada de la enzima, que pierde su actividad peroxidasa por alteraciones en la estructura de su sitio activo. Por otra parte, de acuerdo a predicciones cinéticas, el H<sub>2</sub>S es un sustrato reductor alternativo para la enzima. Finalmente, sugerimos la posibilidad de que las Prxs participen en la persulfuración de proteínas. Dado

que las reacciones de transpersulfuración aquí estudiadas utilizaron una sonda de bajo peso molecular como aceptor, sería importante demostrar si también ocurre la transferencia hacia tioles proteicos. En este caso, ¿Qué requisitos debe cumplir la proteína receptora? Es decir, ¿hay especificidad? y ¿cuáles son los determinantes de dicha especificidad? Sería también interesante investigar si otras Prxs de 1-cisteína, de la familia de la Prx6 también participan en reacciones de transpersulfuración. Asimismo, sería interesante investigar si la transpersulfuración a partir de *MtAhpE* demostrada *in vitro* en este trabajo ocurre también *in vivo*. Para ello, se podría modular los niveles de expresión de *AhpE* u otras Prxs de 1-cisteína y observar los efectos de dicha modulación en los niveles de persulfuración proteica en células expuestas o no a  $H_2S$  exógeno o estimuladas para la producción endógena de dicha molécula.

## E. La *MtPrxQ B* es una Reductasa, Dependiente de Trx, Altamente Eficiente por AG-OOH

### E.I. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se muestran los resultados de la caracterización bioquímica funcional de la *MtPrxQ B* (Rv1608c) que, mediante un análisis informático por homología de secuencias, fue previamente asignada como una Prx de la subfamilia PrxQ/BCP (409). Los primeros miembros de esta subfamilia fueron descritos como Prxs al estudiar los cloroplastos de plantas (410), identificándose posteriormente su homólogo en *E. coli* definido previamente por su migración electroforética como “proteína comigratoria con bacterioferritina” (BCP, bacterioferritin comigratory protein) (411). Desde hace un tiempo, se define a la totalidad de las Prxs de esta subfamilia con el término PrxQs, ya que, inicialmente éstas se referían solamente a los homólogos de las BCPs en plantas. Estas Prxs están presentes principalmente en el dominio Bacteria aunque se han encontrado en Arquea y en organismos Eucariotas (196) como se representa en la Figura E1.

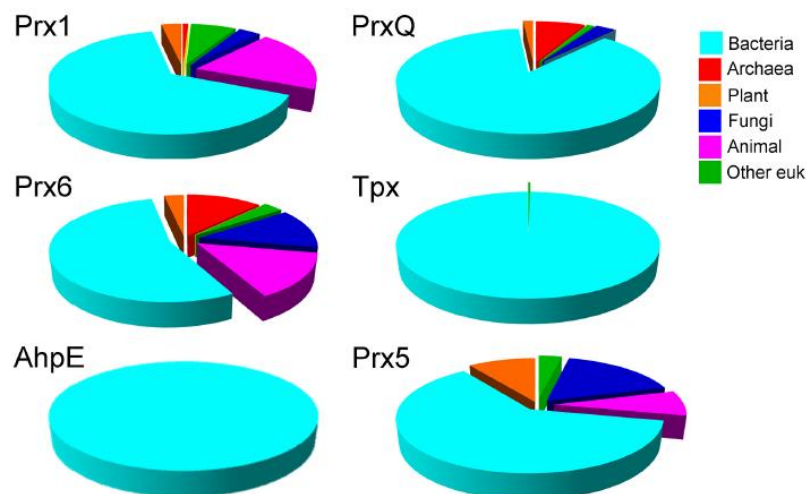


Figura E1. Distribución filogenética de cada una de las subfamilias de Prxs a través de todas especies. Gráficos tomados de (164).

Son el grupo más diverso en cuanto a su funcionalidad, ya que presentan o no la  $C_R$  y en caso de tenerla también varía su localización. En ciertos casos la  $C_R$  está ausente ( $\leq 39\%$  de los miembros (412)) funcionando como Prxs de 1-cisteína. En aquellas en las que la  $C_R$  está presente, por lo general, se encuentra en la hélice- $\alpha_2$  ( $\sim 55\%$  de los miembros (201)) conformando un motivo  $C_PXXXXC_R$ . En otro grupo minoritario se encuentran las PrxQs en las que la  $C_R$  se encuentra en la hélice- $\alpha_3$  ( $\sim 7\%$  de los miembros (201)) siendo equivalente a la posición de ésta en la subfamilia de las Tpx.

También, los miembros de esta subfamilia presentan diferentes estado oligomérico, ya que pueden encontrarse como monómeros o dímeros del tipo A en solución. Por la amplia diversidad funcional y la presencia de Prxs monoméricas en esta subfamilia, algunos autores han llegado a proponer que la subfamilia PrxQ/BCP es la agrupación moderna que más se parece a las proteínas ancestrales de las cuales divergieron las Prxs actuales (413).

Las PrxQs que presentan la  $C_R$ , se comportan como Prxs de 2-cisteínas atípicas, formando un puente disulfuro intramolecular entre la  $C_R$  y la  $C_P$  oxidada a sulfenato ( $C_P\text{-SOH}$ ) por la reacción con el hidroperóxido (265). Como ya se mencionó en la introducción general, el paso de resolución requiere de una transición estructural de la Prx de una conformación FF a la LU que acerca la  $C_P\text{-SOH}$  a la  $C_R$  permitiendo la formación del disulfuro (308). En aquellas PrxQ con la  $C_R$  en la misma hélice- $\alpha_2$  que la  $C_P$  en un motivo  $PXXX(T/S)XXC_PXXXXC_R$ , sufren un cambio estructural local en la transición de  $FF \rightarrow LU$ , siendo esta última conformación estabilizada por el puente disulfuro (412). Cuando la  $C_R$  se encuentra en la hélice- $\alpha_3$ , como por ejemplo en la PrxQ de *Xanthomonas campestris*, en la transición  $FF \rightarrow LU$  hay un cambio conformacional que involucra la rotación de la cadena lateral de la  $C_P\text{-SOH}$  y el desplegamiento de la hélice- $\alpha_3$  permitiendo la formación del disulfuro (414). Perkins y colaboradores utilizaron esta PrxQ para elaborar un conjunto de estructuras cristalográficas, que “congela” la transición durante la oxidación de la  $C_P$  desde su estado tiolato ( $C_P\text{-S}^-$ ) al  $C_P\text{-SOH}$  y la sobreoxidación a sulfínico ( $C_P\text{-SO}_2\text{H}$ ), con el fin de optimizar la descripción de las interacciones que se dan durante la unión del oxidante, la estabilización del estado de transición y la formación de  $C_P\text{-SOH}$  en Prxs (274). El puente disulfuro formado en estas

PrxQs es reducido generalmente por el sistema Trx/TR/NADPH (166), siendo las PrxQs de *Sulfolobus solfataricus* las excepciones determinadas hasta ahora, ya que se reducen por un miembro de la familia de las PDI (228, 415).

Las PrxQs que no presentan C<sub>R</sub>, funcionan como Prxs de 1-cisteína en la cual el C<sub>P</sub>-SOH es reducido generalmente por el sistema GSH/Grxs (416). La PrxQ de *Burkholderia cenocepacia* es un ejemplo de este mecanismo aunque también muestra actividad catalítica residual utilizando la Trx como sustrato. Por experimentos de mutagénesis dirigida se incorporó un “símil C<sub>R</sub>”, es decir un residuo de cisteína, a 4 residuos de la C<sub>P</sub> en la hélice- $\alpha_2$  de esta PrxQ, observándose un mecanismo funcional similar a una Prx de 2-cisteína atípica con reducción preferencial por las Trxs (416). A su vez, la pérdida de la C<sub>R</sub> en el caso de la PrxQ de *E. coli* implicó la formación de un puente disulfuro entre dos C<sub>P</sub> de 2 proteínas que fue resuelto por la Trx (417). Estos ejemplos, resaltan la diversidad funcional en esta subfamilia.

En cuanto a la actividad peroxidasa, las PrxQs reducen un amplio espectro de hidroperóxidos, incluyendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxidos orgánicos artificiales con similar eficiencia catalítica (418-420). Aunque para algunas PrxQs se ha postulado la preferencia por AG-OOH (411, 421, 422) en la mayoría de los casos no se determinó la cinética de esta reacción. La actividad peroxinitrito reductasa de esta subfamilia fue reportada por primera vez para la PrxQ de *Xylella fastidiosa* (418), una bacteria patógena en plantas. Alterativamente a la función peroxidasa, a algunos miembros de esta subfamilia presentes en arqueas termófilas y bacterias se le ha atribuido capacidad de unión al ADN (423, 424), funcionando como chaperonas protegiendo al ADN del estrés oxidativo y de la degradación térmica (425), aunque esta propiedad ha sido poco estudiada en otras Prxs.

La importancia biológica de las PrxQs queda de manifiesto por el hecho de que cepas bacterianas carentes en estas Prxs se vuelven hipersensibles a estrés oxidativo generado por diferentes hidroperóxidos (422, 426-428). Cabe destacar un par de casos en la literatura, por ejemplo, la cepa mutante en la PrxQ de *Helicobacter pylori* es menos eficiente en la colonización del estómago de ratones que la cepa del tipo salvaje (422). Además, se



observó la importancia biológica de la PrxQ de *Corynebacterium glutamicum* al disminuir la supervivencia de la cepa mutante en PrxQ expuesta a diferentes agentes, como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Cu-OOH, metales pesados como CdCl<sub>2</sub> y NiSO<sub>4</sub>, en comparación con la cepa del tipo salvaje, efecto que fue revertido al complementar la cepa mutante con la PrxQ (428). También, se demostró que la expresión de la PrxQ en algunos Actinomicetos está regulada por el factor de transcripción del tipo sigma, SigH, que se ha reportado que responde al estrés oxidativo (429, 430).

En cuanto a *Mtb*, la falta de información sobre la actividad catalítica de la MtPrxQ B fue un aliciente para realizar estudios funcionales explorando su especificidad por sustratos oxidantes y posibles sistemas reductores para cumplir su ciclo catalítico. Una vez caracterizada, se puede tener un panorama del posible mecanismo de acción de la MtPrxQ B como sistema antioxidante. En cuanto al contexto fisiológico, la MtPrxQ B, fue detectada en un estudio de identificación de proteínas asociadas a membrana de la cepa virulenta del *Mtb* H37Rv (255, 431, 432). Además, se reportó que el gen Rv1608c es esencial para el crecimiento de *Mtb* H37Rv en medio de cultivo rico en colesterol, el cual es un nutriente fundamental durante las infecciones crónicas en animales (433, 434).

Los resultados obtenidos en este objetivo de Tesis fueron publicados en la revista "Free Radical Biology & Medicine" en el año 2016 (397), en el que soy primer autor.

## E.II. MATERIALES Y MÉTODOS

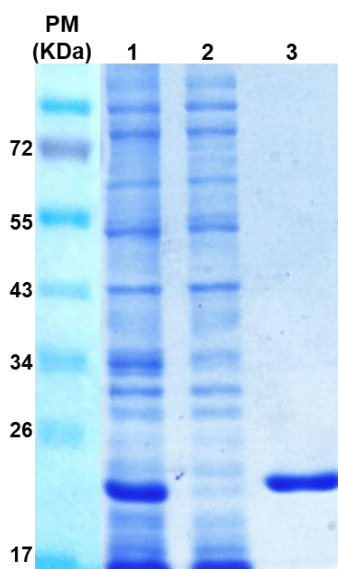
**Químicos.** La peroxidasa de rábano (HRP, horseradish peroxidase), DTNB, DTT, Tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP, Tris(2-carboxyethyl)phosphine), DTPA, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride), BHT, Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, t-bOOH y Cu-OOH fueron comprados a Sigma–Aldrich. La sal tetrasódica de naranja de xilenol fue obtenida de AppliChem. El 15-HpETE (pureza ≥98%) y el hidroperóxido de colesterol conjugado a ácido linoleico (Co-OOH, una mezcla racémica entre el hidroperóxido en posición 9- y 13- del ácido octadeca-dienoico, esterificado al colesterol) (pureza ≥98%) fueron

obtenidos de químicos Cayman. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue comprado a Mallinckrodt. El ácido borónico de cumarina (CBA, coumarin boronic acid) fue gentilmente donado por el Dr. Balaraman Kalyanaraman (Department of Biophysics and Free Radical Research Center, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, USA). El Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) fue comprado a BioWorld.

**Preparación de reactivos.** Se preparó una solución stock de CBA en dimetil sulfóxido (DMSO) como en (435). Las soluciones de peroxinitrito y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se prepararon como se describe en el capítulo anterior. La solubilización de Co-OOH se realizó por incubación de Co-OOH 120 μM con deoxicolato de sodio (20 mM) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) más DTPA (0.1 mM) pH 7.4 y 25 °C, durante 2 a 3 horas (436). La solubilización completa del Co-OOH fue seguida por la disminución de absorbancia a 600 nm.

**Expresión y purificación de proteínas.** El gen de la *MtPrxQ B* (Rv1608c) insertado en el plásmido pDEST17 fue obtenido del Dr. Ahmed Haouz (Institut Pasteur Paris). Se realizó la transformación de cepas *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS con el plásmido para luego seguir un protocolo de purificación de una proteína con una cola de 6 residuos de His por cromatografía de afinidad. Se realizaron estudios de secuenciación del gen de la *MtPrxQ B*, en colaboración con la Dra. M. Dolores Piñeyro del Instituto Pasteur de Montevideo, obteniendo como resultado que había una sustitución en un nucleótido resultando en una mutación puntual de la Ala93 por una Thr. Esta sustitución es frecuentes en homólogos de la PrxQ B en cepas patogénicas y no patogénicas de micobacterias, como por ejemplo en *Mycobacterium indicus pranii*, *Mycobacterium haemophilum*, *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium avium*, entre otras, en las cuales las PrxQ B comparten más de un 85% de la secuencia aminoacídica con la *MtPrxQ B*. Las bacterias transformadas fueron crecidas en medio de cultivo Luria-Bertani (LB) que contenía ampicilina (100 μM/mL) y cloranfenicol (30 μM/mL) a 37 °C hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó un valor ~0.9 AU, para luego ser inducida con IPTG (0.8 mM) durante 4 horas a 37 °C. Luego, se centrifugó el cultivo de bacterias a 4000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El pellet fue resuspendido en amortiguador Tris-clorhídrico (20 mM) más cloruro de sodio (500 mM) pH 7.6, adicionándole PMSF, para luego ser sometido a sonicación con el fin de lisar

las células. La *MtPrxQ B* fue purificada del lisado bacteriano por cromatografía de afinidad utilizando una columna cargada con Níquel (HiTrap Chelating® GE Healthcare) y eluyendo a la proteína retenida con un gradiente de soluciones de concentración creciente de imidazol (5-500 mM). Una vez eluída la proteína fue tratada inmediatamente con DTT (2 mM) con el objetivo de reducir a la enzima, ya que encontramos que está tenía una tendencia a precipitar sin la realización de este paso de reducción. El Imidazol y el DTT remante eran removidos por cromatografía de exclusión molecular usando una columna de desalado HiTrap® (Amersham Bioscience) equilibrada con amortiguador fosfato de sodio (50 mM), NaCl (100 mM) pH 7.4, siguiendo la absorbancia de la proteína a 280 nm. Una vez purificada la enzima (Figura E2) se le agregó glicerol (10%) y se la almacenó a -80 °C.



**Figura E2. Gel al 12% de la electroforesis SDS-PAGE de la purificación de la *MtPrxQ B* recombinante.** En el carril 1 se muestra la migración proteica del lisado de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. En el carril 2, se muestra el eluido de la columna luego de cargar el lisado. El carril 3 se muestra la *MtPrxQ B* (el PM teórico es 19.470 KDa) eluída de la columna con un gradiente de concentración de imidazol.

Las versiones mutantes de gen la *MtPrxQ B* en las Cys44 (*MtPrxQ B* C44S) y Cys49 (*MtPrxQ B* C49S) sustituidas por SER en el plásmido pDEST17 fueron obtenidas de Genscript® y la purificación de estas proteínas fue realizada de la misma manera que el procedimiento para la *MtPrxQ B* tipo salvaje (*MtPrxQ B* WT) que se describió arriba.

Los genes de la *MtTrx C* (Rv3914) y *MtTrx B* (Rv1471) insertados por separados en plásmidos pET22b fueron amablemente donados por el Dr. Marcelo Comini (Instituto Pasteur de Montevideo) y el Dr. Leopold Flohé (Department of Chemistry, University of Padova, Italia y Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay). Los plásmidos fueron transformado en cepas de *E. coli* BL21 Star (DE3) y purificadas como proteínas recombinantes con cola de 6 His como fue descrito en (232).

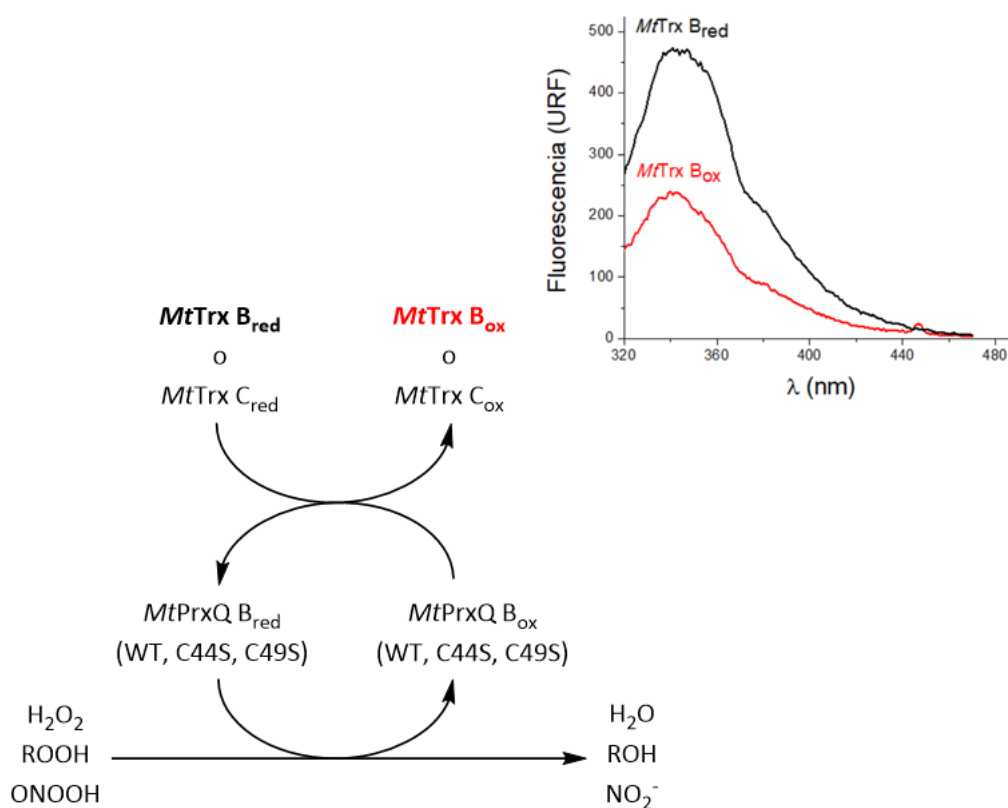
**Determinación de la concentración de peróxidos.** La concentración  $\text{H}_2\text{O}_2$  y peroxinitrito fue determinada como en el capítulo anterior. La concentración de los otros hidroperóxidos usados fue calculada a partir de la pureza de las soluciones stock (la cual fue  $\geq 98\%$  en todos los casos) y verificadas por cuantificación por método de FOX usando curvas de calibración con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cabe destacar que el valor del  $\epsilon$  determinado por el método de FOX tiene una pequeña dependencia en la estructura de cada hidroperóxido en particular (437).

**Determinación de la concentración de proteína y tioles.** La concentración de *MtPrxQ B*, *MtTrx C* and *MtTrx B* se determinó espectrofotométricamente, usando los  $\epsilon_{280}$ , 7,450, 11,000 y 14,105  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, calculados de acuerdo a la secuencia aminoacídica de cada proteína utilizando el servidor informático ExpASy (280). El contenido de tioles reducidos en las proteínas tiol de la proteína se llevó a cabo utilizando DTNB, midiendo la absorbancia a 412 nm ( $\epsilon_{412} = 14,150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (281). La concentración de HRP se determinó por su absorción en la banda de Soret ( $\epsilon_{403} = 1.02 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (438).

**Reducción y oxidación de tioles proteicos.** Para la realización de algunos experimentos, la *MtPrxQ B*, fue previamente reducida tras la incubación con DTT o TCEP (2 mM) durante 30 minutos a 4 °C, procedimiento que también se utilizó para la reducción de la *MtTrx C* y la *MtTrx B*. El exceso de agente reductor fue removido por cromatografía de exclusión molecular usando una columna de desalado HiTrap® (Amersham Bioscience) equilibrada con el amortiguador utilizado en el correspondiente experimento siguiendo la

absorbancia de la proteína a 280 nm mientras eluye. A su vez, la *MtPrxQ B* fue oxidada ante el tratamiento con una concentración equimolar de  $H_2O_2$  la enzima previamente reducida para la realización de ciertos experimentos.

**Medición de la actividad peroxidasa de la *MtPrxQ B*.** La actividad peroxidasa en condiciones catalíticas de la *MtPrxQ B* WT, C44S y C49S fue demostrada usando el cambio de fluorescencia intrínseca que sufre la *MtTrx C* o la *MtTrx B* al oxidarse (descrito anteriormente en (243, 439)) como se muestra en el esquema de la Figura E3.

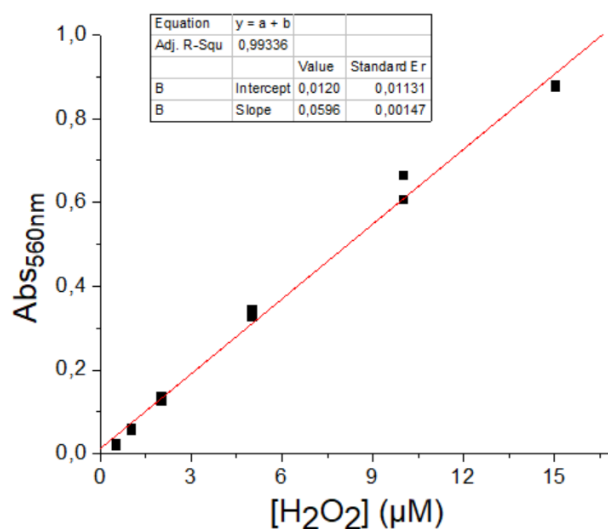


**Figura E3. Esquema del ciclo catalítico de la *MtPrxQ B* utilizando las *MtTrx B* o *MtTrx C* como agentes reductores.** En el inserto se muestra el cambio espectro de emisión de fluorescencia ( $\lambda_{exc}= 295$  nm,  $\lambda_{em}= 335$  nm) de la *MtTrx B* (2  $\mu M$ ) en estado reducido (trazo negro) y oxidado (trazo rojo), descrito anteriormente en (243, 439).

El cambio de fluorescencia durante la oxidación de las Trxs fue seguido en un fluorímetro Aminco Bowman Series 2 luminescence ( $\lambda_{exc}= 295$  nm,  $\lambda_{em}= 335$  nm) o un fluorímetro de flujo detenido SX20 Applied Photophysics ( $\lambda_{exc}= 295$  nm, emisión de fluorescencia total). Cabe destacar que el aporte a la fluorescencia total de la *MtPrxQ B* es mínimo debido a la ausencia de Trps en

la secuencia aminoacídica y que se utiliza concentraciones catalíticas de la enzima en los ensayos.

También se evidenció la actividad peroxidasa de la *MtPrxQ B* al seguir el consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{Co-OOH}$  usando el método de FOX (213, 392). El ensayo se realizó en condiciones catalíticas (en presencia de sustrato reductor) y no catalítica (en ausencia de “turnover”, es decir sin sustrato reductor). El ensayo en condiciones catalíticas consistió en incubar DTT (2 mM) con *MtTrx C* (10  $\mu\text{M}$ ) y *MtPrxQ B* (2  $\mu\text{M}$ ) adicionándole  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50  $\mu\text{M}$ ) o  $\text{Co-OOH}$  (50  $\mu\text{M}$ ) solubilizado en amortiguador fosfato de sodio (50 mM) más deoxicolato de sodio (20 mM) (437), pH 7.4 y 25 °C. Se tomaron alícuotas (100  $\mu\text{L}$ ) cada 30 segundos y se las mezcló con el reactivo de FOX (900  $\mu\text{L}$ ) dejando la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente y midiendo absorbancia a 560 nm. El consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en condiciones no catalíticas se realizó mezclando la enzima reducida (20  $\mu\text{M}$ ) con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50  $\mu\text{M}$ ) y determinando la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  remanente a cierto tiempo de reacción. El  $\epsilon_{560}$  para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se determinó mediante una curva de calibración (Figura E4) utilizando concentraciones conocidas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dando un valor de  $59,620 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  que es cercano al previamente reportado en (213).



**Figura E4. Cuantificación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por método de FOX.** Se representa la curva de calibración donde se representa la absorbancia del complejo que forma el naranja de xilenol con el  $\text{Fe}^{3+}$  en función de concentraciones conocida de  $\text{H}_2\text{O}_2$  preparadas de un stock previamente cuantificado. De la pendiente del grafico se obtiene el  $\epsilon_{560}$  para el  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### Estudio de la especificidad por el sustrato oxidante de la *MtPrxQ B*.

La especificidad por sustrato oxidante de la *MtPrxQ B* se evaluó mediante ensayos cinéticos de estado estacionario, así como estudiando únicamente el paso de la oxidación por diferentes hidroperóxidos.

Los experimentos de la reactividad de *MtPrxQ B* en condiciones de estado estacionario se llevó a cabo variando la concentración de diferentes hidroperóxidos ( $H_2O_2$  o 15-HpETE) u la concentración de *MtTrx C*, siguiendo la disminución de la fluorescencia intrínseca de la *MtTrx C* ( $\lambda_{exc} = 295$  nm, emisión de fluorescencia total) en el espectrofotómetro/fluorímetro de flujo detenido con detector de fluorescencia durante su oxidación. El uso de este aparato permite realizar una medida real de la velocidad inicial de la reacción antes de que pudiera ocurrir una disminución de la actividad enzimática por inactivación oxidativa. Se mezcla en una jeringa *MtPrxQ B* ( $0.5 \mu M$ ) y cierta concentración de *MtTrx C* reducida mientras que la otra jeringa se carga con diferentes concentraciones de hidroperóxido. Las velocidades iniciales del cambio de fluorescencia para cada concentración de *MtTrx C* fueron convertidas a velocidades de consumo de hidroperóxido ( $\mu M$  de hidroperóxido reducido por segundo por  $\mu M$  *MtPrxQ B*) usando la Ec. 1 como se describió previamente en (420, 440),

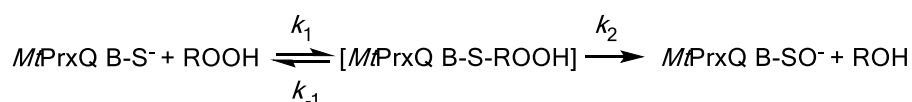
$$V_o (\mu M ROOH \cdot s^{-1} \cdot \mu M^{-1} MtPrxQ B) = V_o' (V \cdot s^{-1}) \cdot \frac{[MtTrx C] (\mu M)}{\Delta F (V) \cdot [MtPrxQ B] (\mu M)} \quad \text{Ec. 1}$$

definiendo a la  $[MtTrx C]$  y la  $[MtPrxQ B]$  como las concentraciones de las proteínas utilizadas en el ensayo,  $\Delta F$  es el cambio de la señal fluorescencia (en voltaje, V) en la presencia de un exceso de hidroperóxido en comparación a la  $[MtTrx C]$  que se está utilizando. La velocidad inicial ( $V_o'$ ) del cambio de fluorescencia es determinada del ajuste lineal de los datos experimentales en los primeros 2 segundos de reacción. Por su naturaleza hidrofóbica, en el caso el 15-HpETE, se utilizaron concentraciones por debajo de la concentración micelar crítica reportada para el ácido araquidónico (296).

Se realizó un análisis cinético de estado estacionario desarrollado por Dalziel en 1957 para mecanismos de reacción del tipo ping-pong para enzimas bisustráticas (441). Los datos velocidad inicial ( $V_o$ ) se ajustaron a la Ec. 2 de Dalziel,

$$\frac{[MtPrxQ B]}{V_o} = \phi_0 + \frac{\phi_1}{[ROOH]} + \frac{\phi_2}{[MtTrx C]} + \frac{\phi_{1,2}}{[ROOH].[MtTrx C]} \quad \text{Ec. 2}$$

En el gráfico primario del análisis de Dalziel se muestra  $\frac{[MtPrxQ B]}{V_o}$  en función de la  $[ROOH]$  a cierta  $[MtTrx C]$ . A partir de este gráfico se obtienen los “coeficientes empíricos  $\phi$ ” de los cuales dependiendo del mecanismo nos pueden dar datos de la cinética de la enzima. Como ya se mencionó, las Prxs tienen un mecanismo bisustrático del tipo ping-pong (169), o sea que no se forma ningún complejo ternario por lo que se asume que  $\phi_{1,2}$  es 0, entonces, el gráfico primario muestra una relación lineal entre  $\frac{[MtPrxQ B]}{V_o}$  y  $[ROOH]$  a cada  $[MtTrx C]$  que tienen igual pendiente, que corresponde al término  $\phi_1$  y el intercepto con el eje Y corresponde a  $\phi_0 + \frac{\phi_2}{[MtTrx C]}$ . El término  $\phi_0$  es el recíproco al valor de la constante catalítica,  $k_{cat}$  y los términos de  $\phi_1$  y  $\phi_2$  son los recíprocos a los valores de la eficiencia catalítica para el sustrato oxidante ( $k_1$ ) y el sustrato reductor, respectivamente (204, 441). Del gráfico primario obtenemos el término  $\phi_1$ , que en términos de constantes de velocidad microscópicas se define como  $\frac{(k_{-1} + k_2)}{(k_1 \cdot k_2)}$ , describiendo cada una de estas constantes microscópicas los siguientes pasos de reacción,



El término  $\phi_1$  se aproxima al recíproco de  $k_1$  cuando el valor de  $k_{-1}$ , que representa la disociación del complejo enzima sustrato nuevamente a enzima reducida e hidropéroxido, es despreciable comparado a  $k_2$ . Siendo este, el caso de las Prxs (204).

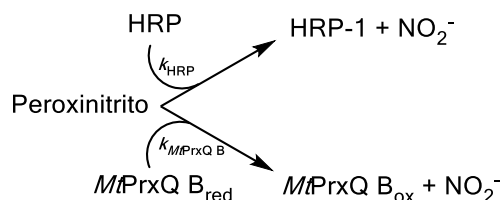
Las determinaciones cinéticas de la oxidación de  $MtPrxQ B$  con peroxinitrito se realizaron siguiendo directamente la reacción o por ensayos donde se analiza la competencia entre dos reacciones, siendo una de ellas ya cinéticamente caracterizada previamente.

*Ensayo directo.* Se siguió la descomposición del peroxinitrito en un espectrofotómetro de flujo detenido siguiendo su absorbancia a 310 nm ( $\epsilon_{310} =$



1600 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) en presencia o ausencia de *MtPrxQ B* (16 μM). La medida de la absorbancia a 310 nm se realiza a modo de evitar interferencia en la señal de absorbancia por parte de la proteína a 302 nm. La constante de velocidad de la reacción fue estimada de las velocidades iniciales del decaimiento del peroxinitrito de las diferentes condiciones como se describió previamente en (393).

*Ensayos de competencia.* Se determinó la constante de velocidad para la reacción entre la *MtPrxQ B* reducida y el peroxinitrito por dos ensayos de competencia. En el primero, la HRP fue utilizada como blanco alternativo para el peroxinitrito como ha sido descrito en (207, 393) y se representa con el siguiente esquema de reacciones,



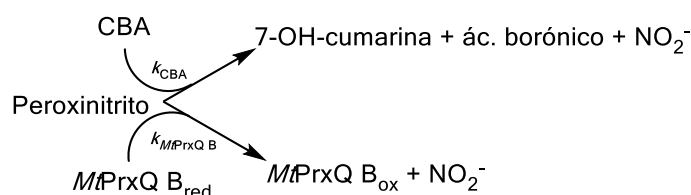
Brevemente, se siguió la aparición de HRP-compuesto 1 (HRP-1) generado como producto de la oxidación de la HRP (2 μM) por peroxinitrito (1 μM) en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de *MtPrxQ B* (1.0, 1.5, 2.5, 5.0 μM) en un espectrofotómetro de flujo detenido. La formación de HRP-1 se midió a 398 nm ( $\epsilon_{398} = 4.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) que es el punto isobéptico entre HRP-1 y el HRP-compuesto 2 (207, 393). Determinamos un valor de  $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para la constante de velocidad de la oxidación de la HRP a HRP-1 por peroxinitrito en nuestras condiciones experimentales, que está de acuerdo a lo reportado previamente (442).

Dado que en el ensayo experimental, no se utilizaron condiciones de pseudoprimer orden, la constante de velocidad de oxidación de *MtPrxQ B* por peroxinitrito fue calculada utilizando la Ec. 3 (443),

$$\frac{k_{\text{HRP}}}{k_{\text{MtPrxQ B}}} = \frac{\ln\left(\frac{[\text{HRP}]_0}{[\text{HRP}]_0 \cdot [\text{HRP-1}]_\infty}\right)}{\ln\left(\frac{[\text{MtPrxQ B}_{\text{red}}]_0}{[\text{MtPrxQ B}_{\text{red}}]_0 \cdot [\text{MtPrxQ B}_{\text{ox}}]_\infty}\right)} \quad \text{Ec. 3}$$

donde  $k_{\text{HRP}}$  es la constante de velocidad de oxidación de HRP,  $k_{\text{MtPrxQ B}}$  es la constante de velocidad de oxidación de la MtPrxQ B,  $[\text{HRP}]_0$  y  $[\text{HRP-1}]_\infty$  son la concentración inicial de HRP y concentración la final de HRP-1, respectivamente.  $[\text{MtPrxQ B}_{\text{red}}]_0$  y  $[\text{MtPrxQ B}_{\text{ox}}]_\infty$  son la concentración inicial de MtPrxQ B en cada condición del ensayo y la concentración final de MtPrxQ B<sub>ox</sub>, respectivamente. Esta última concentración se calcula a partir de la diferencia entre la concentración de peroxinitrito usada en el ensayo y la  $[\text{HRP-1}]_\infty$ .

En el segundo ensayo de competencia, se siguió la aparición de 7-OH-cumarina, el producto de la reacción entre el CBA (1  $\mu\text{M}$ ) y el peroxinitrito (0.2  $\mu\text{M}$ ), por fluorescencia de ( $\lambda_{\text{ex}} = 332 \text{ nm}$ , emisión de fluorescencia total) en presencia y ausencia de concentraciones crecientes de MtPrxQ B reducida (435, 444), como se ejemplifica en el siguiente esquema de reacciones,



Este experimento se realizó en un fluorímetro de flujo detenido y dado que se utilizaron concentraciones de CBA y de MtPrxQ B, por lo menos 5 veces mayores que peroxinitrito en el ensayo. Los datos experimentales se ajustaron a una función exponencial simple obteniéndose las  $k_{\text{obs}}$  y se determinó la  $k_{\text{MtPrxQ B}}$  de la pendiente del gráfico de  $k_{\text{obs}}$  en función de la concentración de MtPrxQ B usada.

**Determinación de la cinética de reducción de la MtPrxQ B por la MtTrx C y MtTrx B.** Para determinar la constante de reducción de la MtPrxQ B por la MtTrx C o B, se mezcló MtTrx C (0.8  $\mu\text{M}$ ) o MtTrx B (0.4  $\mu\text{M}$ ) con concentraciones crecientes y en exceso de MtPrxQ B oxidada en el fluorímetro de flujo detenido. Los registros de fluorescencia se ajustaron a un decaimiento exponencial simple obteniéndose las  $k_{\text{obs}}$ . La constante de velocidad de la reducción MtPrxQ B se obtiene de la pendiente del gráfico de las  $k_{\text{obs}}$  en función de la concentración MtPrxQ B oxidada utilizada (243).

**Comportamiento hidrodinámico de la *MtPrxQ B*.** El PM de la *MtPrxQ B* reducida u oxidada en solución fue determinado por dispersión de luz multiangular (MALS, multiangle light scattering). La enzima reducida contenía TCEP (2 mM) y la enzima oxidada (como se describe arriba) en una concentración de 1 mg/mL se prepararon en amortiguador Tris-clorhídrico (50 mM) más cloruro de sodio (75 mM), pH 7.4. Las muestras fueron centrifugadas a 16,000 rpm a 4 °C antes de la inyección en un sistema de cromatografía de exclusión molecular (Size-exclusion chromatography, SEC-FPLC) que utiliza una columna Superose 12 (GE Healthcare) acoplada a detectores de radiación UV y MALS (Wyatt Technology). La columna fue equilibrada con amortiguador Tris-clorhídrico (50 mM) más cloruro de sodio (75 mM), pH 7.4, a temperatura ambiente. El flujo del sistema fue ajustado a 0.3 mL/min y el volumen de la inyección fue 100 µL. El análisis de los datos experimentales fue realizado usando el software Astra 6.0 (Wyatt Technology). Estos experimentos se realizaron en el Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas “Prof. Alejandro C. Paladini” (IQUIFIB), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, en colaboración con los Drs. Javier Santos y Diego S. Vazquez.

**Espectroscopia de dicroísmo circular de la *MtPrxQ B*.** La elipticidad de la *MtPrxQ B* reducida u oxidada fue evaluada usando una espectropolarímetro (Jasco Corporation, Japón) equipado con un dispositivo para controlar la temperatura. Se prepararon muestras en amortiguador Tris-clorhídrico (50 mM) más cloruro de sodio (75 mM), pH 7.4 y 25 °C. La concentración final de proteína de las muestras fue 10 y 50 µM para realizar los espectros en el UV-lejano y UV-cercano en un rango de 200–250 y 240–340 nm usando cubetas de paso óptico de 0.1 y 1 cm, respectivamente. Se registraron 5 espectros a una velocidad de escaneo de 50 nm/min para luego realizar un promedio. El espectro del amortiguador fue suavizado y restado al espectro promedio de cada muestra. Finalmente, los espectros son expresados en valores de elipticidad molar ( $[\theta]$ ) a partir de siguiente Ec. 4,

$$[\theta](\text{deg dmol}^{-1}\text{cm}^{-2}) = \frac{\theta}{[\text{MtPrxQ B}] (M) \cdot l, \text{p.10}} \quad \text{Ec. 4}$$

definiendo  $\theta$  como la elipticidad,  $[\text{MtPrxQ B}]$  como la concentración de *MtPrxQ B* utilizada en el ensayo,  $l$  como el paso óptico de la celda en cm y  $p$  como el

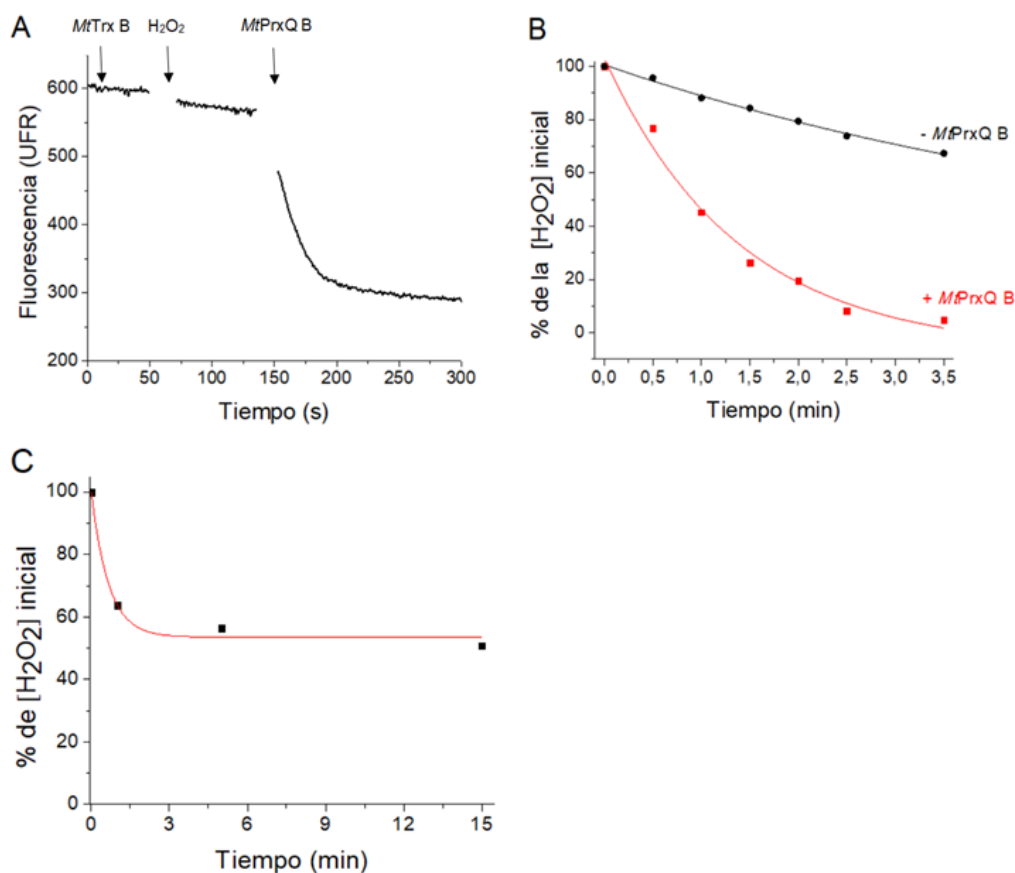
número de enlaces peptídicos de la muestra. Estos experimentos también fueron realizados en colaboración con los Dres. Javier Santos y Diego S. Vazquez.

**Simulaciones de Dinámica Molecular clásica de la *MtPrxQ B*.** Se llevaron a cabo simulaciones de DM de la *MtPrxQ B* reducida y oxidada. Si bien inicialmente se proponía que durante la realización de esta Tesis se determinaría la estructura cristalográfica de esta Prx, la misma fue resuelta por otro grupo de investigación (PDB<sub>ID</sub>= 5EPF). Entonces, utilizamos dicha estructura cristalográfica como punto de partida para la enzima en su estado reducido, en la cual se asume que la Cys44 es la C<sub>P</sub> (de acuerdo a homología de secuencia con otras Prxs de la misma subfamilia, y verificado posteriormente en esta Tesis), como tiolato. Para la *MtPrxQ B* oxidada se tomó la totalidad de la estructura cristalográfica reportada de la enzima reducida pero se realizó un modelo por homología de la hélice- $\alpha_2$  (residuos 39 hasta el 64) tomando como molde la estructura de la hélice- $\alpha_2$  de la PrxQ de *Aeropyrum pernix* en estado oxidado (PDB<sub>ID</sub>= 2CX3) que, en el momento en que se realizaron estos estudios, era una de las estructuras en estado oxidado de las PrxQs con mayor homología a la *MtPrxQ B* (37% de identidad, Figura E7). Se eligió este segmento de la secuencia de la proteína para realizar el modelo por homología debido a que es la región donde ocurren los cambios más significativos durante la oxidación (412). Se utilizó el software de online de Swiss-Model (445) para realizar el modelo por homología la región. Las estructuras de la *MtPrxQ B* reducida y oxidada fueron consideradas como monómeros, como indicaron los experimentos de MALS. Se siguió el mismo protocolo de DM para cada uno de los sistemas. Brevemente, se aplicó una caja octaédrica de moléculas de agua TIP3P (283) de 12 Å al sistema emulando la solvatación de la molécula. Todos los parámetros de los residuos de la proteína corresponden al campo de fuerza Amber parm99 (284). Todas las simulaciones se realizaron en condiciones periódicas de frontera con un valor de corte de 10 Å y el método de sumas de Ewald (PME) para el tratamiento de las interacciones electrostáticas. Las longitudes de enlace de hidrógeno se mantuvieron en su distancia de equilibrio utilizando el algoritmo SHAKE, mientras que la temperatura y la presión se mantuvieron constantes

con un termostato y baróstato de Langevin, respectivamente, tal como se aplica en el programa AMBER12 (284). El sistema fue optimizado en 1000 pasos (10 en gradiente en pasos y el resto con gradiente conjugado). Entonces, fue lentamente calentado de 0 a 300 K durante 20 picosegundos a presión constante, con el termostato de Berendsen, y la presión se equilibró a 1 bar por 5 picosegundos. Después de estos dos pasos, se realizó una simulación de DM larga de 10 nanosegundos a temperatura constante (300 K) y volumen constante. También se llevaron a cabo simulaciones de DM sin restricciones de 100 nanosegundos en el *ensemble* NTP. Todas las visualizaciones de las dinámicas y las representaciones de las moléculas fueron realizado con VMD 1.9.1 (291). Estos experimentos fueron realizados en colaboración con los Dres. Ari Zeida y Darío Estrin del Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química-Física and INQUIMAE-CONICET en Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires.

### E.III. RESULTADOS

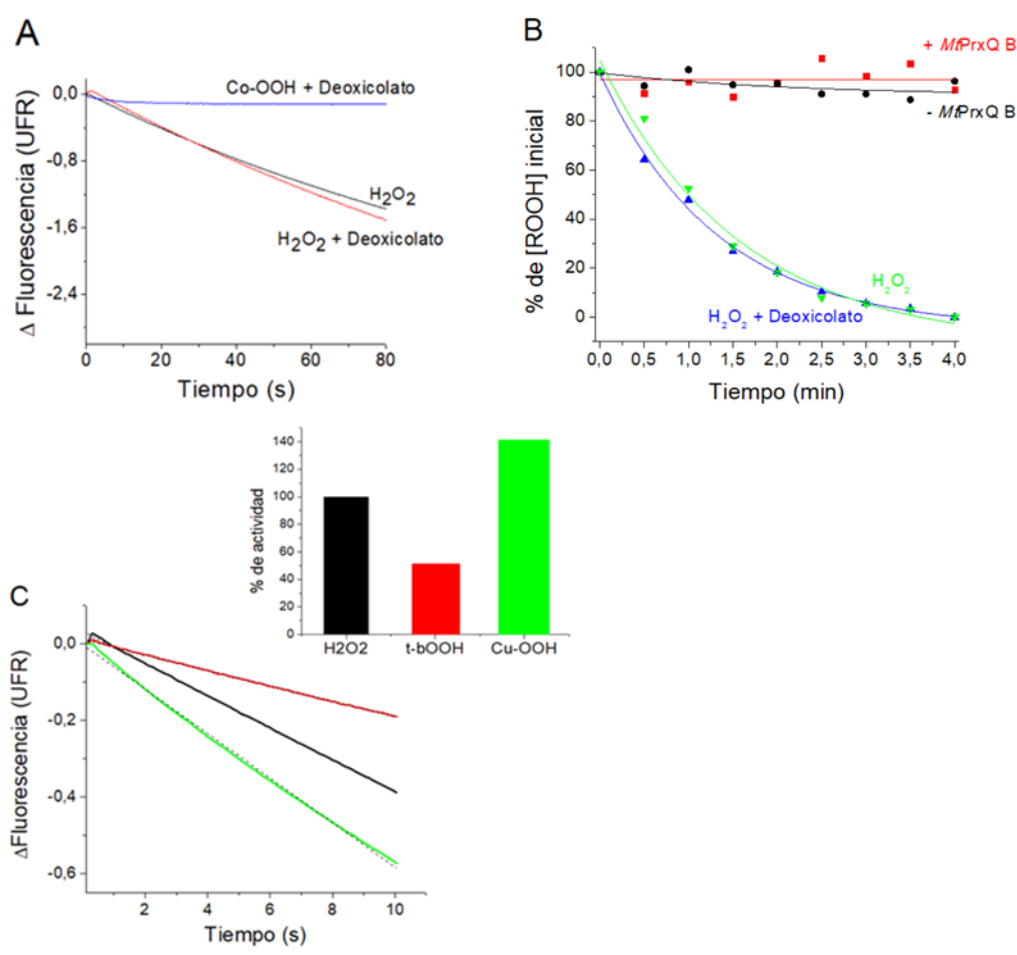
**Actividad peroxidasa de la MtPrxQ B dependiente de Trxs.** Como se muestra en la Figura E5A, la intensidad de fluorescencia intrínseca de la MtTrx B reducida (10  $\mu\text{M}$ ) no fue afectada en forma significativa luego del agregado de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30  $\mu\text{M}$ ) en tiempos de  $\sim 1$  minuto, como se esperaba considerando la baja reactividad previamente reportada de este oxidante con la Trx de *Escherichia coli* ( $k = 1.05 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  at pH 7.4–7.6 y 37 °C, (446)). Ante el agregado de MtPrxQ B (1  $\mu\text{M}$ ), se observó una rápida disminución de la intensidad de la fluorescencia intrínseca de la MtTrx B, indicando que la MtPrxQ B es capaz de catalizar la oxidación de la MtTrx B dependiente de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Además, se evaluó el consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50  $\mu\text{M}$ ) por MtTrx B (10  $\mu\text{M}$ ) y DTT (2 mM) mediante el método de FOX (213), observándose un consumo lento de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\sim 5 \mu\text{M}$  en el primer minuto) mientras que el agregado de MtPrxQ B (2  $\mu\text{M}$ ) a la mezcla mostró un aumento de consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30  $\mu\text{M}$  en el primer minuto) (Figura E5B). Bajo condiciones de consumo no catalítico, utilizando MtPrxQ B reducida (20  $\mu\text{M}$ ) se vio un consumo rápido ( $< 1$  min) y estequiométrico de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura E5C).



**Figura E5. Actividad catalítica de la *MtPrxQ B*.** (A) Se representa el curso temporal de la intensidad de fluorescencia intrínseca total de la *MtTrx B* reducida ( $10 \mu M$ ) sola (primera flecha), después del agregado de  $H_2O_2$  ( $30 \mu M$ , segunda flecha) y la adición de *MtPrxQ B* ( $1 \mu M$ , tercera flecha) en amortiguador fosfato de sodio ( $100 \text{ mM}$ ) mas DTPA ( $0.1 \text{ mM}$ ), pH 7.4 y  $25^\circ C$ . La fluorescencia se registró en un fluorímetro Aminco Bowman Series 2 luminescence. (B) Se representa el curso temporal del consumo de  $H_2O_2$  ( $50 \mu M$ ) por *MtTrx B* ( $10 \mu M$ ) más DTT ( $2 \text{ mM}$ ) en amortiguador fosfato de sodio ( $50 \text{ mM}$ ), pH 7,4 y  $25^\circ C$ , en presencia (rojo, cuadrado) y ausencia (negro, círculos) de *MtPrxQ B* ( $2 \mu M$ ). **Consumo de  $H_2O_2$  por la *MtPrxQ B* en condiciones no catalíticas.** (C) Se representa el curso temporal de consumo de  $H_2O_2$  ( $50 \mu M$ ) en presencia de *MtPrxQ B* reducida ( $20 \mu M$ ) en amortiguador fosfato de sodio ( $50 \text{ mM}$ ), pH 7,4 y  $25^\circ C$ . El % de  $H_2O_2$  inicial se midió por el método de FOX.

Alternativamente, la *MtPrxQ B* ( $0.2 \mu M$ ) también catalizó la oxidación de la *MtTrx C* ( $10 \mu M$ ) dependiente de  $H_2O_2$  ( $10 \mu M$ ), evidenciado por la disminución de fluorescencia intrínseca de la *MtTrx C* (Figura E6A). Tomando ventaja de este cambio de fluorescencia y alternativamente midiendo el consumo del ROOH por método de FOX, se pudo realizar una evaluación primaria de la especificidad por sustrato oxidante de la *MtPrxQ B*. Por ejemplo, la adición de *MtPrxQ B* no causó una disminución en la fluorescencia de *MtTrx C* en presencia de Co-OOH ( $10 \mu M$ ) solubilizado (Figura E6A). Se realizaron controles para descartar que la adición de deoxicolato de sodio al amortiguador

como forma de solubilizar el Co-OOH inactivara a la *MtPrxQ B* utilizando  $H_2O_2$  como sustrato oxidante. Concomitantemente, el agregado de *MtPrxQ B* a una mezcla de Co-OOH ( $50 \mu M$ ) solubilizado, *MtTrx C* ( $10 \mu M$ ) y DTT ( $2 \text{ mM}$ ) en amortiguador fosfato de sodio ( $50 \text{ mM}$ ) más deoxicolato de sodio ( $10 \text{ mM}$ ), no aumentó el lento consumo del oxidante (Figura E6B). Entonces, el Co-OOH solubilizado no es un sustrato oxidante de la *MtPrxQ B*. Por otro lado, la *MtPrxQ B* ( $1 \mu M$ ) catalizó la oxidación de la *MtTrx C* ( $10 \mu M$ ) por hidroperóxidos orgánicos artificiales, *t*-bOOH ( $10 \mu M$ ) y el Cu-OOH ( $10 \mu M$ ) (Figura E6C) observándose que la velocidad fue un 50% y 130% en comparación con el  $H_2O_2$  ( $10 \mu M$ ), respectivamente.



**Figura E6. Estudio de la especificidad por sustrato oxidante de la *MtPrxQ B*.** (A) Curso temporal del cambio de fluorescencia intrínseco de *MtTrx C* ( $10 \mu M$ ) en presencia de *MtPrxQ B* ( $1 \mu M$ ) y  $H_2O_2$  ( $10 \mu M$ ) (trazo negro); o  $H_2O_2$  ( $10 \mu M$ ) más deoxicolato de sodio ( $10 \text{ mM}$ ) (trazo rojo); o con Co-OOH ( $10 \mu M$ ) solubilizado en deoxicolato de sodio (concentración final  $2 \text{ mM}$ ) (trazo azul). La fluorescencia se registró en un fluorímetro de flujo detenido ( $\lambda_{exc} = 295 \text{ nm}$ , emisión de fluorescencia total). (B) Curso temporal del consumo de Co-OOH ( $50 \mu M$ ) solubilizado en deoxicolato de sodio ( $10 \text{ mM}$ ) por *MtTrx C* ( $10 \mu M$ ) y DTT ( $2 \text{ mM}$ ) en amortiguador fosfato de sodio ( $50 \text{ mM}$ ), pH 7.4 y  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , en presencia (rojo, cuadrado) y ausencia

(negro, círculos) de *MtPrxQ B* (2  $\mu$ M). El deoxicolato de sodio no interfiere con actividad peroxidasa de *MtPrxQ B* con  $H_2O_2$  (50  $\mu$ M), ni con la cuantificación de ROOH por el método de FOX (azul, triángulos y verde, triángulo invertido). (C) Curso temporal del cambio de fluorescencia intrínseco de *MtTrx C* (10  $\mu$ M) en presencia de *MtPrxQ B* (1  $\mu$ M) y  $H_2O_2$  (10  $\mu$ M) (línea negra) o *t*-BOOH (10  $\mu$ M) (línea roja) o Cu-OOH (10  $\mu$ M) (línea verde). La fluorescencia se registró en un fluorímetro de flujo detenido ( $\lambda_{exc}= 295$  nm, emisión de fluorescencia total). Las líneas punteadas negras representan los ajustes a rectas en cada una de las condiciones. Inserto: histograma que muestra el % de actividad, tomando como 100% la pendiente del cambio de fluorescencia en presencia de  $H_2O_2$ .

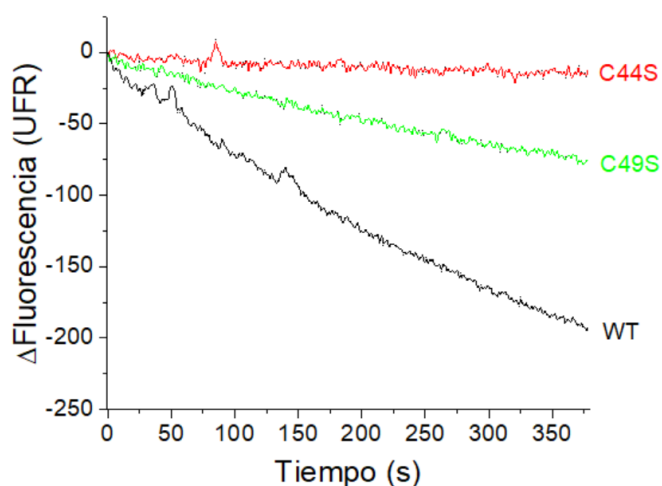
Para determinar si *MtPrxQ B* actúa como una Prx de 1-cisteína o 2-cisteínas, se evaluó la actividad peroxidasa de las formas mutantes en cada uno de los únicos dos residuos de Cys de la *MtPrxQ B*. Estos dos residuos están separados por cuatro residuos en la hélice- $\alpha_2$  y un análisis por la homología de secuencia indicó que Cys44 y Cys49 corresponderían a la  $C_P$  y  $C_R$ , respectivamente (Figura E7).

	PDB <sub>ID</sub>	
<i>MtPrxQ B</i>	(5EPF)	----MKTGDTVADFELPDQGTGTPRRLSVLLS-DGPVVLFFYPAAAMTPGCTKEACHFRDLA
<i>EcBcp</i>	(n.s)	-MNPLKAGDIAPKFSLPDQDGEQVNLTDQFQ-QR-VLVYFYPKAMTPGCTVQACGLRDNM
<i>SsBcp1</i>	(3RDN)	---MVKVGDKAPLFEGIADNGEKISLSDYIG-KHNIIVLYFYPKDDTPGCTREACAFDRNW
<i>ApPrxQ</i>	(2CX4)	MKGLVELGEEKAPDFLTPNQDFEPVNLVEVLKGRPAVLIFFPAAAFSPVCTKELCTFRDKM
<i>StPrxQ</i>	(2YWN)	-GHMVEIGELAPDFELPDTLKKVKLS-ALK-GKVVVLAIFYPAAFTQVCTKEMCTFRDSM
<i>SsBcp4</i>	(3HJP)	---MVEIGEKAPFIELVDTDLKKVKIPSDFK-GKVVVLAIFYPAAFTSVCTKEMCTFRDSM
<i>MtPrxQ B</i>		KEFAEVRASRVGISTDPVRRKQAKFAEVRFDYPLLSDAQGTVAQFGVKRG---LLGKLM
<i>EcBcp</i>		DELKAGVDVLGISTDKPEKLSRFAEKELLNFTLLSDEHQVCEQFGVWGEKSFMGKTYD
<i>SsBcp1</i>		DLKDYDVVVIGVSSDDINSHKRKFKEKYKLPFILVSDPDKKIRELYGAKG-----FI
<i>ApPrxQ</i>		AQLEKANAENVLAISVDSPPWCLKKFKDENRLAFNLLSDYNREVIKLYNVYHEDL-KG-LKM
<i>StPrxQ</i>		AKFNQVNAVVLGISVDPPFSNKAFKEHNKLNFTILSDYNREVVKKYNVAWEFP-ALPGYV
<i>SsBcp4</i>		AKFNEVNAVIGISVDPPFSNKAFKEQNKINFTIVSDFNREAVKAYGVAGELP-ILKGYV
<i>MtPrxQ B</i>		PVKRTTFVIDTDRKVLVDVISEFSMDA-HADKALATLRAIRSG---
<i>EcBcp</i>		GIHRISFLIDADGKIEHVFD-DFKTSN-HHDVVLNWLKEHA-----
<i>SsBcp1</i>		LPARITTFVIDKKGIRHIYNSQMNPAN-HVNEALKALKQIKEEEIS
<i>ApPrxQ</i>		VAKRAVFIVKPDGTVAYKWVTDNPLNEPDYDEVVREANKIAGELVA
<i>StPrxQ</i>		LAKRAVFVIDKEGKVRKWSDDPTKEPPYDEIEKVVKSLS-----
<i>SsBcp4</i>		LAKRSVFVIDKNGIVRYKWSVSDPTKEPNYDEIKDVVTKLSLE---

**Figura E7. Alineación de secuencias entre *MtPrxQ B* y *EcBcp*, *SsBcp1* (PrxQs monoméricas) y *ApPrxQ*, *StPrxQ*, *SsBcp4* (PrxQs diméricas) utilizando el software ExPASy CLUSTALW.** Se marcan los residuos conservados del Motivo PXXX(T/S)XXC<sub>P</sub> y la R de la tétrada catalítica en amarillo. La  $C_R$  se resalta en rojo. En celeste, se resaltan los residuos no polares y aromáticos responsables de la mayoría de las interacciones de la interface de las PrxQs diméricas y los residuos en posiciones correspondientes en la *MtPrxQ B* y en las PrxQs monoméricas. Las secuencias representadas en el alineamiento corresponden a PrxQs monoméricas de *E. coli* (*EcBcp*) y *Sulfolobus solfataricus* (*SsBcp1*) y a las PrxQs diméricas de *Aeropyrum pernix* (*ApPrxQ*), *Sulfolobus tokodaii* (*StPrxQ*) y *Sulfolobus solfataricus* (*Ssbcp4*).



En la Figura E8 se muestra la actividad peroxidasa de la *MtPrxQ B* C44S y C49S en presencia de *MtTrx C* reducida (10  $\mu$ M) y  $H_2O_2$  (10  $\mu$ M). En el caso de la C44S no se observó una disminución en la intensidad de fluorescencia de la *MtTrx C*, lo que indica una falta total de actividad de este mutante, asumiéndose que la Cys44 es la  $C_P$ . En el caso de la C49S mostró una actividad ~60% menor en comparación con la *MtPrxQ B* WT, consistente con el papel de Cys49 como la  $C_R$ , cuyo rol es menos crucial en la catálisis, como se demostró anteriormente para muchos otras Prxs de 2-cisteínas, incluyendo las PrxQs de *Escherichia coli* y *Xanthomonas campestris* (243, 414, 417). Así, en ausencia de la  $C_R$ , el  $C_P-SO^-$  puede ser reducido, aunque de manera menos eficiente, por mecanismos alternativos que también involucran a *MtTrx C* como sustrato reductor. Estos resultados son consistentes con los datos que indican que los miembros de la subfamilia PrxQ puede funcionar también como Prxs de 1-cisteína (447, 448).

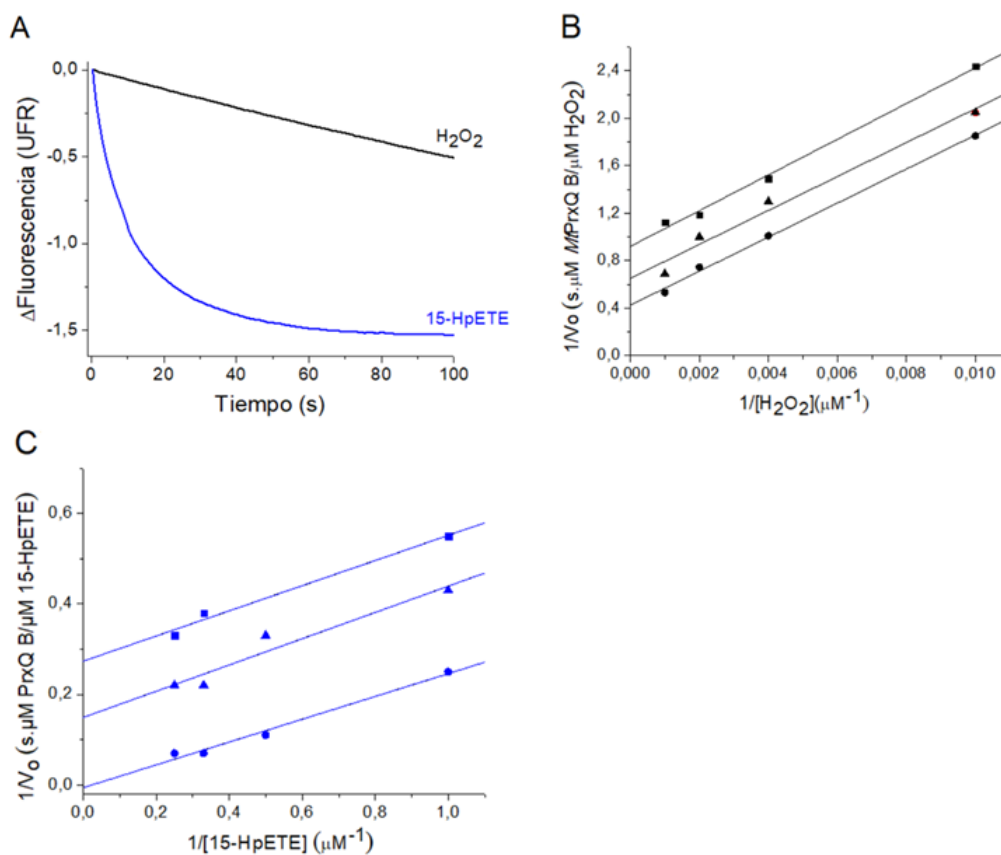


**Figura E8. Actividad de peroxidasa de las versiones WT, C44S, C49S de la *MtPrxQ B*.** Curso temporal del cambio de fluorescencia intrínseca de la *MtTrx C* reducida (10  $\mu$ M) en presencia de  $H_2O_2$  (10  $\mu$ M) ante el agregado de *MtPrxQ B* (0.2  $\mu$ M) WT (trazo negro), C44S (trazo rojo) o C49S (trazo verde) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) más DTPA (0.1 mM), pH 7.4 y 25 °C. La fluorescencia se registró en un fluorímetro Aminco Bowman Series 2 luminescence ( $\lambda_{ex}$ = 295 nm,  $\lambda_{em}$ = 335 nm).

### **Determinaciones cinéticas de la oxidación de *MtPrxQ B* por diferentes sustratos.**

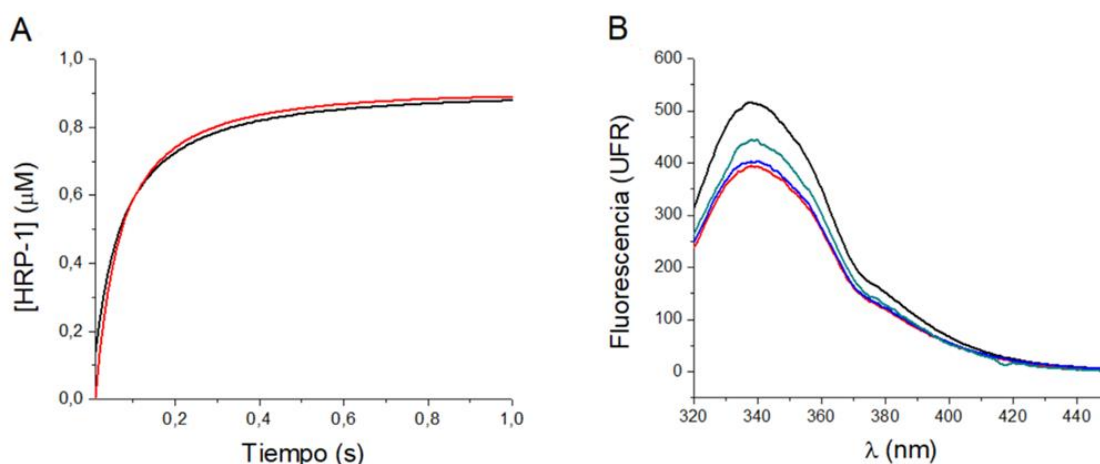
*Oxidación por  $H_2O_2$  y 15-HpETE.* Habiendo probado la actividad peroxidasa de la *MtPrxQ B* con hidroperóxidos orgánicos artificiales, como *t*-BOOH y Cu-OOH, también se evaluó la reactividad con un AG-OOH, el 15-

HpETE, un posible sustrato natural. En la Figura E9A se muestra los cursos temporales de la disminución de fluorescencia intrínseca ( $\lambda_{exc}= 295$  nm, emisión de fluorescencia total) que ocurre durante la oxidación de la *MtTrx C* (10  $\mu\text{M}$ ) por  $\text{H}_2\text{O}_2$  o 15-HpETE (10  $\mu\text{M}$ ) catalizada por *MtPrxQ B* (0.5  $\mu\text{M}$ ). El cambio en la intensidad de la fluorescencia fue mucho más rápido cuando se utilizó 15-HpETE como sustrato oxidante en comparación con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la misma concentración. Se realizó un análisis de estado estacionario usando la ecuación de Dalziel (Ec. 2) para determinar la eficiencia catalítica de la *MtPrxQ B* por  $\text{H}_2\text{O}_2$  o 15-HpETE. Las pendientes obtenidas del gráfico de Dalziel por un ajuste lineal tienen un valor similar cuando la concentración de *MtTrx C* aumento (Figura E9B y E9C), como se esperaba para una enzima que cumpla con un mecanismo bisustrático del tipo ping-pong, como ya se ha descrito para las Prxs (169). Del inverso del valor de la pendiente se estimó un valor para la constante de velocidad para la oxidación de la *MtPrxQ B* por  $\text{H}_2\text{O}_2$  de  $(6.0 \pm 1.0) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y 15-HpETE de  $(3.0 \pm 0.5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , a pH 7.4 y 25  $^\circ\text{C}$ .



**Figura E9. Análisis cinético de estado estacionario de la oxidación de *MtPrxQ B* por  $H_2O_2$  y 15-HpETE.** (A) Curso temporal de la intensidad de fluorescencia intrínseca total de la *MtTrx C* reducida (10  $\mu M$ ) en presencia de *MtPrxQ B* (0.5  $\mu M$ ) al mezclarse rápidamente con  $H_2O_2$  (10  $\mu M$ ) o 15-HpETE (10  $\mu M$ , trazo azul) utilizando un fluorímetro de flujo detenido ( $\lambda_{exc}= 295$  nm, emisión de fluorescencia total). (B) Gráfico de Dalziel derivado de la oxidación de *MtPrxQ B* por  $H_2O_2$  utilizando *MtTrx C* como sustrato reductor. Se incubó *MtTrx C* reducida (2.5  $\mu M$ , cuadrados; 7.5  $\mu M$ , triángulos; 10  $\mu M$  círculos) con diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  en presencia de *MtPrxQ B* en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) mas DTPA (0.1 mM), pH 7.4 y 25 °C. La velocidad inicial de las reacciones se normalizó por la concentración de *MtPrxQ B* utilizada. (C) El mismo análisis que en B) pero usando 15-HpETE como sustrato oxidante a diferentes concentraciones de *MtTrx C* (2.5  $\mu M$ , cuadrados; 5  $\mu M$ , triángulos; 10  $\mu M$ , círculos).

Una vez determinadas las constantes de reacción para  $H_2O_2$  y 15-HpETE, realizamos experimentos adicionales para confirmar estos valores para por ensayos cinéticos de competencia. La oxidación de la *MtPrxQ B* por  $H_2O_2$  no fue lo suficiente rápida como para competir con la oxidación de HRP a HRP-1 ( $k= 2 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ , pH 7.4 (449)), incluso cuando se utilizó una concentración 17 veces mayor de *MtPrxQ B* (17  $\mu M$ ) que HRP (1  $\mu M$ ) como se muestra en la Figura E10A. En el caso de 15-HpETE, utilizamos un ensayo de competencia con *MtAhpE*, que se oxida rápidamente por este sustrato disminuyendo su fluorescencia intrínseca ( $2 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$ , pH 7.4 y 25 °C (213)). Como se muestra en la Figura E10B, se necesita de una concentración 10 veces mayor de *MtPrxQ B* (20  $\mu M$ ) en comparación de la *MtAhpE* (2  $\mu M$ ) para inhibir en forma apreciable el cambio de fluorescencia de la *MtAhpE* causado por su oxidación por 15-HpETE (2  $\mu M$ ), lo que está de acuerdo con el valor de constante determinada, que es 60 veces mayor para la *MtAhpE* que para *MtPrxQ B*. Este ensayo se utilizó para determinar la constante de velocidad de la reacción entre diferentes AG-OOH con una peroxidasa de *Xylella fastidiosa* específica para estos sustratos, la Ohr, (293). Estos 2 experimentos confirman los valores determinados de constante de velocidad para la reducción de estos 2 sustratos oxidantes por la *MtPrxQ B* en los experimentos de cinética de estado estacionario.



**Figura E10. Confirmación de la cinética para la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 15-HpETE por la *MtPrxQ B*.** (A) Curso temporal de la formación de HRP-1 producto de la oxidación de HRP (1  $\mu\text{M}$ ) causada por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1  $\mu\text{M}$ ) en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de *MtPrxQ B* reducida (17  $\mu\text{M}$ ) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) más DTPA (0.1 mM), pH 7.4 y 25 °C. Se registró la absorbancia a 398 nm en un espectrofotómetro de flujo detenido. (B) Espectro de emisión de la *MtAhpE* reducida (2  $\mu\text{M}$ ) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) mas DTPA (0.1 mM), pH 7.4 y 25 °C antes (trazo negro) y después de agregarle 15-HpETE sólo (2  $\mu\text{M}$ , trazo rojo) y en presencia de *MtPrxQ B* reducida (5  $\mu\text{M}$ , trazo azul y 20  $\mu\text{M}$ , trazo gris). La fluorescencia se registró en un fluorímetro Aminco Bowman Series 2 luminescence ( $\lambda_{\text{ex}}= 295 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}= 335 \text{ nm}$ ).

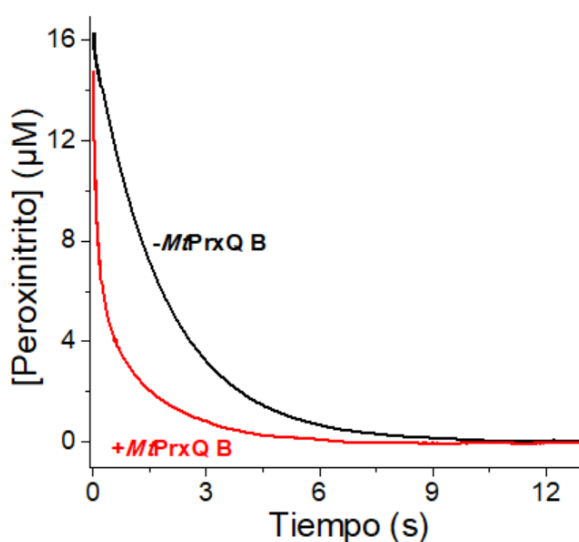
Debido a la limitación en cuanto a las concentraciones de *MtTrx C* que se podían purificar para utilizar en el ensayo, no fue factible poder realizar gráficos secundarios derivados del análisis de Dalziel para obtener determinaciones cinéticas del paso de reducción realizando este tipo de ensayo de estado estacionario. Por esta razón y demostrando que el mecanismo catalítico de la *MtPrxQ B* es del tipo ping-pong, realizamos las siguientes determinaciones cinéticas en condiciones no catalíticas con el fin de analizar el paso oxidativo y el paso reductor del ciclo de manera independiente.

*Oxidación por peroxinitrito.* El peroxinitrito sólo decae por homólisis con una constante de velocidad de  $0.3 \text{ s}^{-1}$  a pH 7.4 y 25 °C (450), como se observa en la Figura E11 (línea negra). El decaimiento de peroxinitrito (16  $\mu\text{M}$ ) se aceleró en presencia de *MtPrxQ B* reducida (16  $\mu\text{M}$ ) (Figura E11), lo que confirma la capacidad peroxinitrito reductasa de la enzima. La velocidad inicial ( $V_0$ ) del decaimiento de peroxinitrito en presencia de *MtPrxQ B* reducida está dada por la Ec.5.

$$V_0 = k \cdot [\text{peroxinitrito}] \cdot [\text{MtPrxQ B}]$$

Ec. 5

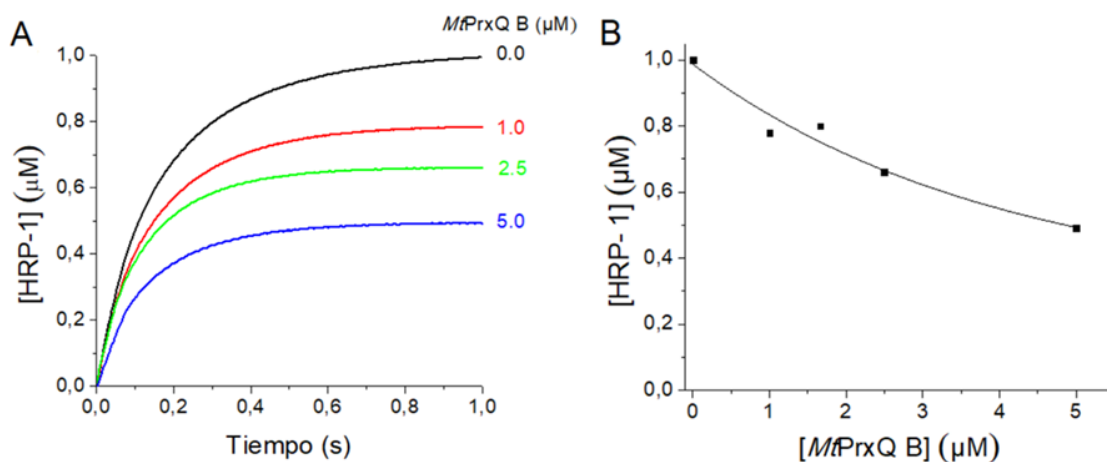
Del ajuste lineal en los primeros 20 milisegundos del decaimiento de peroxinitrito en presencia de enzima y considerando las concentraciones iniciales de reactivos empleados, se calculó la constante de velocidad de la oxidación de *MtPrxQ B* por el peroxinitrito de  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4 y 25 °C. No hubo un decaimiento apreciable de peroxinitrito en ausencia de la enzima durante el mismo periodo de 20 ms. El valor de constante calculado es probablemente subestimado, ya que con una la velocidad observada de decaimiento del peroxinitrito ( $127 \mu\text{Ms}^{-1}$ ) e incluso durante los primeros 20 milisegundos de reacción, las concentraciones iniciales de los reactivos habrían disminuido más del 10%. Por lo tanto, para explorar mejor la cinética de la reacción utilizamos ensayos de competencia.



**Figura E11. Actividad de peroxinitrito reductasa de *MtPrxQ B*.** Curso temporal del decaimiento de peroxinitrito en ausencia (trazo negro) y presencia de *MtPrxQ B* reducido (16 µM, trazo rojo) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) más DTPA (0.1 mM), pH 7.4 y 25 °C. Se registró la absorbancia a 310 nm en un espectrofotómetro de flujo detenido.

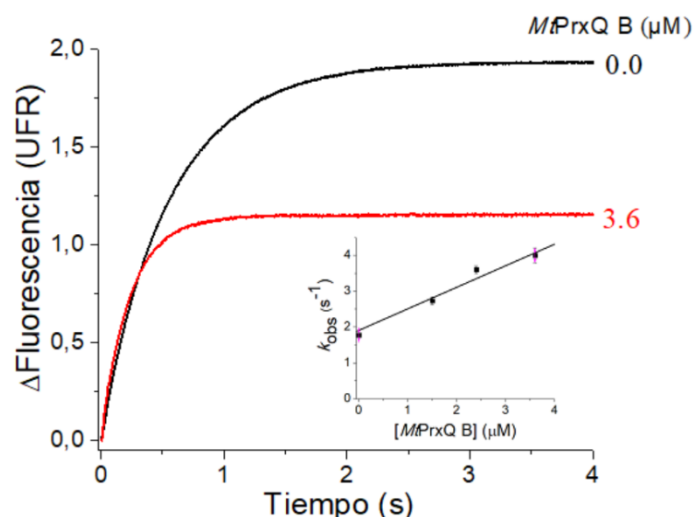
En el primer ensayo de competencia, la *MtPrxQ B* y HRP compiten por el peroxinitrito. La rápida mezcla de HRP (2 µM) y peroxinitrito (1 µM) en ausencia de *MtPrxQ B* causó la formación estequiométrica de HRP-1. En presencia de concentraciones crecientes de *MtPrxQ B*, hubo una disminución en los rendimientos de formación de HRP-1 (Figura E12). A partir del análisis cinético de los datos (explicados en Materiales y Métodos) se determinó una constante

de velocidad de segundo orden de la reducción de peroxinitrito por la *MtPrxQ B* de  $(1.4 \pm 0.3) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4 y 25 °C.



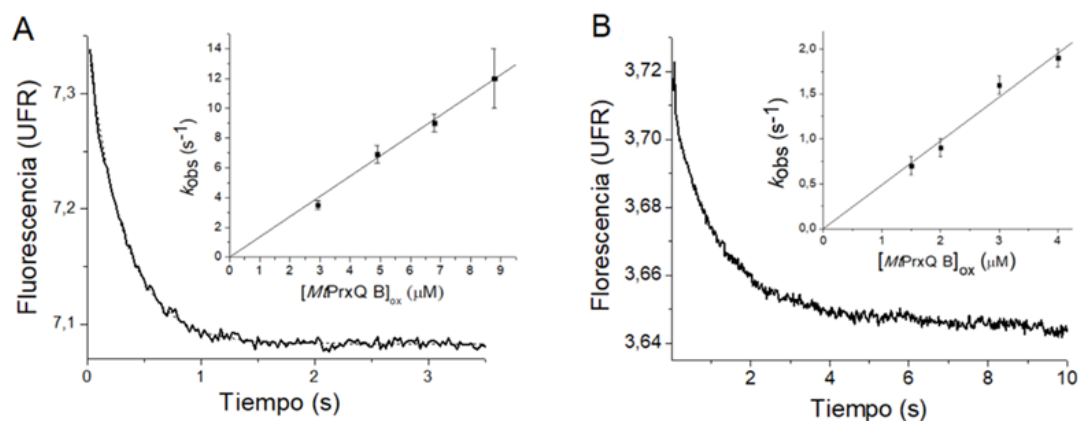
**Figura E12. Ensayo cinético de competencia entre HRP y la *MtPrxQ B* por el peroxinitrito.** (A) Curso temporal de la formación de HRP-1 producto de la oxidación de HRP (2 μM) causada por el peroxinitrito (1 μM) en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de *MtPrxQ B* reducida (0.0 μM trazo negro, 1.0 μM trazo rojo, 1.5 μM, 2.5 μM trazo verde, 5.0 μM trazo azul) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) mas DTPA (0.1 mM), pH 7.4 y 25 °C. Se registró la absorbancia a 398 nm en un espectrofotómetro de flujo detenido. B. Se representa la concentración de HRP-1 formada frente a la concentración *MtPrxQ B* (B) La línea continua representa el rendimiento de formación de HRP-1 simulados en el programa GEPASI (389) evaluando las reacciones del ensayo de competencia representadas en el esquema de reacciones de Materiales y Métodos, considerando las concentraciones iniciales de los reactivos, la constante de velocidad de la oxidación de HRP por peroxinitrito como  $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y la constante de velocidad de la oxidación de *MtPrxQ B* calculada a partir de la Ec. 3 ( $1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ).

Alternativamente, se realizó un ensayo de competencia entre el CBA y la *MtPrxQ B* por el peroxinitrito. La presencia de concentraciones crecientes de *MtPrxQ B* provoca una disminución de la formación de 7-OH-cumarina y un aumento en la  $k_{\text{obs}}$  del proceso (Figura E13). Del ajuste lineal del gráfico de  $k_{\text{obs}}$  vs la concentración de *MtPrxQ B* se obtuvo una pendiente correspondiente a la constante de velocidad de segundo orden para la oxidación de *MtPrxQ B* por peroxinitrito de  $(6.6 \pm 0.1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4 y 25 °C. El intercepto con el eje Y del ajuste lineal representa la constante de velocidad observada la reacción entre peroxinitrito y CBA (1 μM) en ausencia de *MtPrxQ B*, del cual se obtiene una constante de velocidad de  $1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  que es similar aunque algo superior al valor reportado previamente de  $(1.1 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4 y 25 °C (435).



**Figura E13. Ensayo cinético de competencia entre el CBA y la *MtPrxQ B* por el peroxinitrito.** Curso temporal de la formación de 7-OH-cumarina después de mezclar CBA (1  $\mu\text{M}$ ) y peroxinitrito (0.2  $\mu\text{M}$ ) en ausencia o en presencia de *MtPrxQ B* reducida (3.6  $\mu\text{M}$ ) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) mas DTPA (0.1 mM), pH 7.4 y 25  $^{\circ}\text{C}$ . En el recuadro muestra una gráfica de las constantes de velocidad observadas de la formación de 7-OH-cumarina en función de la concentración de *MtPrxQ B*. Se registró la fluorescencia en un fluorímetro de flujo detenido ( $\lambda_{\text{exc}}= 332 \text{ nm}$ , emisión total).

**Cinética de la reducción de *MtPrxQ B* por *MtTrx B* y *MtTrx C*.** Como ya se mencionó en la introducción general, los sustratos reductores de las PrxQs de 2-cisteínas son generalmente Trxs, que puede reciclar el enlace disulfuro en la forma oxidada de PrxQs a expensas de TR/NADPH (418-420). La incubación de *MtTrx C* reducida y un exceso *MtPrxQ B* oxidada causó una rápida disminución de la intensidad de fluorescencia intrínseca de la *MtTrx C*. Los cursos temporales del cambio de fluorescencia se ajustaron a decaimientos exponenciales simples, de las cuales se obtuvieron las  $k_{\text{obs}}$  a diferentes concentraciones de *MtPrxQ B* (Figura E14A). Del ajuste lineal del gráfico  $k_{\text{obs}}$  vs la concentración de *MtPrxQ B* se obtuvo una pendiente correspondiente a la constante de velocidad de segundo orden para la reducción de la *MtPrxQ B* por *MtTrx C* de  $(1.0 \pm 0.4) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4 y 25  $^{\circ}\text{C}$ . De la misma forma, determinamos que la *MtTrx B* redujo *MtPrxQ B* con una constante de velocidad de  $(5.0 \pm 0.1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4 y 25  $^{\circ}\text{C}$  (Figura E14B).



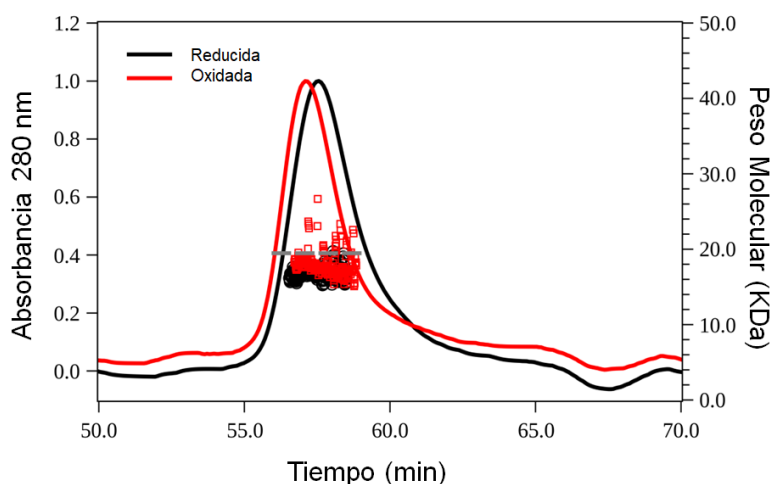
**Figura E14. Cinética de la reducción de *MtPrxQ B* por *MtTrx C* y *MtTrx B*.** (A) Curso temporal del cambio de la intensidad de fluorescencia intrínseca de la *MtTrx C* reducida (0.8  $\mu\text{M}$ ) cuando se mezcla con *MtPrxQ B* oxidado (2.9  $\mu\text{M}$ ) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) mas DTPA (0.1 mM), pH 7.4 y 25  $^{\circ}\text{C}$ . El cambio de fluorescencia se registró en un fluorímetro de flujo detenido ( $\lambda_{\text{exc}}= 295 \text{ nm}$ , emisión total). La línea discontinua representa el ajuste a una curva exponencial. En el inserto se muestra el efecto del aumento de la concentración de *MtPrxQ B* en las  $k_{\text{obs}}$  del cambio de fluorescencia. (B) Curso temporal del cambio de la intensidad de fluorescencia intrínseca de *MtTrx B* reducida (0.4  $\mu\text{M}$ ) cuando se mezcla con *MtPrxQ B* oxidado (1.5  $\mu\text{M}$ ) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) mas DTPA (0.1 mM), pH 7.4 y 25  $^{\circ}\text{C}$ . El cambio de fluorescencia se registró en un fluorímetro de flujo detenido ( $\lambda_{\text{exc}}= 295 \text{ nm}$ , emisión de fluorescencia total). En el inserto se muestra el efecto del aumento de la concentración de *MtPrxQ B* en las  $k_{\text{obs}}$  del cambio de fluorescencia.

### **Influencia del estado redox de la *MtPrxQ B* en la estructura de la proteína.**

*Comportamiento hidrodinámico de la MtPrxQ B en estado reducido y oxidado en solución.* Los miembros de la subfamilia PrxQ se comportan como monómeros o dímeros en solución. La estructura reportada de la *MtPrxQ B* reducida (PDB<sub>ID</sub>= 5EPF) indicó que es un monómero en el cristal y hasta la fecha, no se ha reportado la estructura de la forma oxidada de la enzima. Entonces, para determinar el estado oligomérico de la *MtPrxQ B* reducida y oxidada en solución realizamos experimentos de MALS. La Figura E15 muestra los perfiles de elución de la *MtPrxQ B* reducida (en presencia de TCEP (2 mM)) y oxidada. En ambos casos el perfil de elución fue similar y predominantemente monomérico para los 2 estados de la enzima, determinándose un PM de  $16.8 \pm 0.8$  y  $17.9 \pm 1.6$  KDa obtenido para *MtPrxQ B* reducida y oxidada, respectivamente, que está de acuerdo con la masa teórica de 19,470 Da por subunidad obtenida del análisis de la secuencia polipeptídica. Además, los perfiles de elución bien definidos sugieren la presencia de una población homogénea en solución para ambas condiciones, lo que refleja que el estado

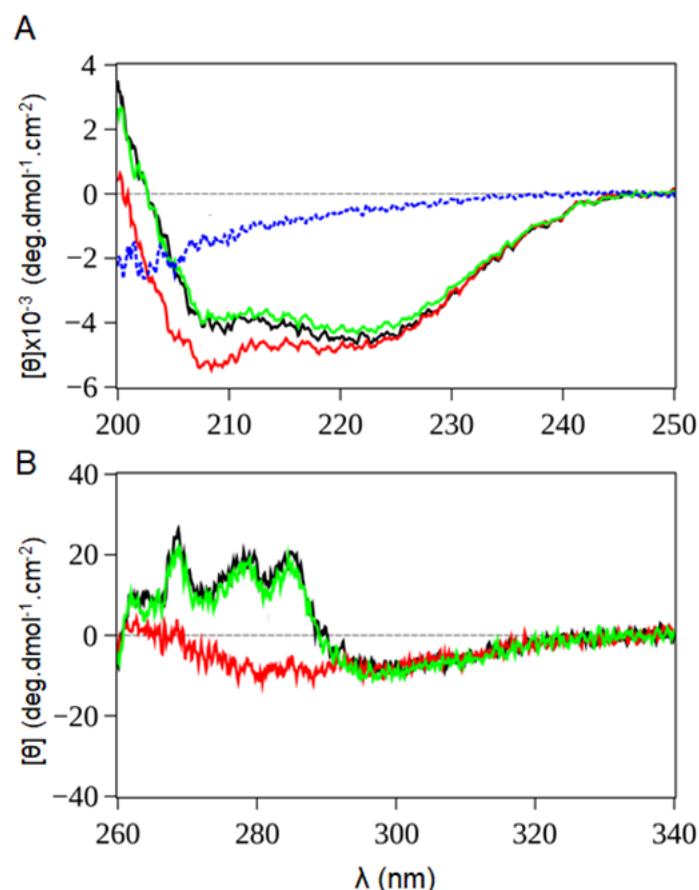


de redox no altera el estado oligomérico de la proteína como lo reportado para otros miembros de la familia de Prxs (199, 279) ni la conformación global de *MtPrxQ B*.



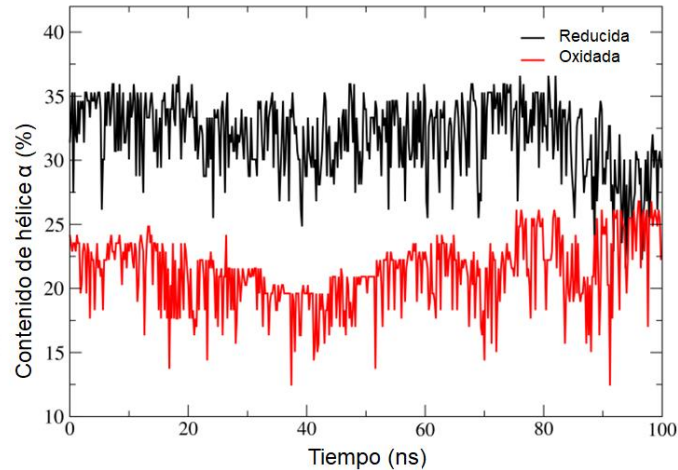
**Figura E15. Comportamiento hidrodinámico de la *MtPrxQ B* reducida y oxidada.** Se muestra los cromatogramas de *MtPrxQ B* reducida (en presencia de TCEP 2 mM, línea negra) y oxidada (línea roja) (48  $\mu$ M) en amortiguador Tris-clorhídrico (50 mM) más cloruro de sodio (75 mM), pH 7.4 a 25 °C. La determinación del PM de la *MtPrxQ B* reducida y oxidada se indica mediante círculos negros y cuadrado rojo, respectivamente. La línea gris no continua indica peso teórico obtenida por el análisis de la secuencia polipeptídica de 19,470 Da. En ambos casos el flujo se fijó en 0.3 mL/min.

*Cambio en la conformación durante la oxidación de la *MtPrxQ B*.* Con el fin de evaluar el cambio conformacional asociado a la oxidación de la *MtPrxQ B*, se realizaron experimentos de dicroísmo circular (DC) observándose los espectros en el UV lejano y cercano (Figura E16A y E16B, respectivamente) de la enzima en estado reducido y oxidado. Durante la oxidación de la *MtPrxQ B*, el espectro de DC en el UV lejano mostró una pérdida significativa de la señal negativa a 208 nm y un ligero corrimiento de la banda negativa de 220 nm a 218 nm, que es compatible con una ganancia señal de una estructura desplegada (451), resultado que concuerda con la forma del espectro diferencial (Figura E16A, línea azul discontinua) que resulta de la resta entre los espectros correspondientes a los estados reducido y oxidado. Los datos a  $\lambda < 200$  nm fueron demasiado ruidosos, lo que excluye el análisis de esa región de los espectros de DC en el UV lejano (Figura E16A), por lo que no se pudo calcular el contenido preciso de motivos de estructura secundaria de la proteína en estado reducido y oxidado.



**Figura E16. Cambios estructurales durante la oxidación de la *MtPrxQ B*.** Espectros de DC en el UV lejano (A) y cercano (B) de la *MtPrxQ B* en estado reducido (en presencia de TCEP, línea negra) y en estado oxidado (rojo línea) en amortiguador Tris-clorhídrico (50 mM) más cloruro de sodio (75 mM), pH 7.4 a 25 °C. También se muestra la adición posterior a la oxidación de un exceso de TCEP a la enzima oxidada (verde línea). Además, se muestra el espectro diferencial entre los estados reducido y oxidado (línea de trazo azul en A)) que es compatible con el espectro de una estructura desplegada. Las concentraciones de enzima utilizadas fueron 10  $\mu\text{M}$  en A y 50  $\mu\text{M}$  en B.

En general, los cambios observados en los espectros son compatibles con reportes previos que indican que se produce un despliegue parcial de la hélice- $\alpha_2$  durante la transición FF $\rightarrow$ LU de PrxQs que presentan la  $C_R$  en la hélice- $\alpha_2$  (412) que fue evidente cuando se comparan las simulaciones de DM de la enzima en estado reducido y oxidado (Figura E17).

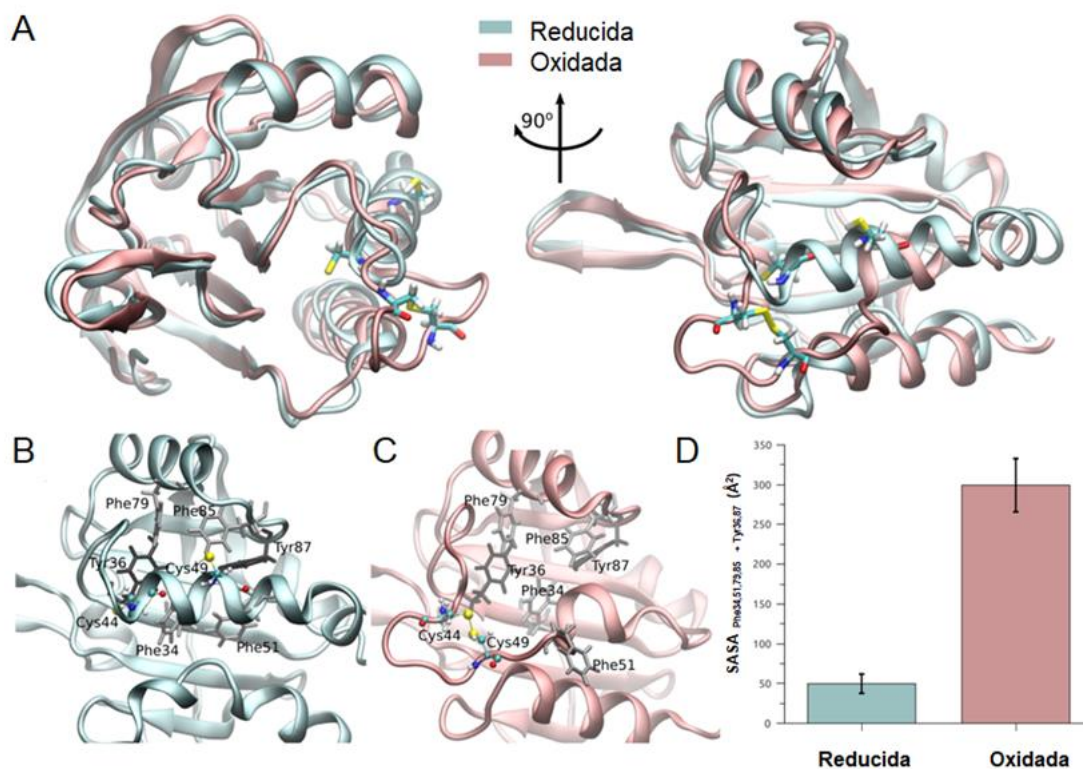


**Figura E17. DM de la MtPrxQ B en estado reducido y oxidado.** Comparación del contenido de hélice- $\alpha$  (en %) en función del tiempo para los estados reducido y oxidado, calculados para simulaciones durante 100 nanosegundos.

Además, en los espectros de DC en el UV cercano se evidencia cambios en el ambiente alrededor de residuos aromáticos por la pérdida de las señales a 268, 278 y 285 nm correspondientes a estos residuos (principalmente, Phe y Tyr) tras la oxidación (Figura E16B). El agregado de agentes reductores fue capaz de revertir estos cambios, como se muestra en la línea verde sólida en las Figura E16A y E16B en los espectros de DC en el UV lejano y cercano, respectivamente.

Con el fin de obtener una visión atomística detallada sobre este cambio conformacional, se realizaron simulaciones de DM de ambos estados redox de la enzima. Una superposición de estructuras representativas de ambos estados se presenta en la Figura E18A. El cambio conformacional que acompaña a la oxidación de MtPrxQ B mostró la exposición de varios aminoácidos, incluidos los residuos de Cys, para establecer una estructura de lengüeta hacia afuera del núcleo de la proteína al formarse el disulfuro (Figura E18A). Ciertamente, el microambiente que rodea a ambos cisteínas se encontró bastante distorsionado. Entre estos cambios, cabe destacar que una serie de residuos aromáticos en la proximidad del sitio activo, sufrieron importantes cambios rotacionales de las cadenas laterales, lo que llevó a un importante aumento en la exposición al solvente de estos residuos (Figura E18B y E18C). Este efecto fue cuantificado al calcular el SASA para los residuos aromáticos seleccionados, mostrando un significativo aumento de este valor durante la

oxidación de la enzima (Figura E18D). En particular, el efecto principal se puede explicar en términos generales al observar solo los residuos Phe51, Tyr36 y Tyr87, que son los que mostraron los cambios más significativos. La modificación en el microambiente de los residuos aromáticos durante la oxidación, está de acuerdo con los cambios en los espectros de DC en el UV cercano que se presentaron anteriormente (Figura E16B).



**Figura E18. Análisis del cambio en la estructura de la *MtPrxQ B* tras la oxidación.** (A) Superposición de las estructuras representativas de la *MtPrxQ B* en estado reducido (cian) y oxidado (magenta) de obtenidos por simulaciones de DM. (B) y (C) vistas cercana del sitio activo y del microentorno que rodea los residuos de Cys catalíticos. Se resaltan los residuos aromáticos (Phe y Tyr). (D) SASA de residuos de Phe y Tyr cercanos al sitio activo, calculada a partir de las DM. Los valores promedio y las desviaciones estándar corresponden a la sumatoria de SASA de los residuos Phe34, Tyr36, Phe51, Phe79, Phe85 y Tyr87.

## E.IV. DISCUSIÓN

A partir de las bases de datos del genoma del *Mtb*, la *MtPrxQ B* era considerada como una Prx de la subfamilia PrxQ/BCP (<http://genoma.tdb.org>; <http://tuberculist.epfl.ch>), aunque la caracterización funcional de esta como peroxidasa no se había realizado hasta el momento de esta Tesis. En las

Figura E5 y E6 se muestra la actividad peroxidasa de *MtPrxQ B* recombinante. Como se esperaba, según la comparación entre secuencias con otras PrxQs, la *MtPrxQ B* funciona como una Prx de 2-cisteínas (Figura E8), siendo la Cys44 la  $C_P$ , que es completamente esencial para la actividad, mientras que Cys49 actúa como  $C_R$ , y como para muchas otras Prx de 2-cisteínas e incluso la Bcp1 de *Sulfolobus solfataricus*, la actividad catalítica disminuyó de manera considerable pero no se perdió completamente en su ausencia (243, 416, 452).

La *MtPrxQ B* fue capaz de catalizar la reducción de diferentes hidroperóxidos que incluyen  $H_2O_2$ , AG-OOH (Figura E9), *t*-bOOH, Cu-OOH (Figura E6) y peroxinitrito (Figura E11, E12, E13), pero las determinaciones cinéticas indican una preferencia por los AG-OOH seguido por el peroxinitrito, mientras que la reducción de  $H_2O_2$  fue mucho más lenta (Tabla E1). La enzima no fue capaz de catalizar la reducción del Co-OOH (Figura E6A y E6B). La reducción de  $H_2O_2$  por la *MtPrxQ B* fue igual de rápida o ~10 veces más lento que la determinada para otras PrxQs, con la excepción de la PrxQ de *Xylella fastidiosa* que cataliza la rápida reducción de  $H_2O_2$  y es capaz de competir la HRP (418). La *MtPrxQ B* no fue capaz de inhibir la reducción de  $H_2O_2$  por HRP (Figura E10A), ya que la constante de velocidad determinada para la *MtPrxQ B* por cinética de estado estacionario (Figura E9B) fue  $\sim 10^3$  veces más lenta que para HRP ( $6 \times 10^3$  vs  $2 \times 10^7$   $M^{-1}s^{-1}$  (449)). Respecto al peroxinitrito, *MtPrxQ B* fue capaz de catalizar su reducción de manera tan eficiente como la *XtPrxQ* (418), la única PrxQ cuya reactividad con este oxidante había sido determinado hasta el momento de la realización de esta Tesis. Un punto a destacar es que aunque varios reportes indicaron que las PrxQ no son especialmente reactivas con los hidroperóxidos orgánicos artificiales (*t*-bOOH y Cu-OOH), si se ha indicado una preferencia por AG-OOH para varios miembros de esta subfamilia, aunque los valores constantes de velocidad reportados son escasos (Tabla E1). De hecho, Liao y colaboradores al analizar las estructuras de diferentes estados redox de la PrxQ de *Xanthomonas campestris* que co-cristalizaban con pequeñas moléculas de carácter hidrofóbico, propusieron un modelo para las interacciones de un bolsillo hidrofóbico de la enzima con la cadena alquílica de hidroperóxidos de 16 (o más) átomos de carbono (414). Al igual que *MtPrxQ B*, la reactividad de la *XcPrxQ* con Cu-OOH y  $H_2O_2$  es similar,

$\sim 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , (274). Desafortunadamente, la reacción de XcPrxQ con AG-OOH no se investigó. En general, la escasez de datos cinéticos impide establecer una relación entre las propiedades estructurales de PrxQs (por ejemplo, ausencia/presencia y localización de C<sub>R</sub>) y especificidad de sustrato (Tabla E1). La MtPrxQ B cataliza rápidamente la reducción del 15-HpETE, como se muestra en la Figura E9, determinándose por cinética de estado estacionario una constante de velocidad para esta reacción de  $(3 \pm 0.5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Este valor está de acuerdo con los resultados de los experimentos de competencia con MtAhpE (Figura E10B).

**Tabla E1. Especificidad por sustrato oxidante de los miembros de la subfamilia PrxQ.**

PrxQ	$k_{\text{H}_2\text{O}_2}$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$k_{t\text{-bOOH}}$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{Cu-OOH}}$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{AG-OOH}}$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{peroxinitrito}}$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	Ref.
MtPrxQ B	$6 \times 10^{3A}$	ND <sup>B</sup>	ND <sup>B</sup>	$3 \times 10^{6A}$	$1.4 \times 10^{6C}$ $6.6 \times 10^{5D}$	Esta Tesis
EcPrxQ <sup>E</sup>	$1.6 \times 10^4$	$2.3 \times 10^2$	$1.2 \times 10^4$	ND	ND	(420)
EcPrxQ <sup>F</sup>	$2.45 \times 10^3$	$8.5 \times 10^2$	ND	$1.2 \times 10^4$	ND	(411)
PtPrxQ <sup>G</sup>	$8 \times 10^3$	$2.4 \times 10^3$	$2.4 \times 10^4$	ND	ND	(419)
AtPrxQ <sup>H</sup>	>>	1	>	<	ND	(453)
Anasp PrxQ						
1 and 3 <sup>I</sup>	>	1	>>	>>>	ND	(421)
XfPrxQ	$3.4 \times 10^{4J}$ $4.5 \times 10^{7K}$	$5.6 \times 10^{3J}$	$5.3 \times 10^{4J}$	ND	$1.04 \times 10^{6K}$	(418)
RsPrxQ <sup>L</sup>	$3.3 \times 10^4$	ND	$3.3 \times 10^4$	ND	ND	(447)
HpPrxQ <sup>M</sup>	1	1	ND	>	ND	(422)
XcPrxQ <sup>N</sup>	$3 \times 10^4$	ND	$3 \times 10^4$	ND	ND	(274)
CgPrxQ	$1.2 \times 10^{3A}$	$4 \times 10^{4A}$	$3 \times 10^{4A}$	ND	$1.3 \times 10^{6C}$	(428)

Abreviaciones: Mt = *Mycobacterium tuberculosis*; Ec = *E. coli*; Pt = *Populus trichocarpa*; At = *Arabidopsis thaliana*; Anasp = *Anabaena sp.*; Xf = *Xylella fastidiosa*; Rs = *Rhodobacter sphaeroides*; Hp = *Helicobacter pylori*; Xc = *Xanthomonas campestris*; Cg = *Corynebacterium glutamicum*.

Los símbolos > 1, >> 1 and >>> 1 indican un patrón del aumento de reactividades comparadas con t-bOOH, que se tomó como referencia y se indica como 1. El símbolo < 1 indica menor actividad comparada con t-bOOH.

<sup>A</sup> Obtenido del análisis de cinética de estado estacionario a pH 7.4 y 25 °C;

<sup>B</sup> Aunque las constantes de velocidad de la reducción de *t*-bOOH y Cu-OOH por la *MtPrxQ B* no fueron determinadas, la enzima fue activa con ambos sustratos observándose una velocidad 50 y 130 % comparada con la velocidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente;

<sup>C</sup> Obtenida por el ensayo de competición con HRP a pH 7.4 and 25 °C;

<sup>D</sup> Obtenida por el ensayo de competición con CBA a pH 7.4 and 25 °C;

<sup>E</sup> Valores de  $k_{cat}/K_m$ , calculados de los valores de  $K_m$  y  $k_{cat}$  aparentes obtenidos a una concentración de Trx (10 μM) a pH 7 and 25 °C;

<sup>F</sup> Valores de  $k_{cat}/K_m$ , calculados de los valores de  $K_m$  y  $k_{cat}$  aparentes obtenidos a una concentración de Trx (0.8 μM) a pH 7 and 25 °C;

<sup>G</sup> pH 7;

<sup>H</sup> Alta actividad peroxidasa por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seguida de Cu-OOH, *t*-bOOH y menos reactiva por FA-OOH. La actividad se midió por consumo de hidroperóxidos cuantificados por el método de FOX;

<sup>I</sup> Alta actividad peroxidasa por el FA-OOH, seguida de Cu-OOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y *t*-bOOH. La actividad se midió por consumo de hidroperóxidos cuantificados por el método de FOX, a pH 7.4 y 37 °C;

<sup>J</sup> Valores de  $k_{cat}/K_m$  a pH 7.4 y 37 °C;

<sup>K</sup> Obtenida por el ensayo de competición con HRP a pH 7.4 y 37 °C;

<sup>L</sup> Valores de  $k_{cat}/K_m$ , calculados de los valores de  $K_m$  y  $k_{cat}$  aparentes obtenidos a una concentración de Trx (20 μM) a pH 7.3 y 25 °C;

<sup>M</sup> Alta actividad peroxidasa por el FA-OOH, comparada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y *t*-bOOH. La actividad se midió al seguir el consumo de NADPH utilizando un ensayo acoplado a pH 7;

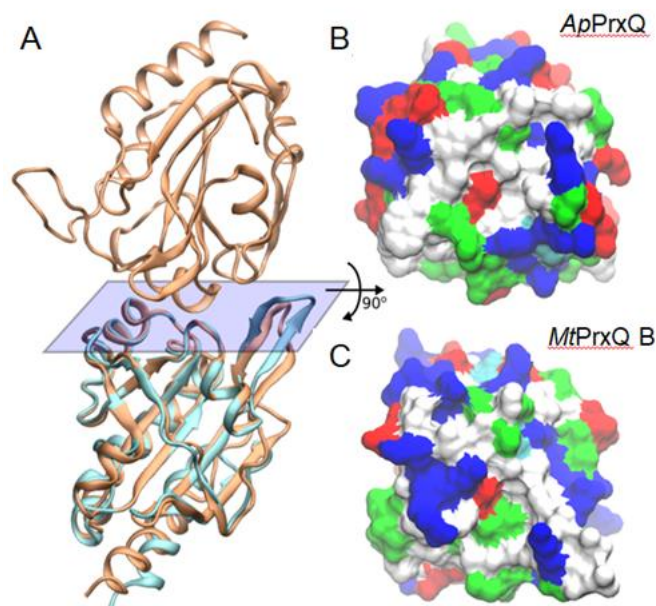
<sup>N</sup> Obtenido del análisis de cinética de estado estacionario a pH 7.4 y 25 °C.

En cuanto al sustrato reductor, los miembros de 2-cisteínas de la subfamilia de las PrxQ usualmente son reducidas eficientemente por Trxs, siendo las PrxQ/BCPs de *Sulfolobus solfataricus* la excepción ya que son reducidas por una miembro de la familia PDI (228, 415). En el caso de la *MtPrxQ B*, tanto la *MtTrx B* o *C* la reducen rápidamente, con constantes de velocidad del orden de  $10^5$ – $10^6$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> (Figura E14), proporcionando así una ruta para el reciclaje eficiente a expensas del sistema TR/NADPH. Posterior a la realización de esta Tesis, Su y colaboradores realizaron una caracterización funcional de la PrxQ de *Corynebacterium glutamicum* (*CgPrxQ*, homóloga a la *MtPrxQ B* ya que comparten un 49% de identidad en la secuencia aminoacídica). La *CgPrxQ* también monomérica, mostró alta reactividad por peroxinitrito e hidroperóxidos orgánicos (Tabla E1) como sustratos oxidantes y

utilizó el sistema Trx/TR/NADPH (428) como reductor y no utilizó el sistema MSH/CgMrx-1 como sustrato reductor alternativo. Inclusive, no se identificó a la CgPrxQ como una proteína que forme un disulfuro mixto con MSH luego del tratamiento con hipoclorito de sodio a la célula, sino que se encontró formando un disulfuro entre la C<sub>P</sub> y la C<sub>R</sub> (454). En esta Tesis no se investigó la posible reducción de *MtPrxQ B* por MSH/*MtMrx-1*, como si lo reportáramos para la *MtAhpE* (142).

Los experimentos de MALS indicaron que la *MtPrxQ B* reducida es principalmente una proteína monomérica en solución (Figura E15) con un PM de ~17 KDa similar a la calculada teóricamente. Este resultado está en acuerdo con la estructura cristalográfica de alta resolución (1.35 Å) de la *MtPrxQ B* reducida (PDB<sub>ID</sub>: 5EPF). Los miembros de la subfamilia PrxQ/BCP se pueden comportar como proteínas monoméricas o diméricas con interfaces del tipo A. Una descripción detallada de las características estructurales de las PrxQs diméricas demostraron que el la interfaz del dímero tipo A está estabilizada principalmente por interacciones que involucran cerca de 30 residuos agrupados en diferentes regiones (412). El área de contacto entre monómeros es mayoritariamente no polar y cuenta con varios residuos aromáticos que contribuyen en gran medida a la interfaz (Phe45, Trp79, Tyr98, en la *ApPrxQ*) que están bien conservadas entre PrxQs diméricas pero no así en la *MtPrxQ B* y en otras PrxQs monoméricas (Figura E7). A tener en cuenta, en el lugar del Trp79 en la *ApPrxQ* se encuentra un aminoácido básico (Arg) en la secuencia de la *MtPrxQ B*, que es en gran parte responsable de la pérdida de hidrofobicidad y simetría en la superficie correspondiente de *MtPrxQ B* en comparación con el superficie de la interface de subunidades en las PrxQs diméricas utilizando a la *ApPrxQ* como ejemplo, como se muestra en la Figura E19.





**Figura E19. Comparación estructural de la *MtPrxQ B* con una *PrxQ* dimérica.** (A) Superposición de la *MtPrxQ B* monomérica (celeste) y el dímero de la *ApPrxQ* (naranja). (B) y (C) Representación de la superficie de la interface dimérica de *ApPrxQ* y la superficie correspondiente en *MtPrxQ B*. Las superficies están coloreadas por tipo de residuo (azul, básico; rojo, ácido; verde, polar; blanco, no polar).

A su vez, nuestros resultados mostraron que la *MtPrxQ B* oxidada también es un monómero (Figura E15). Aunque, la estructura secundaria así como la terciaria de *MtPrxQ B* son influenciadas por el estado redox de la proteína (Figura E16). Los datos obtenidos de los experimento de DC son compatibles con el despliegue parcial de la hélice- $\alpha_2$  que ocurre durante la transición FF $\rightarrow$ LU, ya descrito en otros miembros de esta subfamilia de Prxs (412). Además, la oxidación de *MtPrxQ B* determinó una importante distorsión del microambiente que rodea a ambos Cys reactivas, implicando rotaciones conformacionales en la cadena lateral de una serie de residuos aromáticos en la proximidad del sitio activo, lo que llevó a un importante aumento de su exposición al solvente (Figura E18).

## E.V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En conclusión, la *MtPrxQ B* muestra una alta eficiencia catalítica hacia la reducción de AG-OOH utilizando *MtTrx B* y *C* como reductores, siendo también capaz de reducir otros hidroperóxidos incluyendo peroxinitrito con menor eficiencia. La estructura secundaria y terciaria de la proteína se ven afectadas por la oxidación y particularmente varios residuos hidrofóbicos quedan

expuestos al solvente en el enzima oxidada. La estructura cuaternaria se mantiene invariante ya que permanece como monómero independientemente del estado redox. Se ha reportado que la *MtPrxQ B* es esencial para el crecimiento de *Mtb* en medio de cultivo que contienen colesterol como fuente principal de carbono, el cual es un nutriente esencial durante la infección crónica en modelos animales (434). Una explicación tentadora sería que la *MtPrxQ B* es capaz reducir el Co-OOH. Sin embargo, nuestros datos indicaron que la enzima carece de actividad por ese sustrato. Dado que el metabolismo del colesterol afecta la composición lipídica de la micobacteria (455, 456), otra posibilidad es que *MtPrxQ B* reduzca los hidroperóxidos derivados de otros lípidos preferentemente sintetizados cuando se cultiva a la micobacteria suplementada con colesterol. Sería interesante determinar el grado de correlación entre las reactividades de esta enzima con hidroperóxidos determinadas *in vitro*, con la susceptibilidad de cepas carentes de *MtPrxQ B* frente a diferentes hidroperóxidos adicionados exógenamente, y en especial frente AG-OOH, dada la importante reactividad reportada aquí. Consideramos que el conocimiento de los mecanismos de formación, de citotoxicidad y de detoxificación de AG-OOH en el contexto de enfermedades infecciosas, es aún incompleto, y que aportes en este sentido pueden ser útiles para eventuales desarrollos terapéuticos.

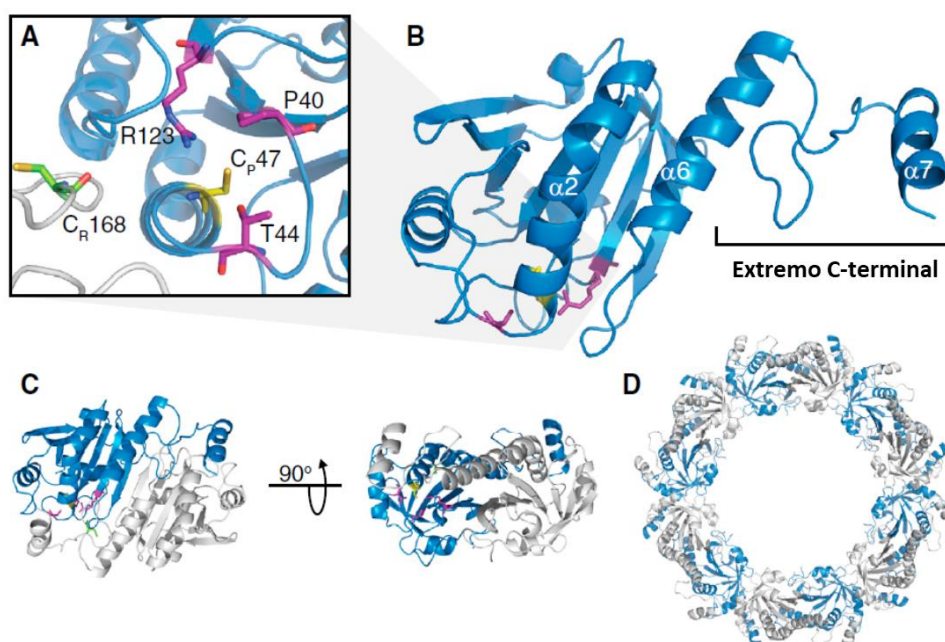
## F. Estudios de las Modificaciones Nitro-oxidativas de la *HsPrx3*

### F.I. INTRODUCCIÓN

La infección macrofágica por la cepa avirulenta *Mtb* H37Ra promueve la muerte de la célula huésped por apoptosis, mientras que dicho proceso no ocurre cuando la infección es por la cepa virulenta *Mtb* H37Rv. Se postula que la muerte por apoptosis del macrófago favorece la eliminación de este patógeno (457). Además se reportó que el potencial de membrana y la relación ATP/ADP de mitocondrias de macrófagos infectados por la cepa patogénica aumenta en relación con los infectados por la cepa no patogénica. Como ya se mencionó en la introducción general, la expresión de varias proteínas en macrófagos infectados también cambia, destacándose que la expresión de Prx3 disminuye en forma significativa durante la infección por cepas patogénicas a diferencia de la causada por cepas no-patogénicas, por un mecanismo que no ha sido aclarado (252). Esta observación es poco intuitiva, ya que se ha demostrado que la depleción de Prx3 sensibiliza a células a la inducción de apoptosis por staurosporina o TNF- $\alpha$  (458). Por otro lado, recientemente se ha demostrado que macrófagos infectados por cepas virulentas de *Mtb* liberan exosomas que inducen estrés oxidativo en macrófagos vecinos no infectados (459). La Prx3 se expresa en forma muy abundante en mitocondria ( $\sim 60 \mu\text{M}$ ) y reacciona con constantes del orden de  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (460) y peroxinitrito ((171), por lo que se sugiere que reduce la mayor parte de estos oxidantes en mitocondria.

La *HsPrx3* pertenece a la subfamilia Prxl/AhpC de las Prxs. Es codificada por un gen localizado en el cromosoma 10, dando como producto una proteína que contiene 256 aminoácidos con un extremo N-terminal de 62 aminoácidos, el cual se escinde para dar lugar a una proteína madura. La  $C_P$  es la Cys47 de la proteína madura, y se encuentra localizado en una región altamente conservada, mientras que la  $C_R$  es la Cys168 localizada en el

extremo C-terminal de la proteína (172). La *HsPrx3* posee una estructura cuaternaria compleja, siendo en su estado reducido un dodecámero formado por 12 unidades monoméricas que se muestra en la Figura F1D (461). Estudios *in vitro* mostraron que estas dodecámeros pueden apilarse para formar filamentos o entrelazarse entre sí para formar estructuras más complejas (461), por lo que se le atribuye a la *HsPrx3* una función del tipo chaperona y a su vez, este ensamble estructural genera un interés desde el punto de vista nanobiotecnológico (462).

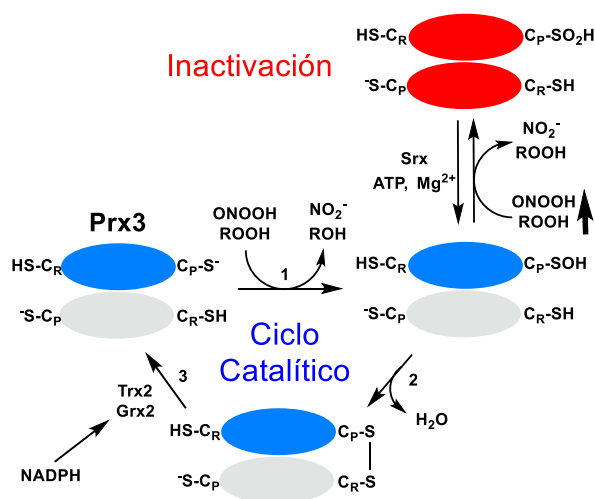


**Figura F1. Estructura cristalográfica de la *HsPrx3* (PDB<sub>ID</sub>= 5JCG).** (A) Se representa el sitio activo en la conformación FF en donde la C<sub>P</sub> (en amarillo) está rodeada por los residuos conservados de la tétada catalítica (Thr44, Pro40, Arg123, en violeta). También, se representa la C<sub>R</sub> (en verde) en el extremo C-terminal del monómero adyacente (en gris). (B) Se representa el monómero de la *HsPrx3* resaltándose las ubicaciones de la hélices- $\alpha_2$  y - $\alpha_6$  involucradas en la formación de fibras y la hélice- $\alpha_7$ , que es parte del extremo C-terminal. (C) Se representan los homodímeros de la *HsPrx3* (monómeros de color azul y gris) en dos vistas ortogonales. (D) Seis copias del homodímero de *HsPrx3* mostradas en C, se organizan como un anillo dodecamérico en condiciones reductoras. Figura modificada de (461).

La formación del dímero en la Prx3 se favorece cuando la enzima se encuentra en estado oxidado, mientras que la formación de dodecámeros se ve favorecida cuando se encuentra en estado reducido (463). Se ha reportado para otros miembros de la misma subfamilia de Prxs la existencia de equilibrios de oligomerización que responden a diferentes variables como pH (464),

concentración de la proteína, fuerza iónica, modificaciones pos-traduccionales como la fosforilación y el estado redox (200). En este objetivo de la Tesis, nos propusimos investigar más a fondo el estado oligomérico de la *HsPrx3*, como punto de partida para el estudio de los cambios estructurales que sufre la proteína por modificaciones oxidativas.

La *HsPrx3* es una Prx de 2-cisteínas típica, por lo que, luego del paso de oxidación se forma un disulfuro intermolecular entre el C<sub>P</sub>-SOH de un monómero y la C<sub>R</sub>-SH de otro monómero (Figura F2, ciclo catalítico) generándose un homodímero covalente orientado “cabeza-cola” (172). Como fuera indicado previamente, la formación del disulfuro (paso 2 de la Figura F2), involucra un cambio estructural parcial que involucra una transición desde la conformación FF a la LU de la enzima.



**Figura F2. Ciclo catalítico e inactivación de la *HsPrx3*.** El ciclo catalítico comienza en paso 1 con la oxidación de la C<sub>P</sub> por hidropéroxidos o peroxinitrito. Luego, sigue con el paso 2 que es la resolución, entendida como la formación del disulfuro entre la C<sub>P</sub>-SOH y la C<sub>R</sub>. Este disulfuro, es reducido por los sistemas Trx2/TR/NADPH y Grx2/GSH/GR/NADPH (paso 3). La reacción de inactivación por sobreoxidación implica la reacción del C<sub>P</sub>-SOH con una molécula de hidropéroxido o peroxinitrito dando como producto la C<sub>P</sub>-SO<sub>2</sub>H. La inactivación es reversible por sulfirredoxina (Srx) mediante una reacción lenta dependiente de ATP.

La Prx3 oxidada puede ser reducida en la mitocondria, por la tiorredoxina 2 (Trx2) o la glutarredoxina 2 (Grx2) por un mecanismo ditiólico (paso 3 en la Figura F2). Ambas reductasas muestran constantes catalíticas de reducción de Prx3 similares (465). A diferencia de Trx2, la Grx2 puede catalizar

también la formación o reducción de disulfuros mixto con GSH mediante un mecanismo monotiólico. El disulfuro formado en el sitio activo de la Trx2 oxidada es reducido por la TR mitocondrial mediante una reacción dependiente de NADPH. Por su parte las Grxs se reducen por GSH, cuya forma oxidada se regenera por la glutatión reductasa (GR) y también por TR mitocondrial (466) .

La Prx3 junto a Prx1, Prx2 y Prx4 componen el grupo de Prxs de 2-cisteínas típicas eucariotas susceptibles a inactivación por sobreoxidación en presencia de exceso de hidropéroxido. Las Prxs de 2-cisteínas típicas bacterianas, son resistentes a sobreoxidación. Un análisis estructural comparativo primario reveló que Prxs susceptibles a inactivación presentan motivos YF y GGLG cerca del sitio activo (Figura F3, gris) que están ausente en mayoría de las procariotas (167, 467). El motivo YF en la hélice C-terminal de una subunidad está próximo a la hélice- $\alpha_2$  que contiene el  $C_P$  de la subunidad adyacente, lo que dificulta la formación del disulfuro. Más recientemente, se descubrieron otros motivos moleculares adicionales, que discriminan distintos niveles de sensibilidad a la sobreoxidación entre las Prx susceptibles a inactivación (468). Experimentalmente, la *HsPrx3* muestra mayor resistencia a sobreoxidarse por  $H_2O_2$  que las *HsPrx1* y *HsPrx2* (469), como consecuencia de la más rápida formación del enlace disulfuro entre la  $C_P$  oxidada y la  $C_R$ , lo que fue atribuido a la presencia de residuos únicos adyacentes a la  $C_R$  de Prx3 (Asn232, Thr234, Asp236 y Pro238, Figura F3, Fucsia) (312).

```

HsPrx3      FTAPAVTQHAPYFKGTAVVNGEFKDLSDDDFKGKYLVLFFYPDFTFVCPTEIVAFSDKA
RrPrx3      FHTPAVTQHAPYFKGTAVVNGEFKELSDDDFKGKYLVLFFYPDFTFVCPTEIVAFSDKA
BtPrx3      --APAVTQHAPYFKGTAVVSGEFKEITSLDDFKGKYLVLFFYPDFTFVCPTEIIFAFSDKA
HsPrx2      -----IGKPAPDFKATAVVDGAFKEVKLSDYKGGYVVLFFYPDFTFVCPTEIIFAFSNA

HsPrx3      NEFHDVNCEVVAVSVDSHFSLAWINTPRKNGGLGHMNIALLSDLTKQISRDYGVLLGSA
RrPrx3      NEFHDVNCEVVAVSVDSHFSLAWINTPRKNGGLGHMNIALLSDLTKQISRDYGVLLGSA
BtPrx3      SEFHDVNCEVVAVSVDSHFSLAWINTPRKNGGLGHMNIALLSDLTKQISRDYGVLLGSA
HsPrx2      EDFRKLGCSEVLGVSVDSTHAWINTPRKEGGLGPLNIPLLADVTRRLSEDYGVLLKTD

HsPrx3      GLALRGLFIIDPNGVIKHLVNDLPVGRSVEETLRLVKAFOYVETHGEVCPANWTPDSPT
RrPrx3      GLALRGLFIIDPNGVIKHLVNDLPVGRSVEETLRLVKAFOYVETHGEVCPANWTPESPT
BtPrx3      GLALRGLFIIDPNGVIKHLVNDLPVGRSVEETLRLVKAFOYVEAHGEVSPANWTPESPT
HsPrx2      GIAYRGLFIIDGKGVLRQITVNDLPVGRSVEALRLVQAFQYTDHEGEVCPAGWKPGSDT

HsPrx3      IKPSPAASKEYFQKVNQ
RrPrx3      IKPSPASKEYFQKVNQ
BtPrx3      IKPSPASKEYFQKVNQ
HsPrx2      IKPNVDDSKKEYFSKHN-

```

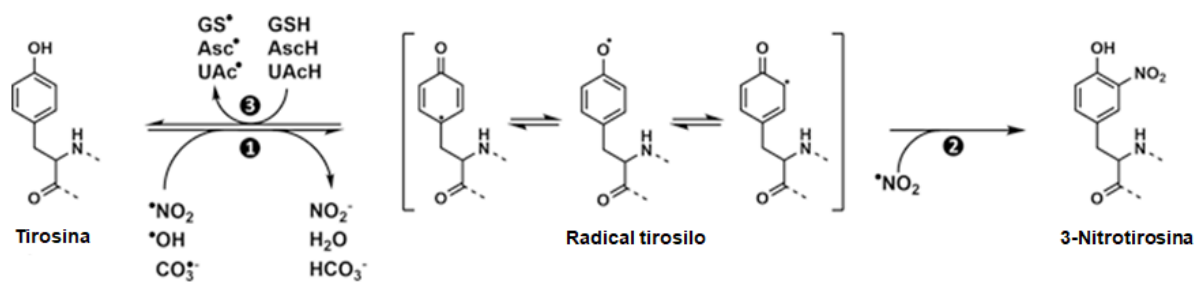
Figura F3. Alineación de secuencias entre la *HsPrx3* y la Prx3 de *Rattus rattus* y de *Bos taurus* (*RrPrx3* y *BtPrx3*, respectivamente) y la *HsPrx2* utilizando el software ExPASy CLUSTALW. En gris

se muestran las regiones YF y GGLG conservadas en Prx de 2-cisteínas susceptibles a inactivación, como las *HsPrx2* y *HsPrx3*. En fucsia se muestran los residuos de NTDP que estarían involucrados en la mayor resistencia a la inactivación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la *HsPrx3* en comparación a la *HsPrx2*. En rojo y amarillo se muestran los residuos que son diferentes en la secuencia de *RrPrx3* y *BtPrx3*, respectivamente, a la secuencia de la *HsPrx3*. Estas enzimas comparten un 93% de identidad, mientras que hay un 65% con la *HsPrx2*. Abreviaciones, *Homo sapiens* (*Hs*), *Rattus rattus* (*Rr*), *Bos Taurus* (*Bt*).

Dado que la mitocondria proporciona un ambiente altamente oxidante, que sea favorecida la formación del enlace disulfuro protegería a la *HsPrx3* de la inactivación por sobreoxidación. Adicionalmente, disminuye la probabilidad de que la forma oxidada a C<sub>P</sub>-SOH de la enzima reaccione con compuestos con grupos tiol diferentes a C<sub>R</sub>, ya sea GSH o tioles proteicos. Esta última reacción es considerada de importancia en la señalización redox por mecanismos de "redox relay", en el que la Prx sería el sensor redox que sensa el nivel de oxidantes, siendo otros tioles proteicos menos reactivos con hidroperóxidos oxidados en forma indirecta (182, 188, 189).

La forma sobreoxidada e inactiva de las Prxs de 2-cisteínas típicas, incluida la Prx3, es reducida por la Srx mediante una reacción lenta dependiente de ATP. La Srx se transporta desde el citosol a la mitocondria mediante un mecanismo que implica la formación de un complejo disulfuro con la proteína 90 de choque térmico, lo cual es promovido por la liberación de peróxido desde la mitocondria. Si bien *in vitro* Prx3 es más resistente a la sobreoxidación que Prx1 y Prx2 citosólicas, estudios recientes *in vivo* indican que Prx3 es la única Prx sobreoxidada detectada en diferentes tejidos de ratón en condiciones normales (470).

Como ya mencionamos en la introducción general de esta Tesis, el peroxinitrito es un potente agente oxidante y es capaz de nitrar residuos de Tyr proteicos (definido como el reemplazo en la posición 3 del anillo fenólico de la Tyr del hidrógeno por un grupo nitro libre), proceso mediado por los radicales derivados de la homólisis del peroxinitrito (Figura F4) (56).



**Figura F4. Principales reacciones implicadas en la formación de 3-nitrotirosina.** La nitración de Tyr se logra a través de dos pasos principales de reacción. Inicialmente, la Tyr se oxida por varios oxidantes de un electrón (derivados principalmente de la homólisis de peroxinitrito) a radical tirosilo (1); entonces el radical tirosilo reacciona con nitrógeno dióxido radical, produciendo el producto no radical 3-nitrotirosina (2). Agentes reductores como el GSH, el ácido ascórbico (AscH) y el ácido úrico (UACh) pueden reducir los radicales tirosilo de nuevo a tirosina (3), evitando así la nitración de los residuos de tirosina. Esquema modificado de (471).

La nitración de residuos de tirosina se considera una “huella molecular”, de oxidantes derivados del  $\text{NO}$ , entre ellos el peroxinitrito (472). A su vez, esta modificación es un proceso muy selectivo (473, 474). La nitración de un residuo de tirosina específico, podría tener un efecto en la función de la proteína (56). El efecto de la nitración en Prxs ha sido estudiado en el caso de la Prx2 de glóbulo rojo humano, en la que ocurre en la secuencia YF C-terminal anteriormente mencionada y facilita la formación del disulfuro entre la  $C_P$  y la  $C_R$  proporcionando mayor resistencia a la sobreoxidación, a la vez aumenta la actividad peroxidasa de esta Prx (475, 476). La Prx3 fue detectada nitrada en corazones de ratones diabéticos, enfermedad en la que se propone un incremento en la formación mitocondrial de peroxinitrito (477), si bien en dicho estudio no se identificó el residuo de Tyr nitrado (478).

Por todo lo anterior, y dado que se ha reportado que modificaciones nitro-oxidativas proteicas podrían estar asociadas con incrementos en la velocidad de degradación (253, 254), decidimos investigar posibles modificaciones nitro-oxidativas de *HsPrx3* recombinante y en mitocondrias aisladas.

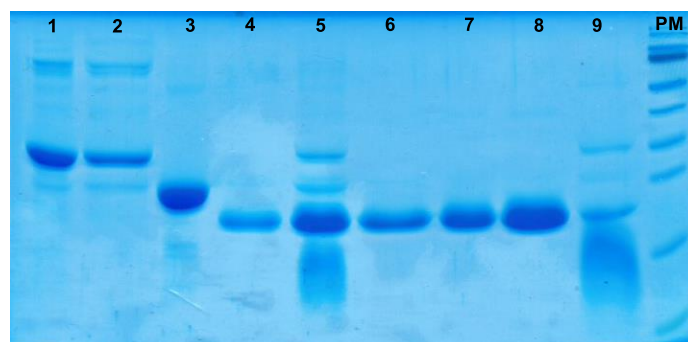
En nuestro grupo de investigación, durante el transcurso de esta Tesis, investigamos la actividad peroxinitrito reductasa de la *HsPrx3* recombinante y determinamos es altamente eficiente en la reducción de peroxinitrito, el cual puede formarse en mitocondria por la reacción controlada por difusión entre



O<sub>2</sub><sup>•</sup> y el <sup>•</sup>NO. Los resultados fueron publicados en la revista “Free Radical Biology & Medicine” el año 2019 (171) en el que María Inés de Armas y Romina Esteves son primeras autoras y yo soy coautor. Mi contribución en este proyecto fue la determinación de modificaciones estructurales de la proteína durante su oxidación, así como el estudio de modificaciones nitro-oxidativas de HsPrx3 recombinante expuesta a peroxinitrito. En este objetivo también planteamos la detección de modificaciones nitro-oxidativas de Prx3 en mitocondrias aisladas tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o peroxinitrito.

## F.II. MATERIALES Y MÉTODOS

**Expresión, Purificación, reducción y cuantificación de la HsPrx3.** El plásmido de la HsPrx3 (clonado en el vector pET-28a) fue amablemente donado por la Dra. C. Winterbourn de la Universidad de Christchurch, Nueva Zelanda. Este plásmido contiene una secuencia de una cola de 6 residuos de His en la región N-terminal 6 seguido de un sitio de corte de proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV, Tobacco Etch Virus) más 3 residuos de Gly adicionales (secuencia ENLYFQSGGG, siendo el sitio de corte es entre los aminoácidos Q y S). La proteína purificada a partir de este plásmido es la HsPrx3 madura, que como ya se mencionó, pierde 62 aminoácidos en la región N-terminal por procesamiento post-traducciona (193). Se generaron versiones por mutagénesis sitio dirigida de la HsPrx3 en las cuales los residuos de C<sub>P</sub> o C<sub>R</sub> fueron reemplazados individualmente por Ser (C<sub>P</sub>S HsPrx3 o C<sub>R</sub>S HsPrx3, respectivamente) en colaboración con Msc. Thiago Alegria del Departamento de Genética y Biología Evolutiva, Instituto de Bioceánicas, Universidad de San Pablo. La expresión y purificación de la proteínas fue realizada con modificaciones menores a como se describió anteriormente (193). La concentración de las proteínas se midió a 280 nm, usando un ε de 19,940 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> calculados de acuerdo a la secuencia aminoacídica utilizando el servidor informático ExpASy (280). La HsPrx3 pura migró como una sola banda en el gel de la electroforesis SDS-PAGE bajo condiciones reductoras (Figura F5) y con PM de 21,797.4 Da determinado por espectrometría de masa, que se corresponde con la masa prevista luego del corte con la TEV.



**Figura F5. Gel al 15% de electroforesis SDS-PAGE del corte de la cola de HISs de la *HsPrx3* recombinante.** En el carril 1 y 2 se muestra la migración de la proteasa TEV, dos stocks purificados en oportunidades diferentes. En el carril 3, se muestra la *HsPrx3* con cola de His purificada y en el 4 se muestra la migración de *HsPrx3* luego del proceso de corte de cola de His por TEV de una purificación previa, utilizada como control del corte. El carril 5 muestra la mezcla de proteínas resultante de la incubación overnight de *HsPrx3* con cola de His y TEV, sin separar. Los carriles 6, 7, 8 muestran la elución de la *HsPrx3* sin cola de His utilizando un gradiente de imidazol de concentraciones que van de 10, 20 y 50 mM, respectivamente. El carril 9 corresponde a la elución de proteínas retenidas en la columna y que efluyen a 500 mM imidazol (TEV, Prx3 remanente sin cortar, péptidos escindidos).

La reducción de la proteína se realizó inmediatamente antes de su uso por incubación con exceso de DTT durante 30 minutos en hielo, que fue posteriormente eliminado por gel filtración usando amortiguador fosfato de sodio (100 mM) mas DTPA (0.1 mM), pH 7.4 recién desgasificado (previamente tratado con 5 µg/mL de catalasa, que luego se eliminó usando filtros de 30 KDa para minimizar el contenido adventicio de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que podría favorecer la reoxidación de la enzima (407)). El contenido de tioles reducidos en las proteínas se determinó utilizando DTNB, midiendo absorbancia a 412 nm ( $\epsilon_{412} = 14,150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (281). Por lo general, se midieron 2 o 3 tioles por proteína sin agregar o agregando SDS 1% a la muestra, respectivamente, luego del tratamiento por DTT.

**Preparación y cuantificación de reactivos.** Las soluciones de peroxinitrito y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se prepararon y cuantificaron como se describe en los capítulos anteriores.

**Cambios en la estructura cuaternaria de la *HsPrx3* dependiente de su estado redox.** La *HsPrx3* reducida (54 µM) sola o expuesta a una concentración equimolar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue analizada por SEC con el fin de realizar un control calidad de la proteína y observar los cambios en la estructura

cuaternaria dependientes del estado redox, ya descritos anteriormente para esta Prx (479, 480). La columna acoplada al equipo fue BioSep-SEC-s3000, tamaño (7.8 x 300 nm) y fue equilibrada con amortiguador fosfato de sodio (20 mM), NaCl (150 mM), pH 7.8, a temperatura ambiente y el flujo fue 1 mL/min. También realizamos mediciones DLS de las muestras en un instrumento Dynapro Molecular Sizing. Las mismas se centrifugaron previamente durante 20 min a 20,000 g. Los datos fueron recolectados con intervalos de 10 s con al menos 100 adquisiciones. El coeficiente de difusión se determinó a partir del análisis de fluctuaciones dependientes del tiempo medidas de la intensidad de dispersión y se utiliza para calcular el radio hidrodinámico ( $R_H$ ) de la proteína a través de la ecuación de Stokes-Einstein. El análisis de los datos se realizó con el software Dynamics V6.3.40. Estos experimentos fueron realizados en el Departamento de Genética y Biología Evolutiva, Instituto de Biociencias, Universidad de San Pablo, en colaboración con el Msc. Thiago Alegria y el Dr. Luis Eduardo Soares Netto.

Alternativamente, se evaluó la estructura cuaternaria de la *HsPrx3* (50  $\mu$ M) en diferentes condiciones redox por SAXS, utilizando 1. una muestra de *HsPrx3* reducida previamente ( $HsPrx3_{red\ prev}$ , a las que se retiró el exceso de DTT por gel filtración), 2. otra muestra de enzima en presencia de DTT, 2 mM, ( $HsPrx3_{red}$ ) y 3. la  $HsPrx3_{red\ prev}$  y oxidada con una concentración equimolar de  $H_2O_2$  ( $HsPrx3_{ox}$ ). Las muestras se prepararon en amortiguador fosfato de sodio (20 mM) más NaCl (150 mM), pH 7.8. Las mediciones SAXS se realizaron utilizando el instrumento de SAXS Nanostar (Bruker, Billerica, Massachusetts) en colaboración de la Dra. Maximilia Frazao de Souza y del Dr. Cristiano Oliveira del Instituto de Física de la Universidad de Sao Paulo, Brasil. La medidas en este equipo se mejoran mediante el uso de la fuente de microfoco Genix3D junto con la óptica multicapa Fox3D y dos juegos de ranuras sin dispersión para la definición del haz, todo proporcionado por Xenocs (Sassenage, Francia). Las muestras se mantuvieron en un capilar de cuarzo pegado a una caja de acero inoxidable. La dispersión del agua se midió en las mismas condiciones de la muestra y se utilizó para normalizar los datos a escala absoluta. La temperatura durante la medición se mantuvo constante a 25 °C. Con el fin de analizar el cambio en la estructura de la *HsPrx3* en el

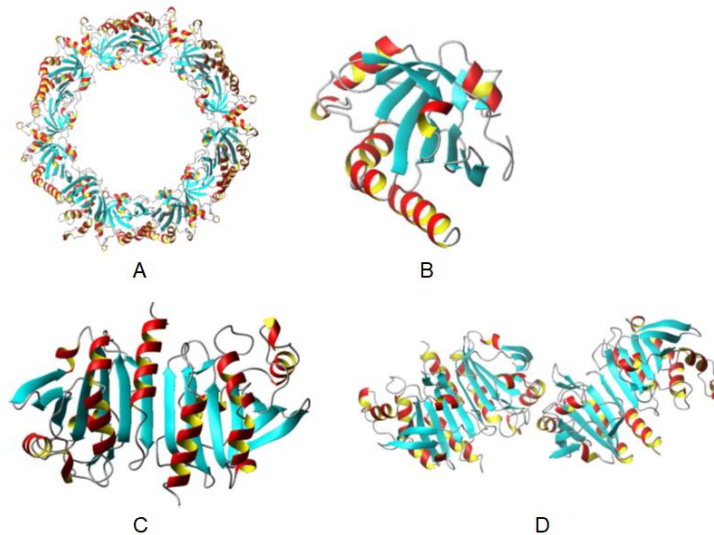
tiempo, algunas muestras fueron medidas durante 30 minutos en ciclos sucesivos con una duración total de 5 horas. La longitud de onda del haz de rayos X monocromático entrante fue  $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$  ( $\text{Cu}_{K\alpha}$ ) y la distancia de la muestra al detector fue de 0.67 m, proporcionando un intervalo  $q$  desde 0.009 a  $0.35 \text{ \AA}^{-1}$ . Los datos de dispersión 2D se recopilaron en un detector Vantec2000 (Bruker), y se realizó la integración de los datos de utilizando el software Bruker SAXS. Posteriormente, se procedió al ajuste de las intensidades de dispersión experimentales por el programa GNOM (481), del cual se obtiene la función de distribución de distancias  $p(r)$  y nos proporciona el radio de giro ( $R_g$ ) y la intensidad cuando el vector de dispersión ( $q$ ) es 0, es decir,  $I(0)$ . Al analizar todo el rango de datos, fue posible obtener el PM a partir de la siguiente ecuación (482):

$$\text{PM} = \frac{I(0)}{C (\Delta\rho m)^2} N_A$$

donde  $\Delta\rho m$  es el cambio en la densidad electrónica,  $N_A$  es el número de Avogadro y  $C$  la concentración en mg/ml. Para las proteínas, una buena aproximación de  $\Delta\rho m$  es  $2 \times 10^{10} \text{ cm/g}$ .

A partir de la estructura cristalográfica de la Prx3 de *Bos taurus* (*BtPrx3*, PDB<sub>ID</sub>= 1ZYE) que comparte un 93% de identidad con la de humano como se muestra en la Figura F3 (en el momento de la realización de estos experimentos no se había resuelto la estructura cristalográfica de la humana (PDB<sub>ID</sub>= 5JCG) la cual mostramos en la Figura F1) y mediante la utilización del programa CRY SOL (483), podemos simular la intensidad de dispersión para esta estructura y compararla con los datos experimentales obtenidos en las diferentes muestras estudiadas, por lo que podemos obtener también el radio de giro ( $R_g$ ) y el PM.

Además, utilizamos el programa OLIGOMER (484) con el fin de hipotetizar la fracción de estructuras derivadas del PDB, 1ZYE, presentes en la solución estudiada. Las estructuras para el análisis de los datos experimentales se muestran en la Figura F6 y son las siguientes: (A) el dodecámero, (B) el monómero (C), el dímero (D), el tetrámero de la estructura cristalográfica de la *BtPrx3*, (PDB<sub>ID</sub>: 1ZYE).



**Figura F6.** Estructura cristalográfica de la *BtPrx3* (PBD<sub>ID</sub>: 1ZYE) representada como A, y las estructuras derivadas consideradas para el análisis por el programa OLIGOMER: monómero (B), dímero (C) y tetrámero (D).

#### **Cambio de fluorescencia intrínseca de *HsPrx3* durante la oxidación.**

La *HsPrx3* reducida se mezcló rápidamente con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) más DTPA (0.1 mM), pH 7.8 y 25 °C. El cambio de fluorescencia se registró en un fluorímetro de flujo detenido ( $\lambda_{exc}$  = 295 nm, emisión de fluorescencia total).

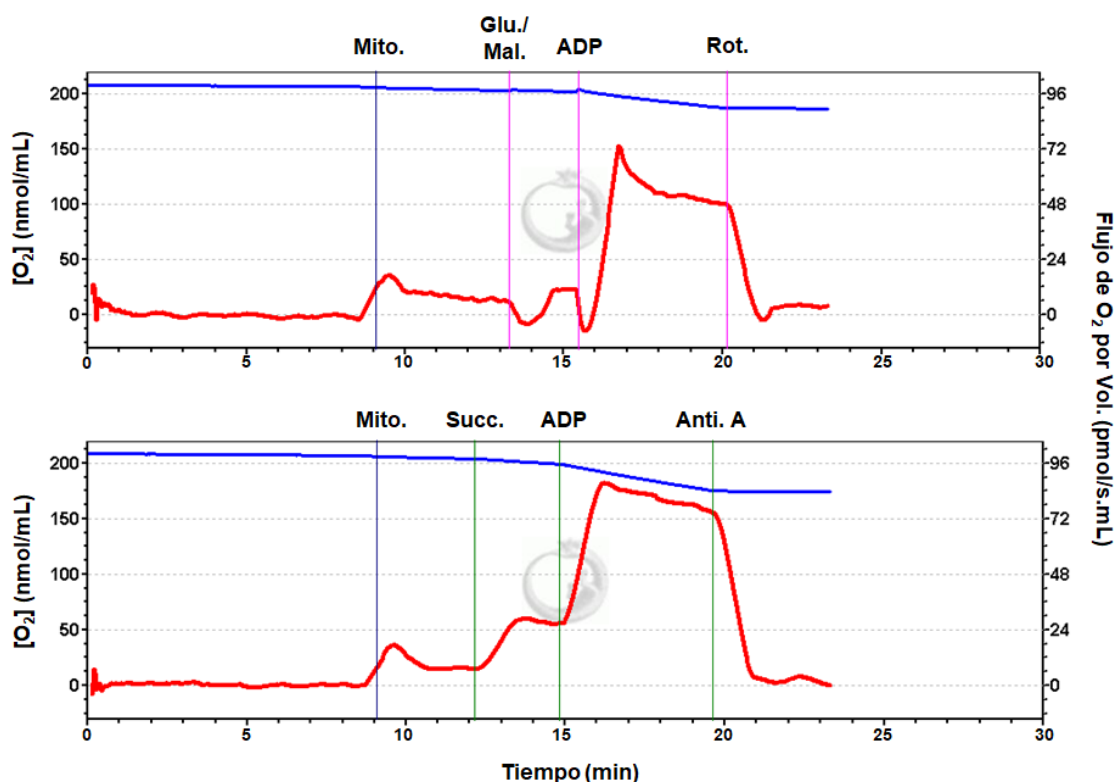
**Purificación del anticuerpo anti-*HsPrx3*.** Primeramente, a partir del suero de un conejo inmunizado dos veces con *HsPrx3* recombinante, se realizó una precipitación de proteínas con una solución saturada de sulfato de amonio, durante toda la noche a 4 °C. Luego, se centrifuga a 3000 g durante 30 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se mantiene en agitación lenta siendo sometido a un segundo paso de precipitación durante toda la noche a 4 °C. Se centrifuga a 3000 g durante y el precipitado se resuspende en amortiguador PBS, pH 7.4. El exceso de sulfato de amonio es removido por diálisis. La separación del anti-*HsPrx3* se realizara utilizando una columna de sefarosa activada con cianuro de bromo. Durante la preparación de la columna se agrega una solución de *HsPrx3* con una concentración entre 3.5 y 7.5 mgrs/mL de gel, en amortiguador bicarbonato 100 mM, NaCl 500 mM, pH 8.3. Luego de pasos de bloqueo, lavado y equilibrado de la columna se agrega la fracción del suero enriquecida en los anticuerpos, la que fue sometida a los 2 pasos de precipitación. La elución del anticuerpo se realizó mediante el uso

soluciones ácidas y básicas colectándose fracciones y midiendo a 280 nm. Finalmente, se unen las fracciones eluidas que muestran señal a 280 nm y son concentradas utilizando un tubo Falcon concentrador con un límite de 10,000 Da que a su vez permite solubilizar los anticuerpos en un amortiguador PBS pH 7-8. El stock de la solución del anticuerpo se guarda a 4 °C agregando azida de sodio 0.02%.

**Detección de oxidación, sobreoxidación de la C<sub>P</sub> y formación de 3-nitrotirosina en HsPrx3 recombinante expuesta a peroxinitrito.** La HsPrx3 reducida (19 µM) se trató con diferentes concentraciones de peroxinitrito (diluciones hechas en NaOH, 10 mM) o previamente descompuesto peroxinitrito (diluciones hechas en amortiguador fosfato de sodio, pH 7.4) en amortiguador fosfato de sodio (100 mM) más DTPA (0.1 mM), pH 7.8 y 25 °C. Luego de 2 minutos, se añadió el agente alquilante, N-etilmaleimida (NEM), 20 mM, a las muestras y se incubó por 30 minutos. Las muestras se corrieron en un gel de 15% de electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras (agregado de β-mercaptoetanol) o no reductoras, para posteriormente realizar un Western Blot mediante una transferencia del gel a una membrana de PVDF y inmunodetección usando diferentes anticuerpos, el anti-3-nitrotirosina policlonal (1:1000) también generado en nuestro laboratorio, como ya se reportó en (485) y el anticuerpo policlonal de conejo anti-Prx-C<sub>P</sub>-SO<sub>2/3</sub>H comercial (1:1000, abcam, 1b16830).

**Evaluación del estado redox de la Prx3 en mitocondrias aisladas del cerebro de rata.** Para el ensayo se utilizó una fracción subcelular enriquecida en mitocondrias (486) de cerebro rata que fueron guardadas a -80 °C. Dichas muestras tenían una concentración de proteínas de 32 mg/mL y las mitocondrias se encontraban acopladas (Figura F7). La concentración de proteínas elegida para trabajar fue de 2 mg/mL según (487), por lo que se realizaron diluciones en amortiguador 40 mM HEPES, 50 mM NaCl, 1mM EGTA, pH 7.4, en un volumen final de 1 ml. Se trató a las mitocondrias con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 mM) durante 10 minutos. Luego, se le agregó NEM 50 mM y CHAPS 1% durante otros 10 minutos, para finalmente iniciar la preparación de las muestras para la corrida de un gel de 15% de electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras.

Luego, realizamos un Western-Blot dejando la membrana con el anticuerpo anti-*HsPrx3* (1:500) (siendo alto el % de homología entre las Prx3 de las distintas especies) o anti-succinato deshidrogenasa (SDH, 1:1000, abcam, ab14715) a 4 °C. Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. Valeria Valez y el Dr. Adrián Aicardo, del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República.



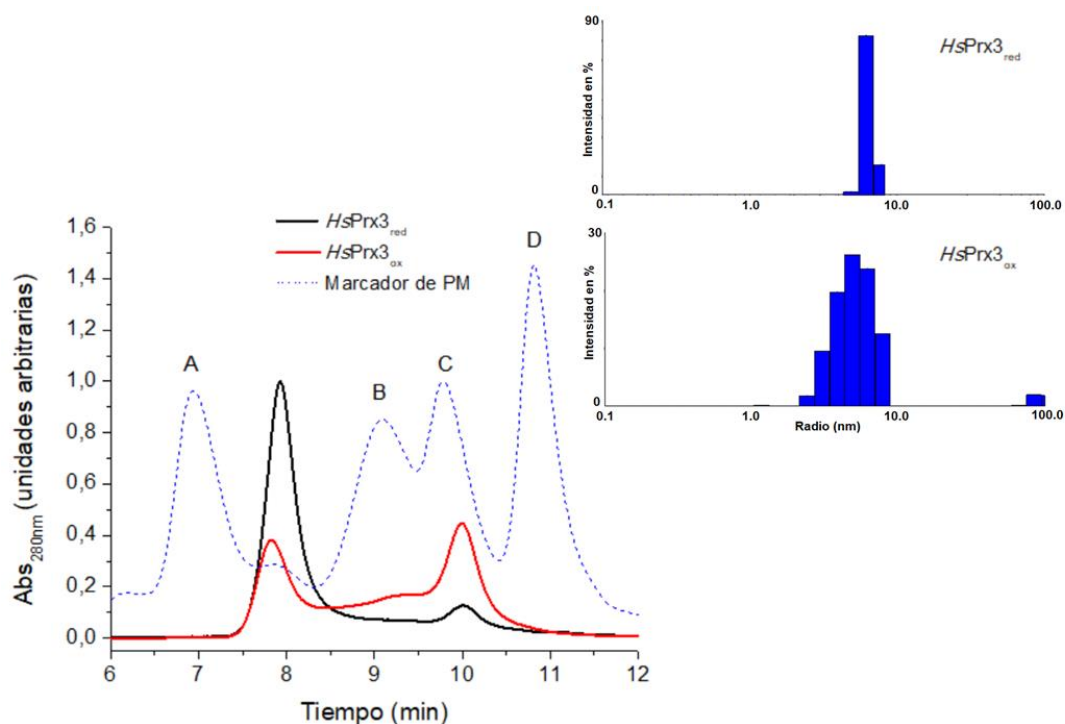
**Figura F7. Acople de la cadena de transporte de electrones con la síntesis de ATP de las mitocondrias aisladas.** Registros de la velocidad de consumo de O<sub>2</sub> evaluado la complejo I (arriba) y complejo II (abajo) medido en un respirómetro de alta resolución OROBOROS Oxygraph-2k a 37 °C. En el registro superior, la velocidad de consumo de O<sub>2</sub> se midieron después de la adición secuencial de Glutamato (10 mM) y Malato (2 mM) (Glu./Mal.), ADP (4 mM), rotenona (0.5 μM) (Rot.). En el registro inferior, la velocidad de consumo de O<sub>2</sub> se midió después de la adición de succinato (10 mM) (Succ.), ADP (4 mM), antimicina A (2.5 μM) (Anti. A). La concentración de proteínas de las mitocondrias fue 0.5 mg/mL en ambos experimentos. El índice de control respiratorio (RCR, respiratory control ratio) que se calcula realizando la división entre el consumo de O<sub>2</sub> en estado 3 (pendiente luego del agregado de ADP en presencia de sustratos) y el consumos de O<sub>2</sub> en estado 4 (pendiente luego del agregado de sustrato) fue 5 y 2.5 para el complejo I y complejo II, respectivamente, mostrando el acople de la cadena de transporte de electrones a la síntesis de ATP.

### F.III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **Análisis los cambios en la estructura cuaternaria de la *HsPrx3* dependiente del estado redox.**

Determinamos la estructura cuaternaria de la *HsPrx3* en solución por técnicas de SEC y SAXS, bajo diferentes condiciones redox. En la Figura F8 observamos el perfil de SEC de la *HsPrx3* reducida y oxidada por una concentración equimolar de  $H_2O_2$ . Se puede observar que en la condición de la *HsPrx3*<sub>red</sub> un pico mayoritario que correspondía al dodecámero de la proteína (~260 KDa) según al perfil del marcador de PM. Esto se pudo corroborar con las mediciones de DLS, que se muestra en el inserto de la Figura F8, observándose una población homogénea de partículas con un PM de 260 KDa y un  $R_H$  de 6.4 nm. Cuando observamos la corrida de la *HsPrx3*<sub>ox</sub>, observamos 2 picos mayoritarios, uno correspondiente al dodecámero y otro al dímero (~45 KDa). Este comportamiento análogo al observado por Cao y colaboradores cuando utilizaron alta concentración de Prx oxidada (10 mg/mL, ~400  $\mu$ M) (463). Además, entre los minutos 9 y 10 de corrida se observa un hombro, que corresponde una masa de un tetrámero (462), que se observa incluso en mutantes de la *HsPrx3* que estrictamente tienen una estructura dimérica (480). Las mediciones de DLS muestran una población heterogénea y los valores del PM y  $R_H$  de la señal mayoritaria son 156 KDa y 5.1 nm, respectivamente.



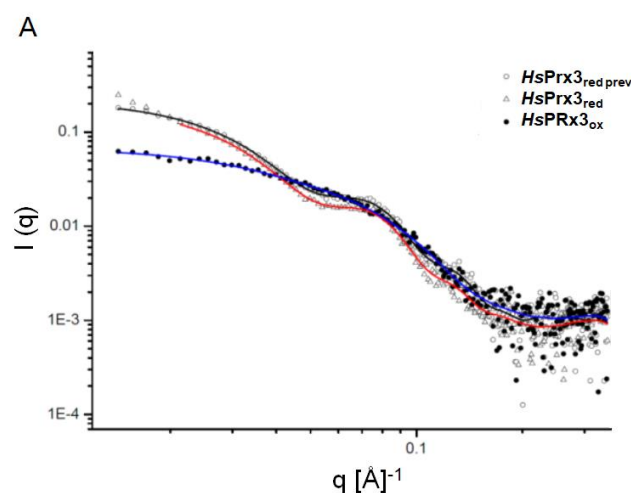


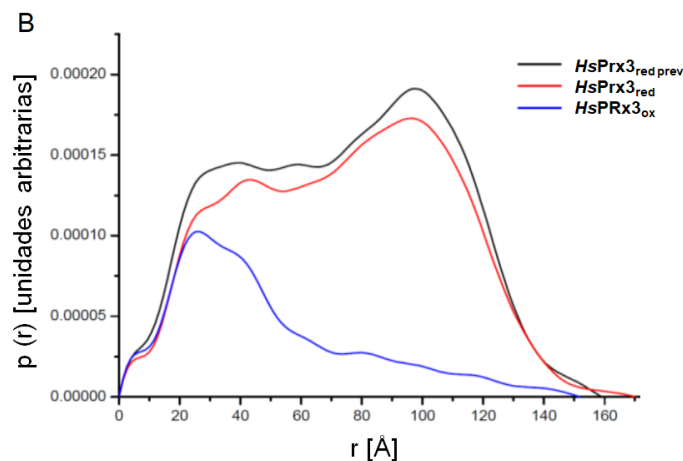
**Figura F8. Perfil de SEC y DLS de la HsPrx3 reducida y oxidada.** La HsPrx3 reducida (54  $\mu\text{M}$ ) sola o expuesta a una concentración equimolar de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La columna utilizada fue BioSep-SEC-s3000, tamaño (7.8 x 300 nm) y la fase móvil fue amortiguador fosfato de sodio (20 mM) más NaCl (150 mM), pH 7.8, a un flujo 1 mL/min. El patrón de PM corresponde a: A-agregados proteicos, A- tiroglobulina de 670 KDa, B-  $\gamma$ -globulina de 158 KDa, C- Ovoalbúmina de 44 KDa, D- Mioglobina de 17 KDa. Inserto: mediciones de DLS de las muestras de HsPrx3 se muestran histogramas de la intensidad de dispersión (en %) vs radio de la partícula (nm).

Estos resultados fueron realizados en el laboratorio del Dr. Luis Eduardo Soares Netto, brindándonos la oportunidad de poder realizar experimentos de SAXS en colaboración con el Dr. Cristiano Oliveira, para evaluar el estado oligomérico de la HsPrx3 reducida y oxidada. En la Figura F9 se muestra el perfil de la intensidad de dispersión los datos obtenidos para las diferentes muestras de la HsPrx3 y a partir de los ajustes de estos en el programa GNOM se obtiene la función de distribución de distancia  $p(r)$  (481). El  $R_g$  de las partículas que se obtienen de los ajustes fueron los siguientes  $55.5 \pm 0.3$ ,  $57.8 \pm 0.2$ ,  $41 \pm 0.1 \text{ \AA}$ , para la HsPrx3<sub>red prev</sub>, HsPrx3<sub>red</sub> y la HsPrx3<sub>ox</sub>, respectivamente. También se obtuvieron los valores PM promedios de la muestras siendo  $224 \pm 22$ ,  $203 \pm 20$ ,  $69 \pm 7 \text{ KDa}$ , para la HsPrx3<sub>red prev</sub>, HsPrx3<sub>red</sub> y la HsPrx3<sub>ox</sub>, respectivamente. Los parámetros de los datos simulados para la estructura dodecamérica de la BtPrx3 fueron  $R_g = 57.2 \text{ \AA}$  y  $\text{PM} = 214.5 \text{ KDa}$ . Los resultados de los experimentos de SAXS para la HsPrx3

reducida están en concordancia con los reportados por Phillips y colaboradores (462), aunque ellos no realizaron el análisis de la *HsPrx3* oxidada.

Los resultados obtenidos de los ajustes de los datos utilizando el programa OLIGOMER (488), muestran la fracción de las estructuras derivadas de la cristal de la *BtPrx3*, que podrían aparecer en solución definidas en Materiales y Métodos, siendo los valores siguientes: para la muestra *HsPrx3*<sub>red prev</sub> se obtuvo una fracción de  $0.901 \pm 0.007$  para la estructura (A),  $0.040 \pm 0.001$  para la (B),  $0.000 \pm 0.000$  para la (C) y  $0.060 \pm 0.008$  para la (D); para la muestra *HsPrx3*<sub>red</sub> se obtuvo una fracción de  $0.965 \pm 0.002$  para la estructura (A),  $0.035 \pm 0.001$  para la (B),  $0.000 \pm 0.000$  para la (C)  $0.060 \pm 0.008$  para la (D); para la muestra *HsPrx3*<sub>ox</sub> se obtuvo una fracción de  $0.06 \pm 0.01$  para la estructura (A),  $0.05 \pm 0.00$  para la (B),  $0.24 \pm 0.02$  para la (C),  $0.65 \pm 0.008$  para la (D). En resumen, a partir de este análisis se observó que en las muestras *HsPrx3*<sub>red prev</sub> y *HsPrx3*<sub>red</sub>, la enzima se encuentra en su totalidad como un dodecámero en solución, mientras que en la muestra *HsPrx3*<sub>ox</sub>, se encuentra en un 90% como mezcla de dímero y tetramero (24% vs 65%). El alto porcentaje de esta “estructura tetramérica” llama la atención, ya que no se observa tal proporción en los experimentos de SEC pero los experimentos de SAXS son mucho más prolongados en cuanto a la escala de tiempo.

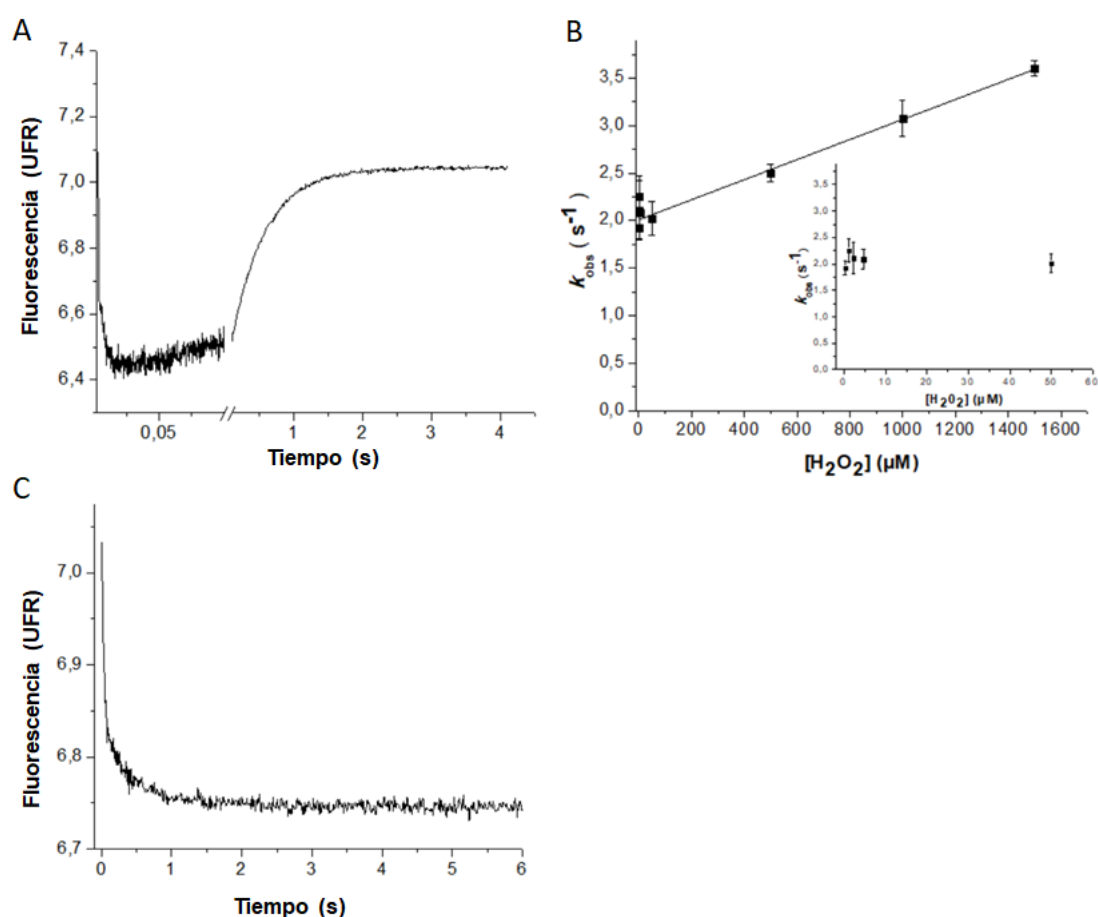




**Figura F9. Perfil de SAXS de la HsPrx3 reducida y oxidada** (A) Gráfico de intensidad de dispersión en función del módulo de vector de dispersión ( $q$ ) para las muestras,  $HsPrx3_{red\ prev}$ ,  $HsPrx3_{red}$  y  $HsPrx3_{ox}$ . Las líneas continuas representan el mejor ajuste de los datos, ya que en la muestra  $HsPrx3_{red}$  se observan altos valores de intensidad a valores de  $q$  pequeños lo que indica la presencia de agregados en la muestra. (B) función de distribución de distancia  $p(r)$  vs el radio (en Å) de las diferentes muestras.

**Cambios en la intensidad de fluorescencia intrínseca de HsPrx3 vinculados a su estado redox.** Varios integrantes de la familia de Prxs sufren cambios en la intensidad de su fluorescencia intrínseca de los Trp asociados al estado redox de su  $C_p$  (206, 247, 393). En el caso de la Prxs pertenecientes a la subfamilia AhpC/Prx1, se reportó un complejo cambio de la intensidad de fluorescencia que involucra dos fases (203, 211). La HsPrx3, posee dos residuos de Trp altamente conservado entre la subfamilia Prx1/AhpC, que son responsables de los cambios de fluorescencia en la AhpC bacteriana expuesta a hidroperóxidos (203). Dado que los estudios cinéticos aprovechando los cambios de fluorescencia intrínseca durante la oxidación de otros miembros de la subfamilia AhpC/Prx1 utilizaron  $H_2O_2$  como oxidante, decidimos analizar los cambios en la fluorescencia de la HsPrx3 cuando se expone a este oxidante. Como se esperaba, la HsPrx3 también presentó un cambio de fluorescencia bifásica cuando se expuso a  $H_2O_2$ . La primera fase fue muy rápida, que casi no se detectó utilizando concentraciones menores de  $2\ \mu M$  de  $H_2O_2$ , incluso a bajas temperatura (pH 7.8,  $14\ ^\circ C$ ) (Figura F10). Considerando que la vida media de la primera fase de reacción cuando se utiliza  $2\ \mu M$  de la HsPrx3 es inferior al tiempo de mezcla del fluorímetro de flujo detenido ( $<1.1$  milisegundos), podemos afirmar que la constante de velocidad de este proceso bimolecular sería  $\sim 10^8\ M^{-1}s^{-1}$ . La constante de velocidad de la oxidación de

*HsPrx3* por  $\text{H}_2\text{O}_2$  ha sido estudiada previamente por cinética de competencia, que también indicó una reacción muy rápida ( $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4 (460)). La  $k_{\text{obs}}$  de la segunda fase del cambio de intensidad de fluorescencia, no dependía de concentraciones menores a  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Realizando el ajuste del gráfico  $k_{\text{obs}}$  vs la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y observando el corte con el eje Y, obtenemos que la constante de velocidad de la segunda fase es  $2 \text{ s}^{-1}$ . Experimentos similares utilizando peroxinitrito como oxidante, realizados en nuestro laboratorio, indicaron que la constante de velocidad de segunda fase fue similar, es decir que esta fase es independiente de la naturaleza del oxidante (171).



**Figura F10. La oxidación de la *HsPrx3* mediado por oxidantes provoca un cambio bifásico en la fluorescencia intrínseca de la proteína.** (A) La *HsPrx3* reducida ( $0.2 \mu\text{M}$ ) se mezcló rápidamente con  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0.2 \mu\text{M}$ ) a pH 7.8 y  $14 \text{ }^\circ\text{C}$ , se siguió el curso temporal del cambio en la intensidad de fluorescencia intrínseca ( $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ , emisión de fluorescencia total). (B) El gráfico muestra el efecto de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la  $k_{\text{obs}}$  del ajuste de la segunda fase (a una exponencial simple), utilizando las mismas condiciones que en A pero usando diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en exceso. La fase inicial del cambio de fluorescencia no se pudo detectar. En el inserto, se muestra el efecto a concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  menores a  $50 \mu\text{M}$ . (C) La  $\text{C}_{\text{R}}\text{S}$  *HsPrx3* reducida ( $1 \mu\text{M}$ ) se mezcló rápidamente con  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1 \mu\text{M}$ ) a

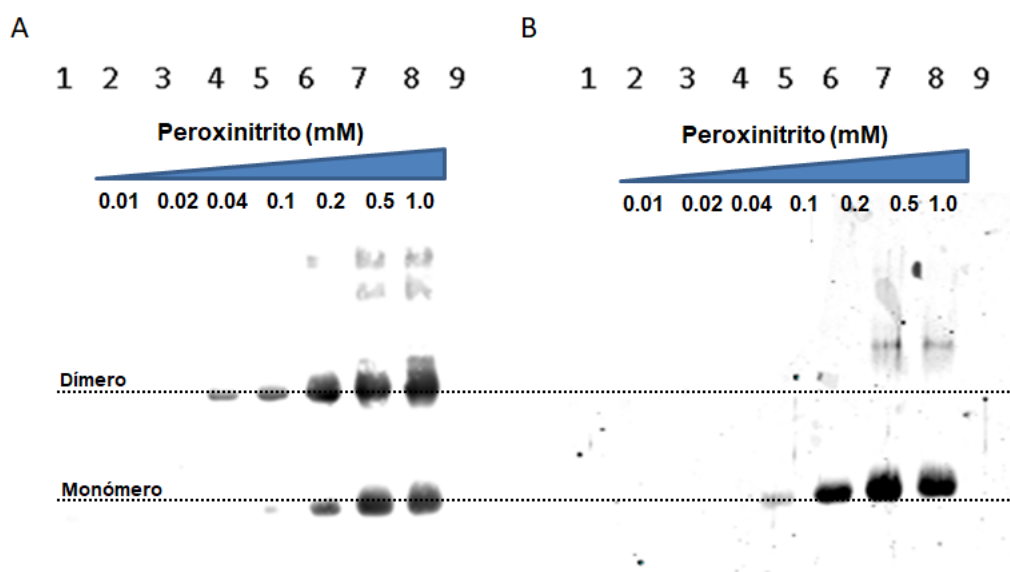
pH 7.8 y 25 °C, se siguió el curso temporal del cambio en la intensidad fluorescencia intrínseca ( $\lambda_{\text{ex}} = 295$  nm, emisión de fluorescencia total).

Cuando  $C_P$ S de la *HsPrx3* se expuso a  $H_2O_2$  (1–80  $\mu\text{M}$ ), no se detectó cambios en su fluorescencia intrínseca, indicando que la oxidación de  $C_P$  es necesaria para que el cambio fluorescencia tenga lugar. Además, mientras que una primera fase de disminución de fluorescencia todavía tuvo lugar cuando la  $C_{R/S}$  *HsPrx3* fue expuesta a  $H_2O_2$ , la segunda fase de recuperación de fluorescencia no se observó (Figura F10C) a menos que el oxidante se añadiera en concentraciones de diez veces en exceso con respecto a la enzima (171). Estos resultados están de acuerdo a que, tal como fuera reportado anteriormente para otras Prxs de 2-cisteínas típicas, la segunda fase del cambio de fluorescencia es causada por la formación de disulfuro por la reacción de condensación entre la  $C_P$ -SOH y la  $C_R$ -SH. Sin embargo, cabe señalar que ocurre un cambio más complejo en la conformación después de la oxidación de las Prxs de 2-cisteínas típicas. Para el caso de la *HsPrx3*, el cambio en su estructura cuaternaria reportado (463, 480) y que vimos en nuestros resultados arriba, también podría afectar la fluorescencia intrínseca de la proteína. Cabe destacar que la constante de velocidad de la reacción de condensación entre el  $C_P$ -SOH y el  $C_R$ -SH se reportó como  $10 \text{ s}^{-1}$  a pH 7.4 y 20 °C, por ensayos de competencia (489).

A concentraciones más altas de  $H_2O_2$  por encima de 50  $\mu\text{M}$ , la  $k_{\text{obs}}$  de la segunda fase aumentó linealmente con la concentración de  $H_2O_2$ , lo que refleja una reacción bimolecular lenta entre la *HsPrx3* y el  $H_2O_2$ , que ocurrió con una constante de velocidad de  $1.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.8 y 14 °C (Figura F10B). Estos resultados son consistentes con la sobreoxidación de la enzima, que es un proceso bimolecular. La constante de velocidad para la sobreoxidación de la *HsPrx3* por  $H_2O_2$  fue reportada como  $6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4 y 20 °C por ensayos de competencia (489). Notablemente, la constante de velocidad de sobreoxidación de *HsPrx3* por  $H_2O_2$  descrita aquí es similar a las reportadas recientemente para *HsPrx1* y para *HsPrx2* utilizando el cambio de fluorescencia de esas Prxs (211).

**Sobreoxidación y nitración de *HsPrx3* por peroxinitrito.** Por lo visto en la sección anterior y lo reportado acerca de la susceptibilidad de la *HsPrx3* a

la sobreoxidación de la  $C_P$ -SOH a  $CP$ -SO<sub>2/3</sub>H mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (210, 312), estudiamos la sobreoxidación de esta Prx por peroxinitrito. Observamos que la adición de este oxidante en exceso también causó la sobreoxidación de la HsPrx3 (Figura F11A). Además, esta adición causó la nitración de la HsPrx3 (Figura F11B) formándose oligómeros que no reducibles por β-mercaptoetanol, probablemente reflejando enlaces covalentes entrecruzados entre subunidades que involucran ditirosinas o ditriptofános. La adición de peroxinitrito previamente descompuesto no tuvo ningún efecto en ambos casos. El efecto de la nitración en Prxs ha sido ampliamente estudiado en el caso de la HsPrx2, observándose que la nitración, particularmente en la Tyr193 del dominio YF (Figura F3), facilita la formación del disulfuro entre la C<sub>P</sub> y la C<sub>R</sub> proporcionando mayor resistencia a la sobreoxidación y a su vez aumenta la actividad peroxidasa de esta Prx (475, 476), por lo que se propuso que esta modificación podría ser un mecanismo de modulación de la actividad de estas enzimas involucradas en complejas redes de señalización redox.

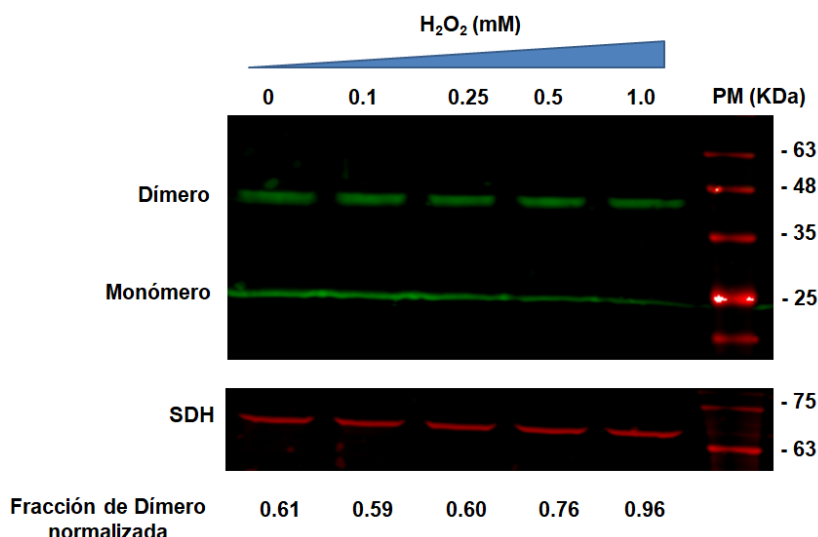


**Figura F11. Sobreoxidación y nitración de la HsPrx3 mediada por peroxinitrito.** La HsPrx3 reducida (19  $\mu$ M en A o 10  $\mu$ M en B) se dejó sin tratar (carril 1) o se mezcló con concentraciones crecientes de peroxinitrito (como se indica en la figura) o peroxinitrito descompuesto previamente (1 mM) (carril 9). Las muestras fueron luego analizadas por Western Blot utilizando anticuerpos anti-Prx-SO<sub>2/3</sub>H en condiciones no reductoras (A) o anti-3-nitrotirosina en condiciones reductoras (B).

**Evaluación de las modificaciones oxidativas de la Prx3 en mitocondrias aisladas del cerebro de rata.** Con el fin de evaluar posibles modificaciones oxidativas de la Prx3 en un modelo cercano a las condiciones

celulares, utilizamos mitocondrias aisladas de cerebro de rata, para en principio evaluar el estado redox de la Prx3 a partir de técnicas de Western Blot (487), ante el agregado externo de peroxinitrito o por generación endógena en la mitocondria. En los resultados que se muestran en la Figura F12, se agregó externamente  $H_2O_2$  a una solución de mitocondrias purificadas a modo de poder ajustar diferentes parámetros, como la concentración de mitocondria utilizada y la concentración de proteínas al cargar en el gel de electroforesis. Como se pudo observar el Anti-*HsPrx3* reconoce a la *RrPrx3* (la cual comparte un 93% de identidad, Figura F3) y como aspecto negativo, ya tenemos un alto porcentaje de Prx3 dimérica oxidada sin el agregado de  $H_2O_2$ . Ha sido anteriormente reportado, que la enzima se encuentra en estado reducido en mitocondrias no sometidas a tratamiento con oxidantes pero que se oxida durante el proceso de purificación excepto que se agregue agente alquilante desde el inicio de la purificación (487). El problema es que en nuestra estrategia experimental no podemos agregar NEM antes del tratamiento con oxidantes, ya que se bloquea la  $C_P$  y no se observaría el efecto de los mismos sobre la proteína.

Nos encontramos actualmente trabajando en la obtención de mitocondrias purificadas que conserven la Prx3 mayoritariamente reducida sin el agregado de agentes alquilantes. Para ello nos basamos en que los sistemas de reducción de Prx3 son el sistema Trx2/TR y Grx2/GSH/GR, que requieren NADPH como reductor inicial. Conociendo los principales sistemas generadores de NADPH en mitocondria (490), pensamos que utilizando sustratos que permitan mantener la concentración de NADPH en estado reducido, podremos obtener mitocondrias aisladas en donde la mayoría de Prx3 este reducida.



**Figura F12. Evaluación del estado redox celular de la Prx3.** Mitocondrias aisladas de cerebro de rata (2 mg/mL) en amortiguador 40 mM HEPES, 50 mM NaCl, 1 mM EGTA (pH 7.4) fueron tratadas con concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 mM). Después de una incubación de 10 minutos, las muestras fueron tratadas con 50 mM NEM durante 30 minutos. Las muestras fueron analizadas por Western Blot usando anticuerpos anti-*HsPrx3* y anti-SDH (succinato deshidrogenasa), bajo condiciones no reductoras.

## F.IV. PERSPECTIVAS

Como perspectivas, nos proponemos trabajar con la muestras de mitocondrias purificadas frescas (sin congelar) intentando favorecer el mantenimiento de la Prx3 en forma mayoritariamente reducida durante su purificación aun en ausencia de agentes alquilantes. Dado que los sistemas de reducción de Prx3 dependen en última instancia del NADPH mitocondrial, el que a su vez se mantiene reducido por la nicotinamida nucleótido transhidrogenasa, mayoritariamente (490), es importante el mantenimiento de mitocondrias acopladas y en presencia de sustratos respiratorios. Para ello trabajaremos en presencia de sustratos de la cadena de transporte de electrones. Una vez que se obtenga una optimización de estas condiciones se procederá a la exposición de dichas mitocondrias a flujos de peroxinitrito exógeno, o generados en forma endógena (491) para finalmente evaluar oxidación, sobreoxidación y nitración de la Prx3. Finalmente, sería interesante conocer si dichas modificaciones nitro-oxidativas conducen o no a la degradación de esta proteína, de forma de intentar dar una explicación



molecular al reporte que indica que los niveles de expresión de esta proteína se encuentran disminuidos durante la infección por cepas patogénicas de *Mtb*.

## G. Conclusiones generales

El *Mtb* carece de Ohr y de miembros de la familia GPx responsables de la reducción de hidroperóxidos orgánicos en muchas otras bacterias (492, 493). Por lo que la función de reducción de AG-OOH debe recaer en las Prxs, particularmente en *MtPrxQ B* y la *MtAhpE*, que como se demostró en el primer y tercer objetivo específico de la Tesis, reducen los AG-OOH de manera muy eficiente ( $\sim 10^6$  y  $\sim 10^8$   $M^{-1}s^{-1}$ , respectivamente). Contrariamente, la *MtAhpC* mostró una actividad catalítica más baja con AG-OOH que con  $H_2O_2$ , y la *MtTpx* no fue activa en lo absoluto utilizando AG-OOH como sustrato (232), por lo que estas enzimas estarían principalmente involucradas en la detoxificación de  $H_2O_2$  y peroxinitrito. Se carece de datos al respecto de la funcionalidad de la *PrxQ A* de este patógeno.

Así, el *Mtb* expresa una batería de enzimas antioxidantes cuya especificidad por sustrato oxidante se solapa parcialmente cubriendo una variedad diferencial de oxidantes por dos electrones con efecto citotóxico (ver Tabla G1). Asimismo, los sistemas de reducción utilizados por las diferentes Prxs de *Mtb* son variados (ver Tabla G1), y a diferencia de las Prxs de células huéspedes, no siempre son dependientes de NADPH como reductor último.

**Tabla G1. Reactividad de las Prxs del *Mtb*.**

<i>MtPrx</i>	Subfamilia de Prx	Principal sustrato oxidante propuesto	Sustrato reductor	Referencia
AhpC (Rv2428)	AhpC/Prx1,	$H_2O_2$ ( $k = 3.7 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ ) <sup>A</sup> , peroxinitrito ( $k = 1.6 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ )	<i>MtAhpD</i> , <i>MtTrx C</i>	(205, 494), (232, 234)
Tpx (Rv1932)	Tpx,	peroxinitrito ( $k = 1.33 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ )	<i>MtTrx B</i> , <i>MtTrx C</i>	(243)
AhpE (Rv2238c)	AhpE,	peroxinitrito ( $k = 1.9 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ ) AG-OOH ( $k \sim 10^8 M^{-1}s^{-1}$ )	<i>MtMrx 1</i> $\pm$ MSH <sup>B</sup> , $H_2S$	(213, 247), (142, 221)
PrxQ B (Rv1608c)	PrxQ/BCP	AG-OOH ( $k_{15-HpETE} = 3 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ ) peroxinitrito ( $k = 1 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ )	<i>MtTrx B</i> , <i>MtTrx C</i>	(397)
PrxQ (Rv2125)	PrxQ/BCP	ND	ND	-

<sup>A</sup> Valor determinado para la AhpC de *Salmonella typhimurium*. MtAhpC redujo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> más rápido que el *t*-bOOH, el cumeno-OOH y los hidroperóxidos derivados del ácido linoleico pero no se reportó el valor constante de la velocidad para la reacción (232). Las constantes de velocidad aparentes con el peroxinitrito fueron determinadas a pH fisiológico, excepto para AhpC (pH 6.8).

<sup>B</sup> Luego de largos tiempos de incubación, el MSH solo también podría reducir a la MtAhpE oxidada (222), pero no se determinó la importancia de esta reacción en catálisis.

Mediante el uso de una combinación de técnicas experimentales y computacionales determinamos las bases moleculares de la especificidad por sustrato oxidante de MtAhpE. Creemos que estudios similares podrían emplearse para explicar dicha especificidad de otras Prxs e incluso de peroxidasas dependientes de tioles/selenoles de otras familias proteicas.

Por otra parte, los resultados encontrados en esta Tesis aportan a la comprensión de las reacciones de persulfuración proteica en general, ya que utilizamos a la MtAhpE como proteína modelo para estudiar reacciones de formación y reactividad de persulfuros proteicos. Nuestros resultados sugieren la posibilidad de que las Prxs actúen como intermediarios en reacciones de persulfuración proteica, posibilidad que merecerá estudios en mayor profundidad.

Finalmente, si bien nuestros estudios en Prx3 mitocondrial son incipientes, y resta mucho camino por recorrer, comenzamos la caracterización de modificaciones nitro-oxidativas de la proteína *in vitro* y desarrollamos herramientas que nos permitirán continuar con su estudio en mitocondrias aisladas.

## H. Referencias

1. Kaufmann, S. H. E. (2001) How can immunology contribute to the control of tuberculosis?, *Nature Reviews Immunology* 1, 20-30.
2. Gomez, J. E., and McKinney, J. D. (2004) M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance, *Tuberculosis (Edinb)* 84, 29-44.
3. Sacchetti, J. C., Rubin, E. J., and Freundlich, J. S. (2008) Drugs versus bugs: in pursuit of the persistent predator *Mycobacterium tuberculosis*, *Nature reviews. Microbiology* 6, 41-52.
4. Ma, Z., Lienhardt, C., McIlleron, H., Nunn, A. J., and Wang, X. (2010) Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality, *Lancet* 375, 2100-2109.
5. Ringold, S., Lynn, C., and Glass, R. M. (2005) JAMA patient page. Tuberculosis, *Jama* 293, 2820.
6. Young, D., Hussell, T., and Dougan, G. (2002) Chronic bacterial infections: living with unwanted guests, *Nature immunology* 3, 1026-1032.
7. Narasimhan, P., Wood, J., Macintyre, C. R., and Mathai, D. (2013) Risk factors for tuberculosis, *Pulmonary medicine* 2013, 828939.
8. Kumar, A., Farhana, A., Guidry, L., Saini, V., Hondalus, M., and Steyn, A. J. (2011) Redox homeostasis in mycobacteria: the key to tuberculosis control?, *Expert reviews in molecular medicine* 13, e39.
9. Hussell, T., and Bell, T. J. (2014) Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context, *Nature reviews. Immunology* 14, 81-93.
10. Stamm, C. E., Collins, A. C., and Shiloh, M. U. (2015) Sensing of *Mycobacterium tuberculosis* and consequences to both host and bacillus, *Immunological reviews* 264, 204-219.
11. Achkar, J. M., and Casadevall, A. (2013) Antibody-mediated immunity against tuberculosis: implications for vaccine development, *Cell host & microbe* 13, 250-262.
12. Flynn, J. L. (2006) Lessons from experimental *Mycobacterium tuberculosis* infections, *Microbes and infection* 8, 1179-1188.
13. Weiss, G., and Schaible, U. E. (2015) Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria, *Immunological reviews* 264, 182-203.
14. Ehrt, S., and Schnappinger, D. (2009) Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses, *Cellular microbiology* 11, 1170-1178.
15. Mitchell, G., and Isberg, R. R. (2017) Innate immunity to intracellular pathogens: balancing microbial elimination and inflammation, *Cell host & microbe* 22, 166-175.
16. Gutierrez, M. G., Master, S. S., Singh, S. B., Taylor, G. A., Colombo, M. I., and Deretic, V. (2004) Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages, *Cell* 119, 753-766.
17. Songane, M., Kleinnijenhuis, J., Netea, M. G., and van Crevel, R. (2012) The role of autophagy in host defence against *Mycobacterium tuberculosis* infection, *Tuberculosis (Edinb)* 92, 388-396.
18. Roca, F. J., and Ramakrishnan, L. (2013) TNF dually mediates resistance and susceptibility to mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species, *Cell* 153, 521-534.
19. Ernst, J. D. (2012) The immunological life cycle of tuberculosis, *Nature reviews. Immunology* 12, 581-591.
20. DeCoursey, T. E. (2016) The intimate and controversial relationship between voltage-gated proton channels and the phagocyte NADPH oxidase, *Immunological reviews* 273, 194-218.

21. Kamen, L. A., Levinsohn, J., Cadwallader, A., Tridandapani, S., and Swanson, J. A. (2008) SHIP-1 increases early oxidative burst and regulates phagosome maturation in macrophages, *J Immunol* 180, 7497-7505.
22. Alvarez, M. N., Peluffo, G., Piacenza, L., and Radi, R. (2011) Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity, *The Journal of biological chemistry* 286, 6627-6640.
23. Tlili, A., Dupre-Crochet, S., Erard, M., and Nusse, O. (2011) Kinetic analysis of phagosomal production of reactive oxygen species, *Free radical biology & medicine* 50, 438-447.
24. Reiss, M., and Roos, D. (1978) Differences in oxygen metabolism of phagocytosing monocytes and neutrophils, *The Journal of clinical investigation* 61, 480-488.
25. Fridovich, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases, *Annual review of biochemistry* 64, 97-112.
26. Blelski, B. H. J. a. A., A. O. (1977) Mechanism of the Disproportionation of Superoxide Radicals, *J. Phyl. Chem.* 81, 1048-1050.
27. Bielski, B. H., Arudi, R. L., and Sutherland, M. W. (1983) A study of the reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> with unsaturated fatty acids, *The Journal of biological chemistry* 258, 4759-4761.
28. Gardner, P. R., and Fridovich, I. (1991) Superoxide sensitivity of the Escherichia coli 6-phosphogluconate dehydratase, *The Journal of biological chemistry* 266, 1478-1483.
29. Varghese, S., Tang, Y., and Imlay, J. A. (2003) Contrasting sensitivities of Escherichia coli aconitases A and B to oxidation and iron depletion, *J Bacteriol* 185, 221-230.
30. Liochev, S. I., and Fridovich, I. (1992) Fumarase C, the stable fumarase of Escherichia coli, is controlled by the soxRS regulon, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 5892-5896.
31. Korshunov, S. S., and Imlay, J. A. (2002) A potential role for periplasmic superoxide dismutase in blocking the penetration of external superoxide into the cytosol of Gram-negative bacteria, *Molecular microbiology* 43, 95-106.
32. Flint, D. H., Tuminello, J. F., and Emptage, M. H. (1993) The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide, *The Journal of biological chemistry* 268, 22369-22376.
33. Sheng, Y., Abreu, I. A., Cabelli, D. E., Maroney, M. J., Miller, A. F., Teixeira, M., and Valentine, J. S. (2014) Superoxide dismutases and superoxide reductases, *Chem Rev* 114, 3854-3918.
34. Winterbourn, C. C., and Metodiewa, D. (1999) Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide, *Free radical biology & medicine* 27, 322-328.
35. Trujillo, M., ; Carballal, S., Zeida, A., and Radi, R. (2018) Comparative analysis of hydrogen peroxide and peroxynitrite reactivity with thiols, In *Hydrogen peroxide metabolism in health and disease* (Vissers, M. C. M., Hampton, M. B., and Kettle, A. J., Eds.), pp 49-79, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL.
36. Vásquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., and Kennedy, M. C. (2000) Mitochondrial Aconitase Is a Source of Hydroxyl Radical: AN ELECTRON SPIN RESONANCE INVESTIGATION, *Journal of Biological Chemistry* 275, 14064-14069.
37. Dizdaroglu, M., Rao, G., Halliwell, B., and Gajewski, E. (1991) Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions, *Archives of biochemistry and biophysics* 285, 317-324.
38. Henle, E. S., Han, Z., Tang, N., Rai, P., Luo, Y., and Linn, S. (1999) Sequence-specific DNA cleavage by Fe<sup>2+</sup>-mediated fenton reactions has possible biological implications, *The Journal of biological chemistry* 274, 962-971.

39. Nathan, C. F., Murray, H. W., Wiebe, M. E., and Rubin, B. Y. (1983) Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity, *J Exp Med* 158, 670-689.
40. Wu, G., and Morris, S. M., Jr. (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond, *Biochem J* 336 ( Pt 1), 1-17.
41. Vodovotz, Y., Russell, D., Xie, Q. W., Bogdan, C., and Nathan, C. (1995) Vesicle membrane association of nitric oxide synthase in primary mouse macrophages, *J Immunol* 154, 2914-2925.
42. Nathan, C. F., and Hibbs, J. B., Jr. (1991) Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity, *Current opinion in immunology* 3, 65-70.
43. Alvarez, M. N., Trujillo, M., and Radi, R. (2002) Peroxynitrite formation from biochemical and cellular fluxes of nitric oxide and superoxide, *Methods in enzymology* 359, 353-366.
44. Bartberger, M. D., Liu, W., Ford, E., Miranda, K. M., Switzer, C., Fukuto, J. M., Farmer, P. J., Wink, D. A., and Houk, K. N. (2002) The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 10958-10963.
45. Shafirovich, V., and Lymar, S. V. (2002) Nitroxyl and its anion in aqueous solutions: spin states, protic equilibria, and reactivities toward oxygen and nitric oxide, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7340-7345.
46. Xie, Q. W., and Nathan, C. (1993) Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide, *Trans Assoc Am Physicians* 106, 1-12.
47. Martin, E., Nathan, C., and Xie, Q. W. (1994) Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase, *J Exp Med* 180, 977-984.
48. MacMicking, J., Xie, Q. W., and Nathan, C. (1997) Nitric oxide and macrophage function, *Annu Rev Immunol* 15, 323-350.
49. Padmaja, S., and Huie, R. E. (1993) The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals, *Biochem Biophys Res Commun* 195, 539-544.
50. Eiserich, J. P., Butler, J., van der Vliet, A., Cross, C. E., and Halliwell, B. (1995) Nitric oxide rapidly scavenges tyrosine and tryptophan radicals, *Biochem J* 310 ( Pt 3), 745-749.
51. Madej, E., Folkes, L. K., Wardman, P., Czapski, G., and Goldstein, S. (2008) Thiyl radicals react with nitric oxide to form S-nitrosothiols with rate constants near the diffusion-controlled limit, *Free radical biology & medicine* 44, 2013-2018.
52. Lepoivre, M., Fieschi, F., Coves, J., Thelander, L., and Fontecave, M. (1991) Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide, *Biochem Biophys Res Commun* 179, 442-448.
53. Saleh, L., Kelch, B. A., Pathickal, B. A., Baldwin, J., Ley, B. A., and Bollinger, J. M., Jr. (2004) Mediation by indole analogues of electron transfer during oxygen activation in variants of Escherichia coli ribonucleotide reductase R2 lacking the electron-shuttling tryptophan 48, *Biochemistry* 43, 5943-5952.
54. Radi, R., Rodriguez, M., Castro, L., and Telleri, R. (1994) Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite, *Archives of biochemistry and biophysics* 308, 89-95.
55. Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1990) 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* 87, 1620-1624.
56. Ferrer-Sueta, G., Campolo, N., Trujillo, M., Bartsaghi, S., Carballal, S., Romero, N., Alvarez, B., and Radi, R. (2018) Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration, *Chem Rev*.

57. Radi, R. (2013) Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant, *The Journal of biological chemistry* 288, 26464-26472.
58. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide, *The Journal of biological chemistry* 266, 4244-4250.
59. Denicola, A., Souza, J. M., and Radi, R. (1998) Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 3566-3571.
60. Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996) Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations, *Archives of biochemistry and biophysics* 333, 49-58.
61. Goldstein, S., and Merenyi, G. (2008) The chemistry of peroxynitrite: implications for biological activity, *Methods in enzymology* 436, 49-61.
62. Alvarez, M. N., Piacenza, L., Irigoien, F., Peluffo, G., and Radi, R. (2004) Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to *Trypanosoma cruzi*, *Archives of biochemistry and biophysics* 432, 222-232.
63. Alvarez, M. N., Peluffo, G., Folkes, L., Wardman, P., and Radi, R. (2007) Reaction of the carbonate radical with the spin-trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide in chemical and cellular systems: pulse radiolysis, electron paramagnetic resonance, and kinetic-competition studies, *Free radical biology & medicine* 43, 1523-1533.
64. Moller, M. N., Rios, N., Trujillo, M., Radi, R., Denicola, A., and Alvarez, B. (2019) Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems, *The Journal of biological chemistry* 294, 14776-14802.
65. Trujillo, M., and Radi, R. (2002) Peroxynitrite reaction with the reduced and the oxidized forms of lipoic acid: new insights into the reaction of peroxynitrite with thiols, *Archives of biochemistry and biophysics* 397, 91-98.
66. Ferrer-Sueta, G., and Radi, R. (2009) Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals, *ACS chemical biology* 4, 161-177.
67. Keyer, K., and Imlay, J. A. (1997) Inactivation of dehydratase [4Fe-4S] clusters and disruption of iron homeostasis upon cell exposure to peroxynitrite, *The Journal of biological chemistry* 272, 27652-27659.
68. Piacenza, L., Trujillo, M., and Radi, R. (2019) Reactive species and pathogen antioxidant networks during phagocytosis, *J Exp Med* 216, 501-516.
69. Porter, N. A., Caldwell, S. E., and Mills, K. A. (1995) Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids, *Lipids* 30, 277-290.
70. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide, *Archives of biochemistry and biophysics* 288, 481-487.
71. Bonney, R. J., Opas, E. E., and Humes, J. L. (1985) Lipoxygenase pathways of macrophages, *Federation proceedings* 44, 2933-2936.
72. Sevanian, A., Muakkassah-Kelly, S. F., and Montestruque, S. (1983) The influence of phospholipase A2 and glutathione peroxidase on the elimination of membrane lipid peroxides, *Archives of biochemistry and biophysics* 223, 441-452.
73. Akaki, T., Tomioka, H., Shimizu, T., Dekio, S., and Sato, K. (2000) Comparative roles of free fatty acids with reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates in expression of the anti-microbial activity of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*, *Clinical and experimental immunology* 121, 302-310.
74. Wang, G., Hong, Y., Johnson, M. K., and Maier, R. J. (2006) Lipid peroxidation as a source of oxidative damage in *Helicobacter pylori*: Protective roles of peroxiredoxins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1760, 1596-1603.
75. Yano, T., Kassovska-Bratinova, S., Teh, J. S., Winkler, J., Sullivan, K., Isaacs, A., Schechter, N. M., and Rubin, H. (2011) Reduction of clofazimine by mycobacterial type

- 2 NADH:quinone oxidoreductase: a pathway for the generation of bactericidal levels of reactive oxygen species, *The Journal of biological chemistry* 286, 10276-10287.
76. Vilcheze, C., Hartman, T., Weinrick, B., and Jacobs, W. R., Jr. (2013) Mycobacterium tuberculosis is extraordinarily sensitive to killing by a vitamin C-induced Fenton reaction, *Nature communications* 4, 1881.
  77. Dey, D., Ray, R., and Hazra, B. (2014) Antitubercular and antibacterial activity of quinonoid natural products against multi-drug resistant clinical isolates, *Phytotherapy research : PTR* 28, 1014-1021.
  78. Singh, R., Manjunatha, U., Boshoff, H. I., Ha, Y. H., Niyomrattanakit, P., Ledwidge, R., Dowd, C. S., Lee, I. Y., Kim, P., Zhang, L., Kang, S., Keller, T. H., Jiricek, J., and Barry, C. E., 3rd. (2008) PA-824 kills nonreplicating Mycobacterium tuberculosis by intracellular NO release, *Science* 322, 1392-1395.
  79. Palde, P. B., Bhaskar, A., Pedro Rosa, L. E., Madoux, F., Chase, P., Gupta, V., Spicer, T., Scampavia, L., Singh, A., and Carroll, K. S. (2016) First-in-Class Inhibitors of Sulfur Metabolism with Bactericidal Activity against Non-Replicating M. tuberculosis, *ACS chemical biology* 11, 172-184.
  80. Makarov, V., Manina, G., Mikusova, K., Mollmann, U., Ryabova, O., Saint-Joanis, B., Dhar, N., Pasca, M. R., Buroni, S., Lucarelli, A. P., Milano, A., De Rossi, E., Belanova, M., Bobovska, A., Dianiskova, P., Kordulakova, J., Sala, C., Fullam, E., Schneider, P., McKinney, J. D., Brodin, P., Christophe, T., Waddell, S., Butcher, P., Albrethsen, J., Rosenkrands, I., Brosch, R., Nandi, V., Bharath, S., Gaonkar, S., Shandil, R. K., Balasubramanian, V., Balganesht, T., Tyagi, S., Grosset, J., Riccardi, G., and Cole, S. T. (2009) Benzothiazinones kill Mycobacterium tuberculosis by blocking arabinan synthesis, *Science* 324, 801-804.
  81. Trefzer, C., Skovierova, H., Buroni, S., Bobovska, A., Nenci, S., Molteni, E., Pojer, F., Pasca, M. R., Makarov, V., Cole, S. T., Riccardi, G., Mikusova, K., and Johnsson, K. (2012) Benzothiazinones are suicide inhibitors of mycobacterial decaprenylphosphoryl-beta-D-ribofuranose 2'-oxidase DprE1, *J Am Chem Soc* 134, 912-915.
  82. Corper, H., and Cohn, M. L. (1933) The viability and virulence of old cultures of tubercle bacilli: studies on twelve-year broth cultures maintained at incubator temperature, *American Review of Tuberculosis* 28, 856-874.
  83. Cole, S. T., and Barrell, B. G. (1998) Analysis of the genome of Mycobacterium tuberculosis H37Rv, *Novartis Found Symp* 217, 160-172; discussion 172-167.
  84. Russell, D. G. (2007) Who puts the tubercle in tuberculosis?, *Nature reviews. Microbiology* 5, 39-47.
  85. Brennan, P. J. (2003) Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis, *Tuberculosis (Edinb)* 83, 91-97.
  86. Glickman, M. S., and Jacobs, W. R., Jr. (2001) Microbial pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: dawn of a discipline, *Cell* 104, 477-485.
  87. Abuhammad, A. (2017) Cholesterol metabolism: a potential therapeutic target in Mycobacteria, *British journal of pharmacology* 174, 2194-2208.
  88. Awuh, J. A., and Flo, T. H. (2017) Molecular basis of mycobacterial survival in macrophages, *Cellular and Molecular Life Sciences* 74, 1625-1648.
  89. Upadhyay, S., Mittal, E., and Philips, J. A. (2018) Tuberculosis and the art of macrophage manipulation, *Pathogens and disease* 76.
  90. BoseDasgupta, S., and Pieters, J. (2018) Macrophage-microbe interaction: lessons learned from the pathogen Mycobacterium tuberculosis, In *Seminars in immunopathology*, pp 577-591, Springer.
  91. Augenstreich, J., Arbues, A., Simeone, R., Haanappel, E., Wegener, A., Sayes, F., Le Chevalier, F., Chalut, C., Malaga, W., and Guilhot, C. (2017) ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of Mycobacterium tuberculosis act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis, *Cellular microbiology* 19, e12726.



92. Via, L. E., Deretic, D., Ulmer, R. J., Hibler, N. S., Huber, L. A., and Deretic, V. (1997) Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7, *Journal of Biological Chemistry* 272, 13326-13331.
93. Wong, D., Bach, H., Sun, J., Hmama, Z., and Av-Gay, Y. (2011) Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H<sup>+</sup>-ATPase to inhibit phagosome acidification, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 19371-19376.
94. Queval, C. J., Song, O.-R., Carralot, J.-P., Saliou, J.-M., Bongiovanni, A., Deloison, G., Deboosère, N., Jouny, S., Iantomasi, R., and Delorme, V. (2017) Mycobacterium tuberculosis controls phagosomal acidification by targeting CISH-mediated signaling, *Cell reports* 20, 3188-3198.
95. Chandra, P., Ghanwat, S., Matta, S. K., Yadav, S. S., Mehta, M., Siddiqui, Z., Singh, A., and Kumar, D. (2015) Mycobacterium tuberculosis inhibits RAB7 recruitment to selectively modulate autophagy flux in macrophages, *Scientific reports* 5, 16320.
96. Storz, G., Tartaglia, L. A., and Ames, B. N. (1990) Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation, *Science* 248, 189-194.
97. Zheng, M., Wang, X., Templeton, L. J., Smulski, D. R., LaRossa, R. A., and Storz, G. (2001) DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the Escherichia coli response to hydrogen peroxide, *J Bacteriol* 183, 4562-4570.
98. Kumar, A., Toledo, J. C., Patel, R. P., Lancaster, J. R., Jr., and Steyn, A. J. (2007) Mycobacterium tuberculosis DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 11568-11573.
99. Honaker, R. W., Leistikow, R. L., Bartek, I. L., and Voskuil, M. I. (2009) Unique roles of DosT and DosS in DosR regulon induction and Mycobacterium tuberculosis dormancy, *Infect Immun* 77, 3258-3263.
100. Sohaskey, C. D. (2008) Nitrate enhances the survival of Mycobacterium tuberculosis during inhibition of respiration, *J Bacteriol* 190, 2981-2986.
101. Watanabe, S., Zimmermann, M., Goodwin, M. B., Sauer, U., Barry, C. E., 3rd, and Boshoff, H. I. (2011) Fumarate reductase activity maintains an energized membrane in anaerobic Mycobacterium tuberculosis, *PLoS pathogens* 7, e1002287.
102. Baek, S. H., Li, A. H., and Sasseti, C. M. (2011) Metabolic regulation of mycobacterial growth and antibiotic sensitivity, *PLoS biology* 9, e1001065.
103. Leistikow, R. L., Morton, R. A., Bartek, I. L., Frimpong, I., Wagner, K., and Voskuil, M. I. (2010) The Mycobacterium tuberculosis DosR regulon assists in metabolic homeostasis and enables rapid recovery from nonrespiring dormancy, *J Bacteriol* 192, 1662-1670.
104. Daniel, J., Maamar, H., Deb, C., Sirakova, T. D., and Kolattukudy, P. E. (2011) Mycobacterium tuberculosis uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages, *PLoS pathogens* 7, e1002093.
105. Low, K. L., Rao, P. S., Shui, G., Bendt, A. K., Pethe, K., Dick, T., and Wenk, M. R. (2009) Triacylglycerol utilization is required for regrowth of in vitro hypoxic nonreplicating Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin, *J Bacteriol* 191, 5037-5043.
106. Kruh, N. A., Troudt, J., Izzo, A., Prenni, J., and Dobos, K. M. (2010) Portrait of a pathogen: the Mycobacterium tuberculosis proteome in vivo, *PLoS One* 5, e13938.
107. Singh, A., Guidry, L., Narasimhulu, K. V., Mai, D., Trombley, J., Redding, K. E., Giles, G. I., Lancaster, J. R., Jr., and Steyn, A. J. (2007) Mycobacterium tuberculosis WhiB3 responds to O<sub>2</sub> and nitric oxide via its [4Fe-4S] cluster and is essential for nutrient starvation survival, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 11562-11567.

108. Mehta, M., Rajmani, R. S., and Singh, A. (2016) Mycobacterium tuberculosis WhiB3 Responds to Vacuolar pH-induced Changes in Mycothiol Redox Potential to Modulate Phagosomal Maturation and Virulence, *The Journal of biological chemistry* 291, 2888-2903.
109. Saini, V., Cumming, B. M., Guidry, L., Lamprecht, D. A., Adamson, J. H., Reddy, V. P., Chinta, K. C., Mazorodze, J. H., Glasgow, J. N., Richard-Greenblatt, M., Gomez-Velasco, A., Bach, H., Av-Gay, Y., Eoh, H., Rhee, K., and Steyn, A. J. C. (2016) Ergothioneine Maintains Redox and Bioenergetic Homeostasis Essential for Drug Susceptibility and Virulence of Mycobacterium tuberculosis, *Cell reports* 14, 572-585.
110. Chinta, K. C., Saini, V., Glasgow, J. N., Mazorodze, J. H., Rahman, M. A., Reddy, D., Lancaster, J. R., Jr., and Steyn, A. J. (2016) The emerging role of gasotransmitters in the pathogenesis of tuberculosis, *Nitric oxide : biology and chemistry* 59, 28-41.
111. Steyn, A. J., Collins, D. M., Hondalus, M. K., Jacobs, W. R., Jr., Kawakami, R. P., and Bloom, B. R. (2002) Mycobacterium tuberculosis WhiB3 interacts with RpoV to affect host survival but is dispensable for in vivo growth, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 3147-3152.
112. Singh, A., Crossman, D. K., Mai, D., Guidry, L., Voskuil, M. I., Renfrow, M. B., and Steyn, A. J. (2009) Mycobacterium tuberculosis WhiB3 maintains redox homeostasis by regulating virulence lipid anabolism to modulate macrophage response, *PLoS pathogens* 5, e1000545.
113. Daniel, J., Deb, C., Dubey, V. S., Sirakova, T. D., Abomoelak, B., Morbidoni, H. R., and Kolattukudy, P. E. (2004) Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in Mycobacterium tuberculosis as it goes into a dormancy-like state in culture, *J Bacteriol* 186, 5017-5030.
114. Errington, J. (1993) Bacillus subtilis sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis, *Microbiological reviews* 57, 1-33.
115. Bashyam, M. D., and Hasnain, S. E. (2004) The extracytoplasmic function sigma factors: role in bacterial pathogenesis, *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 4, 301-308.
116. Barik, S., Sureka, K., Mukherjee, P., Basu, J., and Kundu, M. (2010) RseA, the SigE specific anti-sigma factor of Mycobacterium tuberculosis, is inactivated by phosphorylation-dependent ClpC1P2 proteolysis, *Molecular microbiology* 75, 592-606.
117. Fernandes, N. D., Wu, Q. L., Kong, D., Puyang, X., Garg, S., and Husson, R. N. (1999) A mycobacterial extracytoplasmic sigma factor involved in survival following heat shock and oxidative stress, *J Bacteriol* 181, 4266-4274.
118. Fontan, P. A., Voskuil, M. I., Gomez, M., Tan, D., Pardini, M., Manganelli, R., Fattorini, L., Schoolnik, G. K., and Smith, I. (2009) The Mycobacterium tuberculosis sigma factor sigmaB is required for full response to cell envelope stress and hypoxia in vitro, but it is dispensable for in vivo growth, *J Bacteriol* 191, 5628-5633.
119. Thakur, K. G., Praveena, T., and Gopal, B. (2010) Structural and biochemical bases for the redox sensitivity of Mycobacterium tuberculosis RslA, *Journal of molecular biology* 397, 1199-1208.
120. Wu, H., Hu, X., Xiao, J., Zhang, J., Tao, J., Huang, H., and Mi, K. (2012) [Sigma factor F regulates Mycobacterium smegmatis hydrogen peroxide resistance], *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica* 52, 1352-1359.
121. Bhat, S. A., Singh, N., Trivedi, A., Kansal, P., Gupta, P., and Kumar, A. (2012) The mechanism of redox sensing in Mycobacterium tuberculosis, *Free radical biology & medicine* 53, 1625-1641.
122. Manganelli, R., Voskuil, M. I., Schoolnik, G. K., Dubnau, E., Gomez, M., and Smith, I. (2002) Role of the extracytoplasmic-function sigma factor sigma(H) in Mycobacterium tuberculosis global gene expression, *Molecular microbiology* 45, 365-374.

123. Graham, J. E., and Clark-Curtiss, J. E. (1999) Identification of Mycobacterium tuberculosis RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 11554-11559.
124. Mehra, S., and Kaushal, D. (2009) Functional genomics reveals extended roles of the Mycobacterium tuberculosis stress response factor sigmaH, *J Bacteriol* 191, 3965-3980.
125. Raman, S., Song, T., Puyang, X., Bardarov, S., Jacobs, W. R., Jr., and Husson, R. N. (2001) The alternative sigma factor SigH regulates major components of oxidative and heat stress responses in Mycobacterium tuberculosis, *J Bacteriol* 183, 6119-6125.
126. Song, T., Dove, S. L., Lee, K. H., and Husson, R. N. (2003) RshA, an anti-sigma factor that regulates the activity of the mycobacterial stress response sigma factor SigH, *Molecular microbiology* 50, 949-959.
127. Ando, M., Yoshimatsu, T., Ko, C., Converse, P. J., and Bishai, W. R. (2003) Deletion of Mycobacterium tuberculosis sigma factor E results in delayed time to death with bacterial persistence in the lungs of aerosol-infected mice, *Infect Immun* 71, 7170-7172.
128. Manganelli, R., Fattorini, L., Tan, D., Iona, E., Orefici, G., Altavilla, G., Cusatelli, P., and Smith, I. (2004) The extra cytoplasmic function sigma factor sigma(E) is essential for Mycobacterium tuberculosis virulence in mice, *Infect Immun* 72, 3038-3041.
129. Manganelli, R., Voskuil, M. I., Schoolnik, G. K., and Smith, I. (2001) The Mycobacterium tuberculosis ECF sigma factor sigmaE: role in global gene expression and survival in macrophages, *Molecular microbiology* 41, 423-437.
130. Newton, G. L., and Fahey, R. C. (2002) Mycothiol biochemistry, *Archives of microbiology* 178, 388-394.
131. Newton, G. L., and Fahey, R. C. (2008) Regulation of mycothiol metabolism by sigma(R) and the thiol redox sensor anti-sigma factor RsrA, *Molecular microbiology* 68, 805-809.
132. Buchmeier, N. A., Newton, G. L., Koledin, T., and Fahey, R. C. (2003) Association of mycothiol with protection of Mycobacterium tuberculosis from toxic oxidants and antibiotics, *Molecular microbiology* 47, 1723-1732.
133. Buchmeier, N. A., Newton, G. L., and Fahey, R. C. (2006) A mycothiol synthase mutant of Mycobacterium tuberculosis has an altered thiol-disulfide content and limited tolerance to stress, *J Bacteriol* 188, 6245-6252.
134. Nilewar, S. S., and Kathiravan, M. K. (2014) Mycothiol: a promising antitubercular target, *Bioorganic chemistry* 52, 62-68.
135. Genghof, D. S., and Vandamme, O. (1964) Biosynthesis of Ergothioneine and Hercynine by Mycobacteria, *J Bacteriol* 87, 852-862.
136. Sao Emani, C., Williams, M. J., Van Helden, P. D., Taylor, M. J. C., Wiid, I. J., and Baker, B. (2018) Gamma-glutamylcysteine protects ergothioneine-deficient Mycobacterium tuberculosis mutants against oxidative and nitrosative stress, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495, 174-178.
137. Ta, P., Buchmeier, N., Newton, G. L., Rawat, M., and Fahey, R. C. (2011) Organic hydroperoxide resistance protein and ergothioneine compensate for loss of mycothiol in Mycobacterium smegmatis mutants, *J Bacteriol* 193, 1981-1990.
138. Sao Emani, C., Gallant, J. L., Wiid, I. J., and Baker, B. (2019) The role of low molecular weight thiols in Mycobacterium tuberculosis, *Tuberculosis* 116, 44-55.
139. Paritala, H., and Carroll, K. S. (2013) New targets and inhibitors of mycobacterial sulfur metabolism, *Infectious disorders drug targets* 13, 85-115.
140. Holsclaw, C. M., Muse, W. B., 3rd, Carroll, K. S., and Leary, J. A. (2011) Mass Spectrometric Analysis of Mycothiol levels in Wild-Type and Mycothiol Disulfide Reductase Mutant Mycobacterium smegmatis, *International journal of mass spectrometry* 305, 151-156.

141. Van Laer, K., Buts, L., Foloppe, N., Vertommen, D., Van Belle, K., Wahni, K., Roos, G., Nilsson, L., Mateos, L. M., Rawat, M., van Nuland, N. A., and Messens, J. (2012) Mycoredoxin-1 is one of the missing links in the oxidative stress defence mechanism of Mycobacteria, *Molecular microbiology* 86, 787-804.
142. Hugo, M., Van Laer, K., Reyes, A. M., Vertommen, D., Messens, J., Radi, R., and Trujillo, M. (2014) Mycothiol/mycoredoxin 1-dependent reduction of the peroxiredoxin AhpE from Mycobacterium tuberculosis, *The Journal of biological chemistry* 289, 5228-5239.
143. Kaushal, D., Schroeder, B. G., Tyagi, S., Yoshimatsu, T., Scott, C., Ko, C., Carpenter, L., Mehrotra, J., Manabe, Y. C., Fleischmann, R. D., and Bishai, W. R. (2002) Reduced immunopathology and mortality despite tissue persistence in a Mycobacterium tuberculosis mutant lacking alternative sigma factor, SigH, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 8330-8335.
144. Bhaskar, A., Chawla, M., Mehta, M., Parikh, P., Chandra, P., Bhawe, D., Kumar, D., Carroll, K. S., and Singh, A. (2014) Reengineering redox sensitive GFP to measure mycothiol redox potential of Mycobacterium tuberculosis during infection, *PLoS pathogens* 10, e1003902.
145. Mishra, S., Shukla, P., Bhaskar, A., Anand, K., Baloni, P., Jha, R. K., Mohan, A., Rajmani, R. S., Nagaraja, V., Chandra, N., and Singh, A. (2017) Efficacy of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combination is linked to WhiB4-mediated changes in redox physiology of Mycobacterium tuberculosis, *eLife* 6.
146. Padiadpu, J., Baloni, P., Anand, K., Munshi, M., Thakur, C., Mohan, A., Singh, A., and Chandra, N. (2016) Identifying and Tackling Emergent Vulnerability in Drug-Resistant Mycobacteria, *ACS infectious diseases* 2, 592-607.
147. Nambi, S., Long, J. E., Mishra, B. B., Baker, R., Murphy, K. C., Olive, A. J., Nguyen, H. P., Shaffer, S. A., and Sasseti, C. M. (2015) The Oxidative Stress Network of Mycobacterium tuberculosis Reveals Coordination between Radical Detoxification Systems, *Cell host & microbe* 17, 829-837.
148. Cai, Y., Yang, Q., Liao, M., Wang, H., Zhang, C., Nambi, S., Wang, W., Zhang, M., Wu, J., Deng, G., Deng, Q., Liu, H., Zhou, B., Jin, Q., Feng, C. G., Sasseti, C. M., Wang, F., and Chen, X. (2016) xCT increases tuberculosis susceptibility by regulating antimicrobial function and inflammation, *Oncotarget* 7, 31001-31013.
149. Tung, Q. N., Linzner, N., Loi, V. V., and Antelmann, H. (2018) Application of genetically encoded redox biosensors to measure dynamic changes in the glutathione, bacillithiol and mycothiol redox potentials in pathogenic bacteria, *Free radical biology & medicine* 128, 84-96.
150. Rheault, J. F., Gagne, E., Guertin, M., Lamoureux, G., Auger, M., and Lague, P. (2015) Molecular model of hemoglobin N from Mycobacterium tuberculosis bound to lipid bilayers: a combined spectroscopic and computational study, *Biochemistry* 54, 2073-2084.
151. Couture, M., Yeh, S. R., Wittenberg, B. A., Wittenberg, J. B., Ouellet, Y., Rousseau, D. L., and Guertin, M. (1999) A cooperative oxygen-binding hemoglobin from Mycobacterium tuberculosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 11223-11228.
152. Lama, A., Pawaria, S., Bidon-Chanal, A., Anand, A., Gelpi, J. L., Arya, S., Marti, M., Estrin, D. A., Luque, F. J., and Dikshit, K. L. (2009) Role of Pre-A motif in nitric oxide scavenging by truncated hemoglobin, HbN, of Mycobacterium tuberculosis, *The Journal of biological chemistry* 284, 14457-14468.
153. Pawaria, S., Lama, A., Raje, M., and Dikshit, K. L. (2008) Responses of Mycobacterium tuberculosis hemoglobin promoters to in vitro and in vivo growth conditions, *Applied and environmental microbiology* 74, 3512-3522.

154. Braunstein, M., Espinosa, B. J., Chan, J., Belisle, J. T., and Jacobs, W. R., Jr. (2003) SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*, *Molecular microbiology* 48, 453-464.
155. Piddington, D. L., Fang, F. C., Laessig, T., Cooper, A. M., Orme, I. M., and Buchmeier, N. A. (2001) Cu,Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* contributes to survival in activated macrophages that are generating an oxidative burst, *Infect Immun* 69, 4980-4987.
156. D'Orazio, M., Cervoni, L., Giartosio, A., Rotilio, G., and Battistoni, A. (2009) Thermal stability and redox properties of *M. tuberculosis* CuSOD, *Archives of biochemistry and biophysics* 486, 119-124.
157. Edwards, K. M., Cynamon, M. H., Voladri, R. K., Hager, C. C., DeStefano, M. S., Tham, K. T., Lakey, D. L., Bochan, M. R., and Kernodle, D. S. (2001) Iron-cofactored superoxide dismutase inhibits host responses to *Mycobacterium tuberculosis*, *American journal of respiratory and critical care medicine* 164, 2213-2219.
158. Liao, D., Fan, Q., and Bao, L. (2013) The role of superoxide dismutase in the survival of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages, *Japanese journal of infectious diseases* 66, 480-488.
159. Johnsson, K., Froland, W. A., and Schultz, P. G. (1997) Overexpression, purification, and characterization of the catalase-peroxidase KatG from *Mycobacterium tuberculosis*, *The Journal of biological chemistry* 272, 2834-2840.
160. Wengenack, N. L., Jensen, M. P., Rusnak, F., and Stern, M. K. (1999) *Mycobacterium tuberculosis* KatG is a peroxynitritase, *Biochem Biophys Res Commun* 256, 485-487.
161. Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D., and Cole, S. (1992) The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*, *Nature* 358, 591-593.
162. Vilcheze, C., and Jacobs, W. R., Jr. (2014) Resistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: Genes, Mutations, and Causalities, *Microbiology spectrum* 2, MGM2-0014-2013.
163. Ng, V. H., Cox, J. S., Sousa, A. O., MacMicking, J. D., and McKinney, J. D. (2004) Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst, *Molecular microbiology* 52, 1291-1302.
164. Poole, L. B., and Nelson, K. J. (2016) Distribution and Features of the Six Classes of Peroxiredoxins, *Mol Cells* 39, 53-59.
165. Ferrer-Sueta, G., Manta, B., Botti, H., Radi, R., Trujillo, M., and Denicola, A. (2011) Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction, *Chemical research in toxicology* 24, 434-450.
166. Poole, L. B. (2007) The catalytic mechanism of peroxiredoxins, *Sub-cellular biochemistry* 44, 61-81.
167. Perkins, A., Nelson, K. J., Parsonage, D., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2015) Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling, *Trends in biochemical sciences* 40, 435-445.
168. Winterbourn, C. C. (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species, *Nat Chem Biol* 4, 278-286.
169. Hofmann, B., Hecht, H. J., and Flohe, L. (2002) Peroxiredoxins, *Biological chemistry* 383, 347-364.
170. Karplus, P. A. (2015) A primer on peroxiredoxin biochemistry, *Free radical biology & medicine* 80, 183-190.
171. De Armas, M. I., Esteves, R., Viera, N., Reyes, A. M., Mastrogiovanni, M., Alegria, T. G. P., Netto, L. E. S., Tortora, V., Radi, R., and Trujillo, M. (2019) Rapid peroxynitrite reduction by human peroxiredoxin 3: Implications for the fate of oxidants in mitochondria, *Free radical biology & medicine* 130, 369-378.
172. Cox, A. G., Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2010) Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling, *Biochem J* 425, 313-325.

173. Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2008) Thiol chemistry and specificity in redox signaling, *Free radical biology & medicine* 45, 549-561.
174. Jang, H. H., Lee, K. O., Chi, Y. H., Jung, B. G., Park, S. K., Park, J. H., Lee, J. R., Lee, S. S., Moon, J. C., Yun, J. W., Choi, Y. O., Kim, W. Y., Kang, J. S., Cheong, G. W., Yun, D. J., Rhee, S. G., Cho, M. J., and Lee, S. Y. (2004) Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function, *Cell* 117, 625-635.
175. Moon, J. C., Hah, Y. S., Kim, W. Y., Jung, B. G., Jang, H. H., Lee, J. R., Kim, S. Y., Lee, Y. M., Jeon, M. G., Kim, C. W., Cho, M. J., and Lee, S. Y. (2005) Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death, *The Journal of biological chemistry* 280, 28775-28784.
176. O'Neill, J. S., and Reddy, A. B. (2011) Circadian clocks in human red blood cells, *Nature* 469, 498-503.
177. Edgar, R. S., Green, E. W., Zhao, Y., van Ooijen, G., Olmedo, M., Qin, X., Xu, Y., Pan, M., Valekunja, U. K., Feeney, K. A., Maywood, E. S., Hastings, M. H., Baliga, N. S., Mellow, M., Millar, A. J., Johnson, C. H., Kyriacou, C. P., O'Neill, J. S., and Reddy, A. B. (2012) Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms, *Nature* 485, 459-464.
178. Causton, H. C., Feeney, K. A., Ziegler, C. A., and O'Neill, J. S. (2015) Metabolic Cycles in Yeast Share Features Conserved among Circadian Rhythms, *Current biology : CB* 25, 1056-1062.
179. Knoops, B., Argyropoulou, V., Becker, S., Ferte, L., and Kuznetsova, O. (2016) Multiple Roles of Peroxiredoxins in Inflammation, *Mol Cells* 39, 60-64.
180. Vivancos, A. P., Castillo, E. A., Biteau, B., Nicot, C., Ayte, J., Toledano, M. B., and Hidalgo, E. (2005) A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensing by the antioxidant Pap1 pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8875-8880.
181. Nadeau, P. J., Charette, S. J., Toledano, M. B., and Landry, J. (2007) Disulfide Bond-mediated multimerization of Ask1 and its reduction by thioredoxin-1 regulate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase activation and apoptosis, *Mol Biol Cell* 18, 3903-3913.
182. Sobotta, M. C., Liou, W., Stocker, S., Talwar, D., Oehler, M., Ruppert, T., Scharf, A. N., and Dick, T. P. (2015) Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling, *Nat Chem Biol* 11, 64-70.
183. Cuddihy, S. L., Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2011) Assessment of redox changes to hydrogen peroxide-sensitive proteins during EGF signaling, *Antioxid Redox Signal* 15, 167-174.
184. Rhee, S. G. (1999) Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger, *Experimental & molecular medicine* 31, 53-59.
185. Sies, H. (2017) Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress, *Redox Biol* 11, 613-619.
186. Winterbourn, C. C. (2013) The biological chemistry of hydrogen peroxide, *Methods in enzymology* 528, 3-25.
187. Wood, Z. A., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2003) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling, *Science* 300, 650-653.
188. Toledano, M. B., Delaunay, A., Monceau, L., and Tacnet, F. (2004) Microbial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensors as archetypical redox signaling modules, *Trends in biochemical sciences* 29, 351-357.
189. Stocker, S., Maurer, M., Ruppert, T., and Dick, T. P. (2018) A role for 2-Cys peroxiredoxins in facilitating cytosolic protein thiol oxidation, *Nat Chem Biol* 14, 148-155.

190. Zeida, A., Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., Denicola, A., Estrin, D. A., and Radi, R. (2019) Catalysis of Peroxide Reduction by Fast Reacting Protein Thiols: Focus Review, *Chemical reviews* 119, 10829-10855.
191. Copley, S. D., Novak, W. R., and Babbitt, P. C. (2004) Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor, *Biochemistry* 43, 13981-13995.
192. Pedre, B., van Bergen, L. A., Pallo, A., Rosado, L. A., Dufe, V. T., Molle, I. V., Wahni, K., Erdogan, H., Alonso, M., Proft, F. D., and Messens, J. (2016) The active site architecture in peroxiredoxins: a case study on Mycobacterium tuberculosis AhpE, *Chem Commun (Camb)* 52, 10293-10296.
193. Nagy, P., Karton, A., Betz, A., Peskin, A. V., Pace, P., O'Reilly, R. J., Hampton, M. B., Radom, L., and Winterbourn, C. C. (2011) Model for the exceptional reactivity of peroxiredoxins 2 and 3 with hydrogen peroxide: a kinetic and computational study, *The Journal of biological chemistry* 286, 18048-18055.
194. Portillo-Ledesma, S., Sardi, F., Manta, B., Tourn, M. V., Clippe, A., Knoops, B., Alvarez, B., Coitino, E. L., and Ferrer-Sueta, G. (2014) Deconstructing the catalytic efficiency of peroxiredoxin-5 peroxidatic cysteine, *Biochemistry* 53, 6113-6125.
195. Flohe, L., Budde, H., Bruns, K., Castro, H., Clos, J., Hofmann, B., Kansal-Kalavar, S., Krumme, D., Menge, U., Plank-Schumacher, K., Sztajer, H., Wissing, J., Wylegalla, C., and Hecht, H. J. (2002) Tryparedoxin peroxidase of Leishmania donovani: molecular cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism, *Archives of biochemistry and biophysics* 397, 324-335.
196. Nelson, K. J., Knutson, S. T., Soito, L., Klomsiri, C., Poole, L. B., and Fetrow, J. S. (2011) Analysis of the peroxiredoxin family: using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis, *Proteins* 79, 947-964.
197. Soito, L., Williamson, C., Knutson, S. T., Fetrow, J. S., Poole, L. B., and Nelson, K. J. (2011) PREX: PeroxiRedoxin classification indEX, a database of subfamily assignments across the diverse peroxiredoxin family, *Nucleic acids research* 39, D332-337.
198. Sarma, G. N., Nickel, C., Rahlfs, S., Fischer, M., Becker, K., and Karplus, P. A. (2005) Crystal structure of a novel Plasmodium falciparum 1-Cys peroxiredoxin, *Journal of molecular biology* 346, 1021-1034.
199. Wood, Z. A., Poole, L. B., Hantgan, R. R., and Karplus, P. A. (2002) Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins, *Biochemistry* 41, 5493-5504.
200. Barranco-Medina, S., Lazaro, J. J., and Dietz, K. J. (2009) The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function, *FEBS Lett* 583, 1809-1816.
201. Hall, A., Nelson, K., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2011) Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins, *Antioxid Redox Signal* 15, 795-815.
202. Nakamura, T., Kado, Y., Yamaguchi, T., Matsumura, H., Ishikawa, K., and Inoue, T. (2010) Crystal structure of peroxiredoxin from Aeropyrum pernix K1 complexed with its substrate, hydrogen peroxide, *J Biochem* 147, 109-115.
203. Parsonage, D., Nelson, K. J., Ferrer-Sueta, G., Alley, S., Karplus, P. A., Furdui, C. M., and Poole, L. B. (2015) Dissecting peroxiredoxin catalysis: separating binding, peroxidation, and resolution for a bacterial AhpC, *Biochemistry* 54, 1567-1575.
204. Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., Thomson, L., Flohe, L., and Radi, R. (2007) Kinetics of peroxiredoxins and their role in the decomposition of peroxynitrite, *Sub-cellular biochemistry* 44, 83-113.
205. Bryk, R., Griffin, P., and Nathan, C. (2000) Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins, *Nature* 407, 211-215.
206. Trujillo, M., Clippe, A., Manta, B., Ferrer-Sueta, G., Smeets, A., Declercq, J. P., Knoops, B., and Radi, R. (2007) Pre-steady state kinetic characterization of human

- peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation, *Archives of biochemistry and biophysics* 467, 95-106.
207. Ogusucu, R., Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L. E., and Augusto, O. (2007) Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxyntirite: rate constants by competitive kinetics, *Free radical biology & medicine* 42, 326-334.
  208. Portillo-Ledesma, S., Randall, L. M., Parsonage, D., Dalla Rizza, J., Karplus, P. A., Poole, L. B., Denicola, A., and Ferrer-Sueta, G. (2018) Differential Kinetics of Two-Cysteine Peroxiredoxin Disulfide Formation Reveal a Novel Model for Peroxide Sensing, *Biochemistry*.
  209. Carvalho, L. A. C., Truzzi, D. R., Fallani, T. S., Alves, S. V., Toledo, J. C., Jr., Augusto, O., Netto, L. E. S., and Meotti, F. C. (2017) Urate hydroperoxide oxidizes human peroxiredoxin 1 and peroxiredoxin 2, *The Journal of biological chemistry* 292, 8705-8715.
  210. Peskin, A. V., Dickerhof, N., Poynton, R. A., Paton, L. N., Pace, P. E., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. C. (2013) Hyperoxidation of peroxiredoxins 2 and 3: rate constants for the reactions of the sulfenic acid of the peroxidatic cysteine, *The Journal of biological chemistry* 288, 14170-14177.
  211. Dalla Rizza, J., Randall, L. M., Santos, J., Ferrer-Sueta, G., and Denicola, A. (2019) Differential parameters between cytosolic 2-Cys peroxiredoxins, PRDX1 and PRDX2, *Protein Sci* 28, 191-201.
  212. Aden, J., Wallgren, M., Storm, P., Weise, C. F., Christiansen, A., Schroder, W. P., Funk, C., and Wolf-Watz, M. (2011) Extraordinary mus-ms backbone dynamics in Arabidopsis thaliana peroxiredoxin Q, *Biochim Biophys Acta* 1814, 1880-1890.
  213. Reyes, A. M., Hugo, M., Trostchansky, A., Capece, L., Radi, R., and Trujillo, M. (2011) Oxidizing substrate specificity of Mycobacterium tuberculosis alkyl hydroperoxide reductase E: kinetics and mechanisms of oxidation and overoxidation, *Free radical biology & medicine* 51, 464-473.
  214. Woo, H. A., Chae, H. Z., Hwang, S. C., Yang, K. S., Kang, S. W., Kim, K., and Rhee, S. G. (2003) Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation, *Science* 300, 653-656.
  215. Biteau, B., Labarre, J., and Toledano, M. B. (2003) ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin, *Nature* 425, 980-984.
  216. Akter, S., Fu, L., Jung, Y., Conte, M. L., Lawson, J. R., Lowther, W. T., Sun, R., Liu, K., Yang, J., and Carroll, K. S. (2018) Chemical proteomics reveals new targets of cysteine sulfinic acid reductase, *Nat Chem Biol* 14, 995-1004.
  217. Peshenko, I. V., and Shichi, H. (2001) Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxyntirite, *Free radical biology & medicine* 31, 292-303.
  218. Manevich, Y., Feinstein, S. I., and Fisher, A. B. (2004) 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* 101, 3780-3785.
  219. Pedrajas, J. R., Miranda-Vizuete, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J. A., and Spyrou, G. (2000) Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity, *The Journal of biological chemistry* 275, 16296-16301.
  220. Greetham, D., and Grant, C. M. (2009) Antioxidant activity of the yeast mitochondrial one-Cys peroxiredoxin is dependent on thioredoxin reductase and glutathione in vivo, *Molecular and cellular biology* 29, 3229-3240.
  221. Cuevasanta, E., Reyes, A. M., Zeida, A., Mastrogiovanni, M., De Armas, M. I., Radi, R., Alvarez, B., and Trujillo, M. (2019) Kinetics of formation and reactivity of the persulfide



- in the one-cysteine peroxiredoxin from *Mycobacterium tuberculosis*, *Journal of Biological Chemistry* 294, 13593-13605.
222. Kumar, A., Balakrishna, A. M., Nartey, W., Manimekalai, M. S., and Gruber, G. (2016) Redox chemistry of *Mycobacterium tuberculosis* alkylhydroperoxide reductase E (AhpE): Structural and mechanistic insight into a mycoredoxin-1 independent reductive pathway of AhpE via mycothiol, *Free radical biology & medicine* 97, 588-601.
  223. Monteiro, G., Horta, B. B., Pimenta, D. C., Augusto, O., and Netto, L. E. (2007) 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* 104, 4886-4891.
  224. Pedrajas, J. R., Padilla, C. A., McDonagh, B., and Barcena, J. A. (2010) Glutaredoxin participates in the reduction of peroxides by the mitochondrial 1-CYS peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*, *Antioxid Redox Signal* 13, 249-258.
  225. Lu, J., and Holmgren, A. (2014) The thioredoxin antioxidant system, *Free radical biology & medicine* 66, 75-87.
  226. Jonsson, T. J., Ellis, H. R., and Poole, L. B. (2007) Cysteine reactivity and thiol-disulfide interchange pathways in AhpF and AhpC of the bacterial alkyl hydroperoxide reductase system, *Biochemistry* 46, 5709-5721.
  227. Pérez-Ruiz, J. M., Spínola, M. C., Kirchsteiger, K., Moreno, J., Sahrawy, M., and Cejudo, F. J. (2006) Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage, *Plant Cell* 18, 2356-2368.
  228. Pedone, E., Limauro, D., and Bartolucci, S. (2008) The machinery for oxidative protein folding in thermophiles, *Antioxid Redox Signal* 10, 157-169.
  229. Hugo M, R. R., Trujillo M. (2011) Thiol-Dependent Peroxidases in *Mycobacterium tuberculosis* Antioxidant Defense, In *UNDERSTANDING TUBERCULOSIS – DECIPHERING THE SECRET LIFE OF THE BACILLI* (Cardona, P.-J., Ed.), pp 293 - 316, InTech.
  230. Guimaraes, B. G., Souchon, H., Honore, N., Saint-Joanis, B., Brosch, R., Shepard, W., Cole, S. T., and Alzari, P. M. (2005) Structure and mechanism of the alkyl hydroperoxidase AhpC, a key element of the *Mycobacterium tuberculosis* defense system against oxidative stress, *The Journal of biological chemistry* 280, 25735-25742.
  231. Hillas, P. J., del Alba, F. S., Oyarzabal, J., Wilks, A., and Ortiz De Montellano, P. R. (2000) The AhpC and AhpD antioxidant defense system of *Mycobacterium tuberculosis*, *The Journal of biological chemistry* 275, 18801-18809.
  232. Jaeger, T., Budde, H., Flohe, L., Menge, U., Singh, M., Trujillo, M., and Radi, R. (2004) Multiple thioredoxin-mediated routes to detoxify hydroperoxides in *Mycobacterium tuberculosis*, *Archives of biochemistry and biophysics* 423, 182-191.
  233. Wong, C. F., Shin, J., Subramanian Manimekalai, M. S., Saw, W. G., Yin, Z., Bhushan, S., Kumar, A., Ragunathan, P., and Gruber, G. (2017) AhpC of the mycobacterial antioxidant defense system and its interaction with its reducing partner Thioredoxin-C, *Scientific reports* 7, 5159.
  234. Bryk, R., Lima, C. D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Nathan, C. (2002) Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein, *Science* 295, 1073-1077.
  235. Maksymiuk, C., Balakrishnan, A., Bryk, R., Rhee, K. Y., and Nathan, C. F. (2015) E1 of alpha-ketoglutarate dehydrogenase defends *Mycobacterium tuberculosis* against glutamate anaplerosis and nitroxidative stress, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, E5834-5843.
  236. Storz, G., Christman, M. F., Sies, H., and Ames, B. N. (1987) Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 8917-8921.
  237. Shi, S., and Ehrt, S. (2006) Dihydrolipoamide acyltransferase is critical for *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis, *Infect Immun* 74, 56-63.

238. Farivar, T. N., Varnousfaderani, P. J., and Borji, A. (2008) Mutation in alkylhydroperoxidase D gene dramatically decreases persistence of *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-guerin in infected macrophage, *Indian journal of medical sciences* 62, 275-282.
239. Sherman, D. R., Mdluli, K., Hickey, M. J., Arain, T. M., Morris, S. L., Barry, C. E., 3rd, and Stover, C. K. (1996) Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, *Science* 272, 1641-1643.
240. Datta, G., Nieto, L. M., Davidson, R. M., Mehaffy, C., Pederson, C., Dobos, K. M., and Strong, M. (2016) Longitudinal whole genome analysis of pre and post drug treatment *Mycobacterium tuberculosis* isolates reveals progressive steps to drug resistance, *Tuberculosis (Edinb)* 98, 50-55.
241. Springer, B., Master, S., Sander, P., Zahrt, T., McFalone, M., Song, J., Papavinasundaram, K. G., Colston, M. J., Boettger, E., and Deretic, V. (2001) Silencing of oxidative stress response in *Mycobacterium tuberculosis*: expression patterns of *ahpC* in virulent and avirulent strains and effect of *ahpC* inactivation, *Infect Immun* 69, 5967-5973.
242. Master, S. S., Springer, B., Sander, P., Boettger, E. C., Deretic, V., and Timmins, G. S. (2002) Oxidative stress response genes in *Mycobacterium tuberculosis*: role of *ahpC* in resistance to peroxynitrite and stage-specific survival in macrophages, *Microbiology* 148, 3139-3144.
243. Trujillo, M., Mauri, P., Benazzi, L., Comini, M., De Palma, A., Flohe, L., Radi, R., Stehr, M., Singh, M., Ursini, F., and Jaeger, T. (2006) The mycobacterial thioredoxin peroxidase can act as a one-cysteine peroxiredoxin, *The Journal of biological chemistry* 281, 20555-20566.
244. Rho, B. S., Hung, L. W., Holton, J. M., Vigil, D., Kim, S. I., Park, M. S., Terwilliger, T. C., and Pedelacq, J. D. (2006) Functional and structural characterization of a thiol peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*, *Journal of molecular biology* 361, 850-863.
245. Stehr, M., Hecht, H. J., Jager, T., Flohe, L., and Singh, M. (2006) Structure of the inactive variant C60S of *Mycobacterium tuberculosis* thiol peroxidase, *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 62, 563-567.
246. Hu, Y., and Coates, A. R. (2009) Acute and persistent *Mycobacterium tuberculosis* infections depend on the thiol peroxidase *TpX*, *PLoS One* 4, e5150.
247. Hugo, M., Turell, L., Manta, B., Botti, H., Monteiro, G., Netto, L. E., Alvarez, B., Radi, R., and Trujillo, M. (2009) Thiol and sulfenic acid oxidation of *AhpE*, the one-cysteine peroxiredoxin from *Mycobacterium tuberculosis*: kinetics, acidity constants, and conformational dynamics, *Biochemistry* 48, 9416-9426.
248. Rhee, S. G., and Kil, I. S. (2017) Multiple Functions and Regulation of Mammalian Peroxiredoxins, *Annual review of biochemistry* 86, 749-775.
249. Gomes, F., Palma, F. R., Barros, M. H., Tsuchida, E. T., Turano, H. G., Alegria, T. G. P., Demasi, M., and Netto, L. E. S. (2017) Proteolytic cleavage by the inner membrane peptidase (IMP) complex or Oct1 peptidase controls the localization of the yeast peroxiredoxin *Prx1* to distinct mitochondrial compartments, *The Journal of biological chemistry* 292, 17011-17024.
250. Matsumura, K., Iwai, H., Kato-Miyazawa, M., Kirikae, F., Zhao, J., Yanagawa, T., Ishii, T., Miyoshi-Akiyama, T., Funatogawa, K., and Kirikae, T. (2016) Peroxiredoxin 1 Contributes to Host Defenses against *Mycobacterium tuberculosis*, *J Immunol* 197, 3233-3244.
251. Yabaji, S. M., Mishra, A. K., Chatterjee, A., Dubey, R. K., Srivastava, K., and Srivastava, K. K. (2017) Peroxiredoxin-1 of macrophage is critical for mycobacterial infection and is controlled by early secretory antigenic target protein through the activation of p38 MAPK, *Biochem Biophys Res Commun* 494, 433-439.

252. Jamwal, S., Midha, M. K., Verma, H. N., Basu, A., Rao, K. V., and Manivel, V. (2013) Characterizing virulence-specific perturbations in the mitochondrial function of macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*, *Scientific reports* 3, 1328.
253. Gow, A. J., Duran, D., Malcolm, S., and Ischiropoulos, H. (1996) Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation, *FEBS Lett* 385, 63-66.
254. Berlett, B. S., Friguet, B., Yim, M. B., Chock, P. B., and Stadtman, E. R. (1996) Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues in *Escherichia coli* glutamine synthetase mimics adenylylation: relevance to signal transduction, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 1776-1780.
255. de Souza, G. A., Arntzen, M. O., Fortuin, S., Schurch, A. C., Malen, H., McEvoy, C. R., van Soolingen, D., Thiede, B., Warren, R. M., and Wiker, H. G. (2011) Proteogenomic analysis of polymorphisms and gene annotation divergences in prokaryotes using a clustered mass spectrometry-friendly database, *Mol Cell Proteomics* 10, M110 002527.
256. Abramovitch, R. B., Rohde, K. H., Hsu, F. F., and Russell, D. G. (2011) aprABC: a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific locus that modulates pH-driven adaptation to the macrophage phagosome, *Molecular microbiology* 80, 678-694.
257. Abhishek, S., Saikia, U. N., Gupta, A., Bansal, R., Gupta, V., Singh, N., Laal, S., and Verma, I. (2018) Transcriptional Profile of *Mycobacterium tuberculosis* in an in vitro Model of Intraocular Tuberculosis, *Frontiers in cellular and infection microbiology* 8, 330.
258. Saxena, A. (2018) Differential Expression of Proteins of *Mycobacterium bovis* BCG during Adaptation to Anaerobic Non Replicating Persistence, *International Journal of Pulmonology and Infectious Diseases, Symbiosis online*.
259. Voskuil, M. I., Bartek, I. L., Visconti, K., and Schoolnik, G. K. (2011) The response of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive oxygen and nitrogen species, *Frontiers in microbiology* 2, 105.
260. Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixeira, F., Margis-Pinheiro, M., Ioannidis, V., Penel, C., Falquet, L., and Dunand, C. (2007) PeroxiBase: the peroxidase database, *Phytochemistry* 68, 1605-1611.
261. Li, S., Peterson, N. A., Kim, M. Y., Kim, C. Y., Hung, L. W., Yu, M., Legin, T., Segelke, B. W., Lott, J. S., and Baker, E. N. (2005) Crystal Structure of AhpE from *Mycobacterium tuberculosis*, a 1-Cys peroxiredoxin, *Journal of molecular biology* 346, 1035-1046.
262. Zeida, A., Reyes, A. M., Lebrero, M. C., Radi, R., Trujillo, M., and Estrin, D. A. (2014) The extraordinary catalytic ability of peroxiredoxins: a combined experimental and QM/MM study on the fast thiol oxidation step, *Chem Commun (Camb)* 50, 10070-10073.
263. Zeida, A., Reyes, A. M., Lichtig, P., Hugo, M., Vazquez, D. S., Santos, J., Gonzalez Flecha, F. L., Radi, R., Estrin, D. A., and Trujillo, M. (2015) Molecular Basis of Hydroperoxide Specificity in Peroxiredoxins: The Case of AhpE from *Mycobacterium tuberculosis*, *Biochemistry* 54, 7237-7247.
264. van Bergen, L. A., Alonso, M., Pallo, A., Nilsson, L., De Proft, F., and Messens, J. (2016) Revisiting sulfur H-bonds in proteins: The example of peroxiredoxin AhpE, *Scientific reports* 6, 30369.
265. Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J., and Poole, L. B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins, *Trends in biochemical sciences* 28, 32-40.
266. Rhee, S. G., Yang, K. S., Kang, S. W., Woo, H. A., and Chang, T. S. (2005) Controlled elimination of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification, *Antioxid Redox Signal* 7, 619-626.

267. Basu, M. K., and Koonin, E. V. (2005) Evolution of eukaryotic cysteine sulfinic acid reductase, sulfiredoxin (Srx), from bacterial chromosome partitioning protein ParB, *Cell Cycle* 4, 947-952.
268. Cardey, B., and Enescu, M. (2005) A computational study of thiolate and selenolate oxidation by hydrogen peroxide, *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* 6, 1175-1180.
269. Cardey, B., and Enescu, M. (2007) Selenocysteine versus cysteine reactivity: a theoretical study of their oxidation by hydrogen peroxide, *The journal of physical chemistry. A* 111, 673-678.
270. Chu, J. W., and Trout, B. L. (2004) On the mechanisms of oxidation of organic sulfides by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in aqueous solutions, *J Am Chem Soc* 126, 900-908.
271. Zeida, A., Babbush, R., Lebrero, M. C., Trujillo, M., Radi, R., and Estrin, D. A. (2012) Molecular basis of the mechanism of thiol oxidation by hydrogen peroxide in aqueous solution: challenging the S<sub>N</sub>2 paradigm, *Chemical research in toxicology* 25, 741-746.
272. Hall, A., Parsonage, D., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2010) Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on transition-state stabilization, *Journal of molecular biology* 402, 194-209.
273. Karplus, P. A., and Hall, A. (2007) Structural survey of the peroxiredoxins, *Sub-cellular biochemistry* 44, 41-60.
274. Perkins, A., Parsonage, D., Nelson, K. J., Ogba, O. M., Cheong, P. H., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2016) Peroxiredoxin Catalysis at Atomic Resolution, *Structure*.
275. Edwards, J. O., and Pearson, R. G. (1962) The Factors Determining Nucleophilic Reactivities, *Journal of the American Chemical Society* 84, 16-24.
276. Trindade, D. F., Cerchiaro, G., and Augusto, O. (2006) A role for peroxy-monocarbonate in the stimulation of bi-thiol peroxidation by the bicarbonate/carbon dioxide pair, *Chemical research in toxicology* 19, 1475-1482.
277. Truzzi, D., and Augusto, O. (2017) Influence of CO<sub>2</sub> on hydroperoxide metabolism, p 81, CRC Press.
278. Lo Conte, M., and Carroll, K. S. (2013) The redox biochemistry of protein sulfenylation and sulfinylation, *The Journal of biological chemistry* 288, 26480-26488.
279. Manta, B., Hugo, M., Ortiz, C., Ferrer-Sueta, G., Trujillo, M., and Denicola, A. (2009) The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2, *Archives of biochemistry and biophysics* 484, 146-154.
280. Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J. C., Williams, K. L., Appel, R. D., and Hochstrasser, D. F. (1999) Protein identification and analysis tools in the ExPASy server, *Methods Mol Biol* 112, 531-552.
281. Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups, *Archives of biochemistry and biophysics* 82, 70-77.
282. DeGray, J. A., Gunther, M. R., Tschirret-Guth, R., Ortiz de Montellano, P. R., and Mason, R. P. (1997) Peroxidation of a specific tryptophan of metmyoglobin by hydrogen peroxide, *The Journal of biological chemistry* 272, 2359-2362.
283. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., and Klein, M. L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *The Journal of Chemical Physics* 79, 926-935.
284. Pearlman, D. A., Case, D. A., Caldwell, J. W., Ross, W. S., Cheatham, T. E., DeBolt, S., Ferguson, D., Seibel, G., and Kollman, P. (1995) AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules, *Computer Physics Communications* 91, 1-41.
285. Gauto, D. F., Di Lella, S., Guardia, C. M., Estrin, D. A., and Marti, M. A. (2009) Carbohydrate-binding proteins: Dissecting ligand structures through solvent environment occupancy, *The journal of physical chemistry. B* 113, 8717-8724.

286. Rastelli, G., Del Rio, A., Degliesposti, G., and Sgobba, M. (2010) Fast and accurate predictions of binding free energies using MM-PBSA and MM-GBSA, *Journal of computational chemistry* 31, 797-810.
287. Crespo, A., Scherlis, D. A., Martí, M. A., Ordejón, P., Roitberg, A. E., and Estrin, D. A. (2003) A DFT-Based QM-MM Approach Designed for the Treatment of Large Molecular Systems: Application to Chorismate Mutase, *The Journal of Physical Chemistry B* 107, 13728-13736.
288. Jr., T. H. D. (1989) Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen, *The Journal of Chemical Physics* 90, 1007-1023.
289. Kästner, J., and Thiel, W. (2005) Bridging the gap between thermodynamic integration and umbrella sampling provides a novel analysis method: "Umbrella integration", *The Journal of Chemical Physics* 123, 144104.
290. Kästner, J., and Thiel, W. (2006) Analysis of the statistical error in umbrella sampling simulations by umbrella integration, *The Journal of Chemical Physics* 124, 234106.
291. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics, *J Mol Graph* 14, 33-38, 27-38.
292. Aldini, G., Regazzoni, L., Orioli, M., Rimoldi, I., Facino, R. M., and Carini, M. (2008) A tandem MS precursor-ion scan approach to identify variable covalent modification of albumin Cys34: a new tool for studying vascular carbonylation, *Journal of mass spectrometry : JMS* 43, 1470-1481.
293. Alegria, T. G., Meireles, D. A., Cussiol, J. R., Hugo, M., Trujillo, M., de Oliveira, M. A., Miyamoto, S., Queiroz, R. F., Valadares, N. F., Garratt, R. C., Radi, R., Di Mascio, P., Augusto, O., and Netto, L. E. (2017) Ohr plays a central role in bacterial responses against fatty acid hydroperoxides and peroxyxynitrite, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, E132-E141.
294. Garnica, O. A., Das, K., and Dhandayuthapani, S. (2017) OhrR of Mycobacterium smegmatis senses and responds to intracellular organic hydroperoxide stress, *Scientific reports* 7, 3922.
295. Saikolappan, S., Das, K., Sasindran, S. J., Jagannath, C., and Dhandayuthapani, S. (2011) OsmC proteins of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium smegmatis protect against organic hydroperoxide stress, *Tuberculosis (Edinb)* 91 Suppl 1, S119-127.
296. Sermon, B. A., Eccleston, J. F., Skinner, R. H., and Lowe, P. N. (1996) Mechanism of inhibition by arachidonic acid of the catalytic activity of Ras GTPase-activating proteins, *The Journal of biological chemistry* 271, 1566-1572.
297. Feldman, J. L., Baeza, J., and Denu, J. M. (2013) Activation of the protein deacetylase SIRT6 by long-chain fatty acids and widespread deacylation by mammalian sirtuins, *The Journal of biological chemistry* 288, 31350-31356.
298. Matulis, D., and Lovrien, R. (1998) 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate anion-protein binding depends primarily on ion pair formation, *Biophysical journal* 74, 422-429.
299. Cattoni, D. I., Kaufman, S. B., and Gonzalez Flecha, F. L. (2009) Kinetics and thermodynamics of the interaction of 1-anilino-naphthalene-8-sulfonate with proteins, *Biochimica et biophysica acta* 1794, 1700-1708.
300. Collini, M., D'Alfonso, L., Molinari, H., Ragona, L., Catalano, M., and Baldini, G. (2003) Competitive binding of fatty acids and the fluorescent probe 1-8-anilino-naphthalene sulfonate to bovine beta-lactoglobulin, *Protein science : a publication of the Protein Society* 12, 1596-1603.
301. Roman, E. A., Arguello, J. M., and Gonzalez Flecha, F. L. (2010) Reversible unfolding of a thermophilic membrane protein in phospholipid/detergent mixed micelles, *Journal of molecular biology* 397, 550-559.

302. Shi, L., Palleros, D. R., and Fink, A. L. (1994) Protein conformational changes induced by 1,1'-bis(4-anilino-5-naphthalenesulfonic acid): preferential binding to the molten globule of DnaK, *Biochemistry* 33, 7536-7546.
303. Moore, S. A., and Jencks, W. P. (1982) Formation of active site thiol esters of CoA transferase and the dependence of catalysis on specific binding interactions, *The Journal of biological chemistry* 257, 10893-10907.
304. Jencks, W. P. (1994) Reaction mechanisms, catalysis, and movement, *Protein science : a publication of the Protein Society* 3, 2459-2464.
305. Wu, N., Mo, Y., Gao, J., and Pai, E. F. (2000) Electrostatic stress in catalysis: structure and mechanism of the enzyme orotidine monophosphate decarboxylase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 2017-2022.
306. Hou, T., Wang, J., Li, Y., and Wang, W. (2011) Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations, *Journal of chemical information and modeling* 51, 69-82.
307. Perkins, A., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2014) Tuning of peroxiredoxin catalysis for various physiological roles, *Biochemistry* 53, 7693-7705.
308. Hall, A., Sankaran, B., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2009) Structural changes common to catalysis in the Tpx peroxiredoxin subfamily, *Journal of molecular biology* 393, 867-881.
309. Salsbury, F. R., Jr., Yuan, Y., Knaggs, M. H., Poole, L. B., and Fetrow, J. S. (2012) Structural and electrostatic asymmetry at the active site in typical and atypical peroxiredoxin dimers, *The journal of physical chemistry. B* 116, 6832-6843.
310. Yuan, Y., Knaggs, M., Poole, L., Fetrow, J., and Salsbury, F., Jr. (2010) Conformational and oligomeric effects on the cysteine pK(a) of tryparedoxin peroxidase, *Journal of biomolecular structure & dynamics* 28, 51-70.
311. Budde, H., Flohe, L., Hecht, H. J., Hofmann, B., Stehr, M., Wissing, J., and Lunsdorf, H. (2003) Kinetics and redox-sensitive oligomerisation reveal negative subunit cooperativity in tryparedoxin peroxidase of *Trypanosoma brucei brucei*, *Biological chemistry* 384, 619-633.
312. Haynes, A. C., Qian, J., Reisz, J. A., Furdui, C. M., and Lowther, W. T. (2013) Molecular basis for the resistance of human mitochondrial 2-Cys peroxiredoxin 3 to hyperoxidation, *The Journal of biological chemistry* 288, 29714-29723.
313. Kastner, J., and Thiel, W. (2006) Analysis of the statistical error in umbrella sampling simulations by umbrella integration, *J Chem Phys* 124, 234106.
314. Abe, K., and Kimura, H. (1996) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 1066-1071.
315. Hosoki, R., Matsuki, N., and Kimura, H. (1997) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide, *Biochem Biophys Res Commun* 237, 527-531.
316. Filipovic, M. R., Zivanovic, J., Alvarez, B., and Banerjee, R. (2018) Chemical Biology of H<sub>2</sub>S Signaling through Persulfidation, *Chem Rev* 118, 1253-1337.
317. Kabil, O., and Banerjee, R. (2014) Enzymology of H<sub>2</sub>S biogenesis, decay and signaling, *Antioxid Redox Signal* 20, 770-782.
318. Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., and Wang, R. (2001) The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener, *The EMBO journal* 20, 6008-6016.
319. Robert, K., Vialard, F., Thiery, E., Toyama, K., Sinet, P. M., Janel, N., and London, J. (2003) Expression of the cystathionine beta synthase (CBS) gene during mouse development and immunolocalization in adult brain, *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 51, 363-371.

320. Singh, S. B., and Lin, H. C. (2015) Hydrogen Sulfide in Physiology and Diseases of the Digestive Tract, *Microorganisms* 3, 866-889.
321. Madurga, A., Golec, A., Pozarska, A., Ishii, I., Mizikova, I., Nardiello, C., Vadasz, I., Herold, S., Mayer, K., Reichenberger, F., Fehrenbach, H., Seeger, W., and Morty, R. E. (2015) The H<sub>2</sub>S-generating enzymes cystathionine beta-synthase and cystathionine gamma-lyase play a role in vascular development during normal lung alveolarization, *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 309, L710-724.
322. Bazhanov, N., Ansar, M., Ivanciuc, T., Garofalo, R. P., and Casola, A. (2017) Hydrogen Sulfide: A Novel Player in Airway Development, Pathophysiology of Respiratory Diseases, and Antiviral Defenses, *American journal of respiratory cell and molecular biology* 57, 403-410.
323. Blackstone, E., Morrison, M., and Roth, M. B. (2005) H<sub>2</sub>S induces a suspended animation-like state in mice, *Science* 308, 518.
324. Aslami, H., Schultz, M. J., and Juffermans, N. P. (2009) Potential applications of hydrogen sulfide-induced suspended animation, *Current medicinal chemistry* 16, 1295-1303.
325. Cuevasanta, E., Denicola, A., Alvarez, B., and Moller, M. N. (2012) Solubility and permeation of hydrogen sulfide in lipid membranes, *PLoS One* 7, e34562.
326. Takayama, K., Wang, C., and Besra, G. S. (2005) Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in Mycobacterium tuberculosis, *Clinical microbiology reviews* 18, 81-101.
327. Markovich, D. (2001) Physiological roles and regulation of mammalian sulfate transporters, *Physiol Rev* 81, 1499-1533.
328. Sassetti, C. M., Boyd, D. H., and Rubin, E. J. (2001) Comprehensive identification of conditionally essential genes in mycobacteria, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 12712-12717.
329. Hampshire, T., Soneji, S., Bacon, J., James, B. W., Hinds, J., Laing, K., Stabler, R. A., Marsh, P. D., and Butcher, P. D. (2004) Stationary phase gene expression of Mycobacterium tuberculosis following a progressive nutrient depletion: a model for persistent organisms?, *Tuberculosis (Edinb)* 84, 228-238.
330. Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M. I., Liu, Y., Mangan, J. A., Monahan, I. M., Dolganov, G., Efron, B., Butcher, P. D., Nathan, C., and Schoolnik, G. K. (2003) Transcriptional Adaptation of Mycobacterium tuberculosis within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment, *J Exp Med* 198, 693-704.
331. Sun, M., Andreassi, J. L., 2nd, Liu, S., Pinto, R., Triccas, J. A., and Leyh, T. S. (2005) The trifunctional sulfate-activating complex (SAC) of Mycobacterium tuberculosis, *The Journal of biological chemistry* 280, 7861-7866.
332. Williams, S. J., Senaratne, R. H., Mougous, J. D., Riley, L. W., and Bertozzi, C. R. (2002) 5'-Adenosinephosphosulfate Lies at a Metabolic Branch Point in Mycobacteria, *Journal of Biological Chemistry* 277, 32606-32615.
333. Mougous, J. D., Green, R. E., Williams, S. J., Brenner, S. E., and Bertozzi, C. R. (2002) Sulfotransferases and sulfatases in mycobacteria, *Chem Biol* 9, 767-776.
334. Bick, J. A., Dennis, J. J., Zylstra, G. J., Nowack, J., and Leustek, T. (2000) Identification of a new class of 5'-adenylylsulfate (APS) reductases from sulfate-assimilating bacteria, *J Bacteriol* 182, 135-142.
335. Carroll, K. S., Gao, H., Chen, H., Leary, J. A., and Bertozzi, C. R. (2005) Investigation of the iron-sulfur cluster in Mycobacterium tuberculosis APS reductase: implications for substrate binding and catalysis, *Biochemistry* 44, 14647-14657.
336. Carroll, K. S., Gao, H., Chen, H., Stout, C. D., Leary, J. A., and Bertozzi, C. R. (2005) A conserved mechanism for sulfonucleotide reduction, *PLoS biology* 3, e250.
337. Schnell, R., Sandalova, T., Hellman, U., Lindqvist, Y., and Schneider, G. (2005) Siroheme- and [Fe<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>]-dependent NirA from Mycobacterium tuberculosis is a sulfite

- reductase with a covalent Cys-Tyr bond in the active site, *The Journal of biological chemistry* 280, 27319-27328.
338. Kredich, N. M. (2008) Biosynthesis of Cysteine, *EcoSal Plus* 3.
  339. Newton, G. L., Ta, P., and Fahey, R. C. (2005) A mycothiol synthase mutant of *Mycobacterium smegmatis* produces novel thiols and has an altered thiol redox status, *J Bacteriol* 187, 7309-7316.
  340. Leyh, T. S. (1993) The physical biochemistry and molecular genetics of sulfate activation, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 28, 515-542.
  341. Wheeler, P. R., Coldham, N. G., Keating, L., Gordon, S. V., Wooff, E. E., Parish, T., and Hewinson, R. G. (2005) Functional demonstration of reverse transsulfuration in the *Mycobacterium tuberculosis* complex reveals that methionine is the preferred sulfur source for pathogenic *Mycobacteria*, *The Journal of biological chemistry* 280, 8069-8078.
  342. Held, K. D., and Biaglow, J. E. (1994) Mechanisms for the oxygen radical-mediated toxicity of various thiol-containing compounds in cultured mammalian cells, *Radiation research* 139, 15-23.
  343. Bzymek, K. P., Newton, G. L., Ta, P., and Fahey, R. C. (2007) Mycothiol import by *Mycobacterium smegmatis* and function as a resource for metabolic precursors and energy production, *Journal of bacteriology* 189, 6796-6805.
  344. Bondi, A. (1964) van der Waals Volumes and Radii, *The Journal of Physical Chemistry* 68, 441-451.
  345. Riahi, S., and Rowley, C. N. (2014) Solvation of hydrogen sulfide in liquid water and at the water-vapor interface using a polarizable force field, *The journal of physical chemistry. B* 118, 1373-1380.
  346. Mathai, J. C., Missner, A., Kügler, P., Saparov, S. M., Zeidel, M. L., Lee, J. K., and Pohl, P. (2009) No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 16633-16638.
  347. Riahi, S., and Rowley, C. N. (2014) Why can hydrogen sulfide permeate cell membranes?, *J Am Chem Soc* 136, 15111-15113.
  348. Hughes, M. N., Centelles, M. N., and Moore, K. P. (2009) Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review, *Free radical biology & medicine* 47, 1346-1353.
  349. Cuevasanta, E., Moller, M. N., and Alvarez, B. (2017) Biological chemistry of hydrogen sulfide and persulfides, *Archives of biochemistry and biophysics* 617, 9-25.
  350. Koppenol, W. H., and Bounds, P. L. (2017) Signaling by sulfur-containing molecules. Quantitative aspects, *Archives of biochemistry and biophysics* 617, 3-8.
  351. Li, Q., and Lancaster, J. R., Jr. (2013) Chemical foundations of hydrogen sulfide biology, *Nitric oxide : biology and chemistry* 35, 21-34.
  352. Benchoam, D., Cuevasanta, E., Möller, M. N., and Alvarez, B. (2019) Hydrogen sulfide and persulfides oxidation by biologically relevant oxidizing species, *Antioxidants* 8, 48.
  353. Carballal, S., Trujillo, M., Cuevasanta, E., Bartesaghi, S., Moller, M. N., Folkes, L. K., Garcia-Bereguain, M. A., Gutierrez-Merino, C., Wardman, P., Denicola, A., Radi, R., and Alvarez, B. (2011) Reactivity of hydrogen sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest, *Free radical biology & medicine* 50, 196-205.
  354. Toohey, J. I. (2011) Sulfur signaling: is the agent sulfide or sulfane?, *Analytical biochemistry* 413, 1-7.
  355. Wright, C. M., Christman, G. D., Snellinger, A. M., Johnston, M. V., and Mueller, E. G. (2006) Direct evidence for enzyme persulfide and disulfide intermediates during 4-thiouridine biosynthesis, *Chem Commun (Camb)*, 3104-3106.
  356. Mueller, E. G. (2006) Trafficking in persulfides: delivering sulfur in biosynthetic pathways, *Nat Chem Biol* 2, 185-194.



357. Ida, T., Sawa, T., Ihara, H., Tsuchiya, Y., Watanabe, Y., Kumagai, Y., Suematsu, M., Motohashi, H., Fujii, S., Matsunaga, T., Yamamoto, M., Ono, K., Devarie-Baez, N. O., Xian, M., Fukuto, J. M., and Akaike, T. (2014) Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 7606-7611.
358. Yadav, P. K., Yamada, K., Chiku, T., Koutmos, M., and Banerjee, R. (2013) Structure and kinetic analysis of H<sub>2</sub>S production by human mercaptopyruvate sulfurtransferase, *The Journal of biological chemistry* 288, 20002-20013.
359. Jackson, M. R., Melideo, S. L., and Jorns, M. S. (2012) Human sulfide:quinone oxidoreductase catalyzes the first step in hydrogen sulfide metabolism and produces a sulfane sulfur metabolite, *Biochemistry* 51, 6804-6815.
360. Libiad, M., Yadav, P. K., Vitvitsky, V., Martinov, M., and Banerjee, R. (2014) Organization of the human mitochondrial hydrogen sulfide oxidation pathway, *The Journal of biological chemistry* 289, 30901-30910.
361. Melideo, S. L., Jackson, M. R., and Jorns, M. S. (2014) Biosynthesis of a central intermediate in hydrogen sulfide metabolism by a novel human sulfurtransferase and its yeast ortholog, *Biochemistry* 53, 4739-4753.
362. Libiad, M., Motl, N., Akey, D. L., Sakamoto, N., Fearon, E. R., Smith, J. L., and Banerjee, R. (2018) Thiosulfate sulfurtransferase-like domain-containing 1 protein interacts with thioredoxin, *The Journal of biological chemistry* 293, 2675-2686.
363. Francoleon, N. E., Carrington, S. J., and Fukuto, J. M. (2011) The reaction of H<sub>2</sub>S with oxidized thiols: generation of persulfides and implications to H<sub>2</sub>S biology, *Archives of biochemistry and biophysics* 516, 146-153.
364. Greiner, R., Palinkas, Z., Basell, K., Becher, D., Antelmann, H., Nagy, P., and Dick, T. P. (2013) Polysulfides link H<sub>2</sub>S to protein thiol oxidation, *Antioxid Redox Signal* 19, 1749-1765.
365. Bestetti, S., Medrano-Fernandez, I., Galli, M., Ghitti, M., Bienert, G. P., Musco, G., Orsi, A., Rubartelli, A., and Sitia, R. (2018) A persulfidation-based mechanism controls aquaporin-8 conductance, *Science advances* 4, eaar5770.
366. Mustafa, A. K., Gadalla, M. M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S. K., Barrow, R. K., Yang, G., Wang, R., and Snyder, S. H. (2009) H<sub>2</sub>S signals through protein S-sulfhydration, *Science signaling* 2, ra72.
367. Jarosz, A. P., Wei, W., Gauld, J. W., Auld, J., Ozcan, F., Aslan, M., and Mutus, B. (2015) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is inactivated by S-sulfuration in vitro, *Free radical biology & medicine* 89, 512-521.
368. Vandiver, M. S., Paul, B. D., Xu, R., Karuppagounder, S., Rao, F., Snowman, A. M., Ko, H. S., Lee, Y. I., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Sen, N., and Snyder, S. H. (2013) Sulfhydration mediates neuroprotective actions of parkin, *Nature communications* 4, 1626.
369. Everett, S. A., Folkes, L. K., Wardman, P., and Asmus, K. D. (1994) Free-radical repair by a novel perthiol: reversible hydrogen transfer and perthiyl radical formation, *Free Radic Res* 20, 387-400.
370. Fukuto, J. M., Carrington, S. J., Tantillo, D. J., Harrison, J. G., Ignarro, L. J., Freeman, B. A., Chen, A., and Wink, D. A. (2012) Small molecule signaling agents: the integrated chemistry and biochemistry of nitrogen oxides, oxides of carbon, dioxygen, hydrogen sulfide, and their derived species, *Chemical research in toxicology* 25, 769-793.
371. Jencks, W. P., and Carriuolo, J. (1960) Reactivity of Nucleophilic Reagents toward Esters, *Journal of the American Chemical Society* 82, 1778-1786.
372. Cuevasanta, E., Lange, M., Bonanata, J., Coitino, E. L., Ferrer-Sueta, G., Filipovic, M. R., and Alvarez, B. (2015) Reaction of Hydrogen Sulfide with Disulfide and Sulfenic Acid to Form the Strongly Nucleophilic Persulfide, *The Journal of biological chemistry* 290, 26866-26880.

373. Kawamura, S., Nakabayashi, T., Kitao, T., and Tsurugi, J. (1966) Alkyl Hydrodisulfides. VI. The Reaction of Benzhydryl Hydrosulfide with Several Nucleophiles, *The Journal of organic chemistry* 31, 1985-1987.
374. Bailey, T. S., Zakharov, L. N., and Pluth, M. D. (2014) Understanding hydrogen sulfide storage: probing conditions for sulfide release from hydrodisulfides, *J Am Chem Soc* 136, 10573-10576.
375. Millikin, R., Bianco, C. L., White, C., Saund, S. S., Henriquez, S., Sosa, V., Akaike, T., Kumagai, Y., Soeda, S., Toscano, J. P., Lin, J., and Fukuto, J. M. (2016) The chemical biology of protein hydropersulfides: Studies of a possible protective function of biological hydropersulfide generation, *Free radical biology & medicine* 97, 136-147.
376. Vitvitsky, V., Miljkovic, J. L., Bostelaar, T., Adhikari, B., Yadav, P. K., Steiger, A. K., Torregrossa, R., Pluth, M. D., Whiteman, M., Banerjee, R., and Filipovic, M. R. (2018) Cytochrome c Reduction by H<sub>2</sub>S Potentiates Sulfide Signaling, *ACS chemical biology* 13, 2300-2307.
377. Aroca, A., Gotor, C., and Romero, L. C. (2018) Hydrogen Sulfide Signaling in Plants: Emerging Roles of Protein Persulfidation, *Frontiers in plant science* 9, 1369.
378. Wedmann, R., Onderka, C., Wei, S., Szijarto, I. A., Miljkovic, J. L., Mitrovic, A., Lange, M., Savitsky, S., Yadav, P. K., Torregrossa, R., Harrer, E. G., Harrer, T., Ishii, I., Gollasch, M., Wood, M. E., Galardon, E., Xian, M., Whiteman, M., Banerjee, R., and Filipovic, M. R. (2016) Improved tag-switch method reveals that thioredoxin acts as depersulfidase and controls the intracellular levels of protein persulfidation, *Chemical science* 7, 3414-3426.
379. Doka, E., Pader, I., Biro, A., Johansson, K., Cheng, Q., Ballago, K., Prigge, J. R., Pastor-Flores, D., Dick, T. P., Schmidt, E. E., Arner, E. S., and Nagy, P. (2016) A novel persulfide detection method reveals protein persulfide- and polysulfide-reducing functions of thioredoxin and glutathione systems, *Science advances* 2, e1500968.
380. Ju, Y., Wu, L., and Yang, G. (2016) Thioredoxin 1 regulation of protein S-desulfhydration, *Biochemistry and biophysics reports* 5, 27-34.
381. Pan, J., and Carroll, K. S. (2013) Persulfide reactivity in the detection of protein s-sulfhydration, *ACS chemical biology* 8, 1110-1116.
382. Bailey, T. S., and Pluth, M. D. (2015) Reactions of isolated persulfides provide insights into the interplay between H<sub>2</sub>S and persulfide reactivity, *Free radical biology & medicine* 89, 662-667.
383. Artaud, I., and Galardon, E. (2014) A persulfide analogue of the nitrosothiol SNAP: formation, characterization and reactivity, *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* 15, 2361-2364.
384. Alvarez, B., Demicheli, V., Duran, R., Trujillo, M., Cervenansky, C., Freeman, B. A., and Radi, R. (2004) Inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidinyl radical, *Free radical biology & medicine* 37, 813-822.
385. Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Ferrer-Sueta, G., Souza, J. M., Duran, R., Freeman, B. A., Radi, R., and Alvarez, B. (2008) Reactivity of sulfenic acid in human serum albumin, *Biochemistry* 47, 358-367.
386. Nelson, D. P., and Kiesow, L. A. (1972) Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV), *Analytical biochemistry* 49, 474-478.
387. Bohle, D. S., Hansert, B., Paulson, S. C., and Smith, B. D. (1994) Biomimetic Synthesis of the Putative Cytotoxin Peroxynitrite, ONOO<sup>-</sup>, and Its Characterization as a Tetramethylammonium Salt, *Journal of the American Chemical Society* 116, 7423-7424.
388. Grasseti, D. R., and Murray, J. F., Jr. (1967) Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine, *Archives of biochemistry and biophysics* 119, 41-49.
389. Mendes, P. (1993) GEPASI: a software package for modelling the dynamics, steady states and control of biochemical and other systems, *Comput Appl Biosci* 9, 563-571.

390. Hoffmann, M. R. (1977) Kinetics and mechanism of oxidation of hydrogen sulfide by hydrogen peroxide in acidic solution, *Environmental Science & Technology* 11, 61-66.
391. Kuzmic, P. (1996) Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase, *Analytical biochemistry* 237, 260-273.
392. Jiang, Z. Y., Hunt, J. V., and Wolff, S. P. (1992) Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein, *Analytical biochemistry* 202, 384-389.
393. Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., and Radi, R. (2008) Kinetic studies on peroxynitrite reduction by peroxiredoxins, *Methods in enzymology* 441, 173-196.
394. Siegel, L. M. (1965) A Direct Microdetermination for Sulfide, *Analytical biochemistry* 11, 126-132.
395. Touw, W. G., Joosten, R. P., and Vriend, G. (2016) New Biological Insights from Better Structure Models, *Journal of molecular biology* 428, 1375-1393.
396. Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., and Case, D. A. (2004) Development and testing of a general amber force field, *Journal of computational chemistry* 25, 1157-1174.
397. Reyes, A. M., Vazquez, D. S., Zeida, A., Hugo, M., Pineyro, M. D., De Armas, M. I., Estrin, D., Radi, R., Santos, J., and Trujillo, M. (2016) PrxQ B from *Mycobacterium tuberculosis* is a monomeric, thioredoxin-dependent and highly efficient fatty acid hydroperoxide reductase, *Free radical biology & medicine* 101, 249-260.
398. Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., and Simmerling, C. (2015) ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB, *Journal of chemical theory and computation* 11, 3696-3713.
399. Bibli, S. I., Luck, B., Zukunft, S., Wittig, J., Chen, W., Xian, M., Papapetropoulos, A., Hu, J., and Fleming, I. (2018) A selective and sensitive method for quantification of endogenous polysulfide production in biological samples, *Redox Biol.* 18, 295-304.
400. Chen, W., Liu, C., Peng, B., Zhao, Y., Pacheco, A., and Xian, M. (2013) New fluorescent probes for sulfane sulfurs and the application in bioimaging, *Chem. Sci.* 4, 2892-2896.
401. Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., and Radi, R. (2008) Peroxynitrite detoxification and its biologic implications, *Antioxid Redox Signal* 10, 1607-1620.
402. Loumaye, E., Ferrer-Sueta, G., Alvarez, B., Rees, J. F., Clippe, A., Knoop, B., Radi, R., and Trujillo, M. (2011) Kinetic studies of peroxiredoxin 6 from *Arenicola marina*: rapid oxidation by hydrogen peroxide and peroxynitrite but lack of reduction by hydrogen sulfide, *Archives of biochemistry and biophysics* 514, 1-7.
403. Newton, G. L., Arnold, K., Price, M. S., Sherrill, C., Delcardayre, S. B., Aharonowitz, Y., Cohen, G., Davies, J., Fahey, R. C., and Davis, C. (1996) Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes, *J Bacteriol* 178, 1990-1995.
404. Cumming, B. M., Lamprecht, D. A., Wells, R. M., Saini, V., Mazorodze, J. H., and Steyn, A. J. C. (2014) The Physiology and Genetics of Oxidative Stress in *Mycobacteria*, *Microbiology spectrum* 2.
405. Pal, V. K., Bandyopadhyay, P., and Singh, A. (2018) Hydrogen sulfide in physiology and pathogenesis of bacteria and viruses, *IUBMB life* 70, 393-410.
406. Bonanata, J., Turell, L., Antmann, L., Ferrer-Sueta, G., Botasini, S., Mendez, E., Alvarez, B., and Coitino, E. L. (2017) The thiol of human serum albumin: Acidity, microenvironment and mechanistic insights on its oxidation to sulfenic acid, *Free radical biology & medicine* 108, 952-962.
407. Peskin, A. V., Low, F. M., Paton, L. N., Maghzal, G. J., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. C. (2007) The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents, *The Journal of biological chemistry* 282, 11885-11892.

408. Gao, X. H., Krokowski, D., Guan, B. J., Bederman, I., Majumder, M., Parisien, M., Diatchenko, L., Kabil, O., Willard, B., Banerjee, R., Wang, B., Bebek, G., Evans, C. R., Fox, P. L., Gerson, S. L., Hoppel, C. L., Liu, M., Arvan, P., and Hatzoglou, M. (2015) Quantitative H<sub>2</sub>S-mediated protein sulfhydration reveals metabolic reprogramming during the integrated stress response, *eLife* 4, e10067.
409. Lew, J. M., Kapopoulou, A., Jones, L. M., and Cole, S. T. (2011) TubercuList--10 years after, *Tuberculosis (Edinb)* 91, 1-7.
410. Kong, W., Shiota, S., Shi, Y., Nakayama, H., and Nakayama, K. (2000) A novel peroxiredoxin of the plant *Sedum lineare* is a homologue of *Escherichia coli* bacterioferritin comigratory protein (Bcp), *Biochem J* 351, 107-114.
411. Jeong, W., Cha, M. K., and Kim, I. H. (2000) Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of bacterioferritin comigratory protein (BCP) as a new member of the thiol-specific antioxidant protein (TSA)/Alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family, *The Journal of biological chemistry* 275, 2924-2930.
412. Perkins, A., Gretes, M. C., Nelson, K. J., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2012) Mapping the active site helix-to-strand conversion of CxxxxC peroxiredoxin Q enzymes, *Biochemistry* 51, 7638-7650.
413. Fomenko, D. E., and Gladyshev, V. N. (2003) Identity and functions of CxxC-derived motifs, *Biochemistry* 42, 11214-11225.
414. Liao, S. J., Yang, C. Y., Chin, K. H., Wang, A. H., and Chou, S. H. (2009) Insights into the alkyl peroxide reduction pathway of *Xanthomonas campestris* bacterioferritin comigratory protein from the trapped intermediate-ligand complex structures, *Journal of molecular biology* 390, 951-966.
415. Pedone, E., Limauro, D., D'Alterio, R., Rossi, M., and Bartolucci, S. (2006) Characterization of a multifunctional protein disulfide oxidoreductase from *Sulfolobus solfataricus*, *FEBS J* 273, 5407-5420.
416. Clarke, D. J., Ortega, X. P., Mackay, C. L., Valvano, M. A., Govan, J. R., Campopiano, D. J., Langridge-Smith, P., and Brown, A. R. (2010) Subdivision of the bacterioferritin comigratory protein family of bacterial peroxiredoxins based on catalytic activity, *Biochemistry* 49, 1319-1330.
417. Clarke, D. J., Mackay, C. L., Campopiano, D. J., Langridge-Smith, P., and Brown, A. R. (2009) Interrogating the molecular details of the peroxiredoxin activity of the *Escherichia coli* bacterioferritin comigratory protein using high-resolution mass spectrometry, *Biochemistry* 48, 3904-3914.
418. Horta, B. B., de Oliveira, M. A., Discola, K. F., Cussiol, J. R., and Netto, L. E. (2010) Structural and biochemical characterization of peroxiredoxin Qbeta from *Xylella fastidiosa*: catalytic mechanism and high reactivity, *The Journal of biological chemistry* 285, 16051-16065.
419. Rouhier, N., Gelhaye, E., Gualberto, J. M., Jordy, M. N., De Fay, E., Hirasawa, M., Duplessis, S., Lemaire, S. D., Frey, P., Martin, F., Manieri, W., Knaff, D. B., and Jacquot, J. P. (2004) Poplar peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense, *Plant Physiol* 134, 1027-1038.
420. Reeves, S. A., Parsonage, D., Nelson, K. J., and Poole, L. B. (2011) Kinetic and thermodynamic features reveal that *Escherichia coli* BCP is an unusually versatile peroxiredoxin, *Biochemistry* 50, 8970-8981.
421. Cha, M. K., Hong, S. K., and Kim, I. H. (2007) Four thiol peroxidases contain a conserved GCT catalytic motif and act as a versatile array of lipid peroxidases in *Anabaena* sp. PCC7120, *Free radical biology & medicine* 42, 1736-1748.
422. Wang, G., Olczak, A. A., Walton, J. P., and Maier, R. J. (2005) Contribution of the *Helicobacter pylori* thiol peroxidase bacterioferritin comigratory protein to oxidative stress resistance and host colonization, *Infect Immun* 73, 378-384.

423. Lee, S., Jia, B., Liu, J., Pham, B. P., Kwak, J. M., Xuan, Y. H., and Cheong, G. W. (2015) A 1-Cys Peroxiredoxin from a Thermophilic Archaeon Moonlights as a Molecular Chaperone to Protect Protein and DNA against Stress-Induced Damage, *PLoS One* 10, e0125325.
424. Hicks, L. D., Raghavan, R., Battisti, J. M., and Minnick, M. F. (2010) A DNA-binding peroxiredoxin of *Coxiella burnetii* is involved in countering oxidative stress during exponential-phase growth, *J Bacteriol* 192, 2077-2084.
425. Lee, S., Chung, J. M., Yun, H. J., Won, J., and Jung, H. S. (2016) New insight into multifunctional role of peroxiredoxin family protein: Determination of DNA protection properties of bacterioferritin comigratory protein under hyperthermal and oxidative stresses, *Biochem Biophys Res Commun* 469, 1028-1033.
426. Atack, J. M., Harvey, P., Jones, M. A., and Kelly, D. J. (2008) The *Campylobacter jejuni* thiol peroxidases Tpx and Bcp both contribute to aerotolerance and peroxide-mediated stress resistance but have distinct substrate specificities, *J Bacteriol* 190, 5279-5290.
427. Johnson, N. A., McKenzie, R. M., and Fletcher, H. M. (2011) The *bcp* gene in the *bcp-recA-vimA-vimE-vimF* operon is important in oxidative stress resistance in *Porphyromonas gingivalis* W83, *Molecular oral microbiology* 26, 62-77.
428. Su, T., Si, M., Zhao, Y., Liu, Y., Yao, S., Che, C., and Chen, C. (2018) A thioredoxin-dependent peroxiredoxin Q from *Corynebacterium glutamicum* plays an important role in defense against oxidative stress, *PLoS One* 13, e0192674.
429. Busche, T., Silar, R., Picmanova, M., Patek, M., and Kalinowski, J. (2012) Transcriptional regulation of the operon encoding stress-responsive ECF sigma factor SigH and its anti-sigma factor RshA, and control of its regulatory network in *Corynebacterium glutamicum*, *BMC genomics* 13, 445.
430. Ehira, S., Ogino, H., Teramoto, H., Inui, M., and Yukawa, H. (2009) Regulation of quinone oxidoreductase by the redox-sensing transcriptional regulator QorR in *Corynebacterium glutamicum*, *The Journal of biological chemistry* 284, 16736-16742.
431. Gu, S., Chen, J., Dobos, K. M., Bradbury, E. M., Belisle, J. T., and Chen, X. (2003) Comprehensive proteomic profiling of the membrane constituents of a *Mycobacterium tuberculosis* strain, *Mol Cell Proteomics* 2, 1284-1296.
432. Malen, H., Pathak, S., Softeland, T., de Souza, G. A., and Wiker, H. G. (2010) Definition of novel cell envelope associated proteins in Triton X-114 extracts of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *BMC Microbiol* 10, 132.
433. Griffin, J. E., Gawronski, J. D., Dejesus, M. A., Ioerger, T. R., Akerley, B. J., and Sasseti, C. M. (2011) High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism, *PLoS pathogens* 7, e1002251.
434. Van der Geize, R., Yam, K., Heuser, T., Wilbrink, M. H., Hara, H., Anderton, M. C., Sim, E., Dijkhuizen, L., Davies, J. E., Mohn, W. W., and Eltis, L. D. (2007) A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 1947-1952.
435. Zielonka, J., Sikora, A., Joseph, J., and Kalyanaraman, B. (2010) Peroxynitrite is the major species formed from different flux ratios of co-generated nitric oxide and superoxide: direct reaction with boronate-based fluorescent probe, *The Journal of biological chemistry* 285, 14210-14216.
436. Mitra, S., and Dungan, S. R. (2001) Cholesterol solubilization in aqueous micellar solutions of quillaja saponin, bile salts, or nonionic surfactants, *Journal of agricultural and food chemistry* 49, 384-394.
437. Yin, H., and Porter, N. A. (2003) Specificity of the ferrous oxidation of xylenol orange assay: analysis of autoxidation products of cholesteryl arachidonate, *Analytical biochemistry* 313, 319-326.

438. Schonbaum, G. R., and Lo, S. (1972) Interaction of peroxidases with aromatic peracids and alkyl peroxides. Product analysis, *The Journal of biological chemistry* 247, 3353-3360.
439. Holmgren, A. (1995) Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide, *Structure* 3, 239-243.
440. Nelson, K. J., and Parsonage, D. (2011) Measurement of peroxiredoxin activity, *Current protocols in toxicology Chapter 7*, Unit7 10.
441. Dalziel, K., Dam, H., Moutschen-Dahmen, M., Noer, B., and Reio, L. (1957) Initial Steady State Velocities in the Evaluation of Enzyme-Coenzyme-Substrate Reaction Mechanisms, *11*, 1706-1723.
442. Floris, R., Piersma, S. R., Yang, G., Jones, P., and Wever, R. (1993) Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase, *European journal of biochemistry* 215, 767-775.
443. Espenson, J. H. (1995) *Chemical kinetics and reaction mechanisms*, McGraw-Hill, New York.
444. Demicheli, V., Moreno, D. M., Jara, G. E., Lima, A., Carballal, S., Rios, N., Batthyany, C., Ferrer-Sueta, G., Quijano, C., Estrin, D. A., Marti, M. A., and Radi, R. (2016) Mechanism of the Reaction of Human Manganese Superoxide Dismutase with Peroxynitrite: Nitration of Critical Tyrosine 34, *Biochemistry* 55, 3403-3417.
445. Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and Schwede, T. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling, *Bioinformatics* 22, 195-201.
446. Goldman, R., Stoyanovsky, D. A., Day, B. W., and Kagan, V. E. (1995) Reduction of phenoxyl radicals by thioredoxin results in selective oxidation of its SH-groups to disulfides. An antioxidant function of thioredoxin, *Biochemistry* 34, 4765-4772.
447. Wakita, M., Masuda, S., Motohashi, K., Hisabori, T., Ohta, H., and Takamiya, K. (2007) The significance of type II and PrxQ peroxiredoxins for antioxidative stress response in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*, *The Journal of biological chemistry* 282, 27792-27801.
448. Limauro, D., Pedone, E., Galdi, I., and Bartolucci, S. (2008) Peroxiredoxins as cellular guardians in *Sulfolobus solfataricus*: characterization of Bcp1, Bcp3 and Bcp4, *FEBS J* 275, 2067-2077.
449. Dolman, D., Newell, G. A., and Thurlow, M. D. (1975) A kinetic study of the reaction of horseradish peroxidase with hydrogen peroxide, *Can J Biochem* 53, 495-501.
450. Koppenol, W. H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H., and Beckman, J. S. (1992) Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide, *Chemical research in toxicology* 5, 834-842.
451. Rath, A., Davidson, A. R., and Deber, C. M. (2005) The structure of "unstructured" regions in peptides and proteins: role of the polyproline II helix in protein folding and recognition, *Biopolymers* 80, 179-185.
452. D'ambrosio, K. (2009) Insights into the catalytic mechanism of the Bcp family: functional and structural analysis of Bcp1 from *Sulfolobus solfataricus*, *Proteins* 76, 995-1006.
453. Lamkemeyer, P., Laxa, M., Collin, V., Li, W., Finkemeier, I., Schottler, M. A., Holtkamp, V., Tognetti, V. B., Issakidis-Bourguet, E., Kandlbinder, A., Weis, E., Miginiac-Maslow, M., and Dietz, K. J. (2006) Peroxiredoxin Q of *Arabidopsis thaliana* is attached to the thylakoids and functions in context of photosynthesis, *Plant J* 45, 968-981.
454. Chi, B. K., Busche, T., Van Laer, K., Basell, K., Becher, D., Clermont, L., Seibold, G. M., Persicke, M., Kalinowski, J., Messens, J., and Antelmann, H. (2014) Protein S-mycothiolation functions as redox-switch and thiol protection mechanism in *Corynebacterium glutamicum* under hypochlorite stress, *Antioxid Redox Signal* 20, 589-605.

455. Jain, M., Petzold, C. J., Schelle, M. W., Leavell, M. D., Mougous, J. D., Bertozzi, C. R., Leary, J. A., and Cox, J. S. (2007) Lipidomics reveals control of Mycobacterium tuberculosis virulence lipids via metabolic coupling, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 5133-5138.
456. Griffin, J. E., Pandey, A. K., Gilmore, S. A., Mizrahi, V., McKinney, J. D., Bertozzi, C. R., and Sasseti, C. M. (2012) Cholesterol catabolism by Mycobacterium tuberculosis requires transcriptional and metabolic adaptations, *Chem Biol* 19, 218-227.
457. Molloy, A., Laochumroonvorapong, P., and Kaplan, G. (1994) Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin, *J Exp Med* 180, 1499-1509.
458. Chang, T. S., Cho, C. S., Park, S., Yu, S., Kang, S. W., and Rhee, S. G. (2004) Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria, *The Journal of biological chemistry* 279, 41975-41984.
459. Tyagi, P., Pal, V. K., Srinivasan, S., and Singh, A. (2019) Mycobacterium tuberculosis reactivates HIV via exosomes mediated resetting of cellular redox potential and bioenergetics, *bioRxiv*, 629048.
460. Cox, A. G., Peskin, A. V., Paton, L. N., Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2009) Redox potential and peroxide reactivity of human peroxiredoxin 3, *Biochemistry* 48, 6495-6501.
461. Yewdall, N. A., Venugopal, H., Desfosses, A., Abrishami, V., Yosaatmadja, Y., Hampton, M. B., Gerrard, J. A., Goldstone, D. C., Mitra, A. K., and Radjainia, M. (2016) Structures of Human Peroxiredoxin 3 Suggest Self-Chaperoning Assembly that Maintains Catalytic State, *Structure* 24, 1120-1129.
462. Phillips, A. J., Littlejohn, J., Yewdall, N. A., Zhu, T., Valéry, C. I., Pearce, F. G., Mitra, A. K., Radjainia, M., and Gerrard, J. A. (2014) Peroxiredoxin is a versatile self-assembling tecton for protein nanotechnology, *Biomacromolecules* 15, 1871-1881.
463. Cao, Z., Bhella, D., and Lindsay, J. G. (2007) Reconstitution of the mitochondrial PrxIII antioxidant defence pathway: general properties and factors affecting PrxIII activity and oligomeric state, *Journal of molecular biology* 372, 1022-1033.
464. Morais, M. A., Giuseppe, P. O., Souza, T. A., Alegria, T. G., Oliveira, M. A., Netto, L. E., and Murakami, M. T. (2015) How pH modulates the dimer-decamer interconversion of 2-Cys peroxiredoxins from the Prx1 subfamily, *Journal of Biological Chemistry* 290, 8582-8590.
465. Hanschmann, E. M., Lonn, M. E., Schutte, L. D., Funke, M., Godoy, J. R., Eitner, S., Hudemann, C., and Lillig, C. H. (2010) Both thioredoxin 2 and glutaredoxin 2 contribute to the reduction of the mitochondrial 2-Cys peroxiredoxin Prx3, *The Journal of biological chemistry* 285, 40699-40705.
466. Hanschmann, E. M., Godoy, J. R., Berndt, C., Hudemann, C., and Lillig, C. H. (2013) Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins--molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling, *Antioxid Redox Signal* 19, 1539-1605.
467. Hall, A., Karplus, P. A., and Poole, L. B. (2009) Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions, *FEBS J* 276, 2469-2477.
468. Bolduc, J. A., Nelson, K. J., Haynes, A. C., Lee, J., Reisz, J. A., Graff, A. H., Clodfelter, J. E., Parsonage, D., Poole, L. B., Furdui, C. M., and Lowther, W. T. (2018) Novel hyperoxidation resistance motifs in 2-Cys peroxiredoxins, *The Journal of biological chemistry* 293, 11901-11912.
469. Cox, A. G., Pearson, A. G., Pullar, J. M., Jonsson, T. J., Lowther, W. T., Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2009) Mitochondrial peroxiredoxin 3 is more resilient to hyperoxidation than cytoplasmic peroxiredoxins, *Biochem J* 421, 51-58.

470. Rhee, S. G., and Kil, I. S. (2016) Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling is controlled by the concerted action of peroxiredoxin III and sulfiredoxin: Linking mitochondrial function to circadian rhythm, *Free radical biology & medicine* 100, 73-80.
471. Aicardo, A., Martinez, D. M., Campolo, N., Bartesaghi, S., and Radi, R. (2016) Biochemistry of nitric oxide and peroxynitrite: sources, targets and biological implications, In *Biochemistry of Oxidative Stress*, pp 49-77, Springer.
472. Kooy, N. W., Lewis, S. J., Royall, J. A., Ye, Y. Z., Kelly, D. R., and Beckman, J. S. (1997) Extensive tyrosine nitration in human myocardial inflammation: evidence for the presence of peroxynitrite, *Critical care medicine* 25, 812-819.
473. Beckmann, J. S., Ye, Y. Z., Anderson, P. G., Chen, J., Accavitti, M. A., Tarpey, M. M., and White, C. R. (1994) Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry, *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 375, 81-88.
474. Ischiropoulos, H. (2003) Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration, *Biochem Biophys Res Commun* 305, 776-783.
475. Randall, L. M., Manta, B., Hugo, M., Gil, M., Batthyany, C., Trujillo, M., Poole, L. B., and Denicola, A. (2014) Nitration transforms a sensitive peroxiredoxin 2 into a more active and robust peroxidase, *The Journal of biological chemistry* 289, 15536-15543.
476. Randall, L. M., Dalla Rizza, J., Parsonage, D., Santos, J., Mehl, R. A., Lowther, W. T., Poole, L. B., and Denicola, A. (2019) Unraveling the effects of peroxiredoxin 2 nitration; role of C-terminal tyrosine 193, *Free radical biology & medicine* 141, 492-501.
477. Quijano, C., Castro, L., Peluffo, G., Valez, V., and Radi, R. (2007) Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H3404-3414.
478. Turko, I. V., Li, L., Aulak, K. S., Stuehr, D. J., Chang, J. Y., and Murad, F. (2003) Protein tyrosine nitration in the mitochondria from diabetic mouse heart. Implications to dysfunctional mitochondria in diabetes, *The Journal of biological chemistry* 278, 33972-33977.
479. Phillips, A. J., Littlejohn, J., Yewdall, N. A., Zhu, T., Valery, C., Pearce, F. G., Mitra, A. K., Radjainia, M., and Gerrard, J. A. (2014) Peroxiredoxin is a versatile self-assembling tecton for protein nanotechnology, *Biomacromolecules* 15, 1871-1881.
480. Yewdall, N. A., Peskin, A. V., Hampton, M. B., Goldstone, D. C., Pearce, F. G., and Gerrard, J. A. (2018) Quaternary structure influences the peroxidase activity of peroxiredoxin 3, *Biochem Biophys Res Commun* 497, 558-563.
481. Semenyuk, A., and Svergun, D. (1991) GNOM—a program package for small-angle scattering data processing, *Journal of Applied Crystallography* 24, 537-540.
482. Oliveira, C. L. P. (2011) Investigating macromolecular complexes in solution by small angle X-ray scattering, *Current trends in X-ray Crystallography*, 367-392.
483. Svergun, D., Barberato, C., and Koch, M. H. (1995) CRY SOL—a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates, *Journal of Applied Crystallography* 28, 768-773.
484. Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J., and Svergun, D. I. (2003) PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis, *Journal of Applied Crystallography* 36, 1277-1282.
485. Naviliat, M., Gualco, G., Cayota, A., and Radi, R. (2005) Protein 3-nitrotyrosine formation during *Trypanosoma cruzi* infection in mice, *Braz J Med Biol Res* 38, 1825-1834.
486. Cassina, P., Cassina, A., Pehar, M., Castellanos, R., Gandelman, M., de Leon, A., Robinson, K. M., Mason, R. P., Beckman, J. S., Barbeito, L., and Radi, R. (2008) Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 4115-4122.



487. Cox, A. G., Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2010) Measuring the redox state of cellular peroxiredoxins by immunoblotting, *Methods in enzymology* 474, 51-66.
488. Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H., and Svergun, D. I. (2003) PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis, *Journal of Applied Crystallography* 36, 1277-1282.
489. Peskin, A. V., Pace, P. E., and Winterbourn, C. C. (2019) Enhanced hyperoxidation of peroxiredoxin 2 and peroxiredoxin 3 in the presence of bicarbonate/CO<sub>2</sub>, *Free radical biology & medicine* 145, 1-7.
490. Ronchi, J. A., Francisco, A., Passos, L. A., Figueira, T. R., and Castilho, R. F. (2016) The Contribution of Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase to Peroxide Detoxification Is Dependent on the Respiratory State and Counterbalanced by Other Sources of NADPH in Liver Mitochondria, *The Journal of biological chemistry* 291, 20173-20187.
491. Valez, V., Cassina, A., Batinic-Haberle, I., Kalyanaraman, B., Ferrer-Sueta, G., and Radi, R. (2013) Peroxynitrite formation in nitric oxide-exposed submitochondrial particles: detection, oxidative damage and catalytic removal by Mn-porphyrins, *Archives of biochemistry and biophysics* 529, 45-54.
492. Mongkolsuk, S., Praituan, W., Loprasert, S., Fuangthong, M., and Chamnongpol, S. (1998) Identification and characterization of a new organic hydroperoxide resistance (ohr) gene with a novel pattern of oxidative stress regulation from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *J Bacteriol* 180, 2636-2643.
493. Si, M., Wang, J., Xiao, X., Guan, J., Zhang, Y., Ding, W., Chaudhry, M. T., Wang, Y., and Shen, X. (2015) Ohr Protects *Corynebacterium glutamicum* against Organic Hydroperoxide Induced Oxidative Stress, *PLoS One* 10, e0131634.
494. Parsonage, D., Karplus, P. A., and Poole, L. B. (2008) Substrate specificity and redox potential of AhpC, a bacterial peroxiredoxin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 8209-8214.