



Julio, 2021

Cinética de la reducción de peroxirredoxina 1 humana por tiorredoxinas diversas

Bach. Laura Corrales

Tesina de grado para acceder al título de Lic. en Bioquímica

Tutor: Gerardo Ferrer-Sueta
Laboratorio de Físicoquímica Biológica - IQB
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a mi tutor, Gerardo, por la oportunidad de realizar mi pasantía final de carrera, por todo lo que me ha enseñado, por su tiempo brindado, por la paciencia y el apoyo incondicional. A todos los integrantes del Laboratorio de Físicoquímica Biológica y Enzimología por brindar un ambiente de trabajo agradable día a día; en especial a Sebastián y Joaquín por haberme ayudado tanto con la expresión y purificación de proteínas recombinantes, y sobre todo por la paciencia que han tenido. También a mi familia y amigos por el apoyo de siempre, por incentivarme a seguir adelante, sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Por último, pero no menos importante, a “la banda de la entropía” (Clau y Fede, mis amigos de Facultad), quienes me han acompañado en los buenos momentos y me han contenido en los más difíciles.

Resumen

Las peroxirredoxinas (Prx) son una familia de peroxidases de amplio espectro, las cuales catalizan la reducción de diversos hidroperóxidos a expensas de tioles sin la necesidad de participación de cofactores (Perkins *et al.*, 2015). La hPrx1 ha demostrado ser una enzima que regula el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis (Sieńko *et al.*, 2019).

Los objetivos planteados para este trabajo fueron los que se detallan a continuación:

- Desarrollar una metodología que permita estudiar la cinética de reducción de la hPrx1 en su forma disulfuro, por las siguientes tiorredoxinas (Trx): Trx1 humana (hTrx1), Trx2 humana (hTrx2) y Trx1 de *Escherichia coli* (EcTrx1).
- Obtener la constante de velocidad de segundo orden de reducción de la hPrx1 por Trx.
- Hacer una comparación entre la velocidad de los diferentes procesos asociados al ciclo catalítico, para tratar de entender cuál es el limitante de la velocidad en diferentes condiciones de concentración de sustrato.

Fueron probados diversos protocolos, hasta llegar a uno que funcionó de manera más eficiente. Se siguió el cambio de fluorescencia en distintos cursos temporales, mediante *stopped flow*, para estudiar la cinética de reducción de hPrx1 en su forma disulfuro por las tiorredoxinas hTrx1, hTrx2 y EcTrx1. Finalmente se logró obtener la constante de velocidad de reducción de segundo orden de la hPrx1 por cada una de las Trx utilizadas.

Las constantes de velocidad obtenidas para la reducción de la hPrx1 fueron las siguientes:

- Por hTrx2: $4,3 - 4,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
- Por hTrx1: $1,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
- Por EcTrx1: $5,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Los valores obtenidos en este trabajo son un buen punto de partida, que permite sacar conclusiones de cuáles son los procesos limitantes del ciclo catalítico.

Es importante destacar que la reacción de reducción no ocurre en un único paso. A través del ensayo acoplado se evidencia que existe al menos un proceso adicional que podría ser limitante de la velocidad. De lo contrario, la reducción sería limitante de la velocidad en condiciones fisiológicas de Trx.

Índice

1. Introducción	8
1.1. Peroxirredoxinas	8
1.1.1. 2-Cys típicas o familia Prx1	14
1.2. Prx1 humana	18
1.2.1. Fisiología	18
1.2.2. Medicina	20
1.3. Procesos de reducción de Prx	23
1.4. Interacción Prx-Trx	24
1.4.1. Reacción y cinética	24
1.4.2. Proteínas y estructura	29
1.5. Procesos de reducción asociados con señalización redox	33
2. Objetivos	43
3. Materiales y métodos	44
3.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes	44
3.1.1. Expresión y purificación hPrx1	44
3.1.2. Expresión y purificación de hTrx2	45
3.1.3. Expresión y purificación de hTrx1	45
3.1.4. Expresión y purificación de EcTrx1	47
3.1.5. Expresión y purificación de EcTR	47
3.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	48
3.3. Cuantificación de proteínas	48
3.4. Cuantificación de peróxidos	48
3.5. Cuantificación de tioles	49
3.6. Oxidación del sitio catalítico de Prx a disulfuro	49
3.7. Reducción del sitio catalítico de Trx	49
3.8. Ensayos de cinética	50
3.8.1. Reducción de hPrx1 con hTrx2, hTrx1 y EcTrx1	50
3.8.2. Ensayo acoplado hPrx1-EcTrx1-EcTR	50
4. Resultados y discusión	51
4.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes	51
4.1.1. Tiorredoxina 1 humana	51
4.1.2. Tiorredoxina reductasa de <i>E. coli</i>	52

4.2. Ensayos de cinética	56
4.2.1. <i>Búsqueda de metodología para estudiar la reacción de reducción de hPrx1 con hTrx2, hTrx1 y EcTrx1</i>	56
4.2.2. <i>Conclusión de los abordajes propuestos</i>	65
4.2.3. <i>Ajuste de los cursos temporales</i>	65
4.2.4. <i>Determinación de parámetros cinéticos de la reducción de hPrx1</i>	66
Tiorredoxina 2 humana	66
Tiorredoxina 1 humana	69
Tiorredoxina 1 de <i>E. coli</i>	73
4.2.5. <i>Ensayo acoplado hPrx1-EcTrx1-EcTR</i>	76
4.2.6. <i>Posibles motivos de la dispersión en los resultados experimentales</i>	80
5. Conclusiones	82
6. Bibliografía	83

Listado de abreviaturas

AhpR	Complejo alquil hidroperóxido reductasa
C_P	Cisteína peroxidática
C_R	Cisteína resolutive
D.O.	Densidad óptica
DTDPy	Ditiopiridina
dtpa	Pentaacetato de dietilentriamina
DTT	Ditiotreitol
ER	Retículo endoplásmico
FF	Conformación “fully folded” (completamente plegada)
FNU	Fracción no unida
Gpx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
IMAC	Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
LB	Caldo de Lisogenia
LU	Conformación “locally unfolded” (localmente desplegada)
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
O.N.	Toda la noche
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonil
Prx	Peroxirredoxina
RBP	Proteína de unión a ARN
S⁻	Tiolato
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SEC	Cromatografía de exclusión molecular
SH	Tiol
SOH	Ácido sulfénico

SO₂H	Ácido sulfínico
Srx	Sulfirredoxinas
TR	Tiorredoxina reductasa
Trx	Tiorredoxina
TXN	Triparredoxina
TXNPx	Peroxidasa de triparredoxina

1. Introducción

1.1. Peroxirredoxinas

Las Prx son una familia de peroxidases de amplio espectro. Son un grupo de proteínas que contienen tiol, y son capaces de catalizar la reducción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), hidroperóxidos orgánicos y ácido peroxinitroso, con electrones proporcionados por un tiol fisiológico, generalmente Trx, por un mecanismo de reacción bisustrática de tipo ping-pong. Existen seis Prx en mamíferos (Trujillo *et al.*, 2007) (Matsumura *et al.*, 2008). Implican cambios en su estructura cuaternaria para la regulación de su actividad (Morais *et al.*, 2015).

Se han conservado a lo largo de la evolución, expresándose en arqueas, bacterias y organismos eucariotas (Copley *et al.*, 2004) (Hall *et al.*, 2009). Las Prx participan en vías de señalización mediante la modulación de los niveles de H₂O₂ inducidos por factores de crecimiento (Morgan & Veal, 2007), y cascadas de señalización involucradas en proliferación celular (Chang *et al.*, 2002), diferenciación (Butterfield, *et al.*, 1999) y apoptosis (Zhou *et al.*, 2000). Pueden ser reguladas mediante fosforilación, cambios en los estados redox y posiblemente de oligomerización (Wood *et al.*, 2003).

Fueron descubiertas alrededor de los años '70 por Harris y colaboradores, descritas como un complejo molecular en forma de anillo, ubicado en la membrana de los eritrocitos humanos (Harris, 1969) (Flohé & Ursini, 2008). En 1988 se reportó por primera vez el aislamiento y purificación de una proteína citosólica de aproximadamente 27 kDa de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual fue llamada TSA: *thiol-specific antioxidant protein*, capaz de proteger a la glutamina sintetasa de la inactivación por especies reactivas del oxígeno (K. Kim *et al.*, 1988). Se utilizó un sistema oxidante constituido por Fe³⁺, O₂ y ditioneitol (DTT) para evaluar la capacidad reductora de esta proteína (K. Kim *et al.*, 1988). En los últimos 25 años se han estudiado los aspectos bioquímicos, biológicos y biomédicos. Se consideran actualmente, como una familia ampliamente distribuida, que ha evolucionado de una proteína ancestral con plegamiento tipo Trx. Muestran altos niveles de expresión y presentan reacciones

extremadamente rápidas con la mayoría de los hidroperóxidos, con constantes de velocidad en el rango de $10^4 - 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Zeida *et al.*, 2019); mientras que en el caso de la cisteína libre, la constante de velocidad de segundo orden es de $0,84 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7 (Tairum *et al.*, 2012) (Portillo-Ledesma *et al.*, 2014).

Hasta mediados de los años 2000, la estimación de la constante de velocidad de segundo orden para la reacción de Prx con H_2O_2 se basaba en seguir la cadena de las siguientes reacciones: oxidación de la Prx por H_2O_2 , reducción de la Prx por Trx, reducción de Trx por tiorredoxina reductasa (TR) y oxidación de NADPH por TR. Por lo tanto, la actividad medida reflejaba la velocidad de la reacción más lenta del sistema en lugar de la velocidad neta de reacción de la Prx con H_2O_2 . Medir la velocidad de reacción directa fue un desafío, dado que la Prx purificada después de la reducción volvía a la forma oxidada demasiado rápido, apenas se eliminaba el reductor. Al parecer, los rastros de H_2O_2 presentes en los buffers eran los responsables de que esto ocurriera (Peskin *et al.*, 2007). Luego de investigar e identificar el problema, se aplicó la metodología apropiada para permitir manipulaciones con la Prx reducida purificada en ausencia de reductores. La constante de velocidad de segundo orden para la reacción directa de la Prx con H_2O_2 resultó mucho mayor. Estos resultados, ubican a las Prx entre las enzimas más rápidas (Peskin & Winterbourn, 2021).

Las Prx son un componente fundamental de la señalización redox celular, principalmente en respuesta a alteraciones en la producción de H_2O_2 (Ledgerwood *et al.*, 2017). El mecanismo de señalización redox de H_2O_2 , implica la reacción inicial de H_2O_2 con residuos de cisteína. Los más reactivos y abundantes serán los blancos preferenciales. En ese sentido, con los datos cinéticos disponibles en la actualidad, Prx y selenocisteína-glutatión peroxidasas (GPxs) emergen como los objetivos preferenciales (Randall *et al.*, 2013). Su sensibilidad a oxidación por H_2O_2 las convierte en enzimas clave de detección de H_2O_2 dentro de las células (Ledgerwood *et al.*, 2017). Considerando la velocidad de reacción de Prx con H_2O_2 y su abundancia celular ($15 - 60 \mu\text{M}$), la modificación oxidativa inducida por H_2O_2 de las proteínas de señalización de mamíferos puede ocurrir a través de un proceso indirecto, comenzando con las Prx como receptoras de H_2O_2 que transforman al oxidante peróxido a un oxidante disulfuro que afectan las respuestas de las señales. Las interacciones

adicionales de las Prx oxidadas con otras proteínas son esenciales y determinantes para la transducción de la señal. Estudios recientes han informado de la interacción de las Prx con quinasas y fosfatasa de tirosinas proteicas (Randall *et al.*, 2013).

Las Prx comparten un plegamiento tipo Trx (Cao & Lindsay, 2017). Su estructura primaria característica presenta un residuo de cisteína conservada indispensable llamada cisteína peroxidática (C_P), la cual es esencial para su actividad catalítica. La alta reactividad de la C_P de las Prx, se debe al entorno proteico catiónico particular del sitio activo, que estabiliza el estado de transición y también el grupo saliente aniónico de manera concertada (Randall *et al.*, 2013). La existencia de un sitio de unión a aniones en la vecindad de la cisteína reactiva de las proteínas, proporciona una aceleración inespecífica para la reducción de hidroperóxidos en general, por estabilización del grupo saliente, y que esta mejora de la reacción puede volverse específica en el caso de peróxidos más grandes que tienen grupos funcionales adecuados para interacciones adicionales con la superficie de la proteína. La simetría molecular del H_2O_2 puede tener un papel en las reacciones cuya velocidad está limitada por la difusión, ya que cada ataque del tiolato sobre cualquier oxígeno da como resultado el mismo estado de transición y productos. Para cualquier otro peróxido, el ataque al oxígeno distal generalmente conduce al mejor grupo saliente y minimiza el impedimento estérico (Ferrer-Sueta *et al.*, 2011).

Además de detectar la señal redox, las Prx tienen un papel importante en la transducción de esta señal a proteínas de señalización ulteriores, contribuyendo en última instancia a la regulación de diversos procesos celulares, incluida la proliferación, diferenciación y apoptosis (Ledgerwood *et al.*, 2017). Las Prx bacterianas parecen ser necesarias sólo para proteger las células contra el efecto dañino del H_2O_2 (Ding *et al.*, 2017). Sin embargo, los análisis de competencia cinética han pronosticado que las Prx eucariotas son responsables de la reducción de la mayoría del H_2O_2 mitocondrial y citoplásmico así como del ácido peroxinitroso. Se considera que tienen un papel clave en la protección al estrés oxidativo en las células, participan en la regulación del ciclo circadiano, son importantes en la inmunidad innata y en procesos inflamatorios actuando

como patrones moleculares asociados a patógenos y patrones moleculares asociados al daño, entre otros (Zeida *et al.*, 2019).

Las Prx se clasifican con base en la presencia o ausencia y la respectiva ubicación de un segundo residuo catalítico llamado cisteína resolutive o C_R, que forma un puente disulfuro con la C_P recientemente oxidada. Las Prx de 1-Cys no contienen C_R en su secuencia, por lo que el ácido sulfénico de la C_P debe resolverse por interacción con otros reductores, como ácido ascórbico o glutatión (GSH) (Manevich *et al.*, 2004), (Monteiro *et al.*, 2007). El ascorbato puede reducir al ácido sulfénico en las Prx de 1-Cys de la familia Prx6 y en otras enzimas (Anschau *et al.*, 2020). Se ha estudiado la reducción directa de ácidos sulfénicos en gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) por DTT y ascorbato, así como también la reducción del ácido sulfénico de la papaína por el ascorbato (You *et al.*, 1975) (Zito *et al.*, 2012). La reducción de ácidos sulfénicos por ascorbato se reveló *in vivo* en una investigación a escala proteómica, empleando ratones que son defectuosos en la reoxidación de la proteína disulfuro isomerasa (PDI). Recientemente, se ha estudiado cuantitativamente la reducción de ácidos sulfénicos proteicos por ascorbato. Se observó que, en la mayoría de los casos, las constantes de velocidad se encuentran en el rango de 0,4 - 2,2 × 10³ M⁻¹s⁻¹, lo que indica que la reducción de los ácidos sulfénicos proteicos es relevante en los compartimentos biológicos donde la concentración de ascorbato es alta (Anschau *et al.*, 2020).

Las Prx que presentan C_R se dividen en dos grupos: Prx de 2-Cys atípicas (C_R y C_P están en la misma subunidad) y 2-Cys típicas (C_R y C_P se encuentran en una unidad adyacente dentro del oligómero) (Zeida *et al.*, 2019).

Otro criterio de clasificación fue propuesto mediante un análisis bioinformático por alineamiento de secuencias, utilizando información estructural (K. J. Nelson *et al.*, 2011), y teniendo en cuenta aspectos bioquímicos. Se determinó la existencia de 6 subfamilias distinguidas por motivos estructurales y propiedades (Hall *et al.*, 2011): Prx1, Prx6, Prx5, Tpx, PrxQ (BCP) y AhpE. En humanos se expresan 6 isoformas: Prx1, Prx2, Prx3, Prx4 (agrupadas dentro de la subfamilia Prx1), Prx5 y Prx6 (pertenecientes cada una a su subfamilia homónima) (Perkins *et al.*, 2015).

El ciclo catalítico se puede dividir en tres pasos:

1. Reducción de hidropéroxido a través de la oxidación de la C_P -SH a ácido sulfénico (C_P -SOH) (Randall *et al.*, 2019). Este primer paso ocurre rápidamente; por ejemplo, para el caso de Prx2 humana presenta una constante de velocidad de $10^7 - 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Peskin *et al.*, 2007) (Manta *et al.*, 2009). Sin embargo, la velocidad de reacción de H_2O_2 con tioles de bajo peso molecular es más de un millón de veces menor (Winterbourn & Metodiewa, 1999).
2. Resolución: en las Prx de 2-Cys involucra la condensación del ácido sulfénico con C_R -SH. En las típicas implica formar un disulfuro entre ambas subunidades.
3. Reducción del disulfuro: el disulfuro formado sobre la C_P es reducido por una Trx u otra proteína que presente un dominio Trx (Fig. 1 A). Se recupera el estado redox de tiol o tiolato en la C_P (Randall *et al.*, 2019).

En este trabajo, se destacó el interés por analizar la reacción número 3 del ciclo. A lo largo del ciclo catalítico, todas las Prx sufren cambios estructurales a nivel de su sitio activo, presentando dos conformaciones llamadas “FF - fully folded” (completamente plegada) y “LU - locally unfolded” (localmente desplegada) (Schröder *et al.*, 2000) (Hirotzu *et al.*, 2014) (Fig. 1 B). En la conformación FF, la C_P está rodeada de los residuos que son parte del sitio activo, y se ubica en el fondo de un bolsillo de la estructura (Hall *et al.*, 2011). La C_P y la C_R se encuentran alejadas entre sí (14 \AA), por lo tanto, se necesita que cambie la estructura para formar un disulfuro entre ambos residuos. Dicho cambio produce la conformación LU, debido a la formación de ácido sulfénico en C_P a raíz de la reducción por parte de una molécula de H_2O_2 (Hall *et al.*, 2011) (Perkins *et al.*, 2016). Ambas conformaciones se encontrarían en un equilibrio dinámico cuando C_P está presente en forma de tiolato, sin embargo, la formación del disulfuro bloquea la configuración de la proteína en su conformación LU (Perkins *et al.*, 2015). Este cambio conformacional favorece la disociación de decámeros en dímeros (Morais *et al.*, 2015).

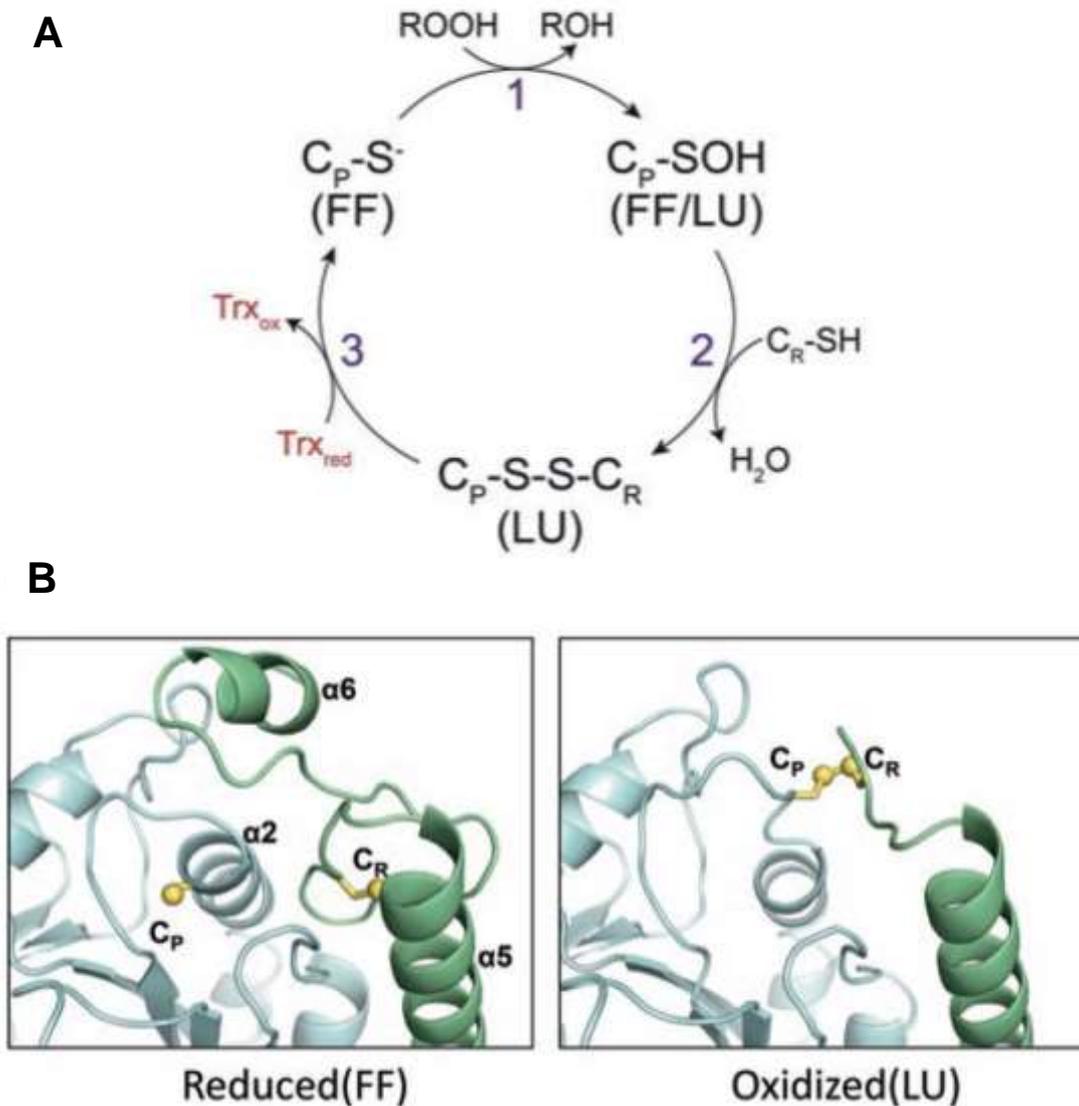


Figura 1 - (A) Representación esquemática del ciclo catalítico de Prx de 2-Cys típicas: 1- peroxidación (la cisteína peroxidática (C_P-S^\bullet) reduce el peróxido), 2- resolución (la cisteína resolutive (C_R-SH) reacciona con la C_P sulfenilada para formar un enlace disulfuro entre cadenas), 3- reducción (la tiorredoxina reducida (Trx_{red}) se oxida dando como resultado la regeneración de C_P). **(B) Estructura del sitio activo en PrxIV reducido y oxidado** (Modificado de Cao & Lindsay, 2017).

En estudios recientes, se ha investigado de manera experimental y computacionalmente la enzima EcTPx, la cual es una Prx bacteriana que presenta plegamiento tipo Trx. La proteína se analizó en condiciones de oxidación y reducción. Aunque la enzima se había descrito previamente como un dímero, los resultados reportados mostraron que, cerca de las condiciones fisiológicas y en ambos estados redox, se comporta como un monómero. Los resultados computacionales permitieron estudiar el proceso de replegamiento

LU→FF, pero la transición FF→LU no se observó como tal. Esto concuerda con los resultados experimentales obtenidos que indicaron que en equilibrio bajo condiciones reductoras se observa una estabilización de la conformación FF, respecto a la conformación LU, en solución acuosa. Se observaron previamente comportamientos similares para la TPx de 2-Cys atípica de *Helicobacter pylori* y PrxQ B de 2-Cys atípica de *Mycobacterium tuberculosis*. Los resultados de dicha investigación sugieren que las especies de tiolato de la C_P estabilizan las conformaciones FF. Sin embargo, a partir de la conformación LU, la forma tiolato de los residuos Cys puede establecer interacciones iónicas que estabilizan las conformaciones LU. Por otro lado, cuando se protonaron los residuos de Cys, se produjo la transición de LU a FF. Los estados protonados podrían favorecer la transición LU→FF, mientras que la desprotonación podría estabilizar la conformación existente. Se piensa que el intercambio conformacional entre los subestados FF y LU del estado nativo puede convertirse en un límite de velocidad y es un paso clave en el mecanismo catalítico de Prx independientemente de la ubicación de los residuos de Cys: (i) mismo elemento de estructura secundaria, (ii) elemento de estructura secundaria diferente pero ubicado en la misma subunidad de proteína, o (iii) residuos de Cys ubicados en subunidades diferentes (Vazquez *et al.*, 2020).

1.1.1. 2-Cys típicas o familia Prx1

Las Prx de 2-Cys típicas se identifican por la conservación de sus dos cisteínas activas redox (Wood *et al.*, 2003), la C_P y la C_R (residuos 52 y 173 respectivamente en Prx1 de rata, Fig. 2 A y B). El tiol C_P tiene un pKa bajo y, por tanto, se desprotona a pH fisiológico. El tiolato (C_PS⁻) reacciona con el H₂O₂ para formar un ácido sulfénico (C_PSOH), que se condensa con C_RSH en el otro monómero para formar un enlace disulfuro (Fig. 2 B) (Ledgerwood *et al.*, 2017).

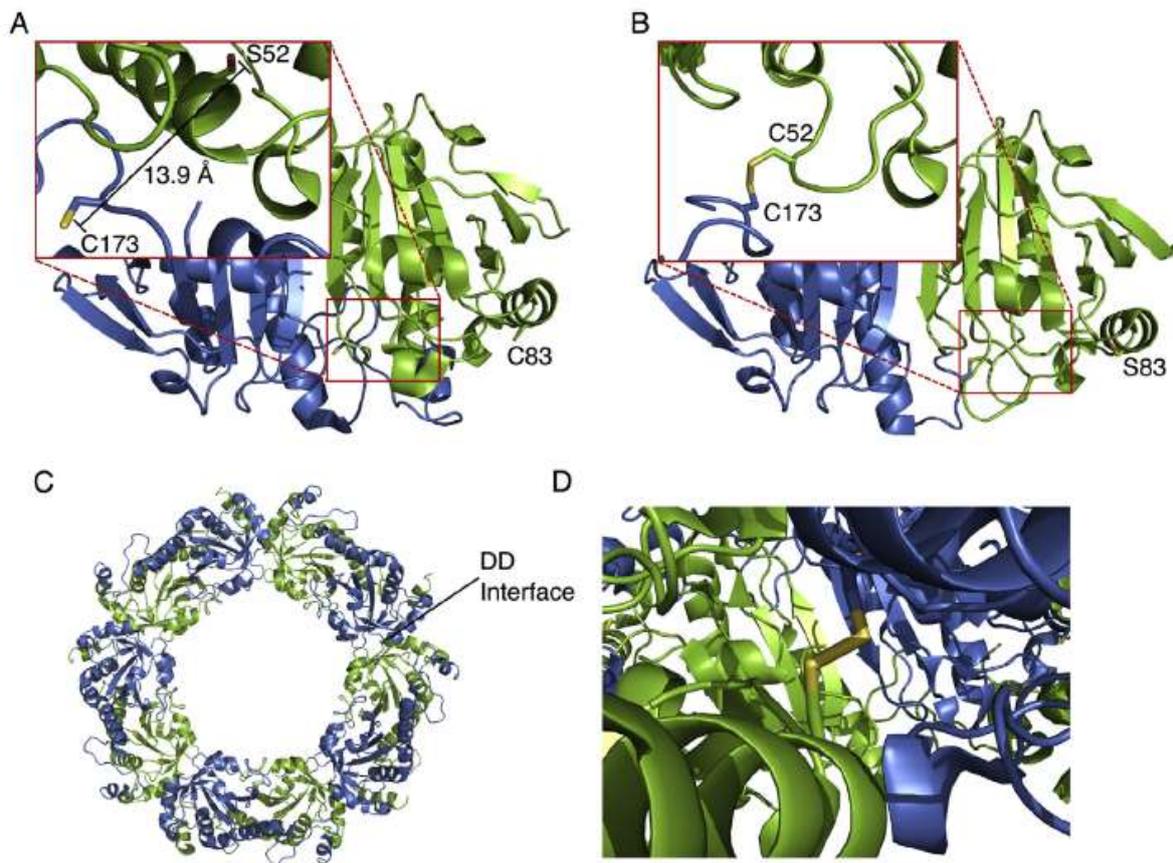


Figura 2 - Características estructurales de Prx1 de rata (Tomado de Ledgerwood *et al.*, 2017). DD interface: enlace disulfuro en la interfaz dímero-dímero.

Son enzimas que se expresan en todos los reinos (Morais *et al.*, 2015). En eucariotas, abundan en varios compartimientos como el citosol, mitocondrias y retículo endoplásmico (ER) (Cox *et al.*, 2009), así como también en cloroplastos (Morais *et al.*, 2015). Los integrantes de la familia Prx1 son homodímeros obligados, presentan dos sitios activos idénticos ubicados en lados opuestos de la interfaz del dímero. En la mayoría de los casos, los homodímeros Prx1 pueden asociarse de manera no covalente en forma de anillos que generalmente son dodecaméricos (Morais *et al.*, 2015). La C_P se oxida por hidroperóxidos para formar ácido sulfénico, el cual condensa con la C_R de una Prx adyacente, formando un dímero cabeza-cola que puede ser reducido por una Trx (Cox *et al.*, 2009). El estado redox de la C_P es el factor de regulación de la oligomerización mejor caracterizado (Morais *et al.*, 2015). La Trx, o una proteína análoga, rompe el enlace disulfuro y restaura la C_P a su estado original (reducido/tiolato) listo para

comenzar otro ciclo de catálisis (Al-Asadi *et al.*, 2019). Además, el ácido sulfénico intermediario puede ser hiperoxidado formando ácido sulfínico, el cual es catalíticamente inactivo. Se ha propuesto que este cambio tiene una función importante en estas proteínas y las hace funcionar como sensores redox que controlan la respuesta celular al estrés oxidativo (Cox *et al.*, 2009). Todas las enzimas Prx poseen una tríada catalítica compuesta por la C_P, una treonina (o una serina) y una arginina. Los residuos C_P y Thr (o Ser) son parte del motivo conservado Pro-XX-X-Thr(Ser)-X-X-C_P, mientras que la Arg completamente conservada se localiza lejos en la estructura primaria de la Prx. Se propuso que estos residuos estabilizarían la cadena lateral de la C_P en la forma de tiolato (C_P-S⁻) a pH fisiológico (Tairum *et al.*, 2012). También se ha demostrado que la Arg conservada es fundamental para la rápida reducción de H₂O₂ por las Prx 2 y 3 humanas y, probablemente, para la estructuración del sitio activo (Portillo-Ledesma *et al.*, 2014).

Se ha reportado que las formas reducidas o hiperoxidadas de la enzima favorecen el estado decamérico, mientras que las formas unidas por disulfuro existen predominantemente como dímeros. Los factores que promueven la oligomerización en las Prx de 2-Cys típicas incluyen concentraciones iónicas altas o bajas, pH bajo, altas concentraciones de magnesio o calcio. Según un estudio cristalográfico, la Prx1 se dispone en forma de pentámeros de dímeros, resultando en un decámero (Wood *et al.*, 2003). Se ha propuesto que la decamerización inducida por el pH puede tener un doble efecto dependiendo del estado redox. Por otro lado, al estabilizar los decámeros oxidados (SS), podría dificultar el paso de reducción, disminuyendo la velocidad de conversión de formas disulfuro a tiol. Un paso de reducción ineficiente se ha asociado con una frecuencia más baja de hiperoxidación de la C_P (Morais *et al.*, 2015).

Se ha estudiado que la inactivación de las proteínas Prx1 permitiría que el H₂O₂ se acumulara para actuar como una molécula de señalización celular, esto constituye el modelo de “*floodgate*” (modelo de compuerta) que se explicará más adelante. Las enzimas sulfirredoxinas (Srx) pueden restaurar la forma hiperoxidada/inactivada de las proteínas Prx a la forma reducida/activa, pero este proceso es relativamente lento. Por lo tanto, habría tiempo para que el H₂O₂ se acumulara y tuviera sus efectos. En general, las Prx1 eucariotas son

"sensibles" a la hiperoxidación, mientras que las procariotas son "robustas". Las Prx1 eucariotas presentan motivos -GG(L/I/V)G- e -Y(F/L)- conservados que pueden explicar su sensibilidad, ya que las procariotas no los poseen, pero hay excepciones (Al-Asadi *et al.*, 2019). En las células eucariotas, la exposición a altos niveles de H₂O₂ puede desencadenar variaciones del pH intracelular, lo que sugiere que los cambios de pH podrían actuar de manera cooperativa con H₂O₂ y otros factores moduladores de la oligomerización para regular la estructura y función de las Prx de 2-Cys típicas en respuesta al estrés oxidativo (Morais *et al.*, 2015).

Las Prx de 2-Cys tienen funciones duales en la modulación de las concentraciones de hidroperóxidos. Además de su función peroxidasa, se ha evidenciado la presencia de actividad chaperona. Se encargan de la prevención de la agregación de proteínas, la cual puede desempeñar un papel fundamental en la respuesta celular a los patógenos y al estrés (J. H. Kim *et al.*, 2012). Los dímeros no covalentes de Prx, los cuales se organizan en estructuras regulares en forma de rosquilla (decámeros, o dodecámeros), pueden "refugiar" a otras proteínas para protegerlas de la inactivación y agregación. La formación de disulfuros en los dímeros de Prx disminuye la estabilidad de estas "rosquillas", mientras que la hiperoxidación las hace más estables. Por lo tanto, las Prx pueden realizar la función de chaperonas en sus estados reducido e hiperoxidado. Esta actividad, puede proteger a las proteínas contra la inactivación/agregación, así como también ayudar a restaurar las proteínas mal plegadas. Cuando una Prx hiperoxidada se asocia con Hsp70 forma complejos con proteínas mal plegadas con el posterior reclutamiento de Hsp104. Luego, la Srx se une al complejo y después de la reducción del ácido sulfínico, el complejo se disocia liberando la proteína nativa restaurada (Peskin & Winterbourn, 2021). La función chaperona de las Prx de 2-Cys ya se ha determinado en bacterias (Chuang *et al.*, 2006), levaduras (Jang *et al.*, 2004) y células de mamíferos (Yang *et al.*, 2002) y posteriormente se ha reportado a partir de reino vegetal (Tripathi *et al.*, 2009). Las funciones duales de las Prx de 2-Cys están asociadas a cambios dinámicos reversibles en su estructura cuaternaria y también dependen de la oxidación de la C_P, fosforilación, estrés oxidativo y/o térmico, irradiación, etc., que inducen un cambio estructural en las Prx. Se cree que las

Prx de 2-Cys evolucionaron como proteínas multifuncionales que cambian entre una función de peroxidasa de alta afinidad pero con bajo recambio y una función de chaperona de baja afinidad pero con alto recambio (E. M. Lee *et al.*, 2015).

1.2. Prx1 humana

1.2.1. Fisiología

La Prx1 humana (hPrx1) forma parte de la familia de peroxirredoxinas de 2-Cys (Kim *et al.*, 2019). Su concentración presente en el citosol se estima de aproximadamente 15 - 60 μM (Park *et al.*, 2011) (Selvaggio *et al.*, 2018). La hPrx1 funciona como un homodímero de cabeza a cola. Cada homodímero activo tiene la capacidad de formar dos enlaces disulfuro y reducir 2 moléculas de H_2O_2 . Luego, el disulfuro se reduce en una reacción de intercambio de disulfuro catalizada por Trx. La hPrx1 reducida existe en equilibrio entre los estados FF y LU (Fig. 2 A y B). La hPrx1 forma decámeros (Fig. 2 C) *in vitro* e *in vivo* y se ha reportado que el equilibrio entre el decámero y el dímero está influenciado por la concentración de proteína, la fuerza iónica, el estado redox, entre otros factores. Se considera que existe principalmente como decámero *in vivo*. En general, el equilibrio se desplaza hacia el estado decamérico en condiciones reducidas e hiperoxidadas (en otras Prx), mientras que la oxidación favorece la forma dimérica. La hPrx1 presenta un tercer residuo de cisteína (Cys83) que no participa en la actividad y se conserva en la mayoría de las proteínas homólogas de vertebrados. Se encuentra en la interfaz dímero-dímero del decámero (Fig. 2 D) (Ledgerwood *et al.*, 2017).

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) es una técnica muy útil para investigar procesos de autoasociación de complejos de proteínas. Se llevaron a cabo experimentos de dilución ITC para investigar procesos de disociación como las transiciones dímero-monómero u oligómero-monómero o el ensamblaje de micelas con antibióticos o proteínas. Este ensayo fue realizado en hPrx1 y otras Prx de 2-Cys. El punto medio de oligomerización o CTC (concentración de transición crítica) define el punto de transición en el que la mitad de los decámeros inyectados se disocian. Se cree que existe un proceso crítico de

nucleación, debido al comportamiento termodinámico en la concentración de transición. Se ha reportado que hay una disociación rápida tras la inyección, seguida de una reasociación más pequeña. Según los resultados de este experimento, el CTC para hPrx1 fue de 1,3 μM con un valor de ensamblaje de entalpía de 156 kcal/mol de dímero. Entre las Prx estudiadas, existe una similitud de los valores de CTC, la cual revela un grado significativo de conservación de este mecanismo entre las especies, y esto hace pensar que la oligomerización es una propiedad típica de las Prx de 2-Cys. La similitud de las CTC a pesar de la divergencia de la interfaz sugiere que la transición dímero-decámero es esencial para la función de las Prx de 2-Cys o que una restricción funcional conservó la transición dímero-decámero con CTC muy similares a pesar de la variación de secuencia emergente durante la evolución (Barranco-Medina *et al.*, 2008).

La hPrx1 participa en la detección de H_2O_2 y media la señalización redox a través de la interacción con otras proteínas (E. K. Kim *et al.*, 2019). En comparación con otras enzimas reductoras, la hPrx1 emplea un mecanismo particular para reducir el H_2O_2 con equivalentes reductores proporcionados a través del sistema de Trx pero no a partir de glutarredoxina (Zhang *et al.*, 2009). La hPrx1 coopera con la Trx en la supresión de la muerte celular inducida por H_2O_2 que involucra diferentes tipos de quinasas y enzimas, como la quinasa reguladora de la señal de apoptosis 1 (ASK1) y p66Shc que desempeñan papeles clave en la regulación de la muerte celular y/o la apoptosis según el tipo celular y los estímulos (S. Y. Kim *et al.*, 2008) (Gertz *et al.*, 2009).

En el núcleo, la hPrx1 oligomérica se asocia directamente con p53 o factores de transcripción como c-Myc, NF- κ B y AR, y por lo tanto afecta sus bioactividades tras la regulación génica, que a su vez induce o suprime la muerte celular. Además, la hPrx1 en el citoplasma tiene potencial antiapoptótico a través de interacciones directas o indirectas por regulación redox, como es el caso de ASK1, p66Shc, GSTpi/JNK y c-Abl quinasa (Ding *et al.*, 2017).

1.2.2. Medicina

Además de los roles conocidos de la hPrx1 en la detección y señalización de H₂O₂, se ha reportado que la hPrx1 se une a los ARN y demuestra la actividad de chaperona de ARN *in vitro*. Esta función de la hPrx1 como una proteína de unión a ARN (RBP) fue respaldado por tres estudios en los que la hPrx1 se identificó como una candidata RBP a través de análisis exhaustivos del interactoma de ARNm en células HeLa, células HEK293 y células embrionarias. Las RBP regulan las moléculas de ARN a través del procesamiento, empalme, estabilidad, localización, traducción y degradación del ARN. La desregulación de las RBP se ha implicado en diversas enfermedades, que van desde trastornos neurológicos hasta cáncer. Se ha demostrado que la capacidad de unión al ARN de la hPrx1 es suprimida por estrés oxidativo, el cual está mediado por residuos de Cys redox-activos en el extremo N-terminal (E. K. Kim *et al.*, 2019).

Las vías de señalización reguladas por la hPrx1 juegan un papel importante en la progresión y metástasis de los tumores humanos, especialmente en los cánceres de mama, esófago y pulmón (Ding *et al.*, 2017). El cáncer de ovario es la quinta causa principal de muerte por cáncer en mujeres en países desarrollados (Sieńko *et al.*, 2019), mientras que en Uruguay se ubica en el séptimo lugar en cuanto a incidencia y en el sexto lugar en mortalidad dentro de los tumores que se diagnostican en el país, ocasionando alrededor de 140 muertes anuales (La República, 2016) (La Diaria, 2018) (Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer, 2019). En general, el tratamiento se realiza comenzando con una cirugía seguida de una quimioterapia basada en una combinación de platino y taxanos (Elattar *et al.*, 2011). El riesgo de complicaciones graves a menudo limita la cirugía óptima (Oseledchyk *et al.*, 2016) (Kebapci *et al.*, 2017), mientras que la resistencia a los medicamentos y la toxicidad son los obstáculos más importantes para una quimioterapia efectiva (Pinato *et al.*, 2013) (Koo & Lim, 2015). Esos problemas probablemente podrían superarse al menos en parte, mediante la selección de regímenes de tratamiento apropiados que dependan de factores pronósticos/predictivos. Muy pocos biomarcadores influyen en la selección de tratamientos específicos en el cáncer de ovario (Ledermann *et al.*, 2014). La hPrx1 puede actuar como un oncogén y

suprimir la muerte de las células tumorales al asociarse directamente con factores de transcripción, como el factor nuclear kappa B (NF- κ B) y el receptor de andrógenos (AR). La hPrx1 se sobreexpresa en muchos tumores malignos humanos, incluidos los carcinomas de pulmón, mama, urinario, esofágico, hepatocelular y endometrial. La alta expresión de la hPrx1 en el cáncer de mama humano se asocia con un mayor grado tumoral y un mayor riesgo de recurrencia local después de la radioterapia. Sin embargo, los estudios de biomarcadores han demostrado que la hPrx1 protege a los receptores de estrógenos (ER α) de la supresión inducida por el estrés oxidativo y es un marcador proteico de pronóstico favorable en los tumores mamarios. Al igual que en el cáncer de mama, el papel de la hPrx1 en el cáncer de esófago es promover la tumorigénesis al funcionar como un "cómplice" de ciertas oncoproteínas o mediante la activación de su enzima reductora. Cuando se ha estudiado la hPrx1 en pacientes con cáncer de ovario, los resultados mostraron que la expresión de la hPrx1 en tejidos tumorales puede ser otro biomarcador de pronóstico (Sieńko *et al.*, 2019).

La terapia de privación de andrógenos (TDA) es utilizada como tratamiento para pacientes diagnosticados con cáncer de próstata metastásico. El receptor de andrógenos es un factor de transcripción dependiente de ligando. La señalización del receptor de andrógenos (AR) desempeña un papel fundamental en el desarrollo y la progresión del cáncer de próstata. Se ha reportado que la hPrx1 interactúa físicamente con AR para mejorar la transactivación del receptor de andrógenos de genes diana. Se evaluó la importancia biológica de la hPrx1 en la modulación del crecimiento estimulado por dihidrotestosterona (DHT) y la expresión génica de AR diana de las células de cáncer de próstata, así como también el mecanismo por el cual la hPrx1 podría potenciar la señalización de AR. Se observó que un nivel bajo de hPrx1 desensibiliza las células a la estimulación del crecimiento y la inducción del gen diana de AR por DHT, de modo que se requiere la exposición a un nivel más alto de DHT para alcanzar la misma magnitud de respuesta cuando se deprime la hPrx1. La hPrx1 aumenta la afinidad de AR a DHT y disminuye la velocidad de disociación de DHT del receptor ocupado. La hPrx1 mejora la interacción de los extremos amino terminal y carboxilo terminal de AR; una interacción N-C más fuerte es

consistente con una señal de activación AR más robusta al mantener la DHT apretada en el bolsillo de unión al ligando. Los efectos estimulantes de la hPrx1 sobre la afinidad de unión al ligando AR y la interacción AR N-C se manifiestan independientemente de un AR de tipo salvaje o mutante. Se cree que la hPrx1 puede ser un objetivo terapéutico en el bloqueo de la transición del cáncer de próstata de un fenotipo dependiente de andrógenos a un refractario a andrógenos (Chhipa *et al.*, 2009).

La transición epitelial a mesenquimatosas (EMT) es un evento morfológico caracterizado por la pérdida de características epiteliales y la adquisición de características mesenquimatosas; inducida por el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). Es un evento importante que permite que las células cancerosas obtengan características invasivas y metastásicas (Ha *et al.*, 2012). La EMT se caracteriza por la disolución de la unión célula-célula, el reordenamiento del citoesqueleto, el aumento de la motilidad celular y la síntesis de matriz extracelular (Lee *et al.*, 2006). El proceso de EMT está estrechamente regulado por las moléculas de señalización e implica la regulación negativa de los marcadores epiteliales, como E-cadherina y zonula occludens-1, y la regulación positiva de los marcadores mesenquimales, como fibronectina, N-cadherina y vimentina. Se ha investigado el efecto regulador de la hPrx1 durante la EMT inducida por TGF- $\beta 1$ en células de adenocarcinoma de pulmón A₅₄₉. Se ha observado que los niveles altos de hPrx1 regulan negativamente la expresión de E-cadherina, y los niveles bajos de hPrx1 aumentan la expresión de E-cadherina, lo que sugiere que el nivel de hPrx1 puede estar correlacionado con EMT. La eliminación de la hPrx1 inhibió significativamente la EMT inducida por TGF- $\beta 1$ y la migración celular, mientras que la sobreexpresión de la hPrx1 mejoró la EMT inducida por TGF- $\beta 1$ y la migración celular. La regulación de la hPrx1 es determinante para mantener el fenotipo epitelial de las células y, por lo tanto, la hPrx1 actúa como una inductora de EMT. A diferencia de la hPrx1 de tipo salvaje, una mutante de la hPrx1 inactiva con peroxidasa (hPrx1-C₅₁S) dio como resultado una expresión aumentada de E-cadherina. Además, la hPrx1 regula la expresión de dos represores transcripcionales de E-cadherina, Snail y Slug. La hPrx1 puede regular la transcripción del gen Snail y Slug para inducir la EMT por un mecanismo desconocido. La regulación de la inducción de EMT por

la hPrx1 puede ser un objetivo potencial para las estrategias terapéuticas dirigidas contra la metástasis del cáncer (Ha *et al.*, 2012). También se investigó la expresión de la hPrx1 en el cáncer gástrico, junto con la evaluación de su importancia clínico-patológica y pronóstica. La alta expresión de la hPrx1 se correlacionó positivamente con la invasión de los ganglios linfáticos y el mal pronóstico. También sirvió como factor de pronóstico autónomo para pacientes con cáncer gástrico. Además, la hPrx1 regula la invasión y metástasis de las líneas celulares de cáncer gástrico mediante la inhibición de la expresión de E-cadherina. La hPrx1 puede promover la transición epitelial-mesenquimal y la progresión del cáncer gástrico; por lo tanto, podría ser un objetivo terapéutico y un indicador de pronóstico para pacientes con cáncer gástrico (Yu *et al.*, 2018).

1.3. Procesos de reducción de Prx

En el caso de las Prx de 1-Cys, las enzimas no parecen tener un reductor universal. Se conocen ejemplos de reductores a base de azufre como la Trx, H₂S y GSH, con o sin la intervención de enzimas adicionales, y también se ha demostrado que el ascorbato reduce Prx de 1-Cys de la familia Prx6. La cinética de reducción de las Prx de 1-Cys ha sido parcialmente caracterizada. La reacción que mejor se ha conocido es la de la Prx6 de mamífero reducida por GSH y catalizada por glutatión transferasa π . La actividad específica informada de 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ (mg Prx6)⁻¹ puede traducirse en una k_{cat} de al menos 2 s⁻¹, aunque no está claro qué tan eficiente podría resultar este sistema en condiciones *in vivo*. Otro ejemplo bien estudiado es el de la AhpE de *M. tuberculosis*, que puede ser reducida por el sistema micotiol/micorredoxina-1/micotiol reductasa, y también por H₂S (Zeida *et al.*, 2019).

Las Prx de 2-Cys son reducidas, en general, por las Trx o proteínas de la superfamilia Trx, como las triparredoxinas en tripanosomátidos o plasmorredoxina en *Plasmodium*; o proteínas que contienen dominios Trx, como AhpF en bacterias, NTRC en plantas y PDI (Zeida *et al.*, 2019).

1.4. Interacción Prx-Trx

1.4.1. *Reacción y cinética*

La reacción de reducción de la Prx consiste en dos intercambios consecutivos de tiol disulfuro. En el primero, la Cys N-terminal de la Trx ataca al disulfuro de la Prx en la C_R, produciendo el tiolato de la C_P y un disulfuro mixto. El segundo paso es el ataque de la Cys C-terminal del sitio activo de la Trx en la Cys N-terminal para liberar el ditiol de la Prx y el disulfuro de la Trx. La secuencia de reacciones se ha estudiado en varios sistemas, y el disulfuro intermedio se ha atrapado utilizando una Trx mutante que carece de su Cys C-terminal (Zeida *et al.*, 2019). La constante de velocidad de reducción de la Prx oxidada por la Trx o proteínas análogas, se ha determinado por cinética de estado estacionario o estado pre-estacionario y suele estar en el intervalo de $10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Por lo tanto, considerando las concentraciones de Trx informadas en el rango micromolar, la mayoría mantenidas, reducidas por los sistemas de TR/NADPH, entonces la parte reductora del ciclo catalítico también podría ser limitante de la velocidad (Ferrer-Sueta *et al.*, 2011). Se cree que la etapa de reducción de las Prx de 2-Cys se puede lograr mediante cualquier Trx, independientemente de la especie, por lo que los ensayos de actividad de la Prx estándar generalmente emplean los sistemas de Trx acoplados a TR de *E. coli* o *S. cerevisiae* (Zeida *et al.*, 2019).

A finales de los '90, se estudiaron las propiedades enzimáticas, utilizando las proteínas recombinantes de tres miembros de la familia Prx (Prx I, II y III) de mamíferos y se demostró que todas eliminan el H₂O₂ mediante la utilización de electrones proporcionados por la Trx. Las tres enzimas presentaron actividad peroxidasa y dependen de la Trx como fuente de equivalentes reductores. Las tres enzimas mostraron propiedades cinéticas similares: la V_{max} fue de 6 - 13 μmol/min por mg a 37°C, la K_m de la Trx fue de 3 - 6 μM y la K_m del H₂O₂ fue menor a 20 μM (Chae *et al.*, 1997).

La reacción 3 del ciclo catalítico de la Prx (reducción del sitio catalítico) ha sido muy poco investigada.



Existen fenómenos tales como hiperoxidación, modificaciones postraduccionales y dinámicas de oligomerización que dificultan el estudio. En la Tabla 1 se resumen los datos cinéticos reportados para las seis Prx presentes en células humanas. No se conocen datos respecto a la reacción 3 en el caso de la hPrx1, por lo cual es importante destacar la relevancia de nuestro trabajo.

Tabla 1 - Constantes de velocidad de reacción del ciclo catalítico de peroxirredoxinas humanas (Modificado de Portillo-Ledesma *et al.*, 2018).

Prx	Localización	Reacción			
		1	2	3	
		$k_{H_2O_2} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{res} (s^{-1})$	Reductor	$k_3 (M^{-1}s^{-1})$
Prx1	Citosol	3,8 x 10 ⁷ 1,1 x 10 ⁸	9 12,9	Trx1	-
Prx2	Citosol	0,13 - 1 x 10 ⁸ 1,6 x 10 ⁸	2; 0,25 0,64	Trx1	-
Prx3	Mitocondria	2 x 10 ⁷	20	Trx2	-
Prx4	Retículo endoplásmico	2,2 x 10 ⁷	-	PDI	-
Prx5	Mitocondria/citosol/peroxisoma	3 - 4 x 10 ⁵	15 18,7	Trx2	2 x 10 ⁶
Prx6	Citosol/lisosoma	3,4 x 10 ⁷ *	No aplicable**	π-GST+GSH	-

(*) Valor obtenido con la proteína de rata.

(**) Prx6 es una 1-Cys Prx y, como tal, no sufre una reacción de resolución.

Sólo se han estudiado a fondo unos pocos sistemas de Prx y Trx, más que nada la reducción de la hPrx5 por la hTrx2 (ambas enzimas mitocondriales humanas) (Trujillo *et al.*, 2007), la reducción de la TPx por la Trx1 de *E. coli* (Baker & Poole, 2003) (Noguera *et al.*, 2017) y la reducción de la PrxQ B por la TrxC de *M. tuberculosis* (Reyes *et al.*, 2016). Se han caracterizado las reducciones de la triparredoxina peroxidasa por la triparredoxina (una proteína similar a Trx) de

tripanosomátidos. También la peroxirredoxina AhpC por la AhpF de *Salmonella typhimurium*, una flavoenzima con un dominio Trx, presente en varias bacterias (Zeida *et al.*, 2019).

La Prx5 es la única Prx de 2-Cys atípica presente en mamíferos. El ácido sulfénico formado por el proceso de oxidación del residuo de Cys47 (C_P) reacciona con el residuo de Cys151 (C_R) en la misma subunidad para formar un puente disulfuro intramolecular, que a su vez es reducido por una Trx. Se investigó la cinética de la reacción entre la Trx2 mitocondrial y la Prx5 siguiendo los cambios rápidos en la intensidad de fluorescencia total registrados en un *stopped flow* tras la reducción de la Prx5 mediada por Trx en condiciones de exceso de Trx2. Tanto la oxidación de la Trx2 como la reducción de la Prx5 ocurren con una reducción en la intensidad de emisión de fluorescencia total. Sin embargo, en condiciones de concentración de Trx2 en exceso sobre la Prx5, las constantes de velocidad observadas de reducción de la intensidad de fluorescencia aumentaron linealmente con la concentración de Trx2 reducida. Además, cuando se usaron Prx5 C47S o Prx5 C151S en lugar de la enzima de tipo salvaje, no se observó una disminución en la intensidad de la fluorescencia, lo que indica que tanto la C_R como el residuo de C_P de la enzima son necesarios para su rápida reducción mediada por Trx. A partir de la gráfica de las constantes de velocidad observadas de disminución de fluorescencia frente a la concentración reducida de Trx2, la constante de velocidad de segundo orden para la reducción por Trx de la Prx5 se calculó como $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7,4 y 25°C (Fig. 3) (Trujillo *et al.*, 2007).

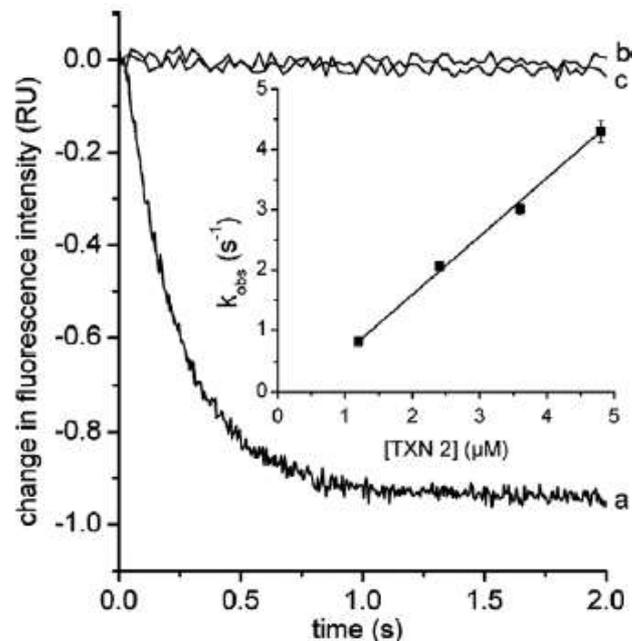


Figura 3 - Cinética de la reducción de Prx5 mediada por Trx2 (Tomado de Trujillo *et al.*, 2007).

Se mezcló Trx2 reducida (0,8 μM) con Prx5 de tipo salvaje oxidada (4,8 μM) (a): Prx5 C⁴⁷S (4 μM) (b): o Prx5 C¹⁵¹S (4 μM) (c): en buffer fosfato de potasio 100 mM más dtpa 0,1 mM, pH 7,4 y 25°C. Recuadro: Gráfico de la constante de velocidad observada de disminución de la intensidad de la fluorescencia al aumentar las concentraciones de Trx2.

La tiol peroxidasa de *E. coli* (Tpx, p20) es parte de un sistema de defensa contra el estrés oxidativo que utiliza equivalentes reductores de Trx1 y TR para reducir los hidroperóxidos de alquilo. La Tpx contiene tres residuos: Cys95, Cys82 y Cys61. La Cys61 se alinea con la Cys N-terminal del sitio activo de otras peroxidases de la familia de las Prx. Se realizaron estudios cinéticos mediante *stopped flow*, y se observó que la Tpx y la Trx1 forman un complejo de Michaelis durante el recambio con una eficiencia catalítica de $3,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Baker & Poole, 2003). Otros estudios arrojaron un resultado de $8,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Noguera *et al.*, 2017). La baja K_m (9,0 μM) de la Tpx para hidroperóxido de cumeno demuestra la especificidad del sustrato hacia los hidroperóxidos de alquilo sobre H_2O_2 ($K_m > 1,7 \text{ mM}$). A causa de la hiperoxidación de la Cys61, se observa una inactivación rápida de la Tpx durante el recambio con hidroperóxido de cumeno y un hidroperóxido lipídico, ácido 15-hidroperoxieicosatetraenoico, pero no H_2O_2 (Baker & Poole, 2003). A diferencia de la mayoría de las otras Prx de 2-Cys, que operan mediante un mecanismo de disulfuro entre subunidades, la Tpx contiene

un enlace disulfuro intramolecular y es monomérica en todas las condiciones (Vazquez *et al.*, 2020).

La tuberculosis, es causada por la bacteria intracelular *M. tuberculosis*. Dentro de los fagosomas de los macrófagos activados, *M. tuberculosis* está expuesto a hidroperóxidos citotóxicos como el H₂O₂, hidroperóxidos de ácidos grasos y ácido peroxinitroso. Dentro de esta bacteria, se ha caracterizado el producto del gen Rv1608c, que según la homología de secuencia se comporta como una Prx de la subfamilia de Prx Q (PrxQ B de *M. tuberculosis* o MtPrxQ B). Se ha investigado la reducción de MtPrxQ B con Trx utilizando el cambio de fluorescencia de Trx como método de estudio, obteniendo resultados en el orden de $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Reyes *et al.*, 2016).

Se han realizado estudios enfocados en *Trypanosoma cruzi*, un parásito protozoario, agente causante de la enfermedad de Chagas, el cual constituye un importante problema sanitario en América Latina. Durante la infección de la célula huésped, los parásitos *T. cruzi* están expuestos a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Como parte de sus sistemas de defensa antioxidante, expresan dos peroxidasas de triparredoxina (TXNPx), miembros de la familia de las TXNPx citosólicas (c-TXNPx) y mitocondriales (m-TXNPx) de *T. cruzi* (Piñeyro *et al.*, 2011). Éstas, son enzimas de tipo Prx, que se encargan de reducir los hidroperóxidos en los tripanosomátidos. Los equivalentes de reducción son proporcionados por la tripanotiona [T(SH)₂] a través de la triparredoxina (TXN). La tripanotiona es utilizada como fuente de electrones por el sistema triparredoxina/triparredoxina peroxidasa (TXN/TXNPx) para reducir los hidroperóxidos producidos por los macrófagos durante la infección (Fiorillo *et al.*, 2012). Tanto la c-TXNPx como la m-TXNPx reducen rápidamente el H₂O₂ ($k = 3,0 \times 10^7$ y $6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7,4 y 25°C, respectivamente) y el ácido peroxinitroso ($k = 1,0 \times 10^6$ y $k = 1,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7,4 y 25°C, respectivamente). También se investigó la parte reductora del ciclo catalítico, y la constante de velocidad para la reducción de c-TXNPx por la triparredoxina I fue de $1,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Piñeyro *et al.*, 2011).

Se han investigado las constantes de velocidad para pasos individuales en el ciclo catalítico de la AhpC de *S. typhimurium*. Los residuos de Trp conservados

situados cerca de las cisteínas resolutivas y peroxidáticas en la AhpC dan lugar a grandes cambios en la fluorescencia durante el ciclo catalítico. El dominio Trx AhpF reduce de manera muy eficiente el disulfuro de la AhpC, en un solo paso, con una constante de velocidad de $2,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Esta Prx bacteriana presenta velocidades para reducir y oxidar que se encuentran entre las más rápidas en las tres fases del ciclo catalítico que se han observado para esta diversa familia de enzimas (Parsonage *et al.*, 2015).

1.4.2. Proteínas y estructura

La Prx1 y la Prx2 se expresan abundantemente, y se estima que su contenido en células de mamíferos es 20 veces mayor que el de la Trx (Matsumura *et al.*, 2008). Tales hallazgos sugieren que existe algún sistema de modulación para la interacción entre la Prx y la Trx. La Trx tiene una función importante en los procesos celulares a través de la regulación redox al experimentar la reacción de oxidación/reducción reversible de dos residuos de cisteína (Cys33 y Cys36 en la Trx de *E. coli*) (Matsumura *et al.*, 2008). Además, los sistemas Trx desempeñan funciones críticas en la respuesta inmunitaria, la infección por virus y la muerte celular a través de la interacción con la proteína que interactúa con Trx (Lu & Holmgren, 2014).

Las Trx son enzimas ubicuas; típicamente oxidorreductasas pequeñas de 12 kDa, que poseen un motivo catalítico conservado WCXXC (Gurung, Das, & Bhattacharjee, 2017). La Trx extracelular está presente en la circulación y sus niveles aumentan bajo estrés oxidativo/condiciones inflamatorias (Madrigal-Matute *et al.*, 2015). La estructura de la Trx presenta cinco hebras β formando el núcleo interno de la proteína. Cuatro hélices α y un tramo corto de hélice rodean las láminas β centrales. El disulfuro del sitio activo se encuentra después de la hoja β_2 y forma la porción N-terminal de α_2 (Lu & Holmgren, 2014) (Fig. 4). Catalizan reacciones de intercambio de tiol-disulfuro usando tioles de cisteína redox activos, para reducir el disulfuro de proteínas oxidadas, incluidas las Prx. Las Trx oxidadas se reducen luego mediante la TR en una reacción dependiente de NADPH mediante cisteína redox activa o tioles de selenocisteína, según el

organismo. Esto se logra mediante la formación de un heterodímero entre la Trx y la TR que permite la transferencia de electrones a la Trx en una reacción de intercambio de disulfuro (Gurung *et al.*, 2017).

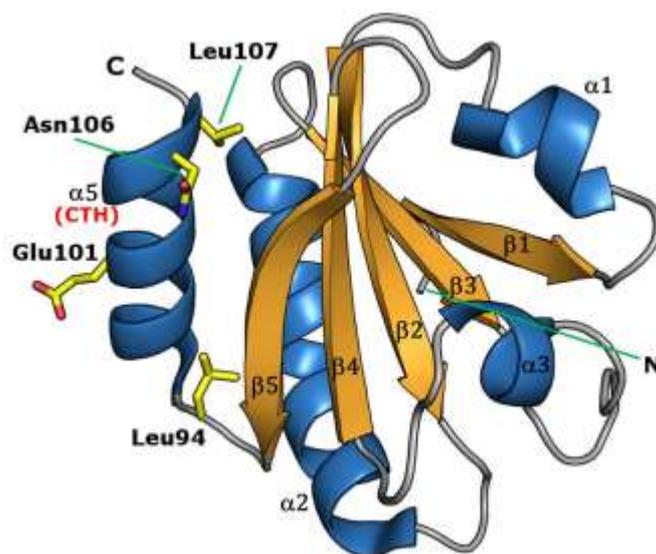


Figura 4 - Estructura tridimensional de *EcTrx* wild type (PDB: 2TRX) (Tomado de Noguera *et al.*, 2017).

Entre los diferentes reductores, la Trx junto con el NADPH constituyen un sistema ubicuo que regula el estado redox celular. Las propiedades de eliminación de oxidantes de la Trx se realizan a través de peroxidasa GPx o Prx. Intracelularmente, además de su papel como reductoras, las Trx y las Prx participan en múltiples procesos importantes, que van desde la síntesis de ADN hasta la regulación de la apoptosis y la proliferación celular. Además, las Trx y las Prx son liberadas al ambiente extracelular por células tanto normales como neoplásicas y están involucradas en numerosos procesos biológicos (Madrigal-Matute *et al.*, 2015).

La caracterización estructural no ha sido tan estudiada como la cinética. Se basa únicamente en microscopía electrónica de baja resolución y modelado estructural (Zeida *et al.*, 2019). Se ha realizado el estudio de la TXNPx en *T. brucei brucei*. Se observó que la TbTXNPx reduce eficientemente los hidroperóxidos orgánicos y es específicamente reducida por la TbTXN, menos eficientemente por la Trx, pero no por glutatión (GSH) o T(SH)₂. Mediante el

análisis por gel filtración, se producen picos de TbTXNPx oxidada correspondientes a un decámero y agregados superiores. La microscopía electrónica muestra estructuras anulares regulares en el pico del decámero. Tras la reducción, los anillos tienden a despolimerizarse formando oligómeros de cadena abierta (Budde *et al.*, 2003). También se investigó en *Leishmania*, un parásito protozoario intracelular causante de una enfermedad denominada Leishmaniasis, el cual posee un metabolismo de tioles también basado en tripanotona. A partir del análisis estructural, se puede estudiar la oligomerización de las dos proteínas e identificar las regiones responsables de su interacción. En el caso de la LmTXN se identificó una inusual α -hélice N-terminal que permite la formación de un dímero de dominio intercambiado estable. En la LmTXNPx, cristalizada en condiciones reductoras, se distingue tanto las conformaciones localmente desplegadas (LU) como las totalmente plegadas (FF), típicas de la proteína oxidada y reducida respectivamente. Se destaca una alta flexibilidad del bucle que incluye la C_P, la cual facilita que la Cys52 forme un enlace disulfuro entre cadenas con la C_R (Cys173), evitando así la hiperoxidación que inactivaría la enzima. El par TXN-TXNPx, que reduce los hidroperóxidos producidos por los macrófagos en los parásitos, durante la infección de una manera dependiente de T(SH)₂, posee bolsillos que rodean las cisteínas catalíticas, los cuales pueden albergar pequeñas moléculas que inhiben su actividad. Se ha demostrado que los metales tiofílicos como el antimonio, el oro y la plata se unen con alta afinidad a las cisteínas del sitio activo de LiTR y también pueden servir como inhibidores del par TXN-TXNPx (Fiorillo *et al.*, 2012).

En células humanas, se ha descubierto también que la reducción de la Prx4 puede ser catalizada de manera eficiente y específica por las proteínas de la familia PDI, GSH mejora este proceso (Lu & Holmgren, 2014). La Prx4 (única Prx residente en el retículo endoplásmico), oxida a los miembros de la familia PDI para apoyar el plegamiento oxidativo de proteínas, para que logren formar los disulfuros correspondientes en el ER (Stöcker, Van Laer, Mijuskovic, & Dick, 2018). Las PDI contienen plegamiento tipo Trx con sitios activos CXXC y cumplen sus funciones fisiológicas en compartimentos celulares oxidantes como el ER. La estructura de la proteína PDI ha sido resuelta por cristalografía de rayos X y ha demostrado ser una molécula flexible, con cuatro dominios Trx en forma

de herradura con una conformación cerrada reducida y una abierta oxidada, lo que es importante para ejercer su actividad catalítica (Lu & Holmgren, 2014).

Las Prx reducidas pueden existir como dímeros, pero se cree que la estructura decamérica se ve fuertemente favorecida en condiciones fisiológicas (Hoyle & O'Neill, 2015). La AhpC, es un ejemplo bacteriano de Prx de 2-Cys típicas, pero se diferencia en varios aspectos de otros miembros de la familia. En primer lugar, posee tres residuos de cisteína, que están directamente implicados en la catálisis, incluida la C_P (Cys61), la C_R (Cys174) y una tercera cisteína catalítica, Cys176, cuya función no está clara (Gurung, *et al.*, 2017). La AhpC es el componente peroxidasa del complejo alquil hidroperóxido reductasa (AhpR). La AhpF contiene los componentes Trx y TR ya que es una flavoproteína dimérica que consta de tres dominios: un dominio N-terminal Trx, un dominio de unión a FAD y un dominio de unión a NADH. La AhpC oxidada favorece a los dímeros catalíticos, mientras que la AhpC reducida se ensambla preferentemente como decámeros estables en forma de rosquilla. El extremo carboxilo terminal de la AhpC es importante no solo en la transición de dímero a decámero, sino también en el ensamblaje AhpC-AhpF (Feng *et al.*, 2020). En *M. tuberculosis*, la AhpC se reduce mediante el sistema de Trx que consta de tres Trx (TrxA, TrxB y TrxC), y TR (Gurung *et al.*, 2017).

Se han realizado estudios computacionales en *M. tuberculosis*, para diseñar una estrategia que permita interrumpir las funciones catalíticas del complejo AhpC-Trx C, que posiblemente puede hacer que el patógeno sea vulnerable a la muerte oxidativa en el huésped. Utilizando el método de acoplamiento proteína-proteína, se construyó el complejo AhpC-Trx C. Las estadísticas de la región de la interfaz revelaron un área de contacto de cada monómero menor a 1500 Å² y enriquecida en aminoácidos polares, lo que indica una interacción transitoria entre la AhpC y la Trx C. Se ha identificado ZINC40139449 como una potente molécula de unión de interfaz a través de la detección virtual de compuestos similares a fármacos de la base de datos ZINC. Se encontró estabilidad de dos residuos catalíticos conservados Cys61 y Cys174 de la AhpC y el motivo catalítico conservado, WCXXC, de la Trx C tras la unión de ZINC40139449 (Gurung *et al.*, 2017). En la Fig. 5 se puede observar el esquema de unión de ambas proteínas.

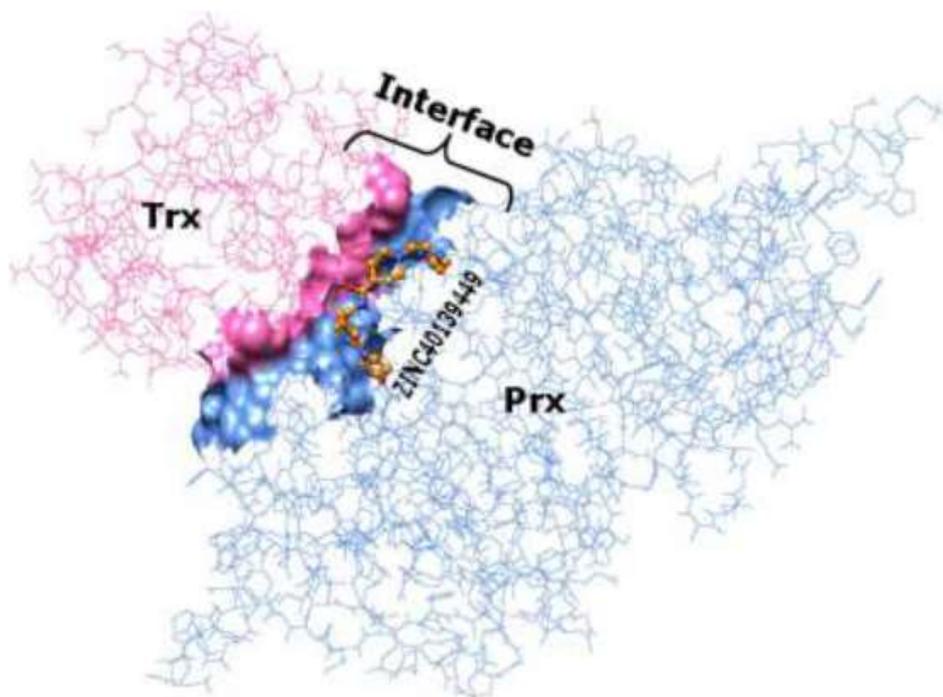


Figura 5 - Esquema de interacción entre AhpC y Trx C de *M. tuberculosis* mediada por la molécula de unión de la interfaz, ZINC40139449 (Tomado de Gurung *et al.*, 2017).

1.5. Procesos de reducción asociados con señalización redox

El H_2O_2 actúa como una molécula de señalización en la transducción de señales en condiciones fisiológicas (Stöcker *et al.*, 2018). El H_2O_2 intracelular puede actuar como una señal al provocar la oxidación de tioles particulares en determinadas proteínas (Talwar *et al.*, 2020). El H_2O_2 es producido de manera regulada por generadores intracelulares, como NADPH oxidasas y la cadena respiratoria mitocondrial. Se estima que las concentraciones citosólicas basales de H_2O_2 en estado estacionario se encuentran en el rango de $\approx 1 - 10$ nM, y aumentan de manera transitoria a aproximadamente 500 - 700 nM durante los eventos de señalización oxidativa. Las Prx son capaces de transferir equivalentes oxidantes derivados de H_2O_2 a proteínas diana reguladas por reacciones redox, facilitando la transmisión de señales de H_2O_2 (Talwar *et al.*, 2020). Se ha descubierto que las proteínas típicas reguladas mediante reacciones redox reaccionan muy lentamente frente al H_2O_2 , presentando una

constante de velocidad de orden 2 menor que 10^2 . Se puede esperar que las Prx capturen casi todo el H_2O_2 que se genera dentro de las células ya que la constante de velocidad de orden 2 del tiol de las Prx frente al H_2O_2 es hasta siete órdenes de magnitud mayor ($k \approx 10^5 - 10^8 M^{-1}s^{-1}$) (Stöcker *et al.*, 2018). Algunas proteínas reguladas por reacciones redox presentan tioles que pueden oxidarse directamente con H_2O_2 , tal es el caso del factor de transcripción bacteriano OxyR y la enzima glucolítica GAPDH (Talwar *et al.*, 2020). Se supone que el H_2O_2 difunde desde la fuente hasta la proteína blanco, donde choca con el tiol objetivo y reacciona directamente en una reacción de sustitución bimolecular para formar un ácido cisteína sulfénico (Cys-SOH) y agua como productos (Stöcker *et al.*, 2018). Algunas proteínas pueden oxidarse indirectamente, de una manera muy eficaz y selectiva, a través de la mediación de las tiol peroxidasa (Talwar *et al.*, 2020). Las formas oxidadas de una tiol peroxidasa (ácido sulfénico y disulfuro) pueden oxidar objetivos secundarios más allá de sus sustratos Trx habituales y, si dichos objetivos tienen un papel en la transmisión de una señal a través de modificaciones postraduccionales o respuesta de transcripción, la señal se puede encender o apagar a través del estado redox del objetivo secundario (Fig. 6 B) (Zeida *et al.*, 2019). Se cree que la posibilidad de que los relevos redox (*redox-relays*) basados en peroxidasa son comunes en células de mamíferos, y representan un principio general que explica la especificidad y eficiencia de las señales de H_2O_2 intracelulares. Esto reafirma la idea, de que las enzimas que tradicionalmente consideramos como "antioxidantes" no son solo eliminadores pasivos de oxidantes, sino que participan activamente en la señalización redox inducida por oxidantes (Sobotta *et al.*, 2015).

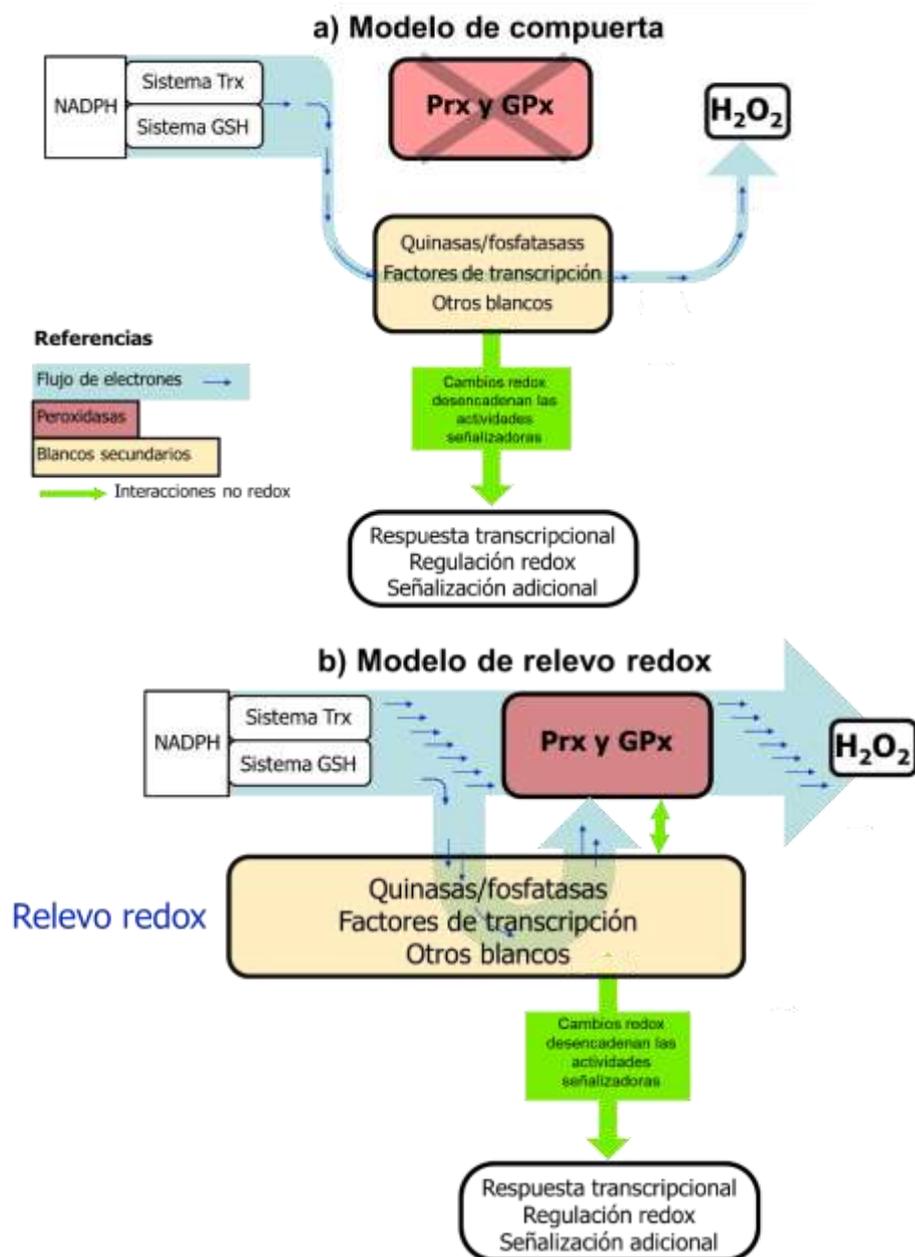


Figura 6 - Modelos para la señalización de hidroperóxido (H_2O_2 en particular) que involucran Prx y GPx (Modificado de Zeida *et al.*, 2019).

(a) Modelo de compuerta: las peroxidasas se inhiben o inactivan, evitando su reducción de hidroperóxidos y recurriendo a objetivos secundarios como vía de reducción. Entonces, los objetivos secundarios se oxidan, actúan como un bypass redox y dan lugar a señales a través de la fosforilación, el control de la transcripción, etc.

(b) Modelo de relevo redox: los objetivos secundarios actúan como socios redox constitutivos de una o varias peroxidasas y la reducción directa de H_2O_2 por objetivos secundarios se vuelve irrelevante. Prx y GPx actúan como sensores que transmiten la señal a través de la oxidación específica de tioles proteicos a los objetivos secundarios. Otra posibilidad implica el reconocimiento diferencial de formas oxidadas o reducidas de las peroxidasas (y el sistema Trx) que no implican reacciones redox.

La Prx se oxida con H_2O_2 ; para continuar necesita 2 electrones, que en general provienen de la Trx, que a su vez vienen de la TR y de NADPH (Fig. 7 C). Sin embargo, puede haber un blanco no vinculado con NADPH, que le provea los electrones a la Prx. Cuando le da los electrones, se forma un dímero o se oxida, y oxidado cumple otra función. Lo que hace es señalar y notificar que hay H_2O_2 . La Prx regula la oxidación de proteínas diana menos reactivas, controlando las concentraciones locales de H_2O_2 o mediante una reacción de oxidación facilitada, en la que el ácido sulfénico o disulfuro de la Prx reacciona con la cisteína reducida de una proteína blanco adyacente. Este mecanismo se denomina relevo redox (Pace *et al.*, 2018). Aunque el modelo se propuso en 2002, el nombre "relevo redox" apareció unos años más tarde junto con al menos dos más, como el modelo de "oxidación facilitada" y el modelo de "peroxidasa señalizadora" (Zeida *et al.*, 2019). En el caso de la transmisión indirecta (relevo redox de dos pasos - Fig. 7 A), la peroxidasa inicialmente recibe equivalentes reductores de una tiol-disulfuro oxidorreductasa, como lo hace normalmente como parte de su ciclo de eliminación de H_2O_2 . La oxidorreductasa luego oxida la proteína diana (representada en color verde en la Fig. 7). En este esquema de relevo, se inserta un integrante adicional en el equipo. Se destacan dos propiedades visibles: efecto ulterior en respuesta a la traducción de ADN y modificación funcional de la enzima en la vía de señalización. En el caso de la transmisión directa, que representa un relevo redox de un paso (Fig. 7 B), la peroxidasa oxida la proteína diana (con la que está formando un complejo - representada con línea de puntos) directamente, transfiriendo equivalentes oxidantes a través de una interfaz común proteína-proteína. La proteína oxidada regulada por reacciones redox es posteriormente reducida por una oxidorreductasa que pertenece a un sistema reductor dependiente de NADPH (Stöcker *et al.*, 2018). En este caso, la oxidación o reducción de un integrante alternativo, despierta un efecto distinto, a raíz de la ganancia o pérdida de función de la enzima.

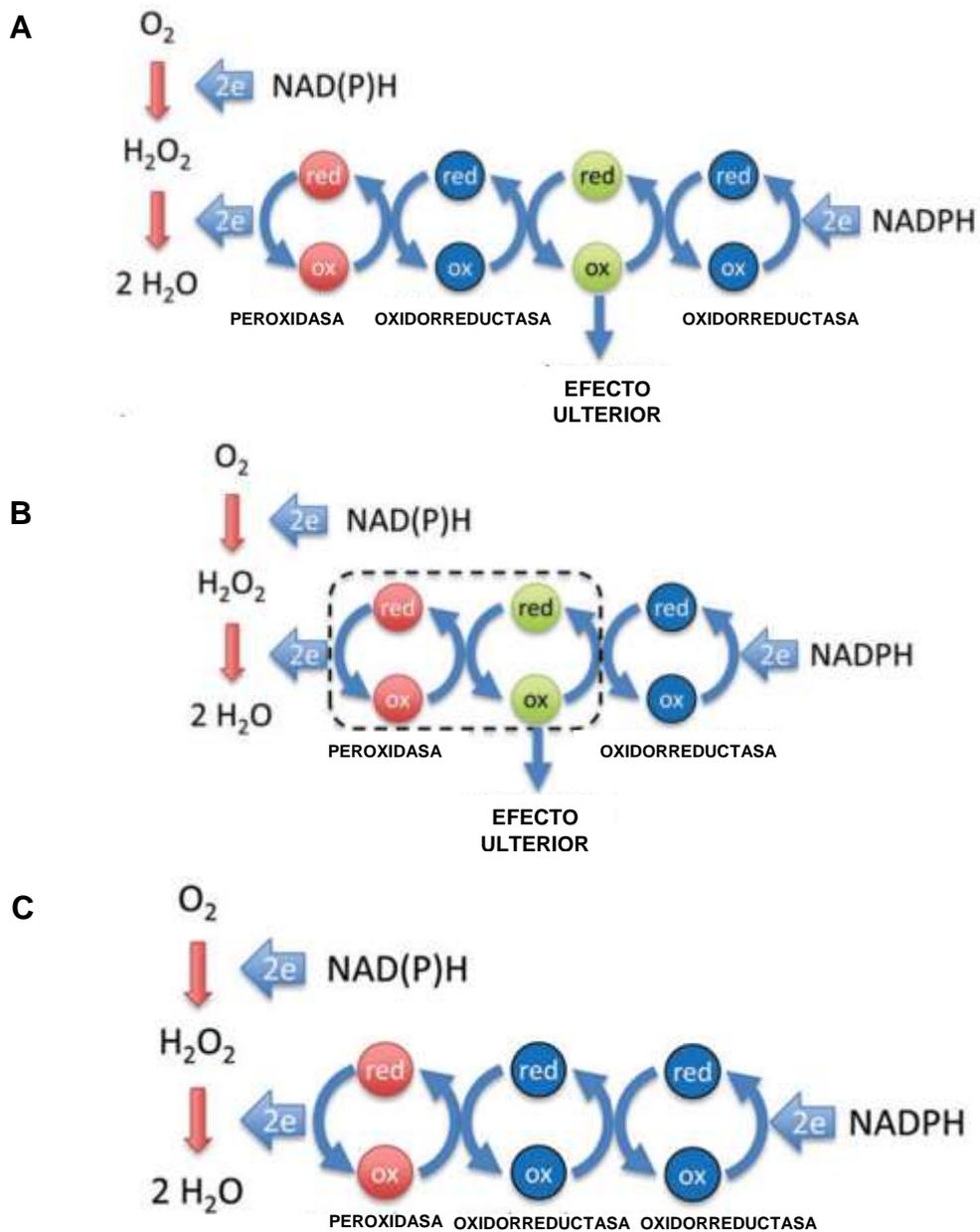


Figura 7 - Posibilidades principales para la oxidación del tiol de la proteína mediada por la peroxidasa de tiol dependiente de H_2O_2 (Modificado de Stöcker *et al.*, 2018).

Se utilizan dos electrones para reducir parcialmente el O_2 a H_2O_2 , que luego extrae dos electrones adicionales de una Prx (en rojo) para formar H_2O .

(a) En un relevo de dos pasos, la oxidoreductasa (azul) recibe el equivalente reductor de una Prx oxidada. Existe una "estación de relevo redox" entre la tior peroxidasa y la proteína diana (verde). La misma oxidoreductasa o una diferente revertiría entonces la oxidación de la proteína diana.

(b) En un relevo de un paso, una proteína diana recibe el equivalente reductor de la tior peroxidasa oxidada con la que está formando un complejo (línea de puntos). La proteína oxidada regulada por reacciones redox es posteriormente reducida por una oxidoreductasa que pertenece a un sistema reductor dependiente de NADPH.

(c) No hay mecanismo de relevo. Una peroxidasa se oxida con H_2O_2 ; para continuar necesita 2 electrones, que en general provienen de la Trx, los cuales a su vez vienen de la TR y NADPH.

El primer ejemplo conocido fue el relevo redox Orp1-Yap1 descubierto en levadura (Pflieger *et al.*, 2002). El Orp1 (receptor oxidante peroxidasa 1) es miembro de la familia de la glutatión peroxidasa (Gpx), también conocida como Gpx3. Transmite señales de H₂O₂ al factor de transcripción Yap1, para activar su actividad transcripcional (Stöcker *et al.*, 2018). El factor de transcripción Yap1 regula las respuestas de las levaduras al H₂O₂ y a varios metales y sustancias químicas no relacionadas. La activación por H₂O₂ implica la formación de enlaces disulfuro intramoleculares Yap1 Cys303-Cys598 dirigidos por el sensor de H₂O₂ Orp1/Gpx3 (Azevedo *et al.*, 2003). La C_P del Orp1 reacciona con H₂O₂ para formar un ácido sulfénico que luego se condensa con una cisteína de Yap1. Una reacción de intercambio de tiol disulfuro completa la transferencia del equivalente oxidante al factor de transcripción. La formación del relevo redox depende de una proteína de soporte (Ybp1) que mantiene cerca a Orp1 y Yap1 (Stöcker *et al.*, 2018). Se ha propuesto, que los estados redox de Yap1 y Orp1 están acoplados a la vía de la Trx. El Orp1 puede reducir a Yap1 oxidada con electrones provenientes de la Trx, también oxidándola. Sin embargo, *in vitro* se observó que la Trx es capaz de reducir a la Yap1 oxidada, mientras que el Orp1 no lo es (Pflieger *et al.*, 2002).

Se han realizado estudios donde la Tsa1 (Prx de levadura típica de 2-Cys), asumió el papel de Orp1 en la oxidación de Yap1 cuando la proteína adaptadora Ybp1 no es funcional o escasea. En una cepa de donde Ybp1 fue eliminada, se detectó oxidación y actividad dependiente de Tsa1 y conjugados de disulfuro Tsa1-Yap1 unidos por disulfuro. También se ha reportado que la Tsa1 forma un relevo redox con piruvato quinasa (Pyk1). En respuesta al H₂O₂, Tsa1 y Pyk1 forman un conjugado unido por enlaces disulfuro, dependiendo de la presencia de la C_P. La Tsa1 facilitó una disminución adaptativa en la actividad de Pyk1. Por otro lado, se ha demostrado que la Ahp1 (Prx atípica de 2-Cys) facilita la oxidación del factor de transcripción Cad1. Se requería la Ahp1 para la actividad transcripcional dependiente de Cad1 y se detectaron intermedios ligados a disulfuro (Stöcker *et al.*, 2018).

La resolución diferencialmente lenta de distintas Prx que coexisten en el mismo compartimento, proporcionaría un rango dinámico diferencial de respuesta a los niveles de H₂O₂. Diversos soportes y la Prx podrían proporcionar señales

específicas que respondan a diferentes tipos de estímulos. Por ejemplo, un aumento repentino de ONOOH sería detectado por la Prx5 más reactiva y la respuesta estaría mediada por soportes específicos de la Prx5 y objetivos secundarios. Por otro lado, la Prx2 sería más adecuada para detectar la variación en concentraciones muy bajas de H₂O₂ y responder en consecuencia. También existe la posibilidad de que un soporte o mecanismo selectivo pueda facilitar la oxidación dirigida de dianas secundarias sin la necesidad de una peroxidasa que actúe como intermediario de relevo. De hecho, puede aparecer la primera evidencia de tal mecanismo: las velocidades de oxidación de PTP1B (proteína tirosina fosfatasa 1B) y de hiperoxidación de la Prx aumentan por la presencia de concentraciones fisiológicas de CO₂/bicarbonato, redirigiendo el H₂O₂ de la Prx a la fosfatasa. El modelo de relevo redox puede explicar un sistema multifacético capaz de responder a la identidad, flujo y persistencia de hidroperóxidos a través de las características catalíticas de las diversas Prx y sujeto a las necesidades y el estado del compartimento específico que proporcionaría proteínas de andamiaje y objetivos secundarios (Zeida *et al.*, 2019).

Más recientemente, se encontraron ejemplos de relevos redox basados en Prx en células de mamíferos, y existe evidencia emergente de un papel de las Prx citosólicas en la transmisión de oxidación a una multitud de proteínas diana (Talwar *et al.*, 2020). Se realizaron estudios en el relevo redox formado entre la Prx2 y el factor de transcripción STAT3 en células humanas, en el que los equivalentes oxidativos fluyen de la Prx2 a STAT3. Los resultados obtenidos demuestran que la Prx2 cataliza la formación de oligómeros STAT3 unidos por enlaces disulfuro, que están comprometidos en la actividad transcripcional. La oxidación de STAT3 es transitoria, ya que el sistema de Trx media la reducción de STAT3. Las citoquinas inducen la oxidación de pequeñas subpoblaciones de Prx2 y STAT3, que muy probablemente están asociadas con microdominios de generación de H₂O₂. Además, se encontró que la actividad transcripcional, mediada por STAT3 e inducida por citoquinas, está fuertemente influenciada por los niveles de expresión de Prx2 (Sobotta *et al.*, 2015).

También se estudió mediante un análisis matemático, el mecanismo Prx2-STAT3, basándose en la información experimental existente, y se lograron

estimar ciertos parámetros en el modelo de acuerdo con el mecanismo supuesto. Según fue reportado, se modificó un modelo cinético de reacciones de oxidación y reducción mediadas por H_2O_2 , para incluir reacciones que describen la oxidación y reducción de STAT3 mediada por la Prx2. Se consideraron dos casos para conectar los datos de Sobotta *et al.* a dicho modelo. Primero, se supuso que los oligómeros STAT3 se formaban rápidamente después de la reacción inicial entre STAT3 y la Prx2 oxidada. Por lo tanto, el número de oligómeros STAT3 oxidados formados igualó el número de disulfuros mixtos Prx2-STAT3 formados en cada punto en el tiempo (es decir, la oxidación STAT3 mediada por Prx2 fue el paso más lento en este proceso y limitó todas las reacciones posteriores). Luego se usó el modelo para determinar la dinámica esperada de la oxidación de STAT3 mediada por la Prx2 en respuesta a la estimulación externa de H_2O_2 bajo estas suposiciones, así como una estimación de la constante de velocidad de oxidación de STAT3 consistente con el modelo. Se determinó que la constante de velocidad para la primera reacción era del orden de $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. En segundo lugar, se supuso que la oligomerización de la post-oxidación de STAT3 es el proceso más lento y se usó un valor limitado por difusión como límite superior para la constante de velocidad para la reacción de la Prx2 oxidada con STAT3 reducido. Finalmente, se usaron las predicciones de cada conjunto de supuestos para estimar las velocidades relativas de oxidación de STAT3 mediada por la Prx2 en comparación con otras reacciones que compitieron por el sustrato de Prx2 oxidada en el sistema. Se determinó que la constante de velocidad estimada era de aproximadamente $4,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Las velocidades relativas de las diferentes vías de reacción sugieren que la reacción entre la Prx2 oxidada y STAT3 probablemente se produce con una desventaja cinética en comparación con otras reacciones en el citosol que compiten por el sustrato de Prx2 oxidada (Langford *et al.*, 2018).

A partir de otro experimento, años más tarde, se encontró que:

- El complejo Prx2-STAT3 no covalente se ensambla antes de la oxidación de la Prx, lo que demuestra que el complejo ya está preformado en el estado reducido y listo para responder al H_2O_2 .

- Ambas proteínas son altamente selectivas entre sí: STAT3 prefiere fuertemente la Prx2 sobre la isoforma Prx1 muy similar, y una mutación puntual única en STAT3 anula la interacción con la Prx2.
- La interacción entre la Prx2 y STAT3 depende de una proteína chaperona de membrana (anexina A2 - AnxA2).
- La transferencia de equivalentes oxidativos de la Prx2 a STAT3 depende de la presencia de AnxA2.
- La oxidación de STAT3 dependiente de la Prx2 y AnxA2 ocurre en asociación con membranas.

A partir de este descubrimiento, se concluyó que la eliminación o disminución de la anexina A2 interrumpe la transferencia de equivalentes oxidantes de la Prx2 a STAT3, que se observa que tiene lugar en las membranas; por lo tanto el relevo redox Prx2-STAT3 es parte de un microdominio de señalización de membrana altamente organizado (Talwar *et al.*, 2020).

La Prx1 forma un relevo redox con la quinasa de estrés ASK1. Cuando se disminuye la Prx1, se ha reportado que se evita la oxidación y activación de ASK1 inducida por H₂O₂. El mismo estudio también indicó un conjugado Prx1-ASK1 unido por disulfuro. Más recientemente, se ha informado acerca de un relevo redox entre la Prx1 y la enzima reparadora del ADN nuclear APE1. Se observó que cuando la Prx1 se ve disminuida, se afecta la ubicación y función de APE1. Se informó la existencia de un intermedio covalente entre la Prx1 y APE1 (Stöcker *et al.*, 2018).

También se realizaron estudios de interacción con la Prx2, donde se buscaron posibles compañeros, planteando que una asociación física favorece la participación en un relevo redox. Se llegó a identificar a la proteína mediadora de la respuesta de colapsina 2 (CRMP2) humana se expresa en forma ubicua y se encarga de regular el ensamblaje y desmontaje de los microtúbulos en el citoesqueleto. Esta función es importante para el desarrollo y mantenimiento de las extensiones de neuritas y para la migración de linfocitos. Cuando se expusieron las células en estudio, a niveles micromolares bajos de H₂O₂, ocurrió una oxidación rápida y reversible de CRMP2, en paralelo con la oxidación la Prx2, a pesar de la proteína

CRMP2 recombinante purificada que reacciona lentamente con H_2O_2 ($k \sim 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Cuando se oxida la Cys504, CRMP2 permite la formación de un homodímero covalente. La inmunoprecipitación de la Prx2 a partir de células, coprecipita CRMP2; y se puede observar la colocalización de estas dos proteínas en las células. Sin embargo, no se ha observado una mezcla de disulfuro. En un entorno celular, estos disulfuros mixtos pueden tener una vida demasiado corta debido a la rápida reducción, y es posible que tampoco se vean en sistemas in vitro si se necesita otra proteína (soporte) para unir a los socios. También se detectó una interacción entre la Prx2 y CRMP2 en otras células humanas y de roedores, incluidas las neuronas primarias. Sin embargo, las bajas concentraciones de H_2O_2 no provocaron la oxidación de CRMP2 en estas células. Esto indica un mecanismo específico de tipo celular para promover la oxidación de CRMP2 en las células Jurkat, con evidencia insuficiente para atribuir la oxidación a un relevo redox dependiente de Prx (Pace *et al.*, 2018).

La Prx puede cambiar entre un modo reductor (que transmite equivalentes oxidativos a Trx) y uno de señalización pro-oxidativo (que transmite equivalentes oxidativos a proteínas reguladas por reacciones redox). Se ha reportado que la Prx1 puede oxidar a la Trx1 en las cisteínas 62 y 69 (las cuales no pertenecen a su sitio activo). El enlace disulfuro Cys62-Cys69 resultante inactiva la transmisión de equivalentes oxidantes a lo largo del eje Prx-Trx-TR, lo que posiblemente permite que la Prx1 entregue equivalentes oxidantes entrantes a otros objetivos. Se espera que la inactivación local y transitoria de la Trx promueva el redireccionamiento de equivalentes oxidativos de la Prx a otros receptores y asegure que las proteínas oxidadas por la Prx permanezcan oxidadas (mientras la Trx permanezca oxidativamente inactivada). En este caso, la Trx no es solo un puente de retransmisión redox entre la Prx y la TR, sino también una proteína diana con regulación redox de Prx (Du *et al.*, 2013) (Stöcker *et al.*, 2018).

Dado que la investigación respecto al proceso de reducción del disulfuro de la Prx 1 humana es escasa, nos hemos dedicado a realizar este trabajo, estudiando la cinética de la reducción de la hPrx por distintas Trx.

2. Objetivos

- Desarrollar una metodología que permita estudiar la cinética de reducción de la hPrx1 en su forma disulfuro, por las siguientes Trx: hTrx1, hTrx2 y EcTrx1.
- Obtener la constante de velocidad de segundo orden de reducción de la hPrx1 por Trx.
- Hacer una comparación entre la velocidad de los diferentes procesos asociados al ciclo catalítico, para tratar de entender cuál es el limitante de la velocidad en diferentes condiciones de concentración de sustrato.

3. Materiales y métodos

3.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

3.1.2. *Expresión y purificación de hPrx1*

Se utilizó el plásmido pET117b_PrX1 (la construcción no tiene una etiqueta de afinidad para facilitar su purificación) y células de la cepa BL21(DE3) de *E. coli* para la transformación. Mediante el uso de ampicilina 100 µg/mL se seleccionaron las células transformantes. El primer paso de la expresión fue el crecimiento de un pre-cultivo con 50 mL de LB 25 g/L y el antibiótico correspondiente durante toda la noche (O.N.) a 37°C, 200 rpm. El siguiente paso fue el escalado con un inóculo 1:100 en 1 L de LB en un matraz de 5 L; se dejó crecer a 37°C, 220 rpm, aproximadamente 3 horas hasta conseguir una D.O._{600nm} de 0,6 U.A. Posteriormente se dejó enfriar y se indujo la expresión agregando 1 mM de IPTG e incubando a 20°C, 220 rpm, O.N. Al día siguiente, se procedió a la centrifugación durante 20 minutos, a 5000 x g, 4°C. El pellet fue resuspendido en buffer de lisis Tris 25 mM, pH 8,8; EDTA 1 mM, PMSF 0,5 mM y lisozima 1 mg/mL (4 - 5 mL de buffer por gramo de pellet). El buffer debe tener este pH, dado que la hPrx1 posee un punto isoeléctrico (pI) inusualmente alto de 8,3 (valor teórico calculado con la herramienta ProtParam [<https://web.expasy.org/protparam/>] a partir de la secuencia primaria de la proteína). Se congeló a -80°C hasta su posterior purificación.

La proteína hPrx1 fue purificada por Joaquín Dalla Rizza según el protocolo que se detalla a continuación. Se descongeló el extracto y se sonicó en tandas de 5 minutos. Al sonicar, es muy importante que previamente el lisado sea tratado con sulfato de estreptomina (concentración final al 1%). Posteriormente, se debe incubar durante toda la noche a 4°C para precipitar los ácidos nucleicos (Engelman *et al.*, 2013). Se trató el extracto celular con 10 mM de DTT por 30 minutos a temperatura ambiente y luego se realizó un intercambio iónico en una columna de Dietilaminoetil Sepharosa (HiPrep DEAE FF 16/1; GE Healthcare). En estas condiciones la hPrx1 eluye en la fracción no unida (FNU) mediante buffer Tris 25 mM con NaCl, pH 8,8. Las fracciones colectadas se analizaron por SDS-PAGE para saber en cuáles eluyó la hPrx1. Dichas

fracciones se colocaron juntas y se concentraron hasta un volumen entre 0,5 - 5 mL, luego se redujo con 10 mM de DTT por 30 minutos a temperatura ambiente y se inyectó en una columna Superdex 200 16/60, equilibrada con buffer de reacción. La hPrx1 purificada fue concentrada y almacenada a -20°C.

3.1.3. Expresión y purificación de hTrx2

La proteína hTrx2 fue expresada y purificada por Stephanie Portillo según el protocolo que figura en su tesis de doctorado de 2018 (Portillo-Ledesma, 2018). La hTrx2 fue clonada en un vector pQE30 sin la secuencia de envío a la mitocondria y una secuencia de 6 residuos de histidina que se utilizó posteriormente para purificar por IMAC. Se expresó en cepas de *E. coli* DE3. Se partió de un cultivo O.N en medio LB a partir de este se realizó un cambio de escala 1/100 y se realizó un crecimiento, hasta llegar a una D.O._{600nm} de 0.6 U.A. La inducción se realizó con 1 mM de IPTG por 4 horas a 37° C.

3.1.4. Expresión y purificación de hTrx1

Se utilizaron bacterias *E. coli* de la cepa BL21(DE3) transformadas con el plásmido pET28a modificado para tener resistencia a ampicilina y también con una extensión amino terminal con 6 histidinas para poder realizar la purificación mediante IMAC.

Se comenzó preparando un pre-cultivo a partir de un crioinóculo de bacterias transformadas en dos matraces Erlenmeyer de 10 mL de medio LB suministrado con ampicilina 100 µg/mL. Se incubó a 220 rpm, a 37°C de temperatura O.N. Al día siguiente se procedió a inocular el pre-cultivo en 1 L de medio LB + ampicilina (100 µg/mL de medio) contenido en un Erlenmeyer de 5 L. Se incubó también a 220 rpm, a 37°C hasta llegar a una D.O._{600nm} de 0,6 U.A. aproximadamente. A continuación, se indujo la expresión de la hTrx1 recombinante adicionando IPTG (1 mM), incubando a 37°C, por 4 horas a 220 rpm. Luego, se cosecharon las células mediante centrifugación a 4000 x g durante 30 minutos a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en un buffer A, compuesto por fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH 8,

teniendo en cuenta una relación de 10 mL de buffer/g de pellet. Se suplementó dicho amortiguador con PMSF (concentración final 1 mM) y lisozima (1 mg/mL) con el fin de iniciar la lisis celular e inactivar la acción de proteasas. Previo a la sonicación, se trató con ADNasa y MgCl₂ para degradar el ADN presente en las células y que el mismo no interfiera luego en la filtración. Se incubó por 1 hora a 4°C, y luego se sonicó realizando 3 tandas de 5 minutos (potencia 40, pulsos 70%). Posteriormente se centrifugó a 10000 x g durante 45 minutos a 4°C y se filtró el extracto líquido empleando filtro de 0,8 µm.

Se comenzó la purificación de la hTrx1 recombinante mediante una IMAC, utilizando una columna HisTrap GE Health care de 1 mL y bomba peristáltica para equilibrar y sembrar el extracto líquido, y luego un equipo ÄKTA FPLC para eluir la proteína recombinante. La columna se pre-equilibró con 5 volúmenes de buffer A y se sembró con el extracto soluble filtrado aplicando un flujo de 0,5 mL/minuto. Luego, se lavó a flujo de 1 mL/minuto con 10 volúmenes de amortiguador A, logrando eluir las proteínas unidas con escalones de 50, 200 y 500 mM de imidazol, recolectando fracciones de 1 mL.

Para el siguiente paso de purificación, se utilizó un buffer compuesto por fosfato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM, dtpa 0,1 mM, pH 7,4. Se realizó una SEC, utilizando una columna Superdex 75 conectada a un equipo ÄKTA FPLC, equilibrada con 5 volúmenes del amortiguador mencionado anteriormente. Previamente, se concentró la proteína utilizando un filtro Amicon de 5 kDa, centrifugando a 8000 x g en tandas de 15 a 20 minutos, hasta alcanzar aproximadamente 500 µL). Se sembraron 500 µL de la muestra, y luego se eluyó colectando fracciones de 0,5 mL.

Las fracciones obtenidas por ambos métodos fueron visualizadas por SDS-PAGE 15%, mediante tinción con Coomassie coloidal durante toda la noche. Se extrajeron bandas de dicho gel, cuyos pesos moleculares coincidían con el de la hTrx1 (~ 12 kDa) y de su respectivo dímero. Se estudió mediante espectrometría de masa con el fin de confirmar que se trataba de la proteína de interés. Se determinó la concentración de la proteína purificada a través de espectrofotometría a 280 nm.

Es importante destacar que la hTrx1 recombinante obtenida se utiliza sin remover la secuencia de histidina, ya que en esta construcción no hay sitio de corte y no es posible quitarla.

3.1.5. Expresión y purificación de EcTrx1

La proteína EcTrx1 fue expresada y purificada por Sebastián Villar según el protocolo de Javier Santos de 2007 (Santos *et al.*, 2007).

3.1.6. Expresión y purificación de EcTR

Se utilizó la cepa BL21(DE3) de *E. coli* para expresar la EcTR transformando las células mediante el plásmido pTr301. El medio empleado para que crezcan las bacterias fue 2YT (1.6% triptona, 1% extracto de levadura, 0.5% NaCl, pH 7.0 ± 0.2) con ampicilina 100 µg/mL. Se comenzó con un precultivo de 50 mL (O.N., 37°C, 200 rpm) y luego se procedió al escalado a 1 L de 2YT con antibiótico. Se dejó crecer el cultivo por 20 horas y luego se indujo con 1 mM IPTG toda la noche a 37°C, 220 rpm. Se cosecharon las células por centrifugación durante 20 minutos a 5000 x g, 4°C. El pellet se resuspendió en 4 - 5 mL de buffer de lisis (fosfato de sodio 10 mM, pH 7,6, EDTA 0,3 mM con PMSF 0,5 mM) por gramo de pellet. Se congeló a -80°C hasta su posterior purificación.

Se agregó 1 mg de FAD, 2 µL de ADNasa y MgCl₂ 10 mM y luego se lisaron las células por sonicación (3 tandas de 5 minutos). Se centrifugó a 17400 x g por 30 minutos a 4°C y luego se agregó sulfato de amonio (0,56 g/mL de lisado) al sobrenadante. Luego de disolver completamente, se centrifugó a 12000 x g por 10 - 15 minutos a 4°C. Se resuspendió el pellet amarillo en 5 - 10 mL de buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,6, EDTA 0,3 mM, y se dializó O.N. contra dicho buffer a 4°C. Al día siguiente se recuperó el dializado, se filtró por 0,45 µm y se sembró en columna de ADP Sepharosa equilibrada con buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,6, EDTA 0,3 mM, para realizar la cromatografía de afinidad. Se lavó la columna con el mismo buffer hasta que la absorbancia a 280 nm disminuyó y se estabilizó. La proteína fue eluida en un gradiente de 120 mL de 0 a 1 M de

NaCl en el mismo buffer. Se colectaron fracciones de 0,5 - 1 mL y durante la cromatografía se monitoreó la absorbancia a 280 y 456 nm cada 3 fracciones. La *EcTR* eluyó en fracciones con la menor relación Abs_{280}/Abs_{456} . Se verificó en qué fracciones eluyó la proteína por SDS-PAGE, éstas se juntaron y se concentró la proteína. El último paso de purificación consistió en una SEC utilizando una columna Superdex 75 conectada a un equipo ÄKTA FPLC, empleando el buffer fosfato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. La proteína pura obtenida, fue reducida con 1 mM de DTT y se guardó a -20°C para su posterior uso (Mulrooney, 1997).

3.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Luego de cada expresión y purificación de proteínas recombinantes, se evaluó cada paso y su pureza a través de una electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida 15% para el gel separador y 5% para el gel concentrador, con posterior tinción con Azul de Coomassie coloidal.

3.3. Cuantificación de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas mediante su absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de absortividad molar de las proteínas en estado nativo, obtenido a partir de ProtParam, el cual es calculado a partir de su secuencia de aminoácidos. Los coeficientes de absortividad molar de las proteínas utilizadas fueron los siguientes: hPrx1: $18600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, hTrx1: $7200\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, hTrx2: $7050\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, *EcTrx1*: $14000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. En el caso de la *EcTR* se utilizó el coeficiente de extinción molar a 280 nm reportado ($\epsilon = 51700\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Wang *et al.*, 1996).

3.4. Cuantificación de peróxido de hidrógeno

Se cuantificaron las soluciones de H_2O_2 a partir de su absorbancia a 240 nm ($\epsilon = 39,4\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (D. P. Nelson & Kiesow, 1972).

3.5. Cuantificación de tioles

Se realizó la cuantificación de tioles proteicos por reacción con DTDPy (ditiopiridina) por espectrofotometría a 324 nm ($\epsilon = 21400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Se cuantificó el producto obtenido luego de incubar la proteína a temperatura ambiente con DTDPy en exceso (Grassetti & Murray, 1967).

3.6. Oxidación del sitio catalítico de Prx a disulfuro

A partir de la proteína reducida, previamente cuantificada su concentración y tioles presentes, se calcula el cociente entre concentración de tioles y concentración de proteína ($[\text{SH}]/[\text{Prx}]$).

Además de las dos Cys presentes en el sitio activo de la hPrx1 (Cys52 y Cys173), existen Cys adicionales. La Cys71 no es accesible al DTDPy y habitualmente no se cuantifica. Por otro lado, la Cys83 reacciona más lento que las del sitio activo con el H_2O_2 . Para oxidar el sitio catalítico se debe agregar 1 equivalente de H_2O_2 por sitio activo. Para conseguir una oxidación eficiente de la Cys83 se necesita una concentración más alta de H_2O_2 o tiempos más largos. Luego de este procedimiento, se verifica la oxidación del sitio catalítico volviendo a cuantificar los tioles presentes en la hPrx1.

3.7. Reducción del sitio catalítico de Trx

A través de la adición de DTT, concentración final 10 mM, incubando 30 - 40 minutos a temperatura ambiente, se logró la reducción de las Trx (en el caso de hTrx1 se realizó durante 1 hora). Una vez reducida la proteína, se removió el DTT pasando la muestra por una columna PD-10 equilibrada en el buffer de trabajo.

3.8. Ensayos de cinética

3.8.1. *Reducción de hPrx1 con hTrx2, hTrx1 y EcTrx1*

Se siguió el cambio de fluorescencia en distintos cursos temporales, excitando a una longitud de onda de 280 nm, mediante *stopped flow* con un filtro de 320 nm (fijando el ancho de rendija en 2 mm), lo cual permitió visualizar la reacción de reducción de la CP. La temperatura fijada para realizar las medidas fue de 25°C. Se partió de hPrx1 oxidada por H₂O₂, y la correspondiente Trx reducida por tratamiento con DTT 10 mM. Se realizó el mismo ensayo con concentraciones variables de ambas proteínas, manteniendo una relación 10:1 de Trx:Prx en jeringas separadas del *stopped flow*. El buffer de trabajo se compone de Tris 30 mM, MES 15 mM, ácido acético 15 mM, NaCl 120 mM y dtpa 100 µM, pH 7,4. Las concentraciones que se mencionan, de aquí en adelante, corresponden a las que se presentan después de la mezcla.

También fue necesario el agregado de 1 µM de catalasa en ambas jeringas para eliminar el H₂O₂ contaminante que pueda contener la mezcla y afectar nuestros resultados.

3.8.2. *Ensayo acoplado hPrx1-EcTrx1-EcTR*

Siguiendo el consumo de NADPH por *stopped flow* (fijando el ancho de rendija en 0,5 mm) se puede medir la actividad peroxidasa de la hPrx1 en su ciclo catalítico (cuando NADPH se oxida, disminuye rápidamente su absorbancia a 340 nm). Se consideró un $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. En una de las jeringas se mezclan 2 µM de EcTR, 15 µM de EcTrx1, 150 µM de NADPH y concentraciones variables de hPrx1 en buffer de reacción (Tris 30 mM, MES 15 mM, ácido acético 15 mM, NaCl 120 mM y dtpa 100 µM, pH 7,4). Las concentraciones de hPrx1 utilizadas fueron entre 0 y 8,4 µM. En la otra jeringa, se agregó 10 µM de H₂O₂ en agua.

4. Resultados y discusión

4.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

4.1.1. *Tiorredoxina 1 humana*

Fue necesario expresar y purificar la hTrx1 recombinante para poder realizar los ensayos cinéticos correspondientes.

En el panel A de la Fig. 8, se muestran los gels de la electroforesis SDS-PAGE realizada para hacer un seguimiento de todos los pasos de expresión y purificación de la proteína.

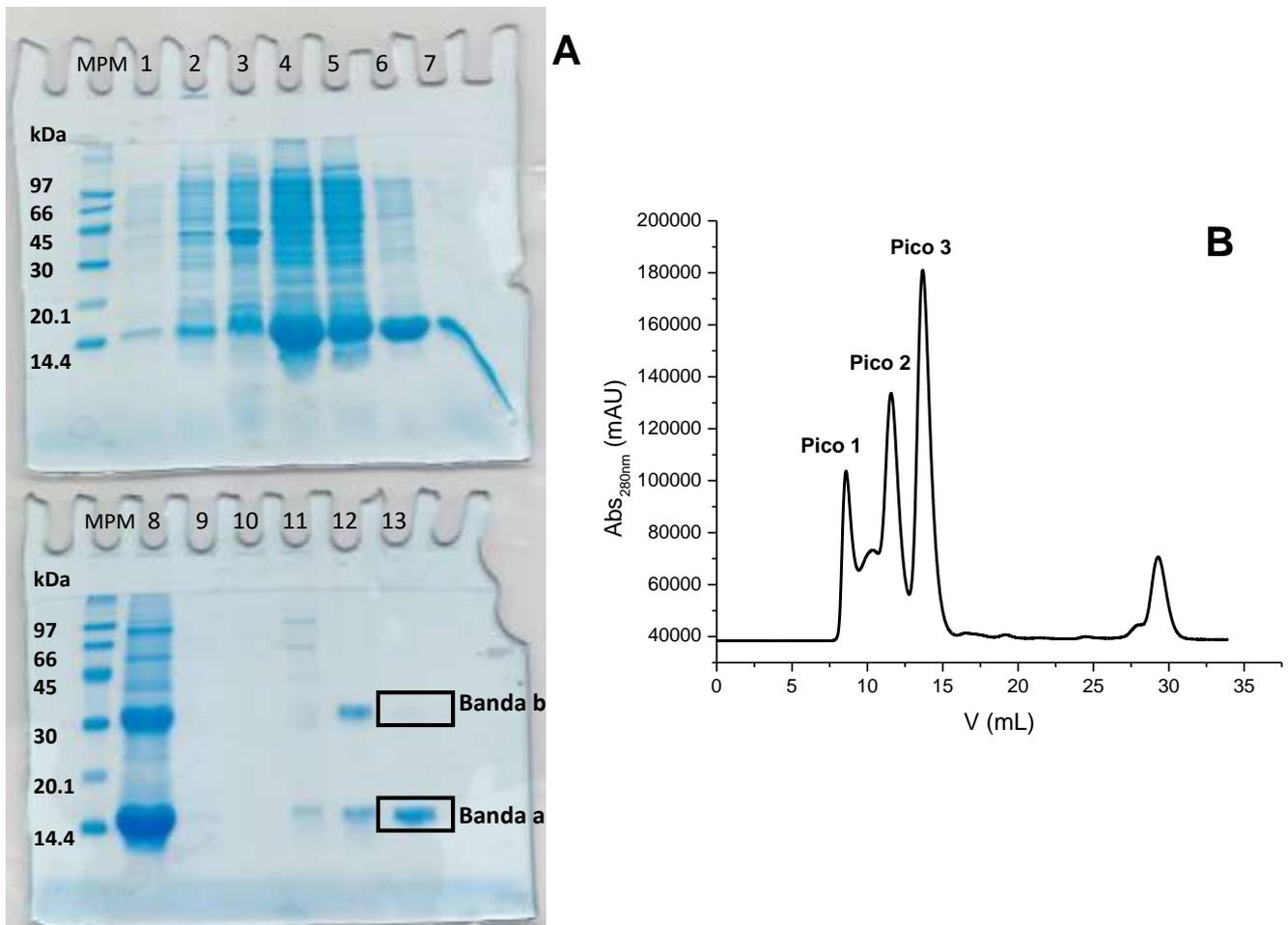


Figura 8 - Expresión y purificación de hTrx1. Panel A: Gel de electroforesis (1: Pre-inducción, 2: Post-inducción, 3: Fracción insoluble, 4: Fracción soluble, 5: Fracción no unida (FNU), 6 y 7: Lavado, 8: Pico IMAC, 9: Cola IMAC, 10: Fondo centrífugo, 11: Pico 1 SEC, 12: Pico 2 SEC, 13: Pico 3 SEC). Panel B: Cromatograma de purificación de hTrx1 mediante SEC.

Posterior a la inducción, se puede ver un aumento en la intensidad de la banda de interés, lo cual permite comprobar que hubo una correcta acción del IPTG (comparando con la pre-inducción). Como era esperado, la mayor parte de la proteína fue recuperada en la fracción soluble. Sin embargo, se puede ver presencia de la misma en la fracción insoluble. También se perdió algo de proteína en la fracción no unida de la IMAC y en los lavados. Por otro lado, se tuvo una buena purificación mediante esta cromatografía, dado que se destaca la presencia de una gran banda correspondiente a la hTrx1 en el carril 8. Cabe destacar que no se perdió proteína en el paso de concentración mediante el centrífugo, como se observa en el carril 10.

A partir de la purificación mediante la SEC, se obtuvo el cromatograma que se muestra en el panel B de la Fig. 8. Se colectaron muestras correspondientes a cada pico, para luego poder visualizarlas mediante electroforesis.

Luego de finalizar todos los pasos de purificación, se redujo la proteína (la cual se encuentra en el carril 13) con 10 mM de DTT durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se obtuvo a la hTrx1 libre de impurezas. En el carril número 13, se observan dos bandas; la banda **a** corresponde al monómero de aproximadamente 12 kDa, mientras que en la **b** aparece el dímero de hTrx1 (no se pudo reducir totalmente la proteína).

4.1.2. Tiorredoxina reductasa de E. coli

La expresión y purificación de la EcTR fue necesaria para la realización del ensayo acoplado hPrx1-EcTrx1-EcTR. En el panel A de la Fig. 9 se observan los cromatogramas obtenidos en la purificación por cromatografía de afinidad. Las fracciones utilizadas para los siguientes pasos de purificación fueron las 25 - 46, ya que son las que presentan mayor relación de absorbancia Abs_{456nm}/Abs_{280nm} .

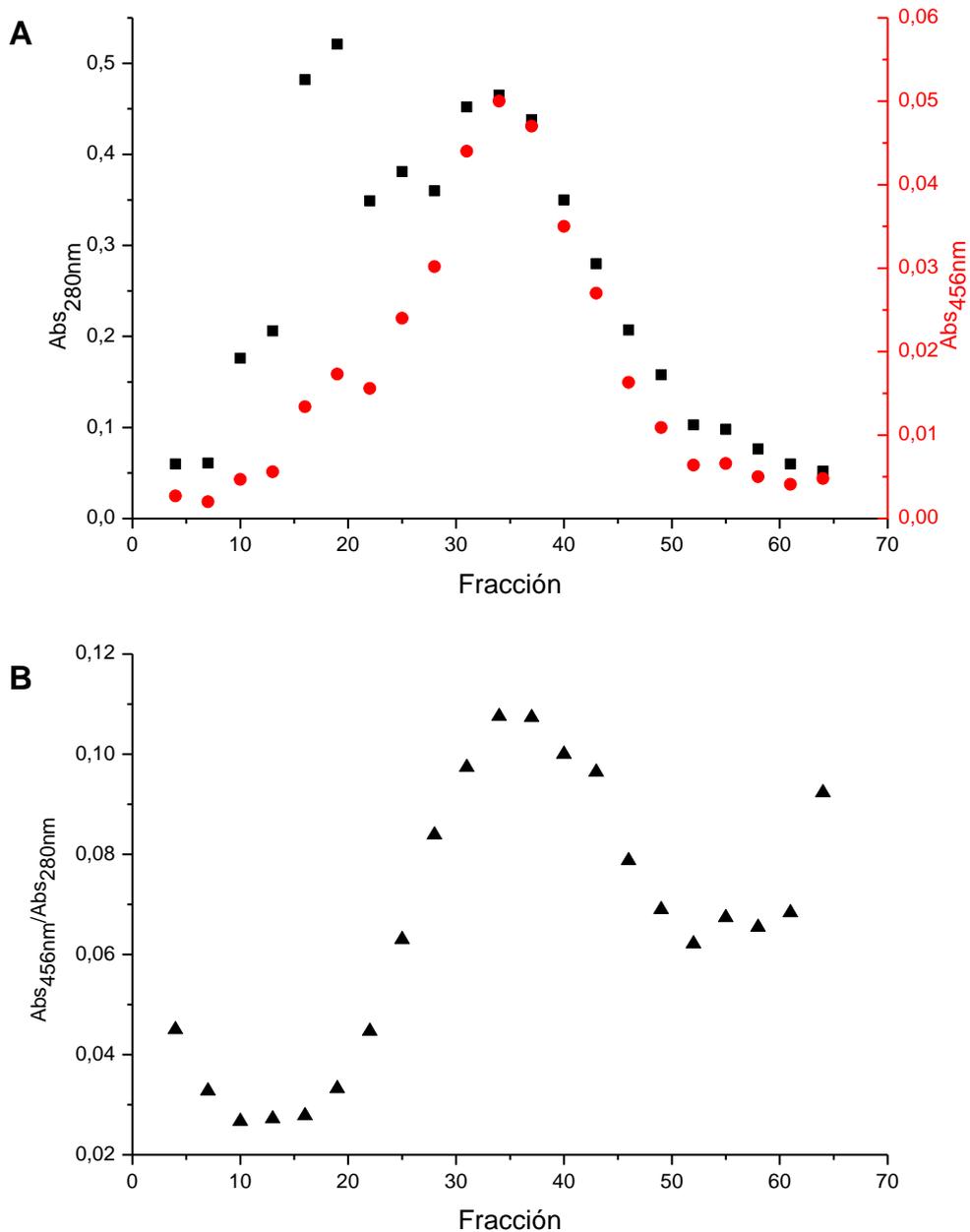


Figura 9 - Cromatogramas *EcTR* por cromatografía de afinidad. Panel A: gráfica de Abs_{280 nm} vs. N° de fracción y Abs_{456 nm} vs. N° de fracción. Panel B: Abs_{456nm}/Abs_{280nm} vs. N° de fracción.

Luego, se procedió a la purificación mediante una SEC, el cromatograma obtenido se muestra en el panel A de la Fig. 10. Las muestras correspondientes a ambos picos fueron colectadas.

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE para visualizar todos los pasos de expresión y purificación de la *EcTR*, tal como se muestra en el panel B de la Fig. 10.

En el carril 10 se detectó una banda mayor a 30 kDa que corresponde a la *EcTR* (35 kDa). Sin embargo, la misma no se encuentra del todo pura. En el carril 11, se pueden identificar impurezas que venían acompañando a nuestra proteína de interés a lo largo de la purificación.

Se verificó que la inducción funcionó bien, comparando los carriles 1 y 2. Se logra ver un aumento en la intensidad de las bandas. En los carriles 3 y 4, hay presencia de la proteína, tal como se esperaba. Por otro lado, se puede observar, que se perdió parte de la proteína en la fracción no unida de la cromatografía y en el lavado. En las fracciones 1 - 24, se detecta algo de proteína (quizás se debería haber colectado algunas fracciones más, anteriores a 25, y agregarlas a al conjunto de 25 - 46), pero como se esperaba, la banda de mayor intensidad se encuentra en las fracciones 25 - 46. En las fracciones 47 - 64 ya no se detecta proteína.

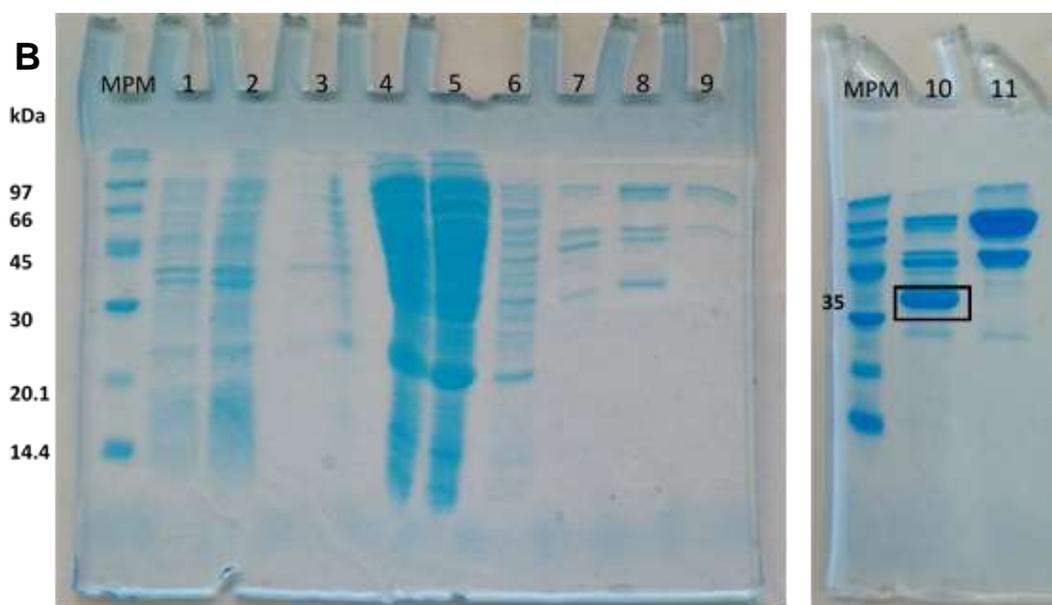
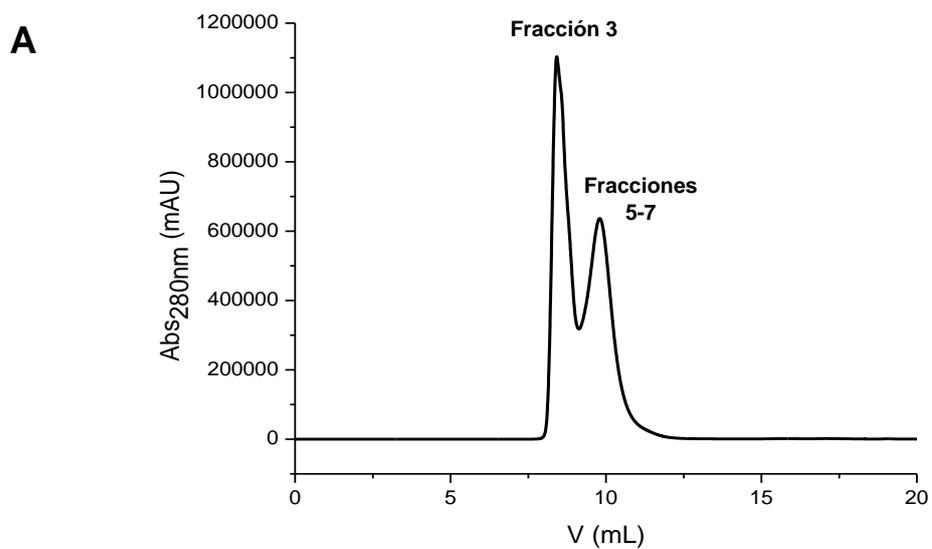


Figura 10 - Expresión y purificación de *EcTR*. Panel A: Cromatograma de purificación de *EcTR* mediante SEC. Panel B: Gel de electroforesis (1: Pre-inducción, 2: Post-inducción, 3: Sobrenadante 2^a centrifugación, 4: *EcTR* post-diálisis, 5: Fracción no unida (FNU), 6: Lavado, 7: Fracciones 1 - 24 (cromatografía de afinidad), 8: Fracciones 25 - 46 (cromatografía de afinidad), 9: Fracciones 47 - 64 (cromatografía de afinidad), 10: Fracciones 5-7 SEC, 11: Fracción 3 SEC).

4.2. Ensayos de cinética

Se estudió la cinética de reducción de la hPrx1 por parte de tres Trx: hTrx2, hTrx1 y EcTrx1.

4.2.1. *Búsqueda de metodología para estudiar la reacción de reducción de hPrx1 con hTrx2, hTrx1 y EcTrx1*

Para poner a punto la técnica se han probado distintas condiciones de trabajo para llevar a cabo los experimentos.

En la Fig. 11 se muestra un experimento de alquilación de hPrx1 reducida con N-etilmaleimida (NEM). Las condiciones de trabajo son las que se detallan a continuación. El buffer utilizado en este caso está compuesto por Tris 30 mM, MES 15 mM, ácido acético 15 mM, NaCl 120 mM y dtpa 100 μ M, pH $7 \pm 0,1$. Se trabajó a una temperatura de 25°C. La concentración de hPrx1 es de 0,5 μ M, mientras que la de NEM es de 500 μ M. Los cursos temporales son promedios de 10 repeticiones.

En el gráfico se distinguen dos condiciones diferentes, en negro se utiliza buffer tratado con catalasa inmovilizada, mientras que en rojo simplemente se utiliza amortiguador. Al comparar estas dos situaciones, se puede verificar la importancia de quitar el H₂O₂ del medio mediante la utilización de catalasa. Es necesario, ya que existe al menos un proceso adicional cuando no se ha eliminado el H₂O₂ de la solución. Esto puede observarse claramente en el inserto, donde se destaca la interferencia del H₂O₂ en la región de 0 a 0,5 s. Por un lado, en presencia de catalasa se puede observar una sola caída. Por otro lado, en el caso del ensayo realizado con buffer sin catalasa, la forma de la curva cambia; se destaca la presencia de una fase adicional (se observan dos caídas consecutivas) a causa del H₂O₂ que se encuentra presente en el amortiguador. Esto permite demostrar que es importante quitar el H₂O₂ de las soluciones cuando se desea trabajar con Prx reducidas. Por lo tanto, en nuestro caso fue necesario incluir catalasa junto con los reactivos, para que los resultados no se vean afectados.

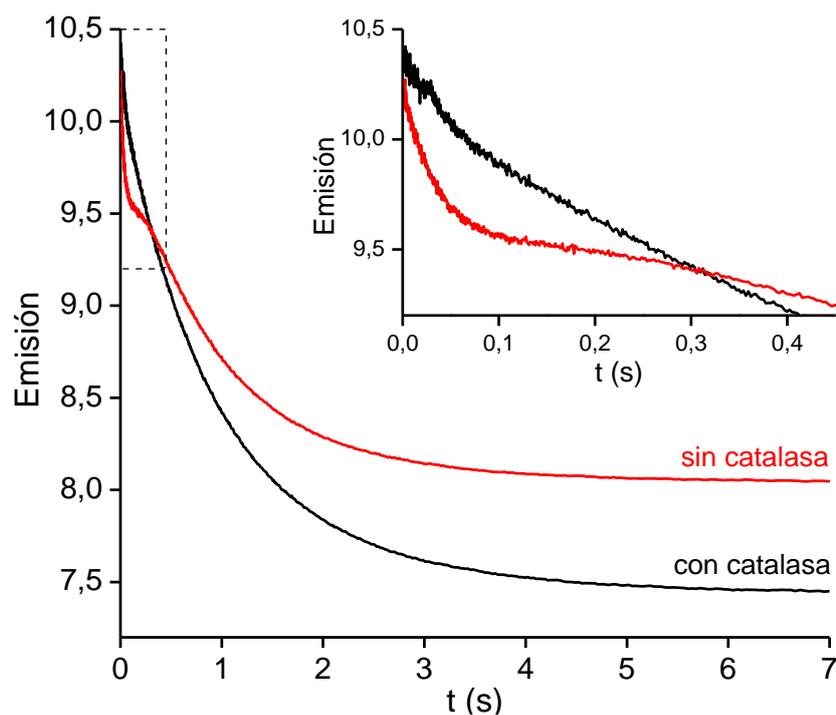


Figura 11 - Alquilación de hPrx1 reducida con N-etilmaleimida (NEM). En rojo: con buffer, y en negro: buffer tratado con catalasa inmovilizada. Buffer de trabajo: Tris 30 mM, MES 15 mM, ácido acético 15 mM, NaCl 120 mM y dtpa 100 μ M, pH $7 \pm 0,1$. Temperatura de 25°C . $[\text{hPrx1}] = 0,5 \mu\text{M}$. $[\text{NEM}] = 500 \mu\text{M}$. Los cursos temporales son promedios de 10 repeticiones.

Se puede ver también, que existe una menor alquilación en ausencia de catalasa; al final del curso temporal no se alcanza el mismo valor de emisión que cuando se realiza el experimento con catalasa inmovilizada. Ocurre una menor alquilación en ausencia de catalasa, debido a que una parte de la hPrx1 ya se ha oxidado por el H_2O_2 contaminante, y por ende no puede alquilarse.

Inicialmente, los experimentos de reducción de Prx con Trx fueron realizados utilizando la Trx reducida y la hPrx1 oxidada en el amortiguador de trabajo, en ausencia de catalasa y con una relación 10:1 de Trx:Prx. Los resultados obtenidos mostraron señales de procesos consecutivos demasiado complejos y poco reproducibles, como se observa en la Fig. 12. Se pueden observar muchas variaciones temporales de la fluorescencia. Por lo tanto, es necesario visualizar los cursos temporales en escala logarítmica, la cual permite separar mejor los procesos exponenciales, sobre todo los que ocurren a tiempos cortos.

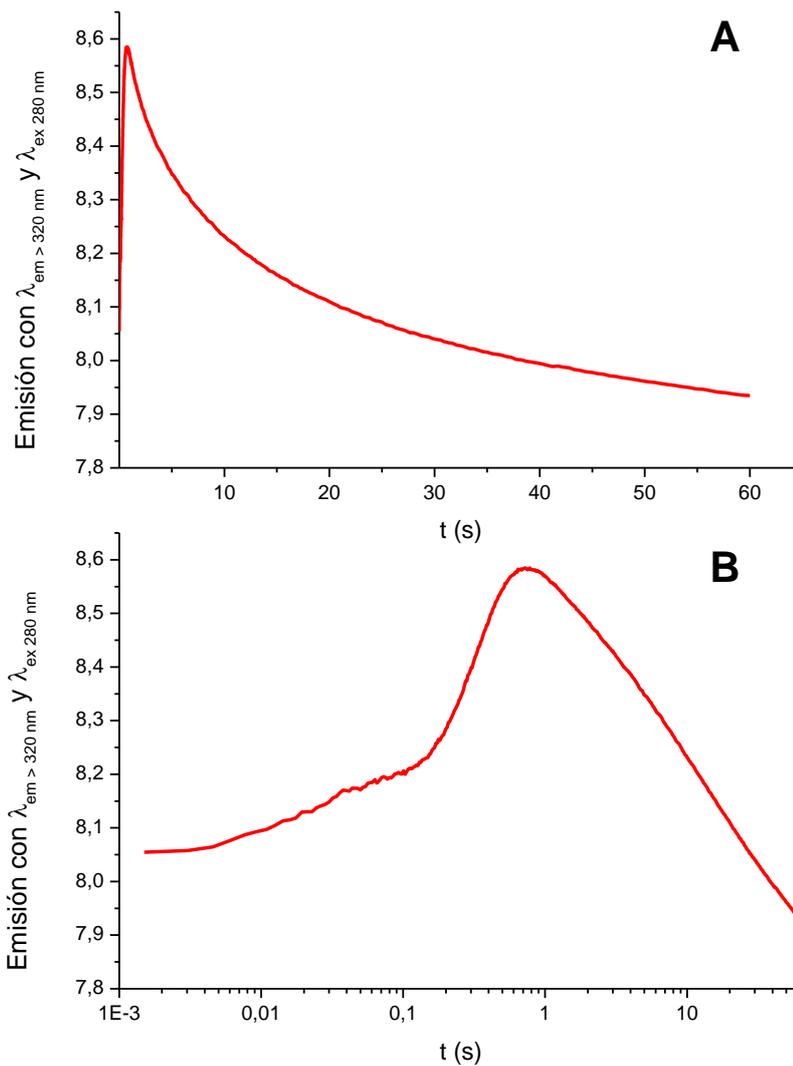


Figura 12 - Gráfico de intensidad de fluorescencia vs. t, para una concentración de 7,5 μM de hTrx2. Relación Trx:Prx 10:1, sin catalasa. Los resultados provienen del promedio de 15 corridas. Panel A: escala lineal, panel B: escala logarítmica.

En la Fig. 13 se encuentran los gráficos obtenidos de los experimentos control sin hPrx1, en presencia y ausencia de catalasa, con una concentración de hTrx2 de 2 μM .

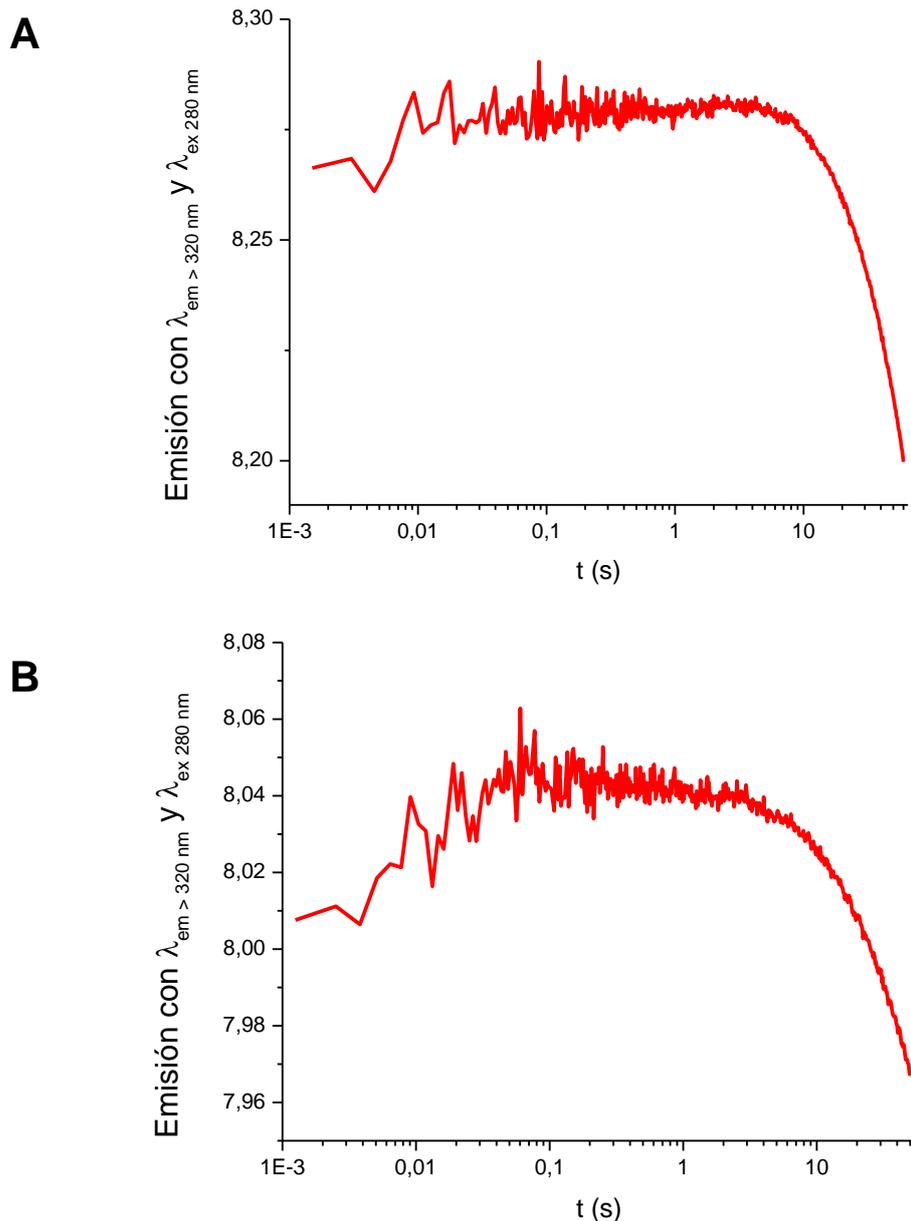


Figura 13 - Curso temporal para el control sin hPrx1 y una concentración de hTrx2 de 2 μM (intensidad de fluorescencia vs. t). Panel A: con 1 μM de catalasa. Panel B: sin catalasa.

El comportamiento de ambas gráficas control es similar. Sin embargo, en el caso en que se encuentra presente la catalasa, se destaca un leve aumento en la intensidad de fluorescencia en la región de 0 a 0,1 s, mientras que cuando está ausente, esto no ocurre. Luego, se puede observar un descenso mucho más lento en la intensidad de fluorescencia. Es importante destacar, que esta caída se detecta en todos los experimentos realizados, y en general se asocia a la fotólisis de los fluoróforos (Trp). También es importante resaltar que la variación de fluorescencia es muy pequeña, en comparación con lo que se puede ver en

los resultados de los experimentos más adelante. Por lo tanto, se concluye que la catalasa no reacciona con la Trx y no interfiere con los resultados.

También se intentó realizar experimentos, agregando 0,2 μM de catalasa en el buffer de trabajo y en ambas proteínas (hPrx1 y hTrx1), teniendo en cuenta una relación Trx:Prx de 10:1. El resultado obtenido se detalla en la Fig. 14. Se evidenció que esta concentración de catalasa es la mínima posible, a la cual se elimina el H_2O_2 presente sin interferir con el ensayo (Fig. 12).

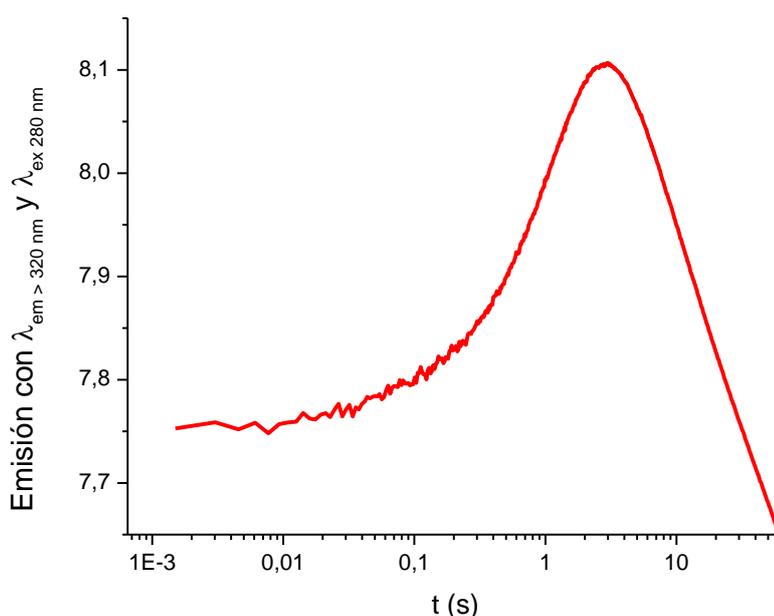


Figura 14 - Gráfico de intensidad de fluorescencia vs. t, para una concentración de 7 μM de hTrx1. Relación Trx:Prx 10:1, 0,2 μM catalasa en el buffer de trabajo y en ambas proteínas. Los resultados provienen del promedio de 15 corridas.

Otra forma de abordar el problema, se basa en la secuencia de reacciones de la Fig. 1 (oxidación \rightarrow resolución \rightarrow reducción), y en que la oxidación y la resolución producen cambios de fluorescencia opuestos (Fig. 15).

En la Fig. 15 se pueden distinguir los espectros de los estados redox. El gráfico fue elaborado analizando los cursos temporales para cada longitud de onda de los experimentos realizados mediante *stopped flow*. El espectro del sulfénico (rojo) es muy distinto al del disulfuro (azul) y el tiol (negro), los cuales se asemejan entre sí.

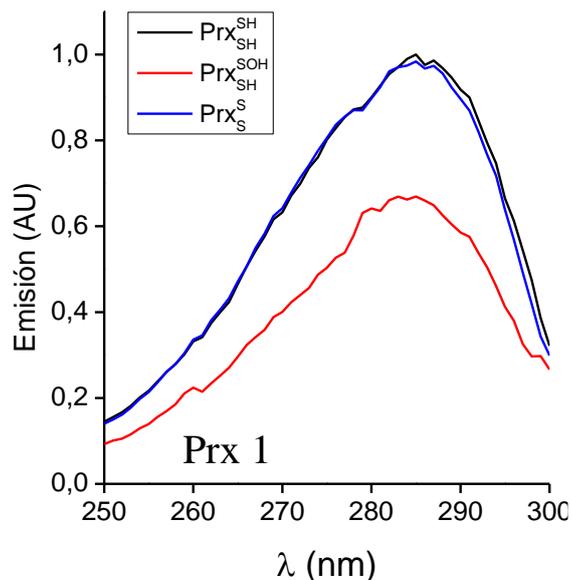


Figura 15 - Espectros de emisión de los intermediarios del ciclo catalítico de Prx1 humana. Buffer de trabajo: Tris 30 mM, MES 15 mM, ácido acético 15 mM, NaCl 120 mM y dtpa 100 μ M, pH $7 \pm 0,1$. Temperatura de 25°C. [hPrx1] = 0,5 μ M. [H₂O₂] = 1 μ M. Los cursos temporales son promedios de 10 repeticiones.

En el Laboratorio de Físicoquímica Biológica y Enzimología se han realizado algunos experimentos con hPrx2, donde en el protocolo se incluye a la Trx reducida en una jeringa y el H₂O₂ junto con la hPrx2 oxidada en la otra, que luego son mezcladas en el *stopped flow*. En este experimento, la hPrx2 se encuentra en defecto mientras que la Trx y el H₂O₂, en exceso (Villar Rodríguez *et al.*, 2020).

En este caso, fue probado un protocolo donde se incluía H₂O₂ junto con la hPrx1 oxidada y la Trx reducida en la otra jeringa, para intentar ver la oxidación y la resolución. En dicho experimento, como la hPrx1 cuenta con ambos sustratos, puede dar la vuelta completa al ciclo catalítico reiteradas veces, comenzando por la reacción de reducción (reacción 3, Fig. 1), para que luego ocurra la oxidación y resolución. En este punto, no hay presencia de hPrx1 disponible para oxidarse y tampoco hay ácido sulfénico para que pueda ser resuelto.

Mediante la intensidad de fluorescencia es posible visualizar el pasaje de tior a sulfénico (oxidación o reacción 1) o de sulfénico a disulfuro (resolución o reacción 2). En la reacción 1 la fluorescencia disminuye, mientras que en la 2, la

fluorescencia aumenta. Por otro lado, no es posible ver directamente el pasaje de disulfuro a tiol (reducción o reacción 3), ya que este cambio no tiene asociada una variación en la intensidad de fluorescencia (el cambio de fluorescencia es apenas perceptible, Fig. 15).

Las velocidades de las reacciones 1 y 3 dependen de cuánto sustrato se emplea, dado que son reacciones bimoleculares. Sin embargo, la reacción 2 es unimolecular, y su velocidad no depende de las concentraciones de H₂O₂ o Trx utilizadas. Dado que ocurre el ciclo completo varias veces, se pueden ver las reacciones más lentas.

La velocidad del descenso de fluorescencia se relaciona con la reacción más lenta en la secuencia de reacciones 3 y 1, y el aumento de fluorescencia obedece a la reacción 2. Existen dos requisitos que establecen los límites en la velocidad. Para poder visualizar a la reacción de interés (reducción), ésta debe ser más lenta que la reacción 1. Para poder ver el cambio en la intensidad de fluorescencia de la secuencia de 3 y 1, tiene que ser más rápida que la reacción 2 y permitir que se acumule el ácido sulfénico. Para poder visualizar al ácido sulfénico, es necesario que la reacción 2 sea la más lenta de todas.

En la reacción 1, con la hPrx1, según los datos expresados en la Tabla 1, la constante de velocidad aparente de oxidación ($k_{ap\ ox}$), con 2 μ M de H₂O₂ vale:

$$k_{ap\ ox} = [H_2O_2] \times k_{H_2O_2}$$

$$k_{ap\ ox} = 2 \times 10^{-6} \text{ M} \times 1,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$k_{ap\ ox} = 220 \text{ s}^{-1}$$

La constante de velocidad de la reacción de resolución (k_{res}), vale 12,9 s^{-1} (Portillo-Ledesma *et al.*, 2018). Existe entonces un intervalo muy pequeño entre 220 s^{-1} y 12,9 s^{-1} . Teniendo en cuenta el valor de 12,9 s^{-1} como límite inferior del intervalo entre ambas constantes, se realizan los cálculos para k_{red} como se describe a continuación. Se considera 2 μ M de Trx como una condición experimental específica, que puede ser variable.

$$[Trx] \times k_{red} = 12,9 \text{ s}^{-1}$$

$$2 \times 10^{-6} \text{ M} \times k_{red} = 12,9 \text{ s}^{-1}$$

$$k_{\text{red}} = 12,9 \text{ s}^{-1/2} \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$k_{\text{red}} = 6,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

Para poder visualizarla, k_{red} debería valer más de $6,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, o bien, la concentración de Trx debería ser mayor. El valor de k_{red} es de un orden de magnitud mayor, respecto a los datos reportados, por ejemplo, de la reacción de la hPrx2 con la EcTrx1 ($k_{\text{red}} = 2,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Manta *et al.*, 2009). Por otro lado, es del mismo orden que el dato informado para la reacción de la Prx5 con la hTrx2, ($k_{\text{red}} = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Tabla 1). El valor calculado de k_{red} , es mayor que los reportados, lo cual implica que se deberían utilizar concentraciones mayores de Trx.

Según la Tabla 1, se pueden realizar los cálculos análogos a los cálculos de la hPrx1, para la hPrx2:

$$k_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$k_{\text{ap ox}} = [\text{H}_2\text{O}_2] \times k_{\text{H}_2\text{O}_2}$$

$$k_{\text{ap ox}} = 2 \times 10^{-6} \text{ M} \times 1,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$k_{\text{ap ox}} = 320 \text{ s}^{-1}$$

$$k_{\text{res}} = 0,25 \text{ s}^{-1}$$

En este caso, la k_{res} es mucho más lenta y proporciona una mayor flexibilidad en cuanto a las condiciones de Trx que se pueden utilizar. El intervalo de $320 \text{ s}^{-1} - 0,25 \text{ s}^{-1}$ es mayor que para hPrx1.

El límite inferior del intervalo es: $0,25 \text{ s}^{-1}$.

$$[\text{Trx}] \times k_{\text{red}} = 0,25 \text{ s}^{-1}$$

$$2 \times 10^{-6} \text{ M} \times k_{\text{red}} = 0,25 \text{ s}^{-1}$$

$$k_{\text{red}} = 0,25 \text{ s}^{-1/2} \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$k_{\text{red}} = 1,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

Se puede notar que, para la hPrx2, la constante de velocidad que puede observarse ($k_{\text{red}} > 1,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) está dentro de lo esperado, por ende, este experimento funciona de manera eficiente con la hPrx2. Sin embargo, no es

práctico realizarlo con la hPrx1, este proceso es más rápido, y no es fácil verlo como en el caso de la hPrx2 (Villar Rodríguez *et al.*, 2020). Además, una concentración tan elevada de Trx, aportaría una mayor intensidad fluorescencia, como se ve en un experimento más adelante (Fig. 16). Incluso no sería posible contar con tanta concentración de proteína disponible. La concentración estimada de Trx en células humanas nucleadas es de aproximadamente 4,1 μM (Selvaggio *et al.*, 2018).

Partiendo de otro enfoque, se realizó un experimento que tenía como objetivo observar el cambio de fluorescencia asociado a la oxidación de la EcTrx1. Esta metodología sólo sería útil en el caso de la EcTrx1, dado que las Trx humanas tienen un cambio de fluorescencia asociado a la oxidación, muy pequeño.

En el ensayo se emplearon concentraciones de hPrx1 oxidada variables (en exceso) junto con 1 μM de H_2O_2 en la misma jeringa, y se mantuvo fija una concentración de EcTrx1 reducida en defecto (0,2 μM). En la siguiente imagen (Fig. 16), se observa el gráfico obtenido.

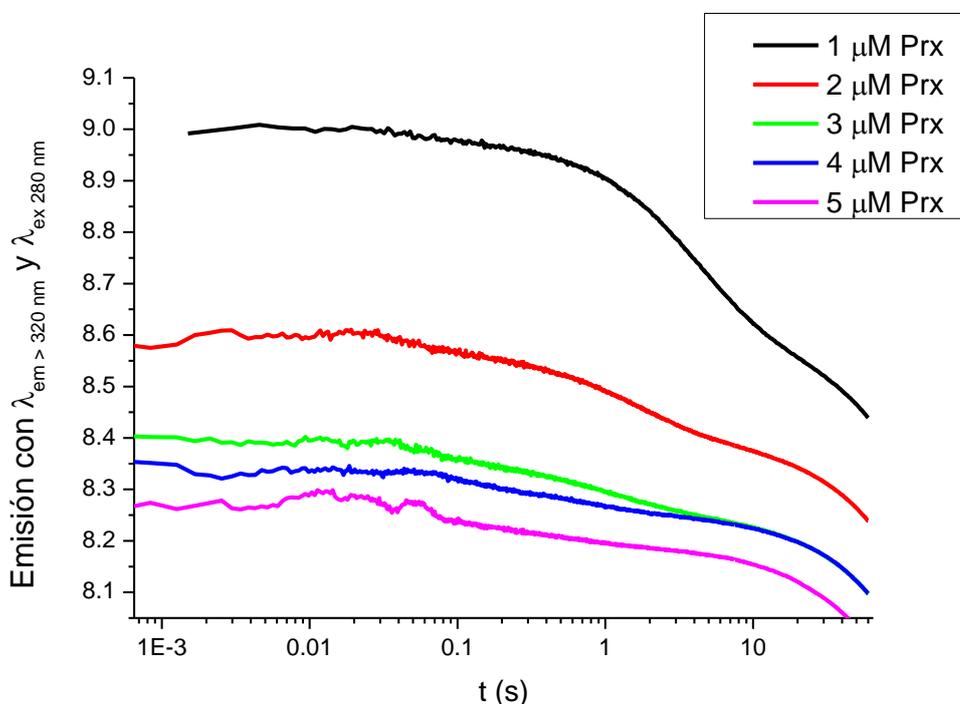


Figura 16 - Gráfico de intensidad de fluorescencia vs. t, para distintas concentraciones en exceso de hPrx1 junto con 1 μM de H_2O_2 y una concentración fija de EcTrx1 igual a 0,2 μM . Los resultados provienen del promedio de 15 corridas.

En este caso, existe otra desventaja; la variación en la intensidad de fluorescencia (ΔF) es constante, pero la intensidad de fluorescencia total es cada vez mayor. Por lo tanto, en términos relativos, se estaría viendo un cambio cada vez menor. La hPrx1 es más fluorescente que la EcTrx1, por eso se observa que, a altas concentraciones, el curso temporal se vuelve cada vez más horizontal y genera más ruido (la señal es grande, pero ΔF es constante).

4.2.2. Conclusión de los abordajes propuestos

A partir de los resultados de los experimentos de prueba mencionados anteriormente, no fue posible realizar un buen ajuste ni obtener constantes de velocidad reproducibles. Por tal motivo, no fueron tomados en cuenta y fue necesario buscar una solución alternativa.

Finalmente se decidió incluir en todos los casos, el agregado de 1 μM de catalasa para eliminar el H_2O_2 contaminante que pueda contener la mezcla, y que los resultados no se vean alterados. Se emplearon concentraciones variables de ambas proteínas, manteniendo una relación 10:1 de Trx:Prx. Este procedimiento fue el que funcionó de manera más eficiente, luego de varios intentos y modificaciones del protocolo.

Es importante destacar que, a pesar de que fueron realizados diversos experimentos de los cuales no se pudieron obtener constantes de velocidad, los mismos fueron útiles para entender mejor cómo funciona el sistema de estudio.

4.2.3. Ajuste de los cursos temporales

Las gráficas obtenidas de los cursos temporales se ajustaron a una suma de exponenciales, más una recta, según la ecuación 1.

$$\sum_1^n (\text{Amp}_n \times (\exp(-k_n t))) + A_{inf} + bt \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde Amp_n es la amplitud de la n-ésima exponencial; k_n es la constante observada asociada a dicha exponencial; A_{inf} corresponde a la fluorescencia a tiempo final; y b es la pendiente de la fase recta. Se probaron sumas de una,

dos, tres y cuatro exponenciales y se decidió cuál sería la más adecuada según la bondad del ajuste. A partir de dicho ajuste, se obtuvieron las constantes observadas de primer orden (k_{obs}) correspondientes a cada concentración de Trx. Con estos datos se realizaron gráficas de k_{obs} vs. concentración de Trx, para obtener a partir de la pendiente del ajuste lineal, la constante de velocidad.

4.2.4. Determinación de parámetros cinéticos de la reducción de hPrx1

Los resultados de los ensayos de reducción de la hPrx1 por parte de las distintas Trx empleadas fueron los que se muestran a continuación:

Tiorredoxina 2 humana

En la Fig. 17 se muestra la intensidad de fluorescencia emitida para las diferentes concentraciones de hTrx2 con las que se trabajó (2, 4, 5 y 7,8 - 7,4 y 15 μM). Los cursos temporales se muestran en escala logarítmica, ya que esto permite apreciar más fácilmente el número de exponenciales ascendentes o descendentes que puedan existir.

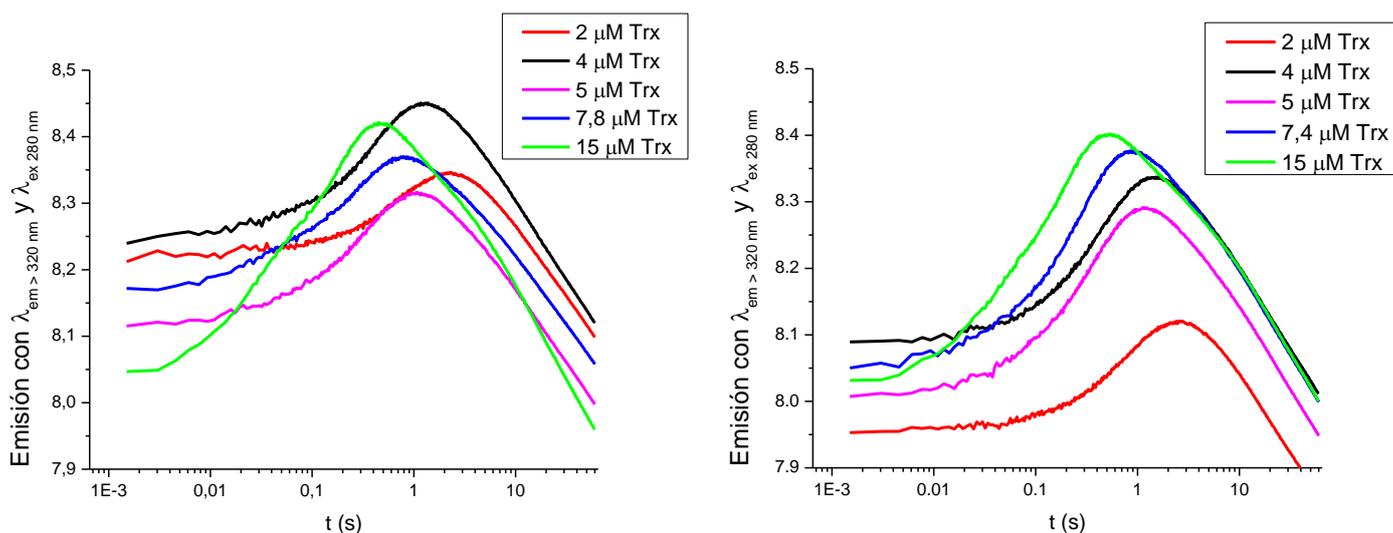


Figura 17 - Gráfico de intensidad de fluorescencia vs. t, para distintas concentraciones de hTrx2. Experimentos de días diferentes. Relación Trx:Prx 10:1, 1 μM catalasa. Los resultados provienen del promedio de 15 corridas.

En la Fig. 18 se observa el curso temporal para una concentración ejemplo de 5 μM de hTrx2. Se puede ver, en primer lugar, un aumento leve de la fluorescencia, una segunda región de aumento más marcado, y por último un descenso que finaliza con una pendiente lineal. A dicho curso temporal se le realizó un ajuste de triple exponencial más recta.

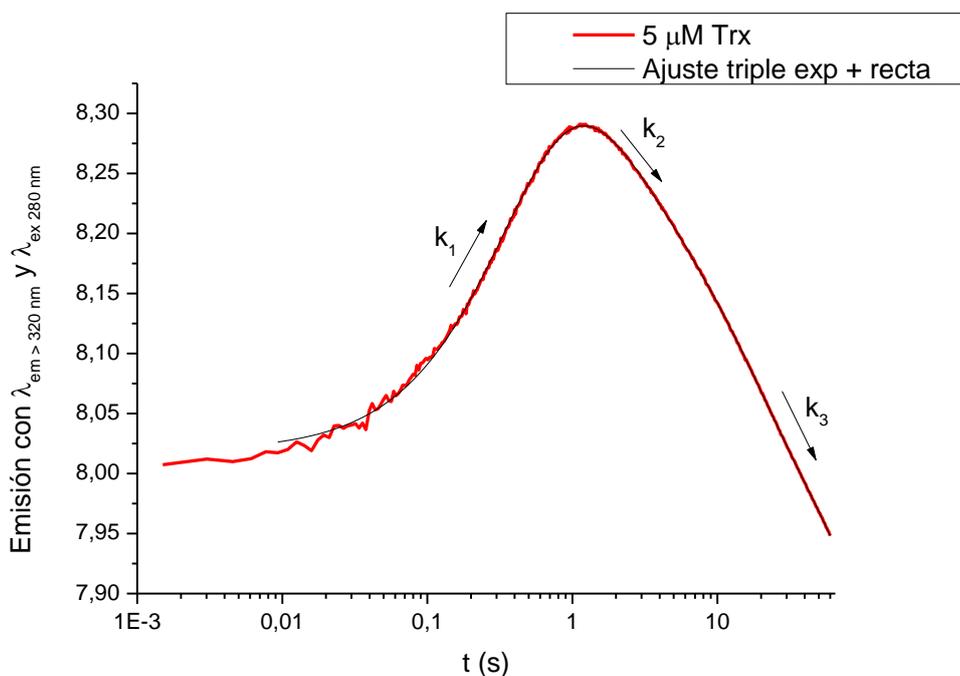


Figura 18 - Curso temporal para una concentración de hTrx2 de 5 μM (intensidad de fluorescencia vs. t). Concentración de hPrx1 de 0,5 μM , 1 μM de catalasa. Los resultados provienen del promedio de 15 corridas. Parámetros obtenidos a partir del ajuste: $k_1 = 2,55 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 0,45 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$, $k_3 = 0,067 \pm 0,003 \text{ s}^{-1}$.

Luego de ajustar las gráficas de los cursos temporales, se obtuvieron las constantes observadas de primer orden (k_{obs}) correspondientes a cada concentración de hTrx2. En la Fig. 19 se muestran las tres constantes observadas obtenidas para cada una de las concentraciones de hTrx2 utilizadas en los experimentos. En este caso, se pudo registrar tres k_{obs} distinguibles con distinta pendiente, las cuales corresponden a tres etapas diferentes del proceso.

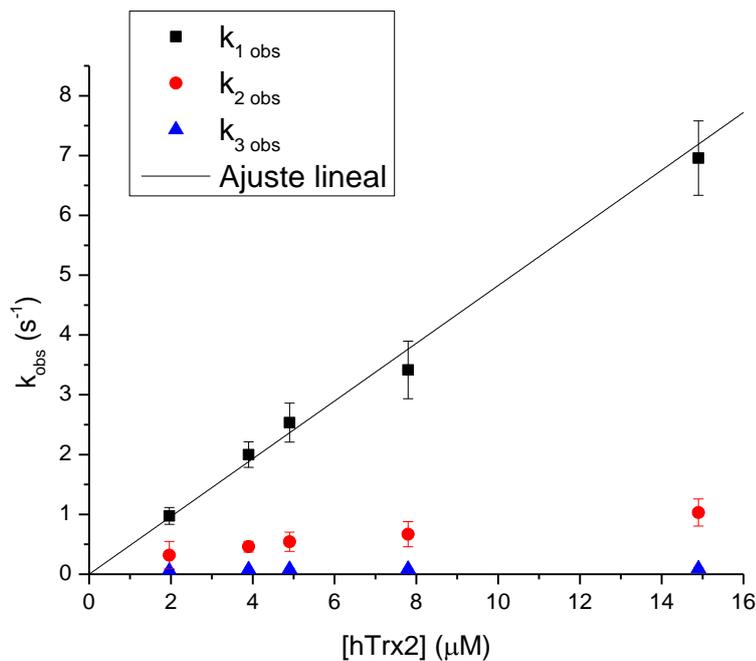
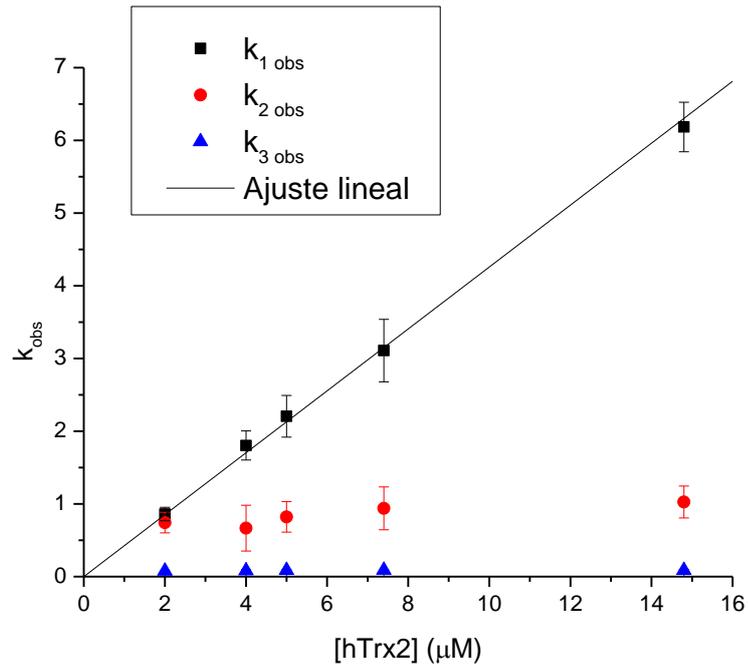


Figura 19 - Gráfico de k_{obs} vs. [hTrx2]. El ajuste lineal de k_{1obs} tiene una pendiente de $(4,3 \pm 0,6) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (panel superior) y $(4,8 \pm 0,1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (panel inferior).

Observando la tendencia que presenta la k_{1obs} del experimento para las distintas concentraciones de hTrx2, se puede ver que es posible realizar un ajuste lineal. A partir de la pendiente del gráfico se obtuvo una constante de velocidad de $4,3 - 4,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Tiorredoxina 1 humana

En la Fig. 20 se puede ver la intensidad de fluorescencia emitida para las diferentes concentraciones de hTrx1 con las que se trabajó: 2, 4, 5 y 5,5 μM . La tendencia de las curvas se presenta como un leve aumento de fluorescencia, seguido por un aumento más marcado, y finaliza con un descenso con pendiente recta, para todas las concentraciones de Trx utilizadas. Tanto en las concentraciones de 2 como 5,5 μM , luego del aumento inicial, se puede distinguir un sutil descenso de la intensidad de fluorescencia. Al graficar el curso temporal de una concentración ejemplo de 5 μM (Fig. 21), se observa un comportamiento similar al que ocurre en el experimento con hTrx2.

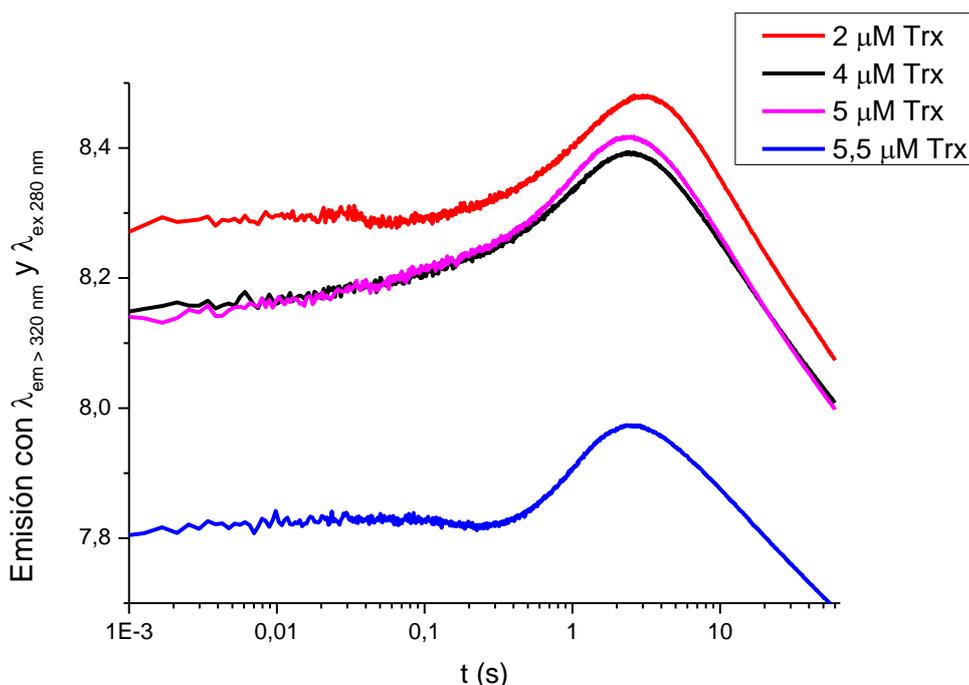


Figura 20 - Gráfico de intensidad de fluorescencia vs. t, para distintas concentraciones de hTrx1. Relación Trx:Prx 10:1, 1 μM catalasa. Los resultados provienen del promedio de 15 corridas.

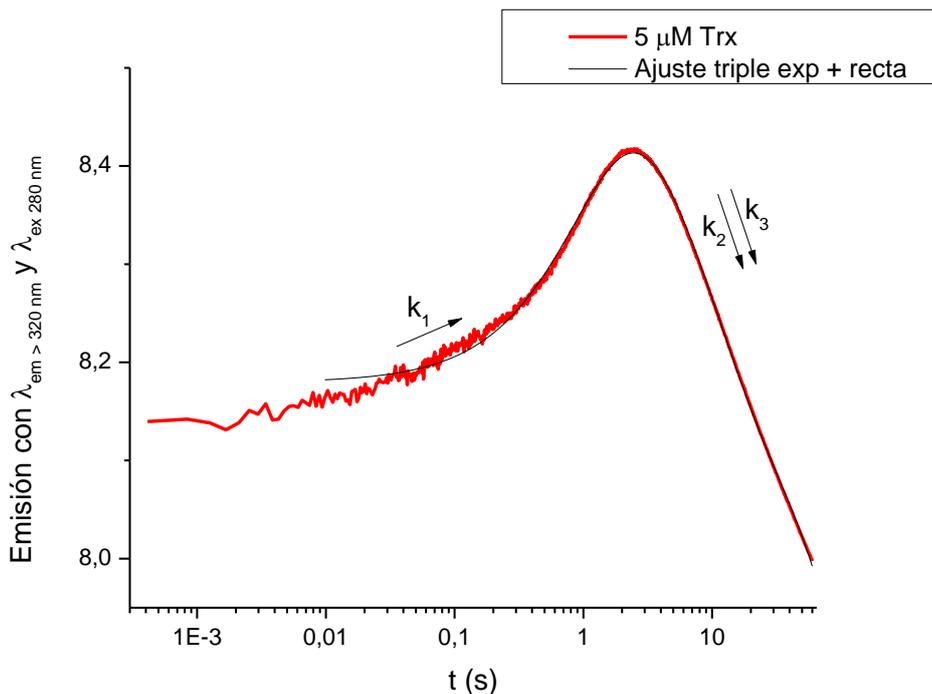


Figura 21 - Curso temporal para una concentración de hTrx1 de 5 μM (intensidad de fluorescencia vs. t). Concentración de hPrx1 de 0,5 μM , 1 μM de catalasa. Parámetros obtenidos a partir del ajuste: $k_1 = 1 \pm 3 \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 1 \pm 3 \text{ s}^{-1}$, $k_3 = 0,107 \pm 0,003 \text{ s}^{-1}$.

Luego de ajustar las gráficas obtenidas de los cursos temporales a triple exponencial más recta según la ecuación 1, se obtuvieron las constantes observadas de primer orden correspondientes a cada concentración de hTrx1. En la Fig. 22 se destaca la tendencia de las tres k_{obs} para cada una de las concentraciones de hTrx1 utilizadas en los experimentos.

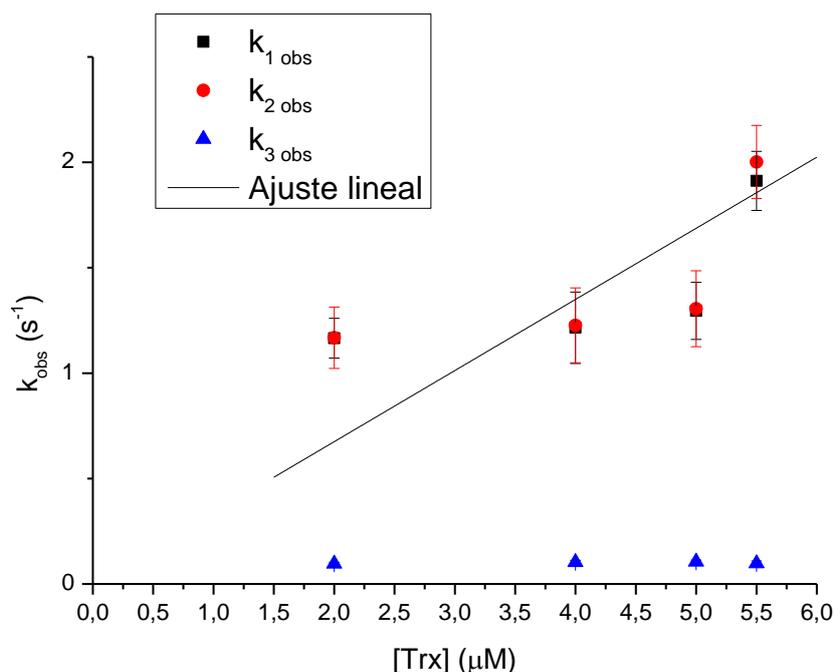


Figura 22 - Gráfico de k_{obs} vs. [hTrx1]. El ajuste lineal de k_{1obs} tiene una pendiente de $(3,4 \pm 0,5) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Para k_{1obs} y k_{2obs} se manifiesta en ambos casos un comportamiento muy similar, lo que podría indicar que sólo existen dos etapas correspondientes a este proceso de reducción de la hPrx1 por parte de la hTrx1. Por lo tanto, se podría pensar que los datos se ajustan mejor a doble exponencial más recta, como se muestra más adelante (Fig. 23).

A partir de la pendiente positiva de k_{1obs} (Fig. 22), se obtuvo una constante de velocidad de $3,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

En la Fig. 23 se puede observar nuevamente el curso temporal de una concentración ejemplo de 5 μM de hTrx1, pero en este caso, con un ajuste de doble exponencial más recta.

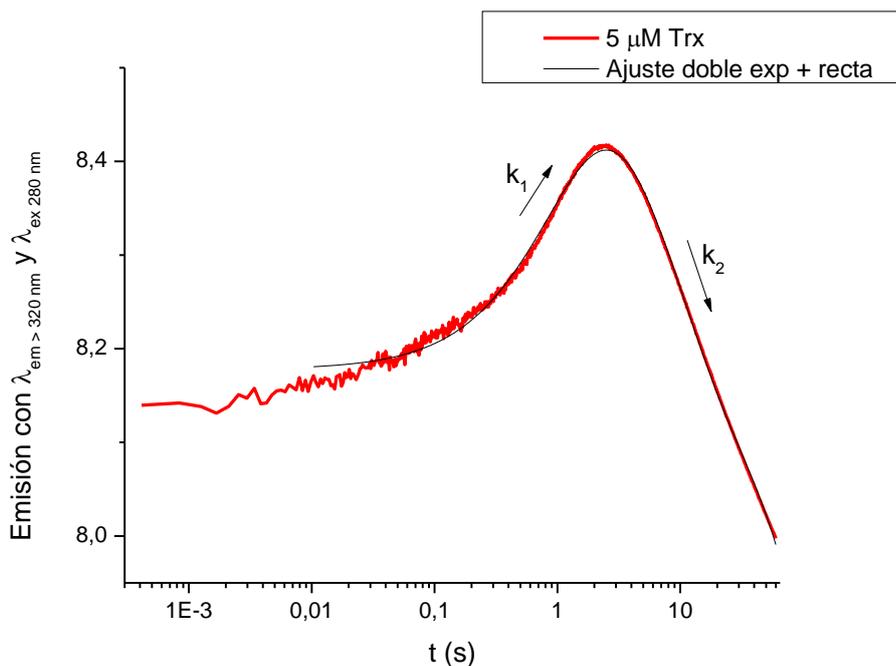


Figura 23 - Curso temporal para una concentración de hTrx1 de 5 μM (intensidad de fluorescencia vs. t). Concentración de hPrx1 de 0,5 μM , 1 μM de catalasa. Parámetros obtenidos a partir del ajuste: $k_1 = 0,901 \pm 0,008 \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 0,114 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$.

Luego de ajustar nuevamente los datos de cada concentración a la que se trabajó, se graficaron las constantes observadas obtenidas (Fig. 24).

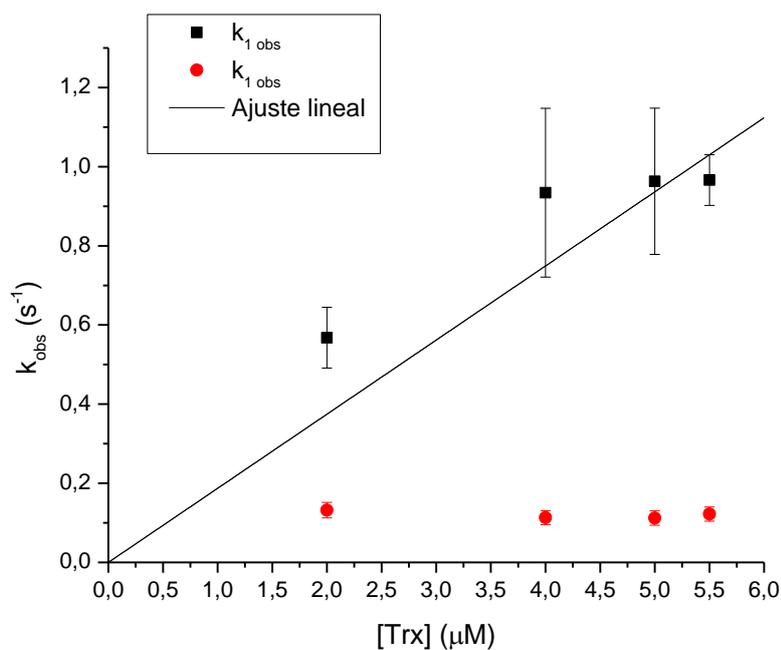


Figura 24 - Gráfico de k_{obs} vs. [hTrx1]. El ajuste lineal de $k_{1\text{obs}}$ tiene una pendiente de $(1,9 \pm 0,2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Considerando la pendiente del ajuste lineal de k_{1obs} (Fig. 24), se obtuvo un valor correspondiente a la constante de velocidad de $1,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Tiorredoxina 1 de *E. coli*

En la Fig. 25 se muestra la intensidad de fluorescencia emitida para las diferentes concentraciones de *EcTrx1* con las que se trabajó (4, 5 y 7,5 y 15 μM). En este caso, el comportamiento registrado de los gráficos fue diferente. Para esta Trx, la tendencia registrada se puede separar en dos regiones; una disminución pequeña en la intensidad de fluorescencia, y luego una etapa de descenso de mayor intensidad.

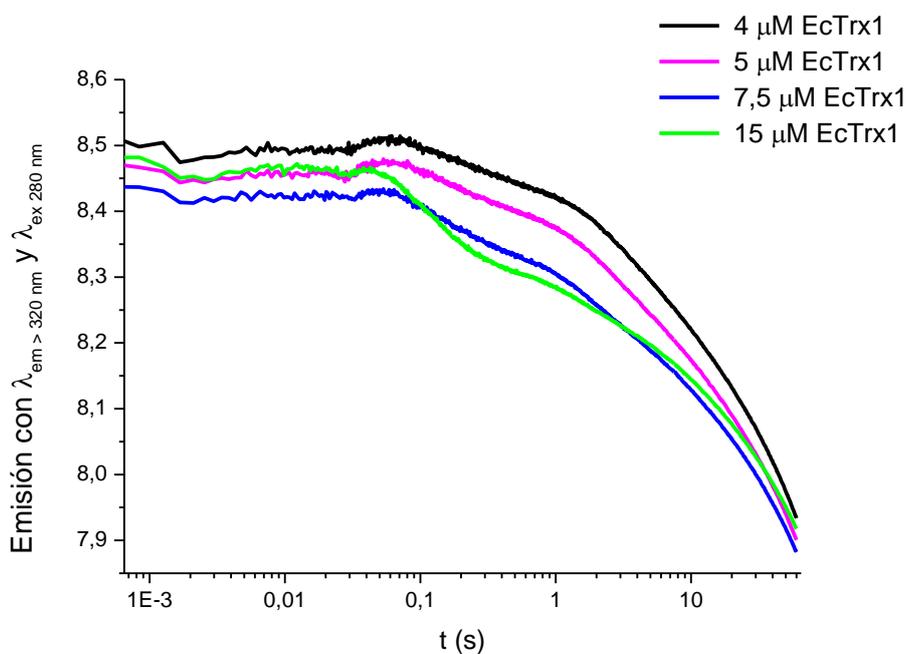


Figura 25 - Gráfico de intensidad de fluorescencia vs. t, para distintas concentraciones de *EcTrx1*. Relación Trx:Prx 10:1, 1 μM catalasa. Los resultados provienen del promedio de 15 corridas.

En la Fig. 26, se puede observar más en detalle, el curso temporal para una concentración ejemplo de 5 μM de *EcTrx1*, con su correspondiente ajuste a triple exponencial más recta.

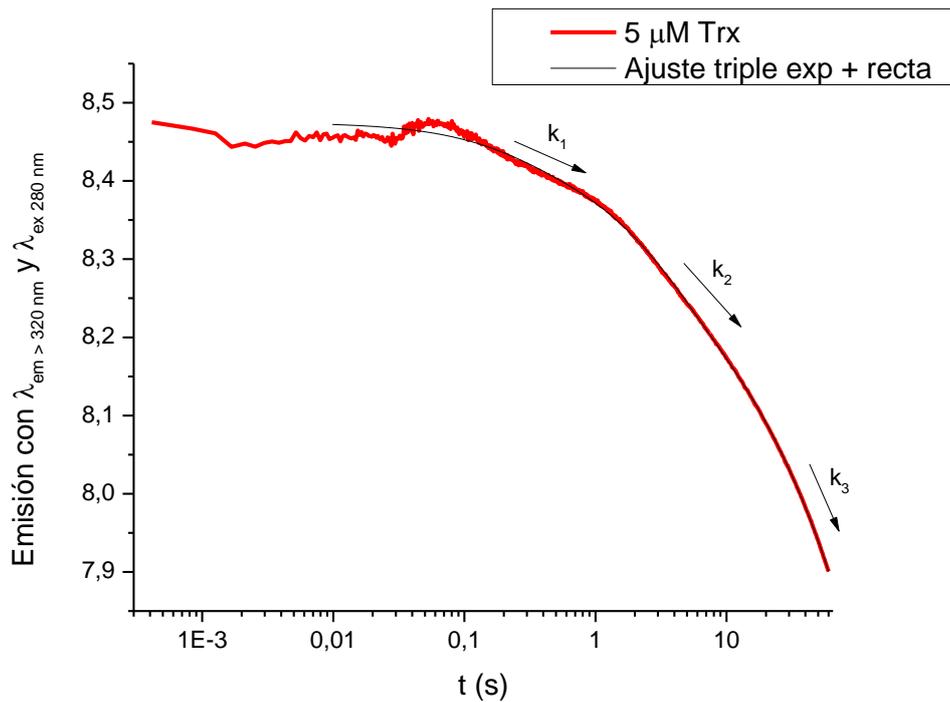


Figura 26 - Curso temporal para una concentración de *EcTrx1* de 5 μM (intensidad de fluorescencia vs. t). Concentración de hPrx1 de 0,5 μM, 1 μM de catalasa. Parámetros obtenidos a partir del ajuste: $k_1 = 4,0 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 0,35 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$, $k_3 = 0,06 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$.

En la Fig. 27 se muestran las tres constantes observadas obtenidas para cada una de las concentraciones de *EcTrx1* utilizadas en los experimentos. En este caso, también pueden distinguirse tres k_{obs} con diferente pendiente, correspondientes a cada una de las etapas.

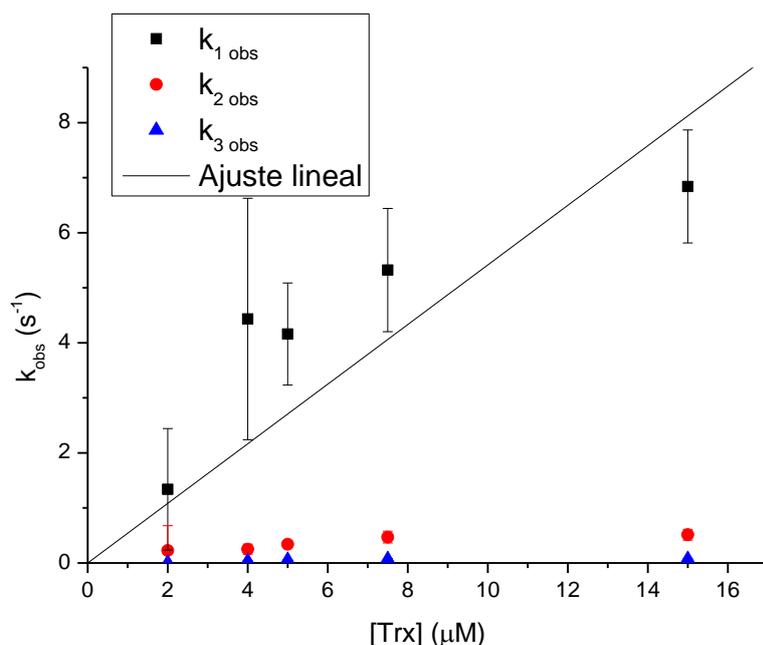


Figura 27 - Gráfico de k_{obs} vs. [EcTrx1]. El ajuste lineal de k_{1obs} tiene una pendiente de $(5,4 \pm 0,7) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

La tendencia que presenta la constante k_{1obs} del experimento para las distintas concentraciones de Trx1 de *E. coli*, es lineal. A partir de la pendiente del gráfico se obtuvo una constante de velocidad de $5,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

La constante de velocidad obtenida a partir del estudio de la cinética de reducción de la hPrx1 por parte de todas las Trx trabajadas, fue del orden de $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, tal como era esperado para la reducción por Trx en humanos (Manta *et al.*, 2009) (Portillo-Ledesma *et al.*, 2018). El único valor informado hasta el momento para la reacción 3 del ciclo catalítico, era para la hPrx5, igual a $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ tal como se expresa en la Tabla 1. Por otra parte, es importante mencionar, que simultáneamente se han estado estudiando en el laboratorio de Físicoquímica Biológica y Enzimología, las reacciones de reducción de la hPrx2 con las mismas Trx empleadas en esta tesina, obteniendo resultados similares (Villar Rodríguez *et al.*, 2020).

4.2.5. Ensayo acoplado hPrx1-EcTrx1-EcTR

En este experimento se siguió el consumo de NADPH para poder medir la actividad peroxidasa de la hPrx1 en su ciclo catalítico (cuando NADPH se oxida, disminuye rápidamente su absorbancia a 340 nm).

El motivo por el cual fue realizado este ensayo, es que se deseaba saber si la reducción es el paso limitante de la velocidad en el ciclo catalítico completo. En el mismo, se emplearon concentraciones de EcTrx1, NADPH y H₂O₂ en exceso.

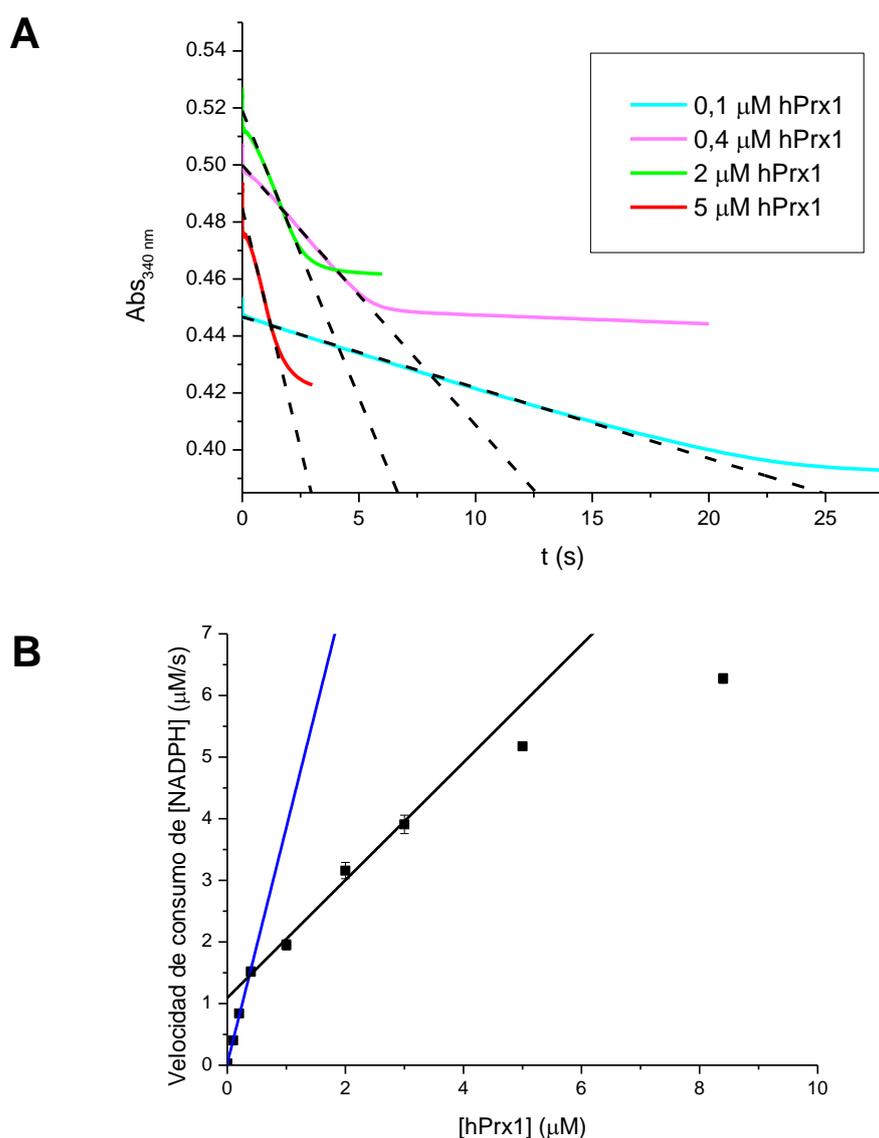


Figura 28 - Ensayo acoplado hPrx1-EcTrx1-EcTR. Panel A: Cursos temporales para distintas concentraciones de hPrx1. Las líneas punteadas muestran el ajuste lineal de la velocidad inicial. Panel B: Velocidad de consumo de [NADPH] vs. [hPrx1]. Pendiente recta azul: $3,8 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$, pendiente recta negra: $0,96 \pm 0,07 \text{ s}^{-1}$.

A partir de los datos obtenidos, y considerando un $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, se obtuvo la gráfica de Velocidad de consumo de [NADPH] vs. concentración de hPrx1 (Fig. 28 B). Teniendo en cuenta los puntos de la gráfica, se logró distinguir dos pendientes considerablemente diferentes. La primera corresponde a un valor de $3,8 \text{ s}^{-1}$ (en azul - asociada al dímero) y la segunda de $0,96 \text{ s}^{-1}$ (en negro - asociada al decámero) (Barranco-Medina et al., 2008). Es posible expresar que la reducción del decámero es considerablemente más lenta. El cambio de pendiente ocurre a una concentración de hPrx1 de $0,37 \text{ }\mu\text{M}$ (valor de velocidad de consumo de [NADPH] = $1,45 \text{ }\mu\text{Ms}^{-1}$).

Con estas dos pendientes, que son velocidades de reacción dentro del ciclo catalítico, podemos tratar de entender cuál es el proceso que está limitando la velocidad. Según lo reportado, $k_{\text{H}_2\text{O}_2} = 3,8 \times 10^7 - 1,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Tabla 1) (Portillo-Ledesma et al., 2018). Contemplando la concentración de H_2O_2 utilizada para el ensayo, y estos valores informados, es posible calcular la constante de velocidad aparente de oxidación por H_2O_2 para ambos datos.

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \text{ }\mu\text{M}$$

$$k_{\text{ap ox}} = [\text{H}_2\text{O}_2] \times k_{\text{H}_2\text{O}_2}$$

$$k_{\text{ap ox}} = 10 \times 10^{-6} \text{ M} \times 3,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$k_{\text{ap ox}} = \mathbf{380 \text{ s}^{-1}}$$

$$k_{\text{ap ox}} = 10 \times 10^{-6} \text{ M} \times 1,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$k_{\text{ap ox}} = \mathbf{1100 \text{ s}^{-1}}$$

Estas cifras evidencian que la oxidación no es limitante de la velocidad, sino que es muy rápida.

Por otro lado, a partir del dato de concentración de *EcTrx1* a la que se trabajó y la constante de velocidad determinada en nuestro trabajo para la reducción de la hPrx1 mediante la *EcTrx1*, se puede calcular la constante de velocidad aparente de reducción ($k_{\text{ap red}}$):

$$[\text{EcTrx1}] = 15 \text{ }\mu\text{M}$$

$$k_{\text{ap red}} = 15 \times 10^{-6} \text{ M} \times 5,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$k_{ap\ red} = 8,1\ s^{-1}$$

Finalmente, el valor reportado de constante de velocidad para la reacción de resolución, k_{res} es el siguiente: $12,9\ s^{-1}$ en hPrx1 (Portillo-Ledesma *et al.*, 2018).

A partir del gráfico resultante del experimento se obtuvieron dos pendientes: 3,8 y $0,96\ s^{-1}$. Los dos valores son menores que cualquiera de las constantes aparentes calculadas. Esto se podría explicar por la existencia de al menos un proceso adicional, que no se ve a través de la cinética bimolecular de la reducción de la hPrx1, y que causa que el ciclo catalítico sea más lento.

En los experimentos de cinética bimolecular existen múltiples fases que podrían estar reflejadas en cambios de fluorescencia. Se podría pensar que la secuencia de reacciones es la siguiente:



En el primer paso, las dos enzimas se encuentran asociadas en un complejo no covalente. Luego ocurren dos reacciones químicas consecutivas de intercambio tiol disulfuro sin que haya disociación. Como último paso, se da la disociación del complejo no covalente, para dar los productos que pueden desplazarse libremente en solución. Cualquiera de estos cuatro procesos podría dar un cambio de fluorescencia.

Sólo una de las reacciones depende linealmente de la concentración de *EcTrx1*, las demás son de orden cero. Si el primer paso es muy rápido y reversible, el que se va a ver como de primer orden es el segundo, que será el limitante de la velocidad. La constante de velocidad medida en nuestro trabajo es asignada a la reacción entre un tiol y un disulfuro para dar un disulfuro mixto.

Además, aún no se conoce si la hPrx1 reducida que se produce, se libera con una conformación LU y se repliega a FF, o si es replegada previo a disociarse del complejo. Este es un paso adicional que sólo depende de la hPrx1, y aún no

se sabe si la *EcTrx1* colabora en este paso ni si tiene un cambio de fluorescencia asociado (Fig. 29).

Es importante resaltar, que lo que se mide es la intensidad de fluorescencia total del sistema (proveniente de los Trp asociados a la *EcTrx1* y la hPrx1), y no concentraciones. Esto genera mucha ambigüedad en la lectura de resultados, ya que no es una tarea sencilla distinguir a cuál de las reacciones corresponde un cambio específico en la fluorescencia. Solamente podríamos asignar aquellos cambios que sean de primer orden con respecto a la Trx. La técnica es, por lo tanto, una limitante importante.

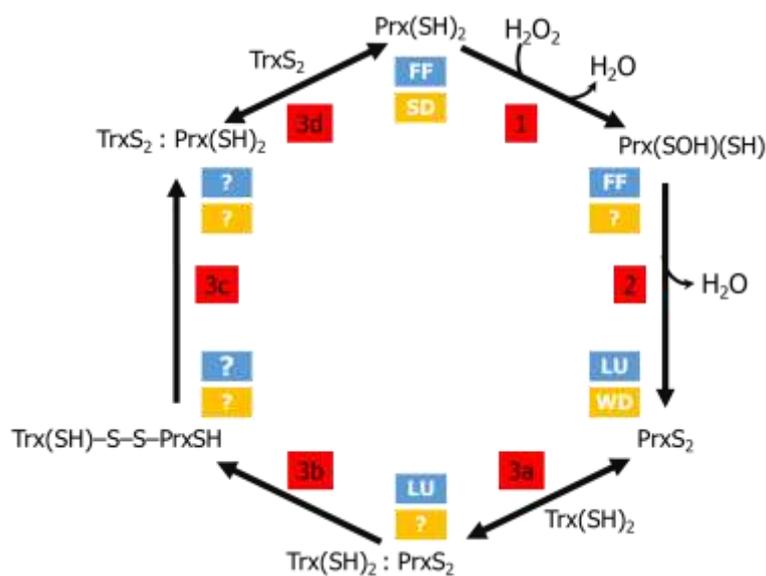


Figura 29 - Ciclo catalítico detallado de la hPrx1, incluye cambios de conformación del sitio activo de la hPrx1 (celeste) y de oligomerización (amarillo). FF: fully folded, completamente plegada; LU: locally unfolded, localmente desplegada; SD: decámeros fuertes, poco dissociables; WD: decámeros débiles, fácilmente dissociables. Interrogantes “?”: aún se desconoce.

Para que se inicie nuevamente el ciclo catalítico es necesario que el sitio activo se encuentre en una conformación FF. Podría ser este, el paso adicional que esté limitando la velocidad de todo el ciclo catalítico.

Otro tema que se desconoce, es la oligomerización (Fig. 29). Cuando la proteína se encuentra reducida, los decámeros presentan una asociación más fuerte (SD), mientras que cuando está oxidada los decámeros son más débiles (WD).

Tampoco se sabe qué pasa con la oligomerización durante el proceso de reducción de la hPrx1 (reacciones 3a a 3d, Fig. 29).

Dado que el cambio de velocidad depende de la concentración de hPrx1 como se puede observar en la Fig. 28 B, el estado oligomérico, que también depende de la concentración de hPrx1, es muy buen candidato a ser el limitante de la velocidad.

Además de la oligomerización, existe un factor adicional que podría causar que sea más lenta. Se podría pensar que la reducción de los decámeros (especie predominante a concentraciones más altas) es más lenta que la reducción de los dímeros (especie predominante a concentraciones más bajas). Aún no se sabe quién es el limitante en el proceso representado por la recta azul (Fig. 28 B) pero existen varios candidatos: la asociación (poco probable, porque en general es muy rápida), la liberación de los productos, la transformación de LU a FF de la hPrx1 o el cambio en el estado oligomérico. Al parecer, alguno de los procesos se podría volver más lento conforme la proteína adquiere oligómeros mayores.

4.2.6. Posibles motivos de la dispersión en los resultados experimentales

Nuestro sistema de estudio es extremadamente complejo; implica una secuencia de al menos cuatro reacciones, y también procesos de cambio conformacional y de oligomerización, asociados a la hPrx1. Sin embargo, en este trabajo contamos con una única herramienta para poder visualizarlo: la intensidad de fluorescencia. En consecuencia, los cursos temporales son bastante complicados, dado que tienen un número elevado de exponenciales que se deben ajustar; además, en cuanto a la variación de fluorescencia asociada a cada una de ellas, algunas son muy pequeñas (Fig. 26). Por consiguiente, los resultados presentan mucha dispersión, dado que los experimentos son difíciles de ajustar.

Si bien nuestros resultados no son valores finales y será necesario desarrollar una metodología complementaria, son una primera aproximación y revelan datos

que se desconocían. Por ejemplo, que en el ciclo catalítico completo existen procesos adicionales a la reducción que pueden limitar la velocidad.

Estos resultados son muy importantes para comprender la fisiología de la hPrx1 y su reducción por la Trx. Se evidenció que la reducción probablemente sea el proceso limitante del ciclo catalítico, o bien, el paso adicional que se observa en el sistema acoplado.

Según los resultados observados, en el caso de la hPrx1 con su reductor natural (hTrx1), la resolución aparentemente, no es el paso limitante del ciclo catalítico. En general, la reacción de reducción es más lenta que la resolución. Esto va a depender de la concentración de Trx presente en la célula, la cual es variable dependiendo de qué compartimiento o tejido se trate (Selvaggio *et al.*, 2018).

En el sistema acoplado, dado que se utiliza una alta concentración de *EcTrx1*, la reducción no sería limitante. Sin embargo, la concentración celular de Trx es de aproximadamente 4,1 μM (Selvaggio *et al.*, 2018). Por lo tanto, en este caso sí se volvería limitante.

Otra aclaración importante, es que en el sistema acoplado se debió trabajar con Trx de *E. coli*, y no humana, debido a las limitaciones de acceso a reactivos. Además, la TR humana es una selenoproteína, y en el laboratorio no se cuenta con la tecnología necesaria para poder producirla.

5. Conclusiones

A partir de los ensayos cinéticos realizados, las constantes de velocidad obtenidas para la reducción de la hPrx1 fueron las siguientes:

- Por hTrx2: $4,3 - 4,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
- Por hTrx1: $1,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
- Por EcTrx1: $5,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Los valores obtenidos en este trabajo son un buen punto de partida, que permite sacar conclusiones de cuáles son los procesos limitantes del ciclo catalítico. Es importante destacar, que la reacción de reducción no ocurre en un único paso. A través del ensayo acoplado se evidencia que existe al menos un proceso adicional que podría ser limitante de la velocidad. De lo contrario, la reducción sería limitante de la velocidad en condiciones fisiológicas de Trx.

6. Bibliografía

- Al-Asadi, S., Malik, A., Bakiu, R., Santovito, G., Menz, I., & Schuller, K. (2019). Characterization of the peroxiredoxin 1 subfamily from *Tetrahymena thermophila*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(23), 4745–4768. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03131-3>
- Anschau, V., Ferrer-Sueta, G., Aleixo-Silva, R. L., Bannitz Fernandes, R., Tairum, C. A., Tonoli, C. C. C., ... Netto, L. E. S. (2020). Reduction of sulfenic acids by ascorbate in proteins, connecting thiol-dependent to alternative redox pathways. *Free Radical Biology and Medicine*, 156(June), 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.06.015>
- Azevedo, D., Tacnet, F., Delaunay, A., Rodrigues-Pousada, C., & Toledano, M. B. (2003). Two redox centers within Yap1 for H₂O₂ and thiol-reactive chemicals signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(8), 889–900. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00434-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00434-9)
- Baker, L. M. S., & Poole, L. B. (2003). Catalytic mechanism of thiol peroxidase from *Escherichia coli*: Sulfenic acid formation and overoxidation of essential Cys61. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 9203–9211. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209888200>
- Barranco-Medina, S., Kakorin, S., Lázaro, J. J., & Dietz, K. J. (2008). Thermodynamics of the dimer-decamer transition of reduced human and plant 2-cys peroxiredoxin. *Biochemistry*, 47(27), 7196–7204. <https://doi.org/10.1021/bi8002956>
- Budde, H., Flohé, L., Hecht, H. J., Hofmann, B., Stehr, M., Wissing, J., & Lünsdorf, H. (2003). Kinetics and redox-sensitive oligomerisation reveal negative subunit cooperativity in trypanredoxin peroxidase of *trypanosoma brucei brucei*. *Biological Chemistry*, 384(4), 619–633. <https://doi.org/10.1515/BC.2003.069>
- Butterfield, L. H. ., Merino, A., Golub, S. H. ., & Shau, H. (1999). From Cytoprotection to Tumor Suppression : T h e Multifactorial R o l e of P e r o x i r e d o x i n s. *Liebert, Mary Ann*, 1(4).
- Cao, Z., & Lindsay, J. G. (2017). The Peroxiredoxin Family: An Unfolding Story, 83(January), 483–504. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46503-6>
- Chae, H. Z., Kang, S. W., Kirn, H. J., Kirn, K., Baines, I. C., & Rhee, S. G. (1997). Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin and their role in signal transduction. *FASEB Journal*, 11(9), 101–112.
- Chang, T. S., Jeong, W., Choi, S. Y., Yu, S., Kang, S. W., & Rhee, S. G. (2002). Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25370–25376. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110432200>
- Chhipa, R. R., Lee, K. S., Onate, S., Wu, Y., & Ip, C. (2009). Prx1 enhances androgen receptor function in prostate cancer cells by increasing receptor affinity to dihydrotestosterone. *Molecular Cancer Research*, 7(9), 1543–1552. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0546>
- Chuang, M. H., Wu, M. S., Lo, W. L., Lin, J. T., Wong, C. H., & Chiou, S. H. (2006). The antioxidant protein alkylhydroperoxide reductase of *Helicobacter pylori* switches from a peroxide reductase to a molecular chaperone function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2552–2557. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510770103>

- Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. (2019). Situación Epidemiológica del Uruguay en relación al Cáncer. *Registro Nacional Del Cáncer, Comisión Honoraria de Lucha Contra El Cáncer*, 1–61. Retrieved from http://www.comisioncancer.org.uy/uc_513_1.html
- Copley, S. D., Novak, W. R. P., & Babbitt, P. C. (2004). Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: Evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry*, *43*(44), 13981–13995. <https://doi.org/10.1021/bi048947r>
- Cox, A. G., Peskin, A. V., Paton, L. N., Winterbourn, C. C., & Hampton, M. B. (2009). Redox potential and peroxide reactivity of human peroxiredoxin 3. *Biochemistry*, *48*(27), 6495–6501. <https://doi.org/10.1021/bi900558g>
- Ding, C., Fan, X., & Wu, G. (2017). Peroxiredoxin 1 – an antioxidant enzyme in cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *21*(1), 193–202. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12955>
- Du, Y., Zhang, H., Zhang, X., Lu, J., & Holmgren, A. (2013). Thioredoxin 1 is inactivated due to oxidation induced by peroxiredoxin under oxidative stress and reactivated by the glutaredoxin system. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(45), 32241–32247. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.495150>
- Elattar, A., Bryant, A., Winter-Roach, B. A., Hatem, M., & Naik, R. (2011). Optimal primary surgical treatment for advanced epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *2011*(8). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007565.pub2>
- Engelman, R., Weisman-Shomer, P., Ziv, T., Xu, J., Arnér, E. S. J., & Benhar, M. (2013). Multilevel regulation of 2-Cys peroxiredoxin reaction cycle by S-nitrosylation. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(16), 11312–11324. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.433755>
- Feng, X., Guo, K., & Gao, H. (2020). Plasticity of the peroxidase AhpC links multiple substrates to diverse disulfide-reducing pathways in *Shewanella oneidensis*. *The Journal of Biological Chemistry*, *295*(32), 11118–11130. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014010>
- Ferrer-Sueta, G., Manta, B., Botti, H., Radi, R., Trujillo, M., & Denicola, A. (2011). Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. *Chemical Research in Toxicology*, *24*(4), 434–450. <https://doi.org/10.1021/tx100413v>
- Fiorillo, A., Colotti, G., Boffi, A., Baiocco, P., & Ilari, A. (2012). The Crystal Structures of the Tryparedoxin-Tryparedoxin Peroxidase Couple Unveil the Structural Determinants of Leishmania Detoxification Pathway. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *6*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001781>
- Flohé, L., & Ursini, F. (2008). Peroxidase: A term of many meanings. *Antioxidants and Redox Signaling*, *10*(9), 1485–1490. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2059>
- Gertz, M., Fischer, F., Leipelt, M., Wolters, D., & Steegborn, C. (2009). Identification of Peroxiredoxin 1 as a novel interaction partner for the lifespan regulator protein p66Shc. *Aging*, *1*(2), 254–265. <https://doi.org/10.18632/aging.100017>
- Grassetti, D. R., & Murray, J. F. (1967). Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *119*(C), 41–49. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(67\)90426-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(67)90426-2)
- Gurung, A. B., Das, A. K., & Bhattacharjee, A. (2017). Disruption of redox catalytic

- functions of peroxiredoxin-thioredoxin complex in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv using small interface binding molecules. *Computational Biology and Chemistry*, 67, 69–83. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2016.12.013>
- Ha, B., Kim, E. K., Kim, J. H., Lee, H. N., Lee, K. O., Lee, S. Y., & Jang, H. H. (2012). Human peroxiredoxin 1 modulates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition through its peroxidase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 421(1), 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.03.103>
- Hall, A., Karplus, P. A., & Poole, L. B. (2009). Typical 2-Cys peroxiredoxins - Structures, mechanisms and functions. *FEBS Journal*, 276(9), 2469–2477. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06985.x>
- Hall, A., Nelson, K., Poole, L. B., & Karplus, P. A. (2011). Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15(3), 795–815. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3624>
- Harris, J. R. (1969). Some negative contrast staining features of a protein from erythrocyte ghosts. *Journal of Molecular Biology*, 46(2), 329–335. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(69\)90425-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(69)90425-2)
- Hirotsu, S., Abe, Y., Okada, K., Nagahara, N., Hori, H., & Hakoshima, T. (2014). Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product., (May).
- Hoyle, N. P., & O'Neill, J. S. (2015). Oxidation-reduction cycles of peroxiredoxin proteins and nontranscriptional aspects of timekeeping. *Biochemistry*, 54(2), 184–193. <https://doi.org/10.1021/bi5008386>
- Jang, H. H., Lee, K. O., Chi, Y. H., Jung, B. G., Park, S. K., Park, J. H., ... 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(5), 625–635. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.002>
- Kebapci, E., Gülseren, V., Tuğmen, C., Gökçü, M., Solmaz, U., Sert, I., ... Sanci, M. (2017). Outcomes of patients with advanced stage ovarian cancer with intestinal metastasis. *Ginekologia Polska*, 88(10), 537–542. <https://doi.org/10.5603/GP.a2017.0098>
- Kim, E. K., Lee, S. Y., Kim, Y., Ahn, S. M., & Jang, H. H. (2019). Peroxiredoxin 1 post-transcriptionally regulates snoRNA expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 141(March), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.030>
- Kim, J. H., Lee, J. M., Lee, H. N., Kim, E. K., Ha, B., Ahn, S. M., ... Lee, S. Y. (2012). RNA-binding properties and RNA chaperone activity of human peroxiredoxin 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 425(4), 730–734. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.142>
- Kim, K., Kim, I. H., Lee, K. Y., Rhee, S. G., & Stadtman, E. R. (1988). The isolation and purification of a specific “protector” protein which inhibits enzyme inactivation by a Thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. *Journal of Biological Chemistry*, 263(10), 4704–4711.
- Kim, S. Y., Kim, T. J., & Lee, K. Y. (2008). A novel function of peroxiredoxin 1 (Prx-1) in apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-mediated signaling pathway. *FEBS Letters*, 582(13), 1913–1918. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.05.015>
- Koo, Y. J., & Lim, K. T. (2015). Toxicity of intraperitoneal chemotherapy and risk factors for severe toxicity in optimally debulked ovarian cancer patients. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 54(3), 275–279.

<https://doi.org/10.1016/j.tjog.2013.12.010>

- Langford, T. F., Deen, W. M., & Sikes, H. D. (2018). A mathematical analysis of Prx2-STAT3 disulfide exchange rate constants for a bimolecular reaction mechanism. *Free Radical Biology and Medicine*, *120*(March), 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.039>
- Ledermann, J., Harter, P., Gourley, C., Friedlander, M., Vergote, I., Rustin, G., ... Matulonis, U. (2014). Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: A preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, *15*(8), 852–861. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70228-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70228-1)
- Ledgerwood, E. C., Marshall, J. W. A., & Weijman, J. F. (2017). The role of peroxiredoxin 1 in redox sensing and transducing. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *617*, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.10.009>
- Lee, E. M., Lee, S. S., Tripathi, B. N., Jung, H. S., Cao, G. P., Lee, Y., ... Chung, B. Y. (2015). Site-directed mutagenesis substituting cysteine for serine in 2-Cys peroxiredoxin (2-Cys Prx A) of *Arabidopsis thaliana* effectively improves its peroxidase and chaperone functions. *Annals of Botany*, *116*(4), 713–725. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv094>
- Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., & Thompson, E. W. (2006). The epithelial-mesenchymal transition: New insights in signaling, development, and disease. *Journal of Cell Biology*, *172*(7), 973–981. <https://doi.org/10.1083/jcb.200601018>
- Lu, J., & Holmgren, A. (2014a). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, *66*, 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036>
- Lu, J., & Holmgren, A. (2014b). The thioredoxin superfamily in oxidative protein folding. *Antioxidants and Redox Signaling*, *21*(3), 457–470. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5849>
- Madrigal-Matute, J., Fernandez-Garcia, C. E., Blanco-Colio, L. M., Burillo, E., Fortuño, A., Martinez-Pinna, R., ... Martin-Ventura, J. L. (2015). Thioredoxin-1/peroxiredoxin-1 as sensors of oxidative stress mediated by NADPH oxidase activity in atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, *86*, 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.001>
- Manevich, Y., Feinstein, S. I., & Fisher, A. B. (2004). Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with π GST. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(11), 3780–3785. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400181101>
- Manta, B., Hugo, M., Ortiz, C., Ferrer-Sueta, G., Trujillo, M., & Denicola, A. (2009). The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *484*(2), 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.11.017>
- Matsumura, T., Okamoto, K., Iwahara, S. I., Hori, H., Takahashi, Y., Nishino, T., & Abe, Y. (2008). Dimer-oligomer interconversion of wild-type and mutant rat 2-Cys peroxiredoxin: Disulfide formation at dimer-dimer interfaces is not essential for decamerization. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(1), 284–293. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705753200>
- Monteiro, G., Horta, B. B., Pimenta, D. C., Augusto, O., & Netto, L. E. S. (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(12), 4886–4891. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700481104>
- Morais, M. A. B., Giuseppe, P. O., Souza, T. A. C. B., Alegria, T. G. P., Oliveira, M. A., Netto, L. E. S., & Murakami, M. T. (2015). How pH modulates the dimer-decamer interconversion of 2-cys peroxiredoxins from the Prx1 subfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 290(13), 8582–8590. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.619205>
- Morgan, B. A., & Veal, E. A. (2007). Functions of typical 2-Cys peroxiredoxins in yeast. *Subcellular Biochemistry*, 44, 253–265. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6051-9_12
- Mulrooney, S. B. (1997). Application of a single-plasmid vector for mutagenesis and high-level expression of thioredoxin reductase and its use to examine flavin cofactor incorporation. *Protein Expression and Purification*, 9(3), 372–378. <https://doi.org/10.1006/prev.1996.0698>
- Nelson, D. P., & Kiesow, L. A. (1972). Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25° C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Analytical Biochemistry*, 49(2), 474–478. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90451-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90451-4)
- Nelson, K. J., Knutson, S. T., Soito, L., Klomsiri, C., Poole, L. B., & Fetrow, J. S. (2011). Analysis of the peroxiredoxin family: Using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 79(3), 947–964. <https://doi.org/10.1002/prot.22936>
- Noguera, M. E., Vazquez, D. S., Ferrer-Sueta, G., Agudelo, W. A., Howard, E., Rasia, R. M., ... Santos, J. (2017). Structural variability of E. coli thioredoxin captured in the crystal structures of single-point mutants. *Scientific Reports*, 7(January), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep42343>
- Oseledchik, A., Hunold, L. E., Mallmann, M. R., Domröse, C. M., Abramian, A., Debald, M., ... Keyver-Paik, M. D. (2016). Impact of Extended Primary Surgery on Suboptimally Operable Patients with Advanced Ovarian Cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 26(5), 873–883. <https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000707>
- Pace, P. E., Peskin, A. V., Konigstorfer, A., Jasoni, C. J., Winterbourn, C. C., & Hampton, M. B. (2018). Peroxiredoxin interaction with the cytoskeletal-regulatory protein CRMP2: Investigation of a putative redox relay. *Free Radical Biology and Medicine*, 129, 383–393. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.407>
- Park, J. W., Piszczek, G., Rhee, S. G., & Chock, P. B. (2011). Glutathionylation of peroxiredoxin i induces decamer to dimers dissociation with concomitant loss of chaperone activity. *Biochemistry*, 50(15), 3204–3210. <https://doi.org/10.1021/bi101373h>
- Parsonage, D., Nelson, K. J., Ferrer-Sueta, G., Alley, S., Karplus, P. A., Furdai, C. M., & Poole, L. B. (2015). Dissecting peroxiredoxin catalysis: Separating binding, peroxidation, and resolution for a bacterial AhpC. *Biochemistry*, 54(7), 1567–1575. <https://doi.org/10.1021/bi501515w>
- Perkins, A., Nelson, K. J., Parsonage, D., Poole, L. B., & Karplus, P. A. (2015). Peroxiredoxins: Guardians against oxidative stress and modulators of peroxide

- signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(8), 435–445.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.05.001>
- Perkins, A., Parsonage, D., Nelson, K. J., Ogba, O. M., Cheong, P. H. Y., Poole, L. B., & Karplus, P. A. (2016). Peroxiredoxin Catalysis at Atomic Resolution. *Structure*, 24(10), 1668–1678. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.07.012>
- Peskin, A. V., Low, F. M., Paton, L. N., Maghzal, G. J., Hampton, M. B., & Winterbourn, C. C. (2007). The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H₂O₂ is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. *Journal of Biological Chemistry*, 282(16), 11885–11892. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700339200>
- Peskin, A. V., & Winterbourn, C. C. (2021). The Enigma of 2Cys Peroxiredoxins : What Are Their Roles ? The Enigma of 2 Cys Peroxiredoxins : What Are Their Roles ?, (January). <https://doi.org/10.1134/S0006297921010089>
- Pflieger, D., Vinh, J., Toledano, M. B., Delaunay, A., & Barrault, M. B. (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*, 111(4), 471–481. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12437921>
- Pinato, D. J., Graham, J., Gabra, H., & Sharma, R. (2013). Evolving concepts in the management of drug resistant ovarian cancer: Dose dense chemotherapy and the reversal of clinical platinum resistance. *Cancer Treatment Reviews*, 39(2), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.04.004>
- Piñeyro, M. D., Arcari, T., Robello, C., Radi, R., & Trujillo, M. (2011). Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: High efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxyxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 507(2), 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.014>
- Portillo-Ledesma, S. (2018). Peroxirredoxinas: eficientes reductoras de peróxidos y eficientemente reducidas. Función de los aminoácidos conservados en ambas reacciones. Retrieved from <http://riquim.fq.edu.uy/archive/files/132f0a4bc143df8062176e1dc0eba116.pdf>
- Portillo-Ledesma, S., Randall, L. M., Parsonage, D., Rizza, J. D., Andrew Karplus, P., Poole, L. B., ... Ferrer-Sueta, G. (2018). Differential kinetics of two-cysteine peroxiredoxin disulfide formation reveal a novel model for peroxide sensing. *Biochemistry*, 57(24), 3416–3424. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00188>
- Portillo-Ledesma, S., Sardi, F., Manta, B., Tourn, M. V., Clippe, A., Knoops, B., ... Ferrer-Sueta, G. (2014). Deconstructing the Catalytic Efficiency of Peroxiredoxin-5 Peroxidatic Cysteine. *Biochemistry*, 53(38), 6113–6125. <https://doi.org/10.1021/bi500389m>
- Randall, L. M., Dalla Rizza, J., Parsonage, D., Santos, J., Mehl, R. A., Lowther, W. T., ... Denicola, A. (2019). Unraveling the effects of peroxiredoxin 2 nitration; role of C-terminal tyrosine 193. *Free Radical Biology and Medicine*, 141, 492–501. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.07.016>
- Randall, L. M., Ferrer-Sueta, G., & Denicola, A. (2013). *Peroxiredoxins as preferential targets in H₂O₂-induced signaling. Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 527). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405882-8.00003-9>
- Reyes, A. M., Vazquez, D. S., Zeida, A., Hugo, M., Piñeyro, M. D., De Armas, M. I., ... 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, 249–260. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.005>

- Santos, J., Marino-Buslje, C., Kleinman, C., Ermácora, M. R., & Delfino, J. M. (2007). Consolidation of the thioredoxin fold by peptide recognition: Interaction between *E. coli* thioredoxin fragments 1-93 and 94-108. *Biochemistry*, *46*(17), 5148–5159. <https://doi.org/10.1021/bi6026264>
- Schröder, E., Littlechild, J. A., Lebedev, A. A., Errington, N., Vagin, A. A., & Isupov, M. N. (2000). Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution. *Structure*, *8*(6), 605–615. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00147-7](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00147-7)
- Selvaggio, G., Coelho, P. M. B. M., & Salvador, A. (2018). Mapping the phenotypic repertoire of the cytoplasmic 2-Cys peroxiredoxin – Thioredoxin system. 1. Understanding commonalities and differences among cell types. *Redox Biology*, *15*(December 2017), 297–315. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.12.008>
- Sieńko, J., Teliga-Czajkowska, J., Przytula, E., Czajkowski, K., Smolarczyk, R., & Nowis, D. (2019). Peroxiredoxin-1 as a prognostic factor in patients with ovarian cancer. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *26*(3), 415–419. <https://doi.org/10.26444/aaem/105899>
- Sobotta, M. C., Liou, W., Stöcker, S., Talwar, D., Oehler, M., Ruppert, T., ... Dick, T. P. (2015). Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling. *Nature Chemical Biology*, *11*(1), 64–70. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1695>
- Stöcker, S., Van Laer, K., Mijuskovic, A., & Dick, T. P. (2018). The Conundrum of Hydrogen Peroxide Signaling and the Emerging Role of Peroxiredoxins as Redox Relay Hubs. *Antioxidants and Redox Signaling*, *28*(7), 558–573. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7162>
- Tairum, C. A., De Oliveira, M. A., Horta, B. B., Zara, F. J., & Netto, L. E. S. (2012). Disulfide biochemistry in 2-Cys peroxiredoxin: Requirement of Glu50 and Arg146 for the reduction of yeast Tsa1 by thioredoxin. *Journal of Molecular Biology*, *424*(1–2), 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.09.008>
- Talwar, D., Messens, J., & Dick, T. P. (2020). A role for annexin A2 in scaffolding the peroxiredoxin 2–STAT3 redox relay complex. *Nature Communications*, *11*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18324-9>
- Tripathi, B. N., Bhatt, I., & Dietz, K. J. (2009). Peroxiredoxins: A less studied component of hydrogen peroxide detoxification in photosynthetic organisms. *Protoplasma*, *235*(1–4), 3–15. <https://doi.org/10.1007/s00709-009-0032-0>
- Trujillo, M., Clippe, A., Manta, B., Ferrer-Sueta, G., Smeets, A., Declercq, J. P., ... 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*(1), 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.08.008>
- Vazquez, D. S., Zeida, A., Agudelo, W. A., Montes, M., Ferrer-Sueta, G., & Santos, J. (2020). Exploring the Conformational Transition Between the Fully Folded and Locally Unfolded Substates of the *Escherichia coli* thiol peroxidase. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *19*. <https://doi.org/10.1039/d0cp00140f>
- Villar Rodríguez, S., Zeida, A., Ferrer-Sueta, G., & Denicola, A. (2020a). A Kinetic and Structural Assessment of the Reduction of Human Prx2 by Thioredoxins. *Free Radical Biology and Medicine*, *159*(November), S35. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.102> https://www.researchgate.net/publication/346916338_A_Kinetic_and_Structural_Assessment_of_the_Reduction_of_Human_Prx2_by_Thioredoxins

- Wang, P., Veine, D. M., Ahn, S. H., & Williams, C. H. (1996). A stable mixed disulfide between thioredoxin reductase and its substrate, thioredoxin: preparation and characterization. *Chart*, 4812–4819.
- Winterbourn, C. C., & Metodiewa, D. (1999). Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(3–4), 322–328. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00051-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00051-9)
- Wood, Z. A., Schröder, E., Harris, J. R., & Poole, L. B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(1), 32–40. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)00003-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)00003-8)
- Yang, K. S., Kang, S. W., Woo, H. A., Hwang, S. C., Chae, H. Z., Kim, K., & Rhee, S. G. (2002). Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 277(41), 38029–38036. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206626200>
- You, K. S., Benitez, L. V., McConachie, W. A., & Allison, W. S. (1975). The conversion of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to an acylphosphatase by trinitroglycerin and inactivation of this activity by azide and ascorbate. *BBA - Enzymology*, 384(2), 317–330. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(75\)90033-9](https://doi.org/10.1016/0005-2744(75)90033-9)
- Yu, W., Wu, J., Ning, Z. L., Liu, Q. Y., & Quan, R. L. (2018). High expression of peroxiredoxin 1 is associated with epithelial-mesenchymal transition marker and poor prognosis in gastric cancer. *Medical Science Monitor*, 24, 2259–2270. <https://doi.org/10.12659/MSM.908722>
- Zeida, A., Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., Denicola, A., Estrin, D. A., & Radi, R. (2019). Catalysis of Peroxide Reduction by Fast Reacting Protein Thiols. *Chemical Reviews*, 119(19), 10829–10855. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00371>
- Zhang, B., Wang, Y., & Su, Y. (2009). Peroxiredoxins, a novel target in cancer radiotherapy. *Cancer Letters*, 286(2), 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.04.043>
- Zhou, Y., Kok, K. H., Chun, A. C. S., Wong, C. M., Wu, H. W., Lin, M. C. M., ... Jin, D. Y. (2000). Mouse peroxiredoxin V is a thioredoxin peroxidase that inhibits p53-induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268(3), 921–927. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2231>
- Zito, E., Hansen, H. G., Yeo, G. S. H., Fujii, J., & Ron, D. (2012). Endoplasmic Reticulum Thiol Oxidase Deficiency Leads to Ascorbic Acid Depletion and Noncanonical Scurvy in Mice. *Molecular Cell*, 48(1), 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.010>