

Tesis de Doctorado en Química  
Facultad de Química – Universidad de la República (UdelaR)  
Programa de Desarrollo en Ciencias Básicas – Química

**Peroxirredoxinas: eficientes reductoras de peróxidos y  
eficientemente reducidas. Función de los aminoácidos  
conservados en ambas reacciones**

**Stephanie Portillo**

**Directora: Dra. E. Laura Coitiño**

Laboratorio de Química Teórica y Computacional  
Instituto de Química Biológica – Facultad de Ciencias – UdelaR

**Co director: Dr. Gerardo Ferrer**

Laboratorio de Físicoquímica Biológica  
Instituto de Química Biológica – Facultad de Ciencias – UdelaR

**Mayo 2018**

**“Si tienes un sueño en tu corazón, y de verdad crees en él, corres el riesgo de que se convierta en realidad”**

**Walt Disney**

# Agradecimientos

A mi directora Laura Coitiño, por introducirme a este hermoso mundo de la academia. Por su apoyo incondicional en cada etapa de estos cinco años, lo que me permitió crecer como científica, docente, y como persona.

A mi co-director Gerardo Ferrer, por su gran apoyo y compromiso a lo largo de todos estos años.

A Luis Netto, Adrian Roitberg y Dario Estrín, quienes me recibieron en sus laboratorios, y me hicieron sentir en casa desde el primer momento.

A Jenner Bonanata, por la ayuda con ONIOM y la reducción por ascorbato.

A Alicia Merlino, por la ayuda inicial con dinámica molecular.

A Diego Vázquez, por la ayuda con las simulaciones de dinámica molecular acelerada, análisis de componentes principales y las horas de discusiones.

A Jonathan Semelak, por su ayuda con las simulaciones QM/MM.

A Joaquín Dalla Rizza y Mariana Bonilla, por su ayuda con la biología molecular.

A toda la gente del LQTC y FQB-ENZ por la buena onda y el compañerismo.

A Santiago, por ser mi conejillo de indias y permitirme crecer en la difícil tarea de enseñar.

A la Comisión Académica de Posgrado (CAP) por las becas de maestría y doctorado, a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por el incentivo del SNI y a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por el proyecto de iniciación a la investigación.

A mi familia, especialmente a mi madre Mónica y mi hermana Joanna, eternas luchadoras.

A mi esposo Tim, por la larga espera y el amor de cada día.

A Alice, por su alegría, su amistad y por todos esos cabos.

A Saira, por ser la mejor conviviente que me podía tocar y una gran amiga.

A Lucía, por estos 15 años de amistad incondicional.

A las chikis (Pauli, Pau, Lu, Maru y Lucy), por qué siempre nos volvamos a encontrar en el fin de la tierra (Finisterre bar).

A Shiloh, por su dulzura.

## Índice

Resumen.....	7
Abreviaturas y acrónimos .....	9
Capítulo 1: Introducción.....	13
1.1 Estrés oxidativo .....	14
1.2 Líneas de defensa celular .....	18
1.3 Generalidades de las peroxirredoxinas.....	22
1.4 Estructura y estado de oligomerización de las Prx.....	26
1.5 Reacción de peroxidación .....	29
1.6 Reacción de resolución y transición <i>fully folded</i> ↔ <i>locally unfolded</i> .....	38
1.7 Sobreoxidación.....	41
1.8 Reducción de peroxirredoxinas.....	44
1.9 PRDX5 y PRDX6: ejemplos de Prx 2-Cys atípica y 1-Cys .....	46
Capítulo 2: Objetivos .....	50
Objetivo General .....	51
Objetivos específicos.....	51
Capítulo 3: Mecanismo de reducción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por la C <sub>p</sub> de PRDX5 y función de los residuos conservados Thr44 y Arg127.....	52
Resumen del capítulo.....	53
Metodología .....	54
3.1 Determinación de la estructura representativa de PRDX5 <sup>WT</sup> en solución acuosa .....	54
3.2 Modelado ONIOM QM/MM de la reacción de peroxidación en PRDX5 <sup>WT</sup> .....	54
3.3 Determinación de fuerza de EdH, cargas atómicas y nucleofilia de C <sub>p</sub> y su evolución en PRDX5 <sup>WT</sup> .....	55
3.4 Determinación de la estructura representativa de la mutante T44V a partir de la enzima WT .....	56
3.5 Modelado ONIOM QM/MM y descriptores de reactividad en PRDX5 <sup>T44V</sup> .....	56
3.6 Dinámica molecular de PRDX5 <sup>WT</sup> , PRDX5 <sup>T44V</sup> y PRDX5 <sup>R127Q</sup> .....	57
Resultados .....	59
3.1 Mecanismo de reducción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por PRDX5 <sup>WT</sup> y PRDX5 <sup>T44V</sup> .....	59
3.2 Efecto de las mutaciones T44V y R127Q en la estructura de PRDX5 .....	66
Discusión .....	69

Capítulo 4: Transición <i>fully folded-locally unfolded</i> en PRDX5. Determinantes moleculares que la disparan.....	74
Resumen del capítulo.....	75
Metodología.....	77
4.1 Estructuras proteicas y parametrización de residuos no estándar.....	77
4.2 Preparación de los sistemas y simulaciones de dinámica molecular convencional (cMD) y acelerada (aMD).....	78
4.3 Análisis de la red de EdH, fluctuaciones estructurales y estructura secundaria.....	80
4.4 Determinación de los movimientos proteicos más importantes durante la aMD por análisis de los componentes principales (PCA).....	80
Resultados.....	82
4.1 Análisis del efecto del estado de oxidación e ionización de C <sub>p</sub> sobre la estructura de PRDX5 a través de cMD en escala de tiempo de los microsegundos.....	82
4.2 Muestreo conformacional avanzado por aMD de PRDX5 considerando oxidación e ionización de C <sub>p</sub> .....	84
4.3 Análisis de la transición FF-LU mediante mapas bidimensionales de componentes principales.....	86
Discusión.....	90
Capítulo 5: Resolución vs. oxidación en PRDX5. Cinética de la formación del enlace disulfuro y sobreoxidación.....	92
Resumen del capítulo.....	93
Metodología.....	94
5.1 Determinación de la constante de velocidad de la formación del enlace disulfuro entre C <sub>p</sub> -SOH y C <sub>R</sub> -SH en PRDX5 <sup>WT</sup> .....	94
5.2 Dinámica molecular a pH constante para determinar el pK <sub>a</sub> de C <sub>R</sub> en PRDX5 <sup>WT</sup> FF y LU.....	96
5.3 Estimación de la constante de velocidad de sobreoxidación mediante medida a tiempo final con isoelectroenfoco.....	99
Resultados.....	101
5.1 Reacción de resolución, pK <sub>a</sub> s de C <sub>p</sub> -SOH y C <sub>R</sub> -SH y constante de velocidad.....	101
5.2 Influencia de la conformación (FF y LU) y del estado de protonación de C <sub>p</sub> y del residuo Glu143 sobre el pK <sub>a</sub> de C <sub>R</sub> .....	103
5.3 Estimación de la constante de sobreoxidación de C <sub>p</sub> -SOH por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> medida a tiempo final... ..	104
Discusión.....	106

Capítulo 6: Reducción de PRDX5 por Trx2. Constantes de velocidad y función de los residuos Thr44 y Arg127. ....	109
Resumen del capítulo.....	110
Metodología.....	111
6.1 Determinación de la constante de velocidad de reducción de PRDX5 WT, T44V y R127Q por Trx2.....	111
6.2 Simulación de dinámica molecular de PRDX5 <sup>WT</sup> , PRDX5 <sup>T44V</sup> y PRDX5 <sup>R127Q</sup> oxidadas a disulfuro .....	112
Resultados .....	114
6.1 Efecto de las mutaciones T44V y R127Q de PRDX5 sobre la reacción de reducción por Trx2	114
6.2 Efecto de las mutaciones T44V y R127Q en la estructura de PRDX5 oxidada a disulfuro .....	115
Discusión .....	119
Capítulo 7: Mecanismo de la reducción del ácido sulfénico por ascorbato. Modelado en solución y en PRDX6. ....	120
Resumen del capítulo.....	121
Metodología.....	122
7.1 Modelado de la reducción de ácido metanosulfénico por ascorbato .....	122
7.2 Dinámica molecular de PRDX6 con C <sub>p</sub> oxidada a ácido sulfénico .....	122
7.3 Parametrización del ascorbato.....	123
7.4 <i>Docking</i> molecular del ascorbato en el sitio activo de PRDX6 con C <sub>p</sub> oxidada a ácido cisteinsulfénico.....	124
7.5 Dinámica molecular del complejo PRDX6-ASC.....	124
7.6 Modelado ONIOM QM/MM de la reducción de C <sub>p</sub> -SOH por ascorbato .....	124
Resultados .....	126
7.1 Modelado de la reducción de ácido metanosulfénico por ASC en solución acuosa.....	126
7.2 Dinámica molecular de PRDX6 y del complejo PRDX6-ASC .....	129
7.3 Modelado ONIOM del mecanismo de reducción de C <sub>p</sub> -SOH por ASC en PRDX6.....	132
Discusión .....	134
Capítulo 8: Conclusiones y perspectivas. ....	136
Referencias.....	141
Anexo: Publicaciones.....	165

# Resumen

En este documento de tesis se presentan los resultados obtenidos durante cinco años de desarrollo de estudios de posgrado. El contenido se organizó en 8 Capítulos, comenzando por la introducción en el Capítulo 1, los objetivos en el Capítulo 2, resultados de la investigación en los Capítulos 3 – 7 (divididos según los objetivos y conteniendo cada uno de ellos: resumen, metodología resultados y su discusión) y finalizando con el Capítulo 8 que incluye las conclusiones y perspectivas. Esta organización permite al lector leer cada capítulo de forma independiente, más allá de que existan varias conexiones entre ellos.

Las peroxirredoxinas (Prx) son una familia de enzimas muy conservada y catalizan la reducción de diversos peróxidos utilizando residuos de cisteína y residuos conservados del sitio activo. El ciclo catalítico presenta pequeñas diferencias entre las distintas Prx, pero en todos los casos consiste en tres reacciones químicas: (1) peroxidación; (2) formación de disulfuro; (3) reducción. La peroxidación involucra el ataque nucleofílico de la cisteína peroxidática ( $C_p$ ) sobre el sustrato peróxido para dar ácido cisteinsulfénico ( $C_p$ -SOH) y es común a todas las Prx. El segundo paso involucra la formación de disulfuro con  $C_p$ -SOH, en las Prx 2-Cys lo realiza la cisteína resolutive ( $C_R$ ) formando un enlace disulfuro y liberando  $H_2O$ , mientras que en las Prx 1-Cys, es realizado por un reductor no específico (e.g. glutatión). En las Prxs 2-Cys, este paso involucra la transición conformacional *fully folded* (FF)  $\rightarrow$  *locally unfolded* (LU) que acerca a ambas cisteínas. Finalmente se completa el ciclo catalítico mediante la reducción del enlace disulfuro, regenerando a la  $C_p$  (y a la  $C_R$  en Prx 2-Cys). Una reacción colateral al ciclo catalítico es la sobreoxidación del  $C_p$ -SOH a  $C_p$ -SO<sub>2</sub>H o  $C_p$ -SO<sub>3</sub>H, reacción reversible únicamente para algunas de las Prx 2-Cys.

En esta tesis se abordó el estudio de la peroxirredoxina 5 humana (PRDX5) y de la peroxirredoxina 6 humana (PRDX6), como ejemplos de Prx 2-Cys y 1-Cys, respectivamente. Se utilizó una integración de técnicas del modelado computacional y de cinética enzimática, de forma tal de obtener una visión del problema lo más amplia posible. Con respecto a PRDX5, se abordaron los siguientes objetivos: (1) estudio del mecanismo de reacción de la peroxidación y función de los aminoácidos conservados Thr44 y Arg127; (2) análisis de los determinantes moleculares que disparan la transición FF $\rightarrow$ LU; (3) determinación de los valores de  $pK_a$ s de  $C_p$ -SOH y  $C_R$ -SH y de las constantes de velocidad ( $k$ ) de resolución y sobreoxidación; (4) estudio de la reducción del enlace disulfuro  $C_p$ -SS- $C_R$

por tioredoxina 2 (Trx2). Con respecto a PRDX6, se estudió la reducción del C<sub>p</sub>-SOH por ascorbato, determinando el mecanismo de reacción en un sistema modelo en solución y en la enzima.

En primer lugar, se determinó que la reacción de peroxidación prosigue a través de un mecanismo tipo S<sub>N</sub>2, en donde los residuos Thr44 y Arg127 tienen funciones clave. La Thr44 está involucrada en la unión del sustrato al sitio activo, la regulación de la nucleofilia de la C<sub>p</sub> y la estabilización del estado de transición (TS) de la reacción, lo que se ve reflejado en un aumento de 3 kcal mol<sup>-1</sup> en la energía libre de activación en la mutante T44V con respecto a la enzima *wild type*. La Arg127 también participa en la estabilización del TS y en una transferencia protónica post-TS, lo que genera C<sub>p</sub>-SOH como producto de la reacción, además es clave en la estructuración del sitio activo cuando C<sub>p</sub> se encuentra en forma tiolato. En segundo lugar, se determinó que la transición FF→LU ocurre únicamente cuando la C<sub>p</sub> se oxida a ácido sulfénico y es producto de la pérdida de interacciones estabilizantes con los residuos Thr44 y Arg127. En tercer lugar, el estudio de la resolución y sobreoxidación mostró que la primera está enlentecida con respecto a la misma reacción en solución y que los pK<sub>a</sub>s del C<sub>p</sub>-SOH y C<sub>R</sub>-SH no son los más favorables para que ocurra la reacción (5.9 y 7.35, respectivamente). Por otro lado, la proteína no mostró sensibilidad a la sobreoxidación,  $k \approx 170 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . En cuarto lugar, se determinó que los residuos conservados del sitio activo Thr44 y Arg127 no son necesarios para la reducción de PRDX5 por Trx2 y que la eficiencia de dicha reacción podría aumentarse, ya que las mutantes T44V y R127Q mostraron un mayor valor de  $k$  con respecto a lo observado en la enzima *wild type*. Finalmente, el estudio de la reducción de metanosulfénico por ASC en solución mostró que las moléculas de H<sub>2</sub>O no tienen una función catalítica, pero si son importantes en la termodinámica de la reacción. Con respecto a la reacción de reducción del C<sub>p</sub>-SOH por ascorbato en PRDX6, se determinó por primera vez la presencia de una catálisis ácida: se observa una transferencia protónica desde el residuo Arg155 al grupo saliente OH<sup>-</sup> acoplada al ataque nucleofílico del ASC sobre el sulfénico. Se obtuvo una energía libre de activación de 11.3 kcal mol<sup>-1</sup>, la cual es consistente con la estimada a partir de la  $k$  determinada experimentalmente.

En su conjunto, estos resultados aportan a la comprensión del funcionamiento de estas enzimas tan eficientes en la reducción de sustratos peróxidos y a la vez tan versátiles.



# Abreviaturas y acrónimos

<b>A</b>	
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AhpC	Alquil hidroperoxido reductasa C
AhpE	Alquil hidroperoxido reductasa E
AhpF	Disulfuro reductasa dependiente de flavina
aMD	Dinámica molecular acelerada
AO	Aldehído oxidasa
ASC	Ascorbato
ASK1	Quinasa reguladora de la apoptosis
ATP	Adenosina trifosfato
<b>B</b>	
B	Proteína blanco
BCP	Proteína co-migratoria con bacterioferritina
<b>C</b>	
CF	Complejo final de reacción
CG	Algoritmo de gradiente conjugado
CI	Complejo inicial de reacción
CicA	Ciclofilina A
$C_{ij}$	Matriz de covarianza
cMD	Dinámica molecular convencional
$C_p$	Cisteína peroxidática
$C_R$	Cisteína resolutive
<b>D</b>	
DFT	Teoría de funcionales de la densidad
DHA	Dehidroascorbato
DTPA	Ácido pentético
DTT	Ditiotreitol
<b>E</b>	
EdH	Enlace de hidrógeno
Ero1	Oxidoreductina 1 del retículo endoplásmico
$e^-$	Electrones
<b>F</b>	
FF	Conformación <i>fully folded</i>
$f_{inac}$	Fracción de enzima inactivada por sobreoxidación
fs	Fentosegundo ( $10^{-15}$ segundos)
<b>G</b>	
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GR	Glutación reductasa

GRx	Glutarredoxina
GS <sup>•</sup>	Glutación reducido radical
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación disulfuro
GSSG <sup>•-</sup>	Anión radical del glutación disulfuro
<b>H</b>	
HOMO-KS	Orbital de Kohn-Sham ocupado de mayor energía
<b>I</b>	
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
IRC	Coordenada de reacción intrínseca
<b>K</b>	
k	Constante de velocidad
K	Grados Kelvin
k <sub>cat</sub>	Constante catalítica
k <sub>ex</sub>	Constante de intercambio entre las conformaciones FF y LU
K <sub>LU</sub>	Constante de equilibrio de la transición FF↔LU
K <sub>M</sub>	Constante de Michaelis
k <sub>res</sub>	Constante de velocidad de la resolución
k <sub>SOX</sub>	Constante de velocidad de la sobreoxidación
K <sub>ss</sub>	Constante de velocidad de la formación del enlace disulfuro en solución
k <sub>ap</sub>	Constante de velocidad aparente
k <sub>B</sub>	Constante de Boltzmann (1.3806 x 10 <sup>-23</sup> J K <sup>-1</sup> )
<b>L</b>	
LCPO	Combinaciones lineales de superposiciones por pares
LMWT	Del inglés <i>low molecular weight thiol</i>
LU	Conformación <i>locally unfolded</i>
<b>M</b>	
MAO	Monoamina oxidasa
MAPK	Quinasas activadas por mitógenos
mBBr	Monobromobimano
MGH1	N-(hidro-5-metil-4-imidazolón-2-il)-ornitinal
MM	Mecánica molecular
mM	Milimolar (10 <sup>-3</sup> molar)
MPO	Mieloperoxidasa
MR	Micotiol disulfuro reductasa
Mrx1	Micorredoxina-1
MSH	Micotiol
<b>N</b>	
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
Nm	Nanometro (10 <sup>-9</sup> metros)
nM	Nanomolar (10 <sup>-9</sup> molar)

NPA	Del inglés <i>natural population analysis</i>
NPT	Ensemble con número de partículas, presión y temperatura constante
NVT	Ensemble con número de partículas, volumen y temperatura constante
ns	Nanosegundo ( $10^{-9}$ segundos)
<b>O</b>	
O <sub>L</sub>	Oxígeno del grupo saliente
ONIOM	Del inglés <i>our own n-layered integrated molecular orbital and molecular mechanics</i>
O <sub>R</sub>	Oxígeno reactivo
<b>P</b>	
PC	Componente principal
PCA	Análisis de componentes principales
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
pK <sub>a</sub>	-log de la constante de ionización
PLA2	Actividad fosfolipasa A2 independiente de Ca <sup>2+</sup>
PME	Del inglés <i>Particle Mesh Ewald</i>
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Prx	Peroxirredoxina
ps	Picosegundo ( $10^{-12}$ segundos)
<b>Q</b>	
QM	Mecánica cuántica
QM/MM	Método mixto cuántico-clásico
<b>R</b>	
RESP	Potencial electrostático restringido
RMSD	Desviación media cuadrática de las posiciones atómicas
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMSF	Fluctuación media cuadrática de las posiciones atómicas
RNS	Del inglés <i>reactive nitrogen species</i>
ROS	Del inglés <i>reactive oxygen species</i>
<b>S</b>	
SASA	Área superficial accesible al solvente
SD	Algoritmo <i>steepest descent</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
S <sub>N</sub> 2	Sustitución nucleofílica bimolecular
SOD	Superóxido dismutasa
Srx	Sulfirredoxina
<b>T</b>	
TIP3P	Del inglés <i>transferable intermolecular potential with 3 points</i>
Tpx	Tiorredoxina peroxidasa
TR	Tiorredoxina reductasa
TS	Estado de transición
TSA1	Antioxidante tiol específico

<b>V</b>	
v	Velocidad de reacción
<b>X</b>	
XO	Xantina oxidasa
$\pi$ -GST	Glutación transferasa $\pi$
$\mu$ s	Microsegundos ( $10^{-6}$ segundos)
$\mu$ M	Micromolar ( $10^{-6}$ molar)
$\Delta G$	Cambio en la energía libre de Gibbs
$\epsilon$	Coeficiente de absortividad molar o constante dieléctrica

# Capítulo 1: Introducción

## 1.1 Estrés oxidativo

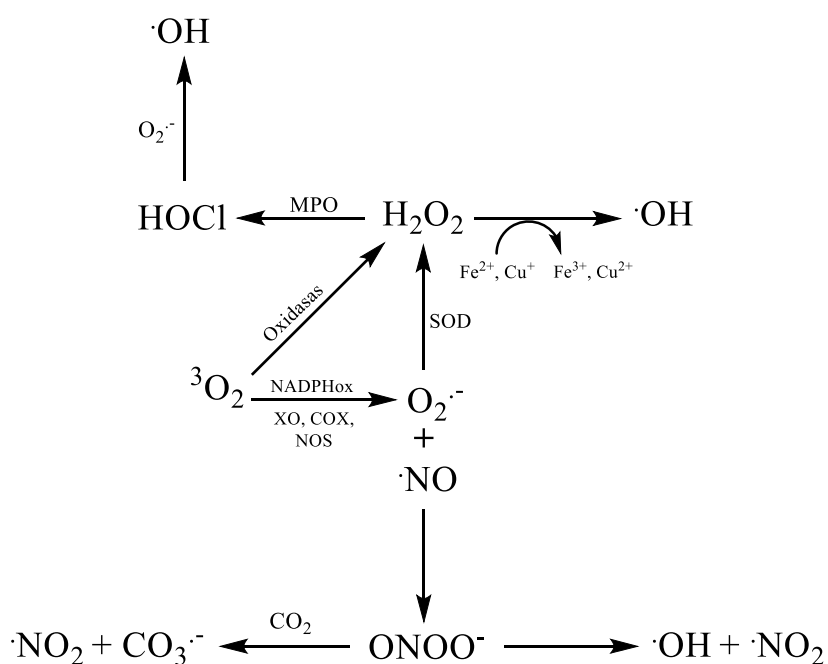
En los organismos aerobios existe un balance entre la producción de especies oxidantes (radicales, especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, ROS y RNS por sus siglas en inglés, respectivamente) y la defensa celular antioxidante. Si ocurre una producción desmedida de especies oxidantes, moléculas claves como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, pueden sufrir un daño oxidativo y provocar una disrupción de las vías de señalización redox. Este estado se conoce como estrés oxidativo<sup>1</sup>.

El concepto de estrés oxidativo fue introducido por primera vez en la literatura en el año 1985 por Helmut Sies, definido como una alteración en el balance prooxidante-antioxidante, en favor del primero<sup>2</sup>. Un año después, este mismo autor publicó una revisión, en donde sitúa a los oxidantes en un contexto bioquímico<sup>3</sup>. En dicha revisión se describe el daño oxidativo que generan los oxidantes en diversas macromoléculas biológicas (ácidos nucleicos, aminoácidos y proteínas, carbohidratos y lípidos), y los sistemas antioxidantes celulares (enzimáticos y no enzimáticos).

El estrés oxidativo ha sido vinculado a una gran variedad de enfermedades: asociadas al sistema inmune (artritis reumatoidea<sup>4</sup>, alergias<sup>5</sup> y disfunciones del sistema inmune en sí mismo<sup>6</sup>), cardiovasculares<sup>7</sup>, neurodegenerativas (Parkinson y Alzheimer<sup>8</sup>), relacionadas al metabolismo (diabetes<sup>9</sup>) y cáncer<sup>10</sup>.

Las moléculas oxidantes más comunes que se producen durante el estrés oxidativo derivan del oxígeno y nitrógeno, y pueden o no ser radicales (**Figura 1.1**). En los organismos aerobios, la presencia del oxígeno molecular  $O_2$  es la mayor fuente de producción de ROS y RNS. Su reducción parcial por un electrón, produce el anión radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el cual se puede convertir en peroxinitrito ( $ONOO^-$  /  $ONOOH$ ) mediante la reacción controlada por difusión con el óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ )<sup>11</sup>, o en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) de forma espontánea o catalizada por la superóxido dismutasa (SOD). El  $H_2O_2$  también se genera por la reducción de  $2 e^-$  del  $O_2$ , que puede ser catalizada por diversas oxidasas como la xantina oxidasa (XO), oxidoreductina 1 del retículo endoplásmico (Ero1), aldehído oxidasa (AO) y monoamina oxidasa (MAO). A su vez, el  $H_2O_2$  es fuente de productos secundarios más reactivos, como el extremadamente fuerte oxidante radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ )<sup>12</sup>. Éste es producido mediante la reducción del  $H_2O_2$  por los metales de transición  $Fe^{2+}$  y  $Cu^+$ , reacción de Fenton<sup>13</sup>, la reacción entre el ácido hipocloroso (HOCl) generado por la enzima mieloperoxidasa (MPO) y el superóxido o por homólisis de  $ONOOH$ .

El  $\text{ONOO}^-$  puede generar  $\text{OH}^\cdot$  y dióxido de nitrógeno ( $\cdot\text{NO}_2$ ) mediante su homólisis espontánea, o reaccionar con dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) para generar el radical carbonato ( $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ) y  $\cdot\text{NO}_2$ . El  $\cdot\text{NO}_2$  reacciona con una constante de velocidad ( $k$ ) del orden de  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ( $\text{pH} = 7.4$ ) con moléculas de relevancia biológica como glutatión (GSH), cisteína (Cys) y urato<sup>14</sup>, y con un valor de  $k$  del orden de  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  con ácidos grasos ( $\text{pH} = 9$ ) y los aminoácidos triptófano (Trp) y tirosina (Tyr) ( $\text{pH} = 7.5$ )<sup>15</sup>. De esta manera, la producción de peroxinitrito puede derivar en la generación de radicales oxidantes, capaces de reaccionar con tioles proteicos, aminoácidos aromáticos o incluso modificar las bases nitrogenadas del ácido desoxirribonucleico (ADN)<sup>16</sup>.



**Figura 1.1** Posibles rutas de formación de ROS y RNS

Tal como se muestra en la **Figura 1.1** las ROS y RNS pueden actuar como oxidantes de un electrón (especies de capa abierta o radicales), o de dos electrones (especies de capa cerrada). En el caso de las primeras, la energía de activación de la reacción es muy pequeña, por lo que la capacidad oxidante de estas moléculas está dada por su potencial de reducción; en el caso de las segundas, las barreras de activación de las reacciones son más determinantes en la capacidad de oxidar de la molécula que los potenciales de reducción<sup>17</sup>. Si bien todas las rutas de formación de oxidantes presentadas en la **Figura 1.1** son en principio posibles, algunas de ellas están favorecidas frente a otras. Factores como el valor de  $k$ , la concentración de alguno de los reactivos, o su consumo eficiente por algún sistema antioxidante, hacen que no todas las rutas tengan la misma relevancia biológica. En

el caso del HO $\cdot$ , la ruta principal de su formación *in vivo* es la reacción de Fenton, ya que su producción a través de la ruptura homolítica del ONOOH no tiene relevancia biológica y el HOCl, además de reaccionar con el O $_2^{\cdot-}$  para formar HO $\cdot$ , experimenta numerosas reacciones con otras moléculas. Con respecto al ONOO $\cdot$ , su reacción con CO $_2$  para dar los radicales  $\cdot$ NO $_2$  y CO $_3^{\cdot-}$ , tiene un valor de  $k = 5.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ <sup>18</sup> y además el CO $_2$  se encuentra en concentraciones del rango milimolar<sup>19</sup> lo cual hace que esta reacción sí tenga relevancia biológica. Por otro lado, su formación a partir del O $_2^{\cdot-}$  y  $\cdot$ NO está controlada por difusión, por lo que es muy favorecida cinéticamente. Con respecto al H $_2$ O $_2$ , su formación a partir de la dismutación del O $_2^{\cdot-}$  también está favorecida cinéticamente, ya que es catalizada por las SOD, con valores de  $k$  que se encuentran en el orden de  $10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  dependiendo del tipo de SOD<sup>20</sup>.

De todos estos metabolitos redox, el H $_2$ O $_2$  es el que se encuentra más implicado en la detección, regulación y señalización redox<sup>21</sup>. La fuente principal de su generación en el organismo es la familia de NADPH oxidasas y la cadena respiratoria<sup>22</sup>, y en menor medida algunas oxidasas como las mencionadas previamente. En total se conocen 31 enzimas capaces de generar H $_2$ O $_2$ <sup>23</sup> y su concentración celular se encuentra en el rango 1 - 50 nM<sup>24</sup>. Aún no está claro como el H $_2$ O $_2$  actúa selectiva y eficientemente en la oxidación de ciertas proteínas involucradas en rutas de señalización, y en literatura se manejan dos grandes ideas al respecto<sup>25-27</sup>. Una de ellas postula que el H $_2$ O $_2$  actúa directamente sobre las proteínas blanco a regular, y la señalización redox es específica debido a que las diferentes proteínas blanco son activados según el tiempo de exposición a H $_2$ O $_2$  y a su concentración. Para que esto suceda, las proteínas que detoxifican H $_2$ O $_2$  deberían ser inactivadas. La otra vertiente postula que las proteínas que detoxifican H $_2$ O $_2$  (en especial peroxirredoxinas), transfieren la oxidación a las proteínas blanco, la cual puede ser directa o facilitada por proteínas auxiliares. Cuando el H $_2$ O $_2$  se encuentra a concentraciones fisiológicas, en donde no genera un daño oxidativo de moléculas biológicas, sino que participa en la regulación de vías de señalización redox, se dice que la célula se encuentra en un estado de "eustrés oxidativo"<sup>28</sup>.

Las ROS y RNS también tienen funciones benéficas a nivel celular, por ejemplo son muy importantes en la defensa del hospedero de agentes infecciosos<sup>29</sup>. Durante el estallido respiratorio, los fagocitos pueden convertir O $_2$  a ROS con una velocidad máxima de  $\sim 35$  nmoles por cada  $10^7$  células por minuto<sup>30</sup>, que es significativamente mayor a la observada en fagocitos no activados<sup>31</sup>. Los mecanismos de muerte celular dependiente de ROS incluyen la acción directa del radical hidroperoxilo (HO $_2\cdot$ ) y el H $_2$ O $_2$ . El HO $_2\cdot$  está presente a pHs bajos (como en los fagosomas) o en los alrededores de las membranas, y el H $_2$ O $_2$  tiene acción bactericida mediante la peroxidación<sup>32</sup> o la generación de HOCl en



el fagosoma<sup>33</sup>. La regulación redox de diversas vías de señalización es clave en varios procesos celulares. Por ejemplo, los procesos de proliferación, supervivencia y diferenciación celular, así también como el metabolismo, son regulados mediante la regulación directa de quinasas y fosfatasa de las cascadas de quinasas activadas por mitógenos (MAPK)<sup>34</sup> y de la vía fosfoinositol 3-quinasa (PI3K)<sup>35</sup> que sufren modificaciones redox. Otro ejemplo de regulación a nivel celular es la homeostasis del hierro, su reacción con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (reacción de Fenton<sup>13</sup>) permite conectar su metabolismo con el estrés oxidativo. La expresión de las proteínas encargadas del transporte en plasma (transferrina) y almacenamiento celular (ferritina) del hierro está regulada por proteínas con elementos de respuesta al hierro y al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>36,37</sup>. Altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhiben la síntesis de ferritina y estimulan la expresión del receptor de transferrina<sup>38</sup>.

La oxidación y reducción de los tioles proteicos es el mecanismo mayoritario por el cual los oxidantes regulan las diversas vías de señalización. Los residuos de cisteína pueden oxidarse a ácido sulfénico (-SOH), que forman enlaces disulfuro (-S-S-) con otras cisteínas o sufrir una sobreoxidación a ácidos sulfínico (-SO<sub>2</sub>H) o sulfónico (-SO<sub>3</sub>H). El ácido sulfénico también puede formar una sulfenamida (-SNH-) si hay un grupo amina o amida cercano en su entorno proteico, o reaccionar con otro derivado sulfénico para formar un tiosulfonato (-RS(O)SR-)<sup>39</sup>. Estas modificaciones pueden generar cambios en la estructura y función de la proteína, y son, exceptuando el sulfónico y en menor grado el sulfínico, reversibles por diversos sistemas reductores<sup>40</sup>. El mecanismo de oxidación de la proteína blanco a regular puede ser de diversas maneras: i) el oxidante puede actuar directamente sobre ella; ii) el oxidante puede alterar el par redox GSH/GSSG, resultando en la oxidación de tioles proteicos; iii) el oxidante puede modificar proteínas muy reactivas que actúan como sensores y luego transmiten la oxidación a la proteína blanco<sup>41</sup>.

Como se mencionó previamente, la posibilidad de que una molécula blanco (B) reaccione con un oxidante no indica que ese proceso sea biológicamente relevante. En la célula hay diversos blancos que competirán entre sí en las reacciones con los diversos oxidantes, cuál de ellos se oxide, dependerá de sus velocidades de reacción relativas (r). Cada velocidad de reacción está dada por la concentración de B ([B]) y por la constante de velocidad de la reacción (k). Por ejemplo, en la competencia entre dos moléculas blanco B1 y B2 se puede establecer una relación cuantitativa a través del cociente entre las velocidades de reacción:

$$r = k_1 [B1] / k_2 [B2] \quad (1.1)$$

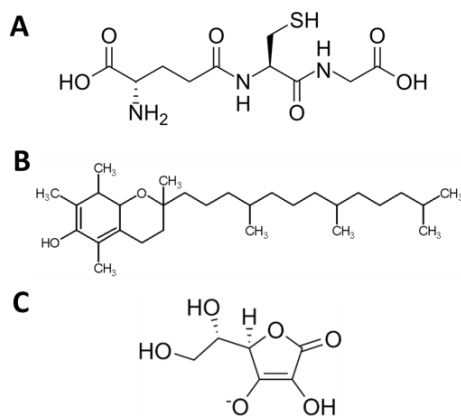
En el caso que haya  $n$  moléculas blanco que compiten por el mismo oxidante, la proporción de oxidante que reacciona con la molécula blanco B1 estará dada por la siguiente relación:

$$r = k_1 [B1] / \sum k_n [B_n] \quad (1.2)$$

de esta manera, si la molécula blanco no se encuentra en concentraciones significativas, su oxidación no será favorecida. Lo mismo sucederá en el caso en que el valor de  $k$  sea pequeño. Finalmente, hay que tener en cuenta que este modelo cinético considera una solución homogénea; sin embargo, la capacidad de los oxidantes de difundir y atravesar membranas y el compartimiento celular específico donde se generen, serán determinantes en su acción. Por ejemplo, el peróxido de hidrógeno atraviesa las membranas a través de acuaporinas<sup>42</sup> por lo que su generación no está restringida a ciertos compartimientos celulares. En el caso de especies aniónicas como el superóxido, la permeabilidad de la membrana no es buena y su actuación se restringe al compartimiento en donde se generó<sup>43</sup>.

## 1.2 Líneas de defensa celular

Las especies antioxidantes son aquellas capaces de retardar, prevenir o eliminar las modificaciones oxidativas presentes en diferentes moléculas blanco. Su reacción con los oxidantes generará productos menos reactivos y dañinos, protegiendo de esta manera a las moléculas propensas a sufrir daño oxidativo<sup>44</sup>. Las reacciones entre antioxidantes y radicales van a generar productos que también son radicales y únicamente en el caso en que el producto sea menos dañino se hablará de actividad antioxidante. Las especies antioxidantes no enzimáticas más comunes a nivel celular capaces de eliminar radicales son: el GSH, la vitamina E y el ascorbato (ASC) (**Figura 1.2**).

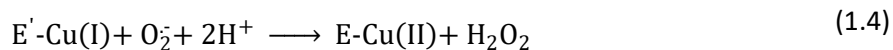
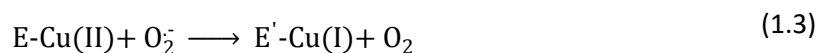


**Figura 1.2** Estructura de los antioxidantes no enzimáticos más comunes a nivel celular. (A) GSH; (B) vitamina E; (C) ASC.

El ASC reacciona con una gran variedad de radicales, dando como producto radicales ascorbilo, que se desproporcionan para dar ascorbato y dehidroascorbato (DHA)<sup>45</sup>. La vitamina E es una molécula lipofílica y su acción antioxidante genera radicales tocoferoxilo, poco reactivos que se eliminan a través de reacciones que involucran radicales, por ejemplo por el ASC<sup>46</sup>. Winterbourn propuso una vía que involucra al  $O_2^-$  y al GSH por la cual los radicales intracelulares son eliminados<sup>47</sup>. En esta vía, los radicales generados transfieren electrones al oxígeno, directamente o a través del GSH, para formar  $O_2^-$  que es consumido por la SOD. El glutatión reacciona con los radicales formando el radical tiilo en el grupo tiol de la cisteína (GS $\cdot$ ), de esta forma puede eliminar, por ejemplo, radicales formados en las bases nitrogenadas del ADN<sup>48</sup>. El GSH será eficiente en la eliminación de los radicales únicamente si el producto GS $\cdot$  es eliminado con eficiencia, ya que puede iniciar otras reacciones que involucran radicales. La ruta más favorable que sigue el GS $\cdot$  es la reacción con una segunda molécula de GSH para dar glutatión disulfuro aniónico radical (GSSG) $^-$ , un reductor fuerte que reacciona muy rápido con  $O_2$  para dar  $O_2^-$  y GSSG<sup>49</sup>.

En la célula existe además un conjunto de antioxidantes enzimáticos que cataliza la reducción de oxidantes. Este grupo incluye a las siguientes enzimas: superóxido dismutasas (SOD, EC 1.15.1.11), catalasa (CAT, EC 1.11.1.6), glutatión peroxidasas (GPx, EC 1.11.1.9), tioredoxina (Trx, EC 1.8.4.10), glutarredoxinas (GRX, EC 1.20.4.1) y peroxirredoxinas (Prx, EC 1.11.1.15).

La dismutación del anión superóxido por la SOD para dar  $H_2O_2$  es clave en la defensa celular ya que el  $O_2^-$  es fuente del ONOO $^-$ . Esta enzima logra una aceleración de 10,000 veces con respecto a la dismutación espontánea del superóxido. En los mamíferos hay tres isoformas de SOD: SOD1, SOD2 y SOD3. La SOD1 es un homodímero que contiene cobre y zinc y se localiza principalmente en el citoplasma; la SOD2 es un homotetrámero que contiene manganeso y se localiza en la mitocondria; la SOD3 también presenta cobre y zinc, pero es un tetrámero y se localiza a nivel extracelular<sup>50</sup>. La reacción de la SOD involucra la dismutación del superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Por cada ciclo catalítico se consumen dos moléculas de superóxido, por ejemplo para el cobre las reacciones serían las siguientes<sup>51</sup>:

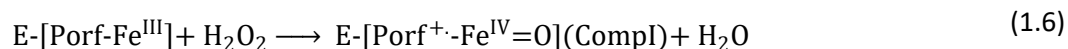


donde E y E' representan a la SOD reducida y oxidada, respectivamente.

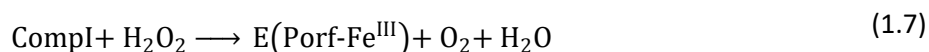
La catalasa es otra dismutasa, que contiene un grupo hemo en el sitio activo y convierte dos moléculas de peróxido de hidrógeno en oxígeno molecular y agua:



Esta reacción requiere la unión de una primera molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al sitio activo para generar el intermediario de vida corta llamado compuesto I (CompI), mediante la oxidación del grupo hemo a una especie oxiferrilo ( $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ) por extracción de un electrón del  $\text{Fe}^{\text{III}}$  y otro del macrociclo de la porfirina (Porf), originando un catión radical sobre el mismo:

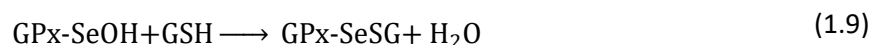
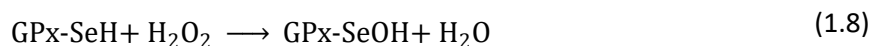


La segunda molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduce al CompI y se restaura la enzima a su estado inicial, formando  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ :

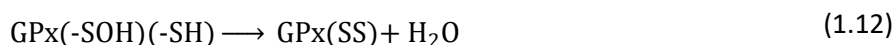
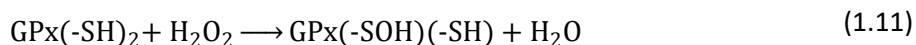


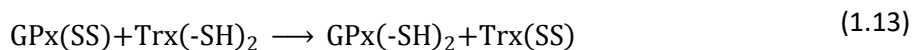
El valor de la  $K_M$  aparente de la CAT por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se encuentra en el rango milimolar, por lo que la enzima es eficiente cuando hay una concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  muy elevada<sup>52</sup>.

Las GPx catalizan la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizando residuos de selenocisteína (SecGPx) o cisteína (CysGPx) según la isoforma. En vertebrados hay ocho isoformas: GPx1 a GPx4 contienen selenio en el sitio activo, mientras que GPx5 a GPx8 presentan cisteína en el mismo (siendo GPx6 Cys dependiente en humanos). En el caso de las GPx que utilizan selenio, la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  produce ácido selenénico ( $-\text{SeOH}$ ), el cual es posteriormente reducido por la acción de dos moléculas de GSH, como se muestra en las expresiones (1.9) y (1.10):



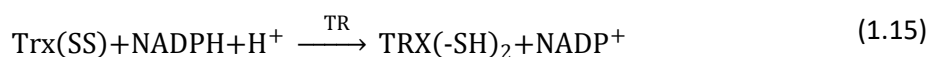
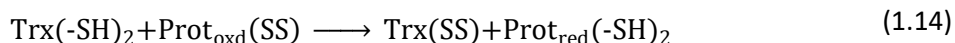
En el caso de las CysGPx, el ciclo catalítico transcurre de la manera análoga a las SecGPx si solo hay una Cys involucrada en la catálisis. Si hay dos Cys involucradas, luego de la formación del ácido sulfénico en una de ellas, se genera un enlace disulfuro entre ambas, que posteriormente es reducido por la Trx<sup>53</sup>:





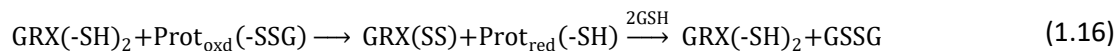
donde  $\text{GPx(-SH)}_2$ ,  $\text{GPx(-SOH)(-SH)}$ ,  $\text{GPx(SS)}$ ,  $\text{Trx(-SH)}_2$  y  $\text{Trx(SS)}$  representan los diferentes estados de oxidación en que se encuentran una o ambas Cys en GPx y Trx.

Las Trx son disulfuro isomerasas que catalizan la reducción de enlaces disulfuro. De esta forma mantienen un ambiente reductor en el interior de la célula, en donde la mayoría de las cisteínas se encuentran reducidas. Todas las Trx tienen un motivo Cys-Gly-Pro-Cys conservado en el sitio activo y los dos residuos de Cys presentes en el mismo son los implicados en la reacción de reducción del enlace disulfuro de las proteínas oxidadas. Luego de una ronda de catálisis esas Cys se encuentran formando un enlace disulfuro, que es reducido por la tiorredoxina reductasa (TR) a expensas de  $\text{NADPH}^{54}$ :



donde  $\text{Prot}_{\text{oxd}}(\text{SS})$  y  $\text{Prot}_{\text{red}}(\text{-SH})_2$  representan a la proteína oxidada a disulfuro y reducida, respectivamente.

Las glutarredoxinas (GRX) también son disulfuro isomerasas y tienen mecanismos mono- y di-tiólicos. El mecanismo ditiólico (ec. 1.16) utiliza dos Cys catalíticas para reducir sustratos que pueden ser disulfuros proteicos o proteínas glutationiladas, resultando en la formación de  $\text{GRX(SS)}$ , que es reducida por dos moléculas de GSH. En el mecanismo monotiólico (ec. 1.17) una Cys y una molécula de GSH son necesarias en cada evento de reducción<sup>55</sup>:



donde  $\text{Prot}_{\text{oxd}}(\text{-SSG})$  y  $\text{GRX(-SSG)}$  representan disulfuros mixtos con GSH de la proteína blanco y la enzima GRX, respectivamente, y GSSG al disulfuro del GSH, su forma oxidada.

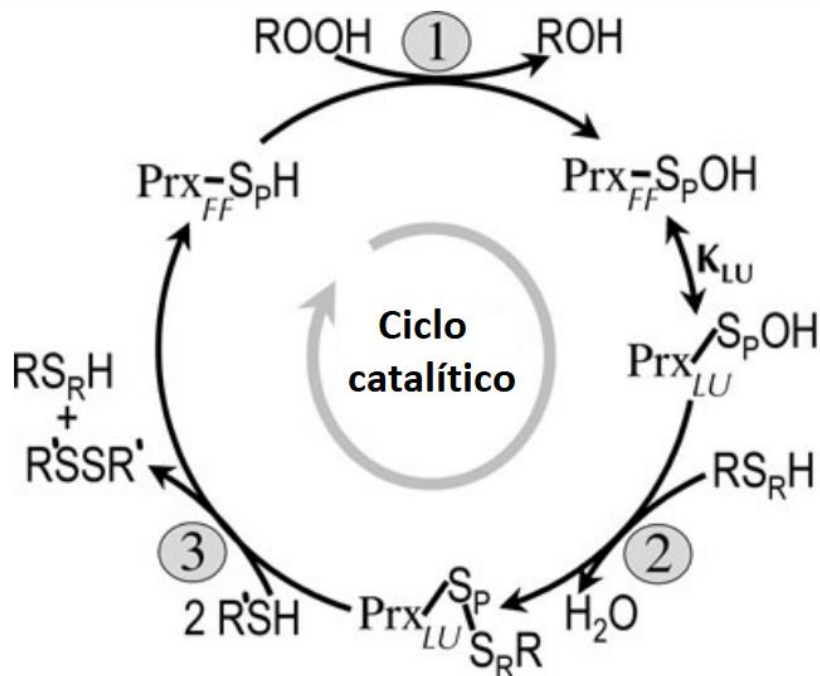
Las peroxirredoxinas (Prx) y sus características serán desarrolladas en mayor detalle en el resto de este capítulo de introducción.

### 1.3 Generalidades de las peroxirredoxinas

Las peroxirredoxinas son una familia de enzimas peroxidasa que catalizan la reducción de diversos peróxidos (ROOH) utilizando residuos de cisteína<sup>56</sup>, con la excepción conocida de una única Prx presente en *Eubacterium acidaminophilum*, que contiene selenocisteína en lugar de cisteína<sup>57</sup>. La primera peroxirredoxina fue identificada en levaduras en el año 1987 por Stadtman y colaboradores<sup>58</sup>. En ese momento se le llamó proteína antioxidante tiol específica (TSA) y se determinó que presentaba dos grupos tioles, un peso molecular de 25 kDa y que se encontraba en diferentes estados de oligomerización. Poco tiempo después, en 1990, el clonado y secuenciamiento de TSA y de la alquil hidropéroxido reductasa (AhpC) permitió determinar que ambas pertenecían a una misma familia de más de 25 proteínas antioxidantes presentes en los organismos de todos los reinos<sup>59</sup>.

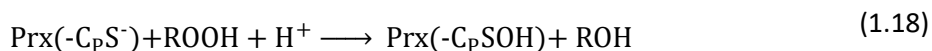
Algo que llamó especial atención hacia este grupo de enzimas es que no utilizan cofactores en la catálisis de la reacción<sup>60</sup>. Las Cys involucradas en la catálisis se denominaron cisteína peroxidática (C<sub>p</sub>), presente en todas las Prx, y cisteína resolutive (C<sub>R</sub>), que puede o no estar presente<sup>61</sup>. Las Prx son muy rápidas catalizadoras de la reducción de peróxidos y abarcan un rango de constantes de velocidad bastante amplio. Por ejemplo, para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se ha reportado un valor de k en el orden de 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> para la proteína comigratoria con bacterioferritina B (BCP)<sup>62</sup>, mientras que para la peroxirredoxina 2 (PRDX2) el valor aumenta a 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup><sup>63</sup>. Su eficiencia en la reducción junto a los altos niveles de expresión que presentan, las hace las reductoras de peróxido por excelencia, reduciendo más del 90% de los peróxidos presentes en la célula<sup>43</sup>.

En la **Figura 1.2** se ilustra el ciclo catalítico universal de las Prx, con tres pasos químicos principales. El primer paso es común a todas las Prx y se denomina peroxidación<sup>64</sup>. Los pasos de formación de disulfuro y reducción presentan pequeñas diferencias de un tipo a otro de Prx y permiten clasificar a las Prx en tres clases, según el número de Cys utilizadas en la catálisis y su localización relativa en una o más unidades de la proteína.



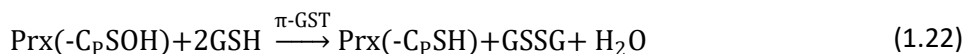
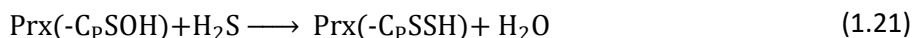
**Figura 1.2.** Ciclo catalítico universal de las Prx. Se muestran los tres pasos principales del ciclo: (1) peroxidación, (2) formación de disulfuro y (3) reducción, junto a los estados conformacionales *fully folded* (FF) y *locally unfolded* (LU) de la proteína.  $S_p$  y  $S_r$  representan los átomos de azufre de las  $C_p$  y  $C_r$ , respectivamente. Figura adaptada de Karplus y Hall<sup>65</sup>.

La reacción de reducción de los distintos ROOH comienza con un ataque nucleofílico por parte de la  $C_p$  (ionizada a tiolato  $\text{Prx}(-C_pS^-)$ ), sobre uno de los átomos de oxígenos del ROOH, formando un ácido sulfénico en la  $C_p$  ( $\text{Prx}(-C_pSOH)$ ) y el alcohol correspondiente (o  $H_2O$  en el caso que  $R = H$ ):

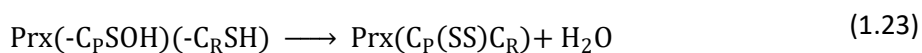


Las Prx que utilizan un único residuo de Cys en la catálisis se denominan Prx 1-Cys. Luego del paso peroxidático, se forma un enlace disulfuro con un tiol externo a la proteína (con una excepción conocida que será desarrollada en el apartado 1.8), como ser: tiorredoxina (ec. 1.19)<sup>66</sup>, ciclofilina A (CicA; ec. 1.20)<sup>67</sup>,  $H_2S$  (ec. 1.21)<sup>68</sup> o GSH asociado a la isoforma  $\pi$  de la enzima glutatión transferasa ( $\pi$ -GST), donde primero se glutatiónila la  $C_p$  y luego el disulfuro mixto  $\text{Prx-SS-}\pi\text{GST}$  es reducido de forma espontánea por una segunda molécula de glutatión (ec. 1.22)<sup>69</sup>.





Las Prx que utilizan un segundo residuo de Cys en la catálisis se denominan Prx 2-Cys, y la formación del disulfuro con C<sub>p</sub>-SOH es realizado por la cisteína resolutive, C<sub>R</sub>. En las Prx 2-Cys atípicas, el enlace disulfuro es intramolecular ya que las C<sub>p</sub> y C<sub>R</sub> se encuentran en la misma cadena polipeptídica; en las Prx 2-Cys típicas el enlace disulfuro es intermolecular, la reacción ocurre entre el derivado sulfénico de C<sub>p</sub> ubicado en un monómero y el grupo tiolato de C<sub>R</sub> localizado en otro<sup>70,71</sup>.



El tercer paso del ciclo catalítico donde el enlace disulfuro es reducido para recuperar la enzima en su estado original se denomina paso de reducción y es llevado a cabo, en general, por la enzima Trx, también utilizando dos residuos de Cys (ec. 1.14). La Trx es devuelta a su forma reducida a través de la acción de la TR, a expensas de NADPH (ec. 1.15). Una excepción conocida es la reducción por el sistema GSH/Grx + GR y NADPH que se ha reportado para algunas PrxQ de 1-Cys y para la Prx3 mitocondrial<sup>72</sup>.

Además de clasificarlas según las características del ciclo catalítico, las Prx pueden ser agrupadas en seis subfamilias en base al perfil del sitio activo analizado en términos de estructuras cristalográficas conocidas y secuencias aminoacídicas. En particular se consideran fragmentos de la secuencia cercanos a los residuos clave para la catálisis y características tales como la interfaz de oligomerización (ver sección 1.4), especificidad del ROOH y donantes de electrones, sensibilidad redox y sensibilidad a la sobreoxidación. La base de datos PREX (*PeroxiRedoixn classification indEX*, disponible en <http://www.csb.wfu.edu/prex/>) fue así desarrollada por Nelson, Poole y colaboradores<sup>73</sup> utilizando las 29 estructuras resueltas para determinar seis subfamilias bien diferenciadas de Prx, entre las cuales asignar las 3,516 secuencias de la familia depositadas hasta enero 2008 en *GenBank*<sup>74</sup>. Más recientemente se actualizó PREX, ampliando el número de secuencias a 6,325 presentes a noviembre 2010 en *GenBank*, **Tabla 1.1**. En 2017 se desarrolló un nuevo método bioinformático para identificar miembros de cada subfamilia y su agrupamiento por *clustering* según relevancia funcional<sup>75</sup>. Con este algoritmo se logró identificar 38,739 secuencias del *GenBank*<sup>74</sup> como correspondientes a la familia de las Prx.



**Tabla 1.1.** Asignación de secuencias a las distintas subfamilias de Prx en PREX<sup>76</sup>.

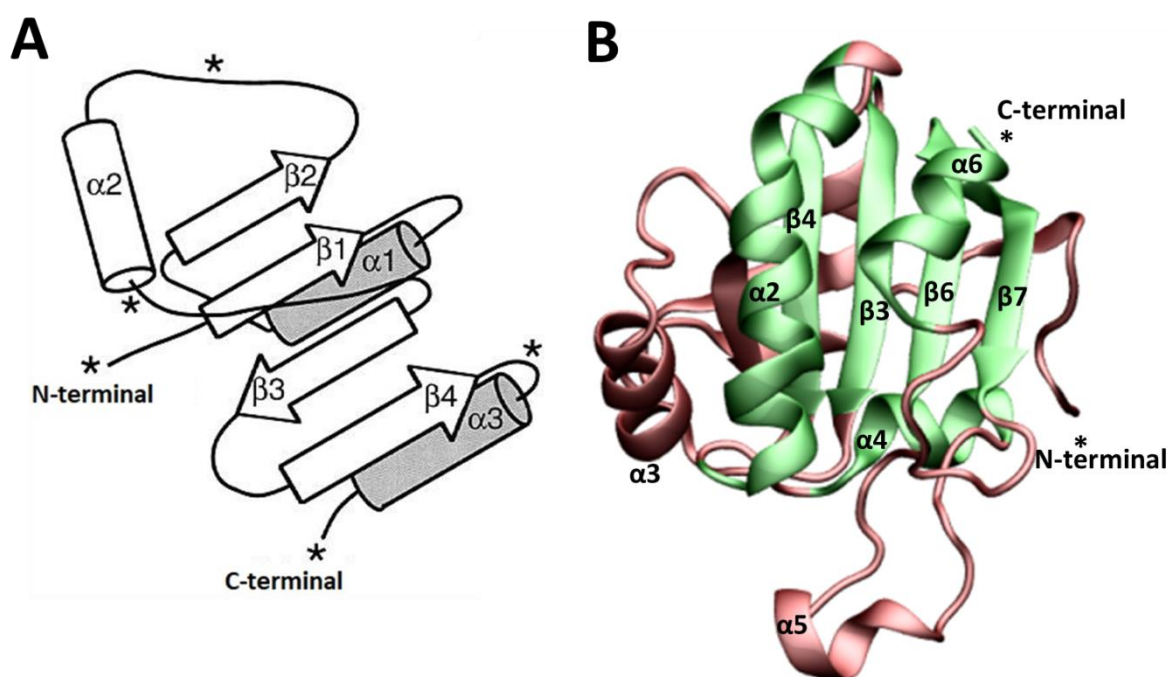
Subfamilia <sup>1</sup>	Número de secuencias	Distribución filogenética	Clasificación según mecanismo
AhpC-Prx1	2,026	Arqueobacterias, Bacterias, Hongos, Plantas, Animales	2-Cys típicas
BCP-PrxQ	1,610	Bacterias, Plantas, Arqueobacterias, Hongos	2-Cys atípicas y 1-Cys
Prx5	914	Bacterias, Plantas, Hongos, Animales	2-Cys atípicas y 1-Cys
Prx6	899	Arqueobacterias, Bacterias, Plantas, Hongos, Animales	1-Cys y 2-Cys típicas
Tpx	779	Bacterias	2-Cys atípicas
AhpE	97	Bacterias	1-Cys y 2-Cys

<sup>1</sup>Abreviaturas: AhpC, alquil hidroperóxido reductasa C; BCP, proteína co-migratoria con bacterioferritina; Tpx, tiol peroxidasa; AhpE, alquil hidroperóxido reductasa E. Prx1 hace referencia a una excepción del grupo BCP, una Prx de *Mycobacterium tuberculosis* con dos Cys que pueden actuar como C<sub>R</sub>.

Tal como se muestra en la **Tabla 1.1**, todas las subfamilias de Prx pueden encontrarse en bacterias, siendo la Tpx y la AhpE exclusivas de dicho reino. El resto de las subfamilias (AhpC-Prx1, BCP-PrxQ, Prx5 y Prx6) se encuentran tanto en plantas como en hongos y únicamente AhpC-Prx1, BCP-PrxQ y Prx6 están presentes en las arqueobacterias. Para aquéllas proteínas pertenecientes al grupo de Prx 2-Cys también varía la localización de la C<sub>R</sub>. En la subfamilia AhpC-Prx1, la C<sub>R</sub> se localiza en una extensión de la región C-terminal (ver detalles de la estructura en la sección 1.4). En la subfamilia BCP-PrxQ, la C<sub>R</sub> se localiza 5 residuos después de la C<sub>P</sub>, ambas contenidas en la misma hélice ( $\alpha_2$ ), con algunas excepciones conocidas en donde se localiza en la hélice  $\alpha_3$ <sup>76,77</sup>. En la subfamilia Prx5, la C<sub>R</sub> se localiza cerca del extremo C-terminal (que, a diferencia de de la subfamilia AhpC-BCP, no tiene extensión) en la hélice  $\alpha_5$  (ver **Figura 1.3, B**)<sup>78</sup>. En la subfamilia Prx6, la Prx 2-Cys típica pertenece a *Toxoplasma gondii* y la C<sub>R</sub> se localiza en un *loop* del dominio C-terminal<sup>79</sup>. En la subfamilia Tpx, la C<sub>R</sub> se encuentra localizada en el giro C-terminal de la hélice  $\alpha_3$ . Finalmente, en el caso de la subfamilia AhpE, la localización de la C<sub>R</sub> es desconocida.

## 1.4 Estructura y estado de oligomerización de las Prx

Si se realiza una búsqueda en el *Protein Data Bank*<sup>80</sup> con la palabra clave “*peroxiredoxin*”, se obtienen 189 resultados (Abril de 2018), de los cuales el 23% corresponden a estructuras de Prx de humanos. La estructura tridimensional de las Prx consiste en un único dominio con plegamiento tipo tiorredoxina. A través de la correlación entre elementos de secuencia conservados, estructura y aspectos mecánicos de las Trx, Prx y las proteínas involucradas en la maduración del citocromo (CMP), se propuso que las segundas evolucionaron divergentemente a partir de un ancestro tipo tiorredoxina y tienen como eslabón a las CMP<sup>81</sup>.

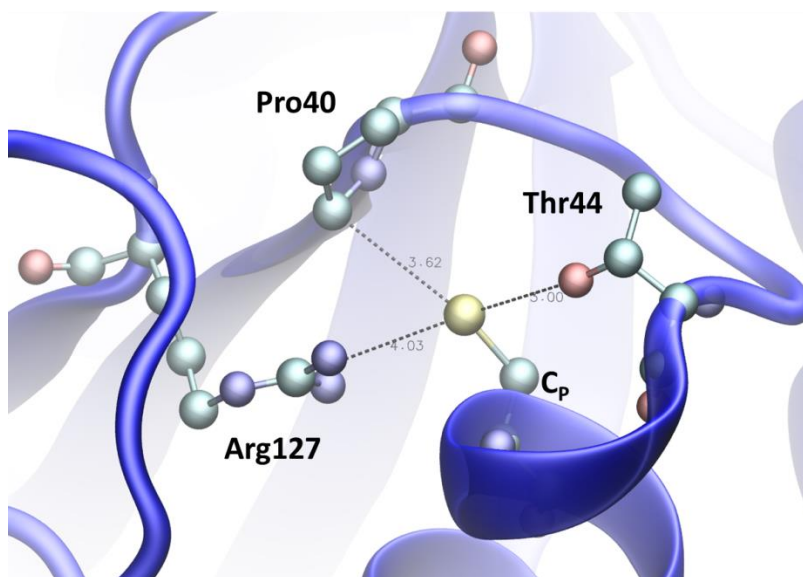


**Figura 1.3 A:** plegamiento tipo tiorredoxina con la numeración de las hélices  $\alpha$  y hebras  $\beta$ . Los asteriscos muestran los sitios de inserción. Figura adaptada de Martín<sup>82</sup>. **B:** estructura de la PRDX5 humana (PDBID 1HD2<sup>78</sup>). En verde se destacan los elementos de estructura secundaria pertenecientes al plegamiento tipo tiorredoxina y en rosa las inserciones, con la numeración propia de aquellos que se logra ver en la imagen.

El plegamiento tipo tiorredoxina (**Figura 1.3, A**) es un motivo estructural que consiste en una hoja  $\beta$  central formada por cuatro hebras dispuestas de forma antiparalela ( $\beta1 - \beta4$ ), rodeadas por tres hélices  $\alpha$  ( $\alpha1 - \alpha3$ ). Consta de alrededor de 80 residuos y tiene ciertos sitios en los cuales se encuentran inserciones de otros residuos según el tipo de proteína. Ha sido identificado en la estructura de varias clases de proteínas, por ejemplo: Trx, GRx,  $\pi$ -GST, tiol-disulfuro oxidorreductasa (DsbA), GPx y Prx<sup>82</sup>. En la familia de las Prx se encuentran elementos de estructura secundaria

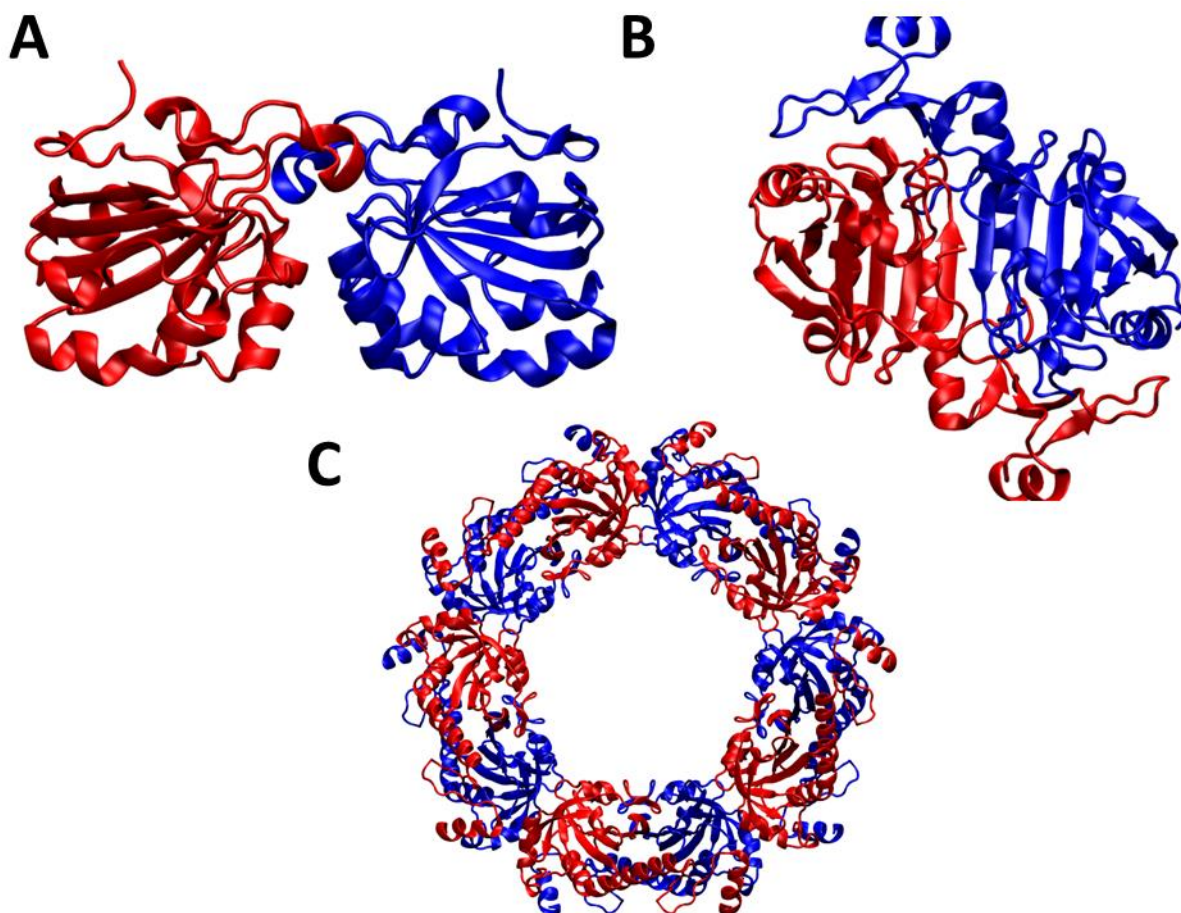
adicionales a este plegamiento, formando la arquitectura proteica junto al núcleo en común, que consiste en una hoja  $\beta$  formada por siete hebras y cinco hélices  $\alpha$ . En la **Figura 1.3, A** se muestra la topología del plegamiento tipo tiorredoxina y los puntos en dónde se encuentran las inserciones de residuos (\*) y en la **Figura 1.3, B** se muestra la estructura de la peroxirredoxina 5 humana (PRDX5), en donde se evidencian los elementos de estructura secundaria y terciaria pertenecientes al plegamiento tipo tiorredoxina y los elementos adicionales.

La estructura primaria de las Prx consta de 160 - 220 aminoácidos. Cuatro de ellos se encuentran altamente conservados y conforman el sitio activo (**Figura 1.4**). Tres se encuentran cercanos en secuencia y conforman el motivo PXXXTXXC (por motivos de practicidad, de aquí en más se utilizará indistintamente el código de aminoácidos de una letra o de tres letras), donde la Cys y la Thr se localizan en la última vuelta del extremo N-terminal de la hélice- $\alpha_2$  y la prolina en un *loop* previo a dicha hélice. El residuo de treonina se encuentra sustituido por una serina en algunas Prx. El cuarto residuo es una Arg que se localiza en la hebra- $\beta_6$ <sup>56</sup>. Como se mencionó previamente, la posición de la C<sub>R</sub> en las Prx del tipo 2-Cys es variable, pero en general, se encuentra lejana en secuencia amionoacídica y en posición espacial respecto al sitio activo, con un a distancia a la C<sub>P</sub> de entre 12 - 15 Å<sup>83,84</sup>.



**Figura 1.4** Estructura representativa del sitio activo de las Prx. Se destaca en representación de bolas y varillas los átomos (sin evidenciar los H) de los residuos conservados Cys, Thr, Arg y Pro que forman el sitio activo peroxidasa. La numeración corresponde a la PRDX5 y los números pequeños en gris a distancias relativas al átomo de S de la C<sub>P</sub> (en Å).

Con respecto a la estructura cuaternaria, la mayoría de las Prx se encuentran organizadas en estado oligomérico (**Figura 1.5**) y sólo algunos miembros de la subfamilia BCP-PrxQ se encuentran como monómeros. La formación de dímeros puede ser de dos tipos, A o B, según las características de la interfaz que se forma entre los monómeros constituyentes. En los dímeros del tipo A (**Figura 1.5, A**), la interacción entre monómeros ocurre mayoritariamente a través de la hélice- $\alpha 3$ ; esta interacción se encuentra en las subfamilias Prx5, Tpx, BCP-PrxQ y AhpE de la clasificación PREX previamente introducida. Por otro lado, los dímeros del tipo B (**Figura 1.5, B**) se forman por la interacción en disposición anti-paralela de las hojas  $\beta$  del plegamiento tipo tiorredoxina de los monómeros constituyentes, formando una hoja  $\beta$  extendida de 14 hebras. Esta interacción se encuentra en las subfamilias AhpC-Prx1 y Prx6. La unión de 5 dímeros del tipo B mediante una interfaz del tipo A genera decámeros; este tipo de estructura se encuentra también en las subfamilias AhpC-Prx1 y Prx6<sup>85</sup>.



**Figura 1.5** Estructura cuaternaria (estados oligoméricos) en las Prx. **A:** dímero del tipo A establecido entre unidades de PRDX5. **B:** dímero del tipo B establecido en la peroxirredoxina 6 humana (PRDX6). **C:** decámero formado por interacción tipo A entre dímeros tipo B establecidos en PRDX2. Códigos PDB de las estructuras mostradas: **A:** 2vl3; **B:** 1prx; **C:** 1qmv.

La oligomerización de las Prx es afectada por el estado de oxidación de las Cys catalíticas<sup>86</sup>, la concentración proteica<sup>87</sup>, la presencia de una cola de histidinas<sup>87</sup> y por diversos factores del medio, como el pH, la fuerza iónica y la concentración de fosfato<sup>88</sup>. Las Prx 2-Cys típicas son homodímeros obligados (recuérdese que ya se planteó en la sección dedicada a las generalidades del ciclo catalítico que requieren la participación en el paso resolutorio de una C<sub>R</sub> ubicada en otra subunidad de la proteína respecto a la que lleva la C<sub>P</sub>) que por lo general se encuentran asociados formando decámeros<sup>89</sup>. Se ha visto que mientras que la oxidación de la C<sub>P</sub> altera la estabilidad de los decámeros, favoreciendo su desagregado hacia la forma dimérica<sup>61</sup>, su sobreoxidación los estabiliza<sup>90</sup> y en algunos casos hace que la enzima gane actividad chaperona<sup>91</sup>.

El efecto del estado oligomérico sobre la actividad peroxidasa ha sido estudiado para distintas Prx, incluyendo a la AhpC de *Salmonella typhimurium*<sup>92</sup>, Prx1 de *Arabidopsis thaliana*<sup>93</sup> y PRDX3 humana<sup>94</sup>. Los resultados de los estudios sobre AhpC y PRDX3 mostraron que la actividad peroxidasa es mayor cuando las enzimas forman ensamblados de alto peso molecular, mientras que para el caso de Prx1 se determinó lo opuesto. Mediante experimentos de calorimetría desarrollados trabajando con Prx 2-Cys de plantas y humanos, se determinó que la concentración crítica requerida para formar oligómeros se encuentra en el rango 1 - 2  $\mu\text{M}$ , lo cual se toma como indicador de que estas formas de agregación son la especie predominante *in vivo*<sup>95</sup>.

## 1.5 Reacción de peroxidación

El primer paso del ciclo catalítico, de peroxidación, es una sustitución nucleofílica tipo S<sub>N</sub>2, con ataque del tiolato de la C<sub>P</sub> sobre el peróxido ROOH, que forma ácido cistiensulfénico (C<sub>P</sub>-SOH) y ROH. Esta reacción tiene un valor de k elevado, en el rango de 10<sup>3</sup> - 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup><sup>96</sup>, 2 a 7 órdenes de magnitud mayor que en el caso de la cisteína libre (k = 2.9 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, pH 7.4 y 25 °C)<sup>97</sup>. El tiolato de la Cys considerado como reactivo en este proceso<sup>98</sup>, es mucho mejor nucleófilo que el grupo tiol, ya que presenta carga negativa neta y una mayor polarizabilidad sobre el átomo de azufre. Por otra parte, cuanto menor sea la constante de acidez (o lo que es lo mismo, mayor su pK<sub>a</sub>) del grupo tiol, mayor será la proporción de la especie tiolato presente a pH fisiológico; esto lleva con frecuencia a la confusión de suponer en análisis rápido que cuanto más ácido sea un tiol, más reactivo será<sup>99</sup>, prescindiendo de considerar el efecto que tiene la variación del pH sobre la nucleofilia del tiolato.

La constante de velocidad independiente del pH para la reacción de un tiolato RS<sup>-</sup> (k<sub>RS-</sub>), es buen indicador de su reactividad intrínseca, ya que indica cuál sería el valor de su k si toda la especie

se encontrara en la forma más reactiva (tiolato).  $k_{RS-}$  se obtiene dividiendo la constante de velocidad aparente de la misma reacción, determinada a cierto pH ( $k_{ap}^{pH}$ ) por la fracción de tiolato presente a ese mismo pH:

$$k_{RS-} = k_{ap}^{pH} \left( \frac{K_a^{SH} + [H^+]}{K_a^{SH}} \right) \quad (1.24)$$

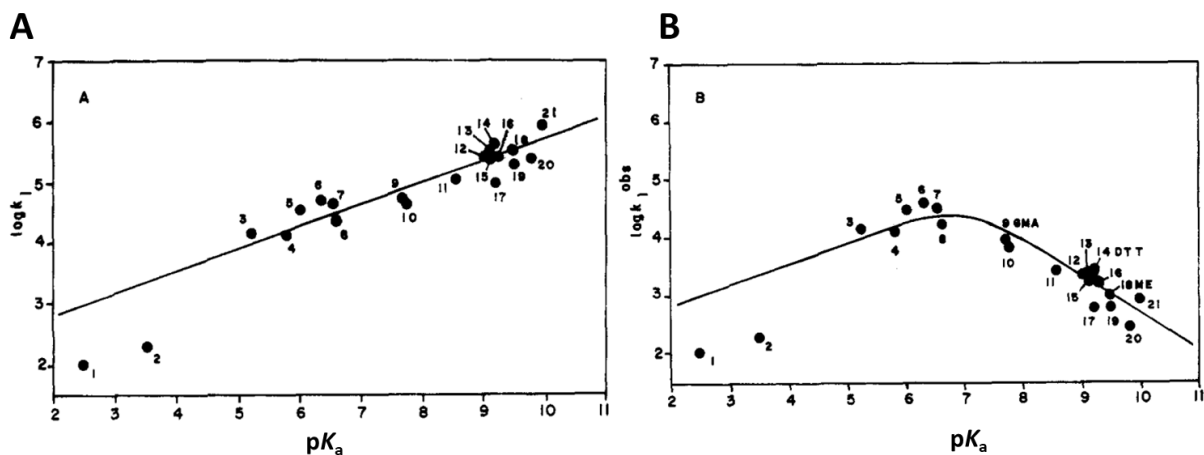
donde  $K_a^{SH}$  es la constante de ionización del grupo tiol en interés.

Hay una relación lineal empírica entre  $k_{RS-}$  y  $pK_a$  denominada relación de Brønsted:

$$\log k_{RS-} = \beta_{nuc} pK_a + C \quad (1.25)$$

Donde C es una constante y  $\beta_{nuc}$  la constante de nucleofilidad, que toma valores de 0 a 1 y es la pendiente del gráfico de  $\log k_{RS-}$  vs.  $pK_a$ . De esta manera, la relación de Brønsted muestra que, para la reacción entre un tiol de bajo peso molecular (LMWT, por su sigla en inglés) y un electrófilo dado,  $k_{RS-}$  aumenta con la basicidad del tiol o se mantiene constante, pero nunca decrece<sup>100,101</sup> (**Figura 1.6, A**). Por otro lado, la dependencia de la  $k_{ap}^{pH}$  con el  $pK_a$  del tiol muestra que la constante de velocidad es máxima cuando el  $pK_a \approx pH$  (**Figura 1.6, B**), según:

$$\log k_{ap}^{pH} = pK_a (\beta_{nuc} - 1) + C + \log ([H^+] + K_a) \quad (1.26)$$



**Figura 1.6.** Reducción de 5,5'-Ditiobis-2-nitrobenzoato por LMWT (números 1 a 21) a pH 7 y 30 °C. **A:** correlación de Brønsted. **B:** dependencia de  $k_{ap}^{pH}$  en función del  $pK_a$  del tiol. Extraído de Whitesides et al<sup>101</sup>.

En suma, cuanto menor sea el valor del  $pK_a$  del tiol, mayor disponibilidad de tiolato habrá a pH 7.4, lo que tendería a traducirse en un aumento de la velocidad de reacción por la vía de una mayor

concentración de la especie más reactiva del par tiol/tiolato. Sin embargo, en oposición a esta tendencia, el tiolato del LMWT será tanto más reactivo cuanto mayor sea su basicidad ( $pK_a$  más alto). Por lo tanto, el  $pK_a$  del tiol debe ser suficientemente bajo para asegurar la presencia de una cantidad suficiente de tiolato para el ataque nucleofílico, pero la basicidad del tiolato debe estar bien regulada para asegurar que su reactividad intrínseca y que la reacción proceda con velocidad apreciable.

Pasando a tioles proteicos, en el caso de las Prx, las  $C_p$  presentan valores de  $pK_a$ s en el entorno de  $5^{102-105}$ , que indicaría que a pH 7.4 más del 90% del tiol se va a encontrar ionizado a su forma tiolato, asegurando así la presencia de la mayor cantidad posible de la forma más reactiva de la  $C_p$  en la actividad peroxidasa. Si se tiene en cuenta que una cisteína libre presenta un  $pK_a$  en el orden de 8.3 - 8.5<sup>97,106</sup> es inmediato inferir que las Prx son capaces de modular la acidez del grupo tiol en gran medida y se ha propuesto que lo logran a través de:

- *Interacciones electrostáticas de  $C_p$  con residuos básicos protonados cercanos.* La interacción con el grupo guanidinio de la Arg conservada del sitio activo (**Figura 1.4**) es clave para estabilizar la forma tiolato<sup>56</sup>. Para varias Prx se determinó un aumento en el valor del  $pK_a$  de la  $C_p$  al mutar esa Arg por residuos neutros como Gln o Ala<sup>107,108</sup>.
- *Redes de enlaces de hidrógeno (EdH).* El tiolato puede actuar como aceptor de EdH, que tendrán distancias S...H mayores y ángulos S...H-D (siendo D el dador de EdH) menores respecto a los EdH convencionales formados con átomos de oxígeno o nitrógeno. Esto se debe al mayor tamaño del azufre, asociado a su nube electrónica más extendida<sup>109,110</sup>. En diversas Prx se ha estudiado la formación de EdH entre el tiolato y residuos aminoacídicos y moléculas de agua<sup>107,108,110-112</sup>.
- *Interacción de  $C_p$  con el macrodipolo de la  $\alpha$ -hélice.* Las  $C_p$  de las Prx se localizan en el extremo N-terminal de la hélice- $\alpha$ 2 (**Figura 1.3, B**). Resultado de la disposición espacial de los dipolos de los enlaces peptídicos que la forman, la estructura  $\alpha$ -hélice genera un macrodipolo con su extremo N-terminal positivo, dispuesto en una forma tal que sería capaz de estabilizar la carga negativa presente sobre el tiolato<sup>113</sup>. Sin embargo, en hélices expuestas al solvente, este efecto es atenuado por el medio<sup>114</sup>. Por esto, en muchos casos se considera que no existe realmente un macrodipolo; varios autores atribuyen el efecto estabilizante de la  $\alpha$ -hélice a la formación de EdH entre el tiolato y un grupo amida del esqueleto peptídico<sup>106,115</sup> y/o a la formación de dipolos microscópicos<sup>116</sup> más que a un macrodipolo en sí mismo.
- *Desolvatación del sitio activo.* La exclusión de moléculas de agua del sitio activo (detectado en la mayoría de los sitios activos de Prx depositadas en el PDB) atribuida a la arquitectura del sitio

activo<sup>100,108</sup> reduce la constante dieléctrica del entorno de la C<sub>p</sub> respecto al medio acuoso, incrementando la fuerza de las interacciones electrostáticas y de EdH que establece el tiolato, acentuando su estabilización, lo que permite la disminución del pK<sub>a</sub><sup>100</sup>. Este efecto no se aprecia en otras Cys proteicas que no están protegidas en bolsillos y donde hay acceso de moléculas de agua, como es el caso de la albúmina sérica humana<sup>117</sup>.

Si bien la disponibilidad de tiolato es importante para la reacción, el bajo valor de pK<sub>a</sub> que tiene la C<sub>p</sub> logra explicar solamente un aumento de 10 veces en la velocidad de reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respecto al mismo proceso para el caso de una Cys libre, lo cual deja una diferencia de entre 10<sup>2</sup> a 10<sup>6</sup> sin explicar<sup>97</sup>. Esto indica que en las Prx el sitio activo y su arquitectura particular tienen funciones clave en la activación de la nucleofilia de la C<sub>p</sub> y en la estabilización diferencial del estado de transición (TS) de la peroxidación respecto al complejo enzima-sustrato, de forma de disminuir significativamente la barrera energética de la reacción.

El detalle del mecanismo básico de la reacción de oxidación de un tiol por un peróxido ha sido estudiado por diversos autores, empleando distintos tipos de aproximaciones metodológicas: experimentales, teóricas e integrativas de ambas. En cuanto al modelado computacional, el mismo constituye una poderosa herramienta para el análisis a nivel de detalle atómico y electrónico de mecanismos de reacción y las características de los TS asociados, junto a las posibles causas de su estabilización diferencial por efectos del entorno en el que ocurre el proceso. En este sentido, es muy útil trabajar con modelos materiales representativos de la reacción en solución y en el sitio activo de la enzima, donde se puede modificar distintas variables del sistema como la polaridad del entorno (representada implícitamente con modelos de dieléctrico continuo como el PCM<sup>118,119</sup> o explícitamente a nivel molecular, esencialmente agua descrita a nivel de mecánica clásica (MM)<sup>119</sup>, mecánica cuántica (QM)<sup>120</sup> o mediante híbridos cuántico-clásico (QM/MM)<sup>121</sup>) o la naturaleza del sistema reactivo incluyendo/excluyendo elementos del medio de reacción (como residuos clave) para analizar su influencia sobre el proceso y su barrera energética.

En 1993, Bach, Su y Schlegel<sup>122</sup> publicaron el primer artículo que describe el mecanismo entre un tiol (el H<sub>2</sub>S) y un peróxido, utilizando métodos *ab initio* post Hartree-Fock (MP4// MP2<sup>123</sup>) en fase gaseosa e incluyendo los efectos del medio de forma explícita (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH<sup>+</sup>) e implícita (agua, modelo de continuo SCRF<sup>119</sup>). La estructura del TS hallada evidencia el ataque nucleofílico del S sobre el oxígeno proximal del ROOH, además, encuentran la posibilidad de catálisis ácida general y específica



por solvente protonado en donde se transfiere un  $H^+$  al oxígeno distal del ROOH junto con la transferencia del  $HO^+$  al nucleófilo, también estabilizada por el solvente.

Varios años después, en 2005, Cardey y Enescu utilizaron cálculos *ab initio* (QCISD(T))<sup>124</sup>//MP2<sup>125</sup>) para estudiar la oxidación del metanotiolato por  $H_2O_2$  en fase gaseosa e incluyendo el medio acuoso de forma implícita a través del modelo PCM<sup>119,126</sup>. Siguieron la evolución energética a lo largo del camino de reacción (IRC<sup>127</sup>) y realizaron un análisis de los enlaces involucrados en la coordenada de reacción en el tramo posterior al TS de la misma. Los resultados permitieron determinar que el camino de reacción post-TS combina la transferencia de un oxígeno del  $H_2O_2$  al S del tiolato, con un desplazamiento de hidrógeno desde ese oxígeno hacia el oxígeno distal del  $H_2O_2$  y que el medio tiene un efecto importante sobre la barrera energética. Posteriormente, en 2007, estos mismos autores publicaron un nuevo artículo sobre el mecanismo de esta reacción<sup>128</sup> en donde mejoran la descripción del tiolato para extrapolar el análisis del proceso reactivo a contextos más complejos, como el de los tiolatos proteicos. Describen a la cisteína completa (donde sustituyen los grupos  $-NH_3^+/-COO^-$  por  $-NH-CH_3/-CO-NH-CH_3$ , respectivamente) y al solvente acuoso implícitamente con IEF-PCM<sup>119,129</sup> a nivel MP2<sup>124</sup> y con mejora energética utilizando el método integrativo IMOMO<sup>130,131</sup> (estrategia QM:QM antecesora del método ONIOM<sup>132</sup>) que combina QCISD(T)<sup>125</sup> con MP2<sup>124</sup>. Un hallazgo relevante de este estudio es la evidencia de un EdH entre el  $H_2O_2$  y el grupo NH de la cisteína el cual es clave en la disminución de la barrera de activación.

En 2011, Bayse presenta el primer estudio de este tipo de reacciones<sup>133</sup> en donde se utilizan métodos basados en la teoría de funcionales de la densidad (DFT)<sup>119</sup> aplicando el funcional híbrido B3PW91<sup>134</sup>. Allí analiza la reacción entre el  $CH_3OOH$  y la Cys (tiol/tiolato) libre neutra en fase gaseosa e incluyendo la asistencia de moléculas de  $H_2O$  explícitamente. Además incluye el estudio de la polaridad del medio utilizando el modelo de solvente implícito COSMO-PCM<sup>135</sup> y diversos solventes como el agua, clorobenceno y ciclohexano. El mecanismo más favorable involucra el ataque nucleofílico del tiolato concertado con una transferencia protónica desde el  $-COOH$  de la Cys al grupo saliente  $RO^-$  que es mediada por agua y presenta un TS típico de una reacción  $S_N2$ . Esto evidencia la importancia de contar con un dador de protones en el entorno de la reacción que facilite la salida del grupo  $RO^-$  antes o después del ataque nucleofílico.

Más recientemente, en 2012, Zeida *et al.*, estudiaron la oxidación del metanotiolato por  $H_2O_2$  (mismo modelo de tiolato que el usado en el primer artículo de Cardey y Enescu) incluyendo  $n = 0, 1$  o  $4$  moléculas de  $H_2O$ , reiterando el uso de métodos QM (MP2<sup>124</sup> y los funcionales PBE<sup>136</sup> y B3LYP<sup>137,138</sup>)

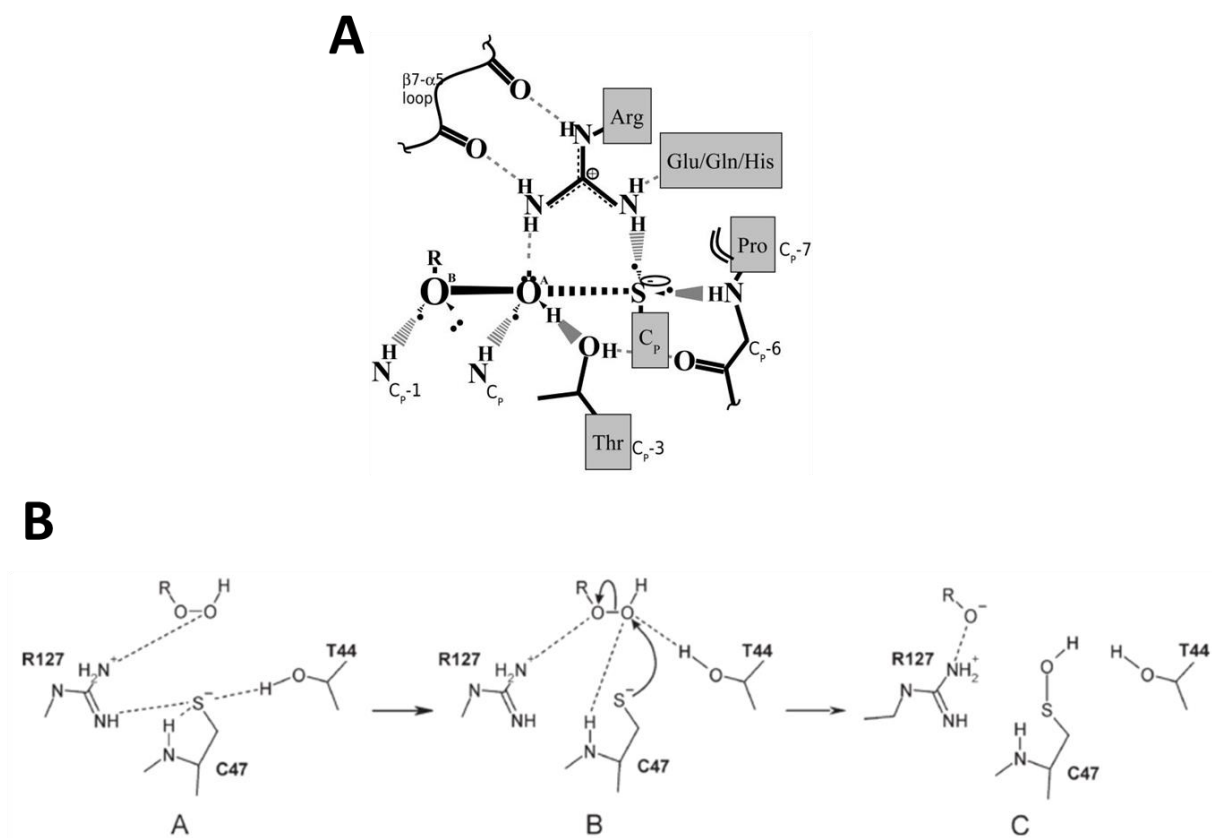
en fase gaseosa y condensada (agua) y ampliando la metodología con simulaciones de dinámica molecular QM-MM<sup>139</sup> a 300 K en condiciones periódicas con solvente explícito clásico (aguas TIP4P<sup>140</sup>) y un esquema de muestreo avanzado (*umbrella sampling*<sup>141</sup>) para construir perfiles de energía libre<sup>142</sup>. Determinaron que la interacción directa con moléculas de solvente es clave para lograr el posicionamiento de los reactivos. El seguimiento de la evolución geométrica y de las cargas atómicas de Mulliken<sup>143</sup> del sistema mostró un TS casi lineal y temprano, donde los procesos de ruptura y formación de enlaces O..O/S..O son concertados e implican una reorganización apreciable de carga atómica (con efectos sobre el patrón de solvatación). Como productos de la reacción se obtuvieron H<sub>3</sub>C-SO<sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O debido a que hay una transferencia protónica post-TS.

En ese mismo período, en el contexto de mi tesina de graduación de la Licenciatura en Bioquímica<sup>144</sup> estudiamos a nivel DFT<sup>119</sup> (con el funcional híbrido B3LYP<sup>137,138</sup>) la modulación de la reactividad del par tiol/tiolato de la Cys y de las características del mecanismo de su oxidación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando el mismo modelo de Cys que el usado por Enescu y Cardey en 2007 y realizamos un barrido de medios de distinta polaridad ( $\epsilon = 1, 4, 20$  y  $78$ ) descritos a nivel IEF-PCM<sup>119</sup>. Los resultados obtenidos mostraron que el tiolato es la especie más blanda y reactiva y que el aumento de la polaridad del medio afecta su fracción disponible (aumentándola) pero a su vez disminuye su nucleofilia. El mecanismo de reacción también fue consistente con una reacción del tipo S<sub>N</sub>2 con una transferencia protónica post-TS, donde la posición de la misma es modulada por la polaridad del medio y se plantea que corresponde a un punto de inflexión cresta-valle en la superficie de energía potencial (Portillo-Ledesma y Coitiño, sin publicar).

En 2014, Bergen, Roos y De Proft presentan un nuevo estudio de la oxidación del metanotiolato por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también utilizando métodos basados en DFT (con el funcional MO6-2X<sup>145</sup>) en fase gaseosa y con correcciones energéticas del efecto del solvente (agua, con cálculos *single-point* a nivel PCM y con radios UAHF<sup>146</sup>), además examinan la influencia de ligandos apolares (CH<sub>4</sub>) y polares (H<sub>2</sub>O y NH<sub>3</sub>) ubicados en distintas posiciones que podrían “imitar” el ambiente enzimático<sup>147</sup>. Los autores encuentran que la forma tiolato es la más reactiva y que la barrera energética del mecanismo puede ser disminuida significativamente por intercambio de protones asistido por solvente, tal como había observado previamente Bayse<sup>133</sup>. De esta manera, el intercambio de protones asistido ayuda a disminuir la barrera energética cuando la especie que actúa es el tiol, por lo que esta alternativa mecanística podría ser viable en contextos proteicos con residuos capaces de asistir en el intercambio de protones. Un buen ejemplo de esto es el estudio integrativo teórico-experimental de la oxidación de la Cys34 de la albúmina por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, desarrollado por Bonanata *et al.*<sup>117</sup>. Mediante el uso del método

de modelado mixto QM/MM ONIOM(DFT:AMBER)<sup>132</sup> se comprobó que las moléculas de agua tienen una función importante en el mecanismo del proceso de oxidación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Éstas permiten que un residuo del entorno (Asp38) extraiga un protón y además forman una caja de agua que acompaña y estabiliza al hidroperóxido a lo largo de la reacción.

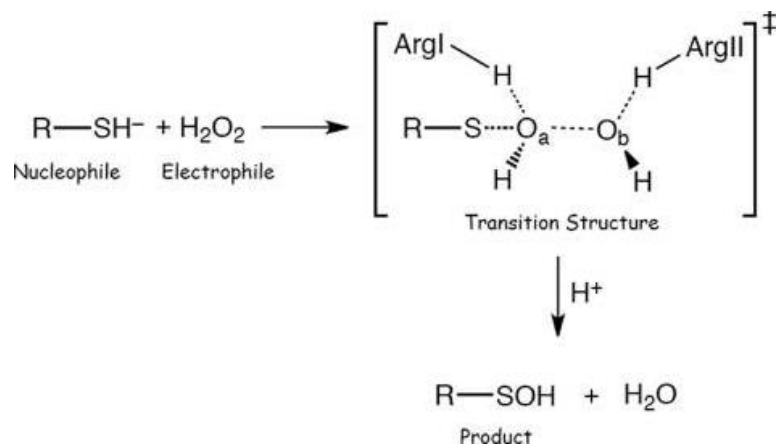
Con respecto a la reacción en el contexto específico de una Prx, también se encuentra registro de avances en la literatura con respecto a la naturaleza del TS y efectos del entorno que indiquen sobre la eficiencia del proceso. En 2010, mediante el análisis comparado de estructuras cristalográficas de PRDX5 formando complejos con moléculas que “imitan” a los sustratos peróxidos Hall *et al.* propusieron un modelo del TS de la reacción<sup>111</sup>. Este TS presentaría una red de EdH extendida que involucraría a la C<sub>p</sub>, al sustrato ROOH y a los residuos conservados Thr, Pro y Arg (Figura 1.7, A muestra el complejo enzima-sustrato).



**Figura 1.7 A:** estructura propuesta para complejo enzima-sustrato en la reacción de peroxidación de las Prx. Se muestra la red de EdH establecida entre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el sitio activo. Extraída de Hall *et al.*<sup>111</sup>. **B:** secuencia de estructuras propuestas para el complejo enzima-sustrato, TS y complejo enzima-producto de la reacción de peroxidación (numeración en base a la secuencia de PRDX5), se muestran los EdH y las flechas indican el ataque nucleofílico y ruptura del enlace O-O. Extraída de Ferrer-Sueta *et al.*<sup>100</sup>.

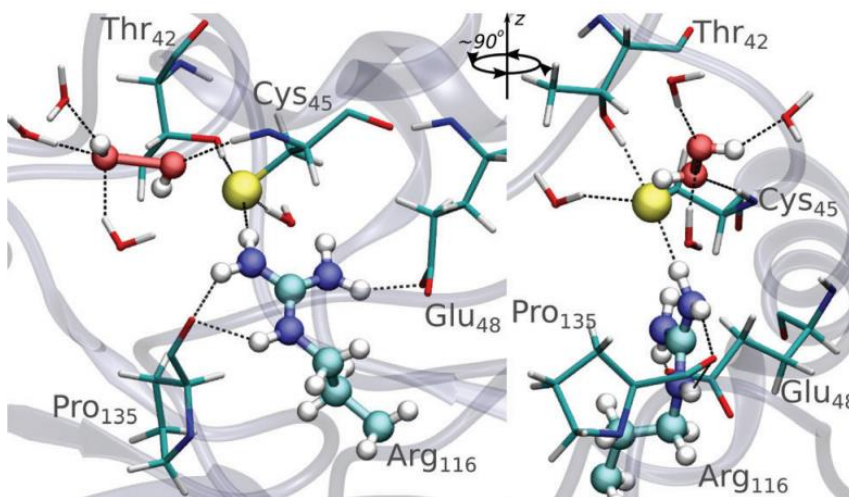
Estas interacciones otorgarían un buen sitio de unión para el peróxido y permitirían su correcto alineamiento para el ataque nucleofílico del tiolato de  $C_p$  (idea acuñada por los autores como “*oxygen track*”, camino de los oxígenos) y a su vez, bajarían la energía de activación del proceso de ruptura-formación de los enlaces directamente involucrados en la reacción. En 2011 Ferrer-Sueta *et al.*, también realizaron a partir de la experiencia en el estudio experimental de la cinética y  $pK_a$  de LMWT y tioles proteicos, incluidas varias Prx, junto al planteo previo de Hall *et al.* una propuesta mecanística que hipotetiza la unión del hidroperóxido al sitio activo mediante interacciones de EdH con la Arg y Thr conservadas (**Figura 1.7, B**, estructura A), lo cual causaría la ruptura de los EdH que estos residuos formaban previamente con la  $C_p$ . Posteriormente en el TS se plantea la estabilización de los grupos  $OH^+$  proximal y  $OH^-$  distal del peróxido (**Figura 1.7, B**, estructura B) y finalmente la formación del producto  $C_p-SOH$  y estabilización del grupo saliente  $OH^-$  mediante la Arg127 (**Figura 1.7, B**, estructura C). Esta secuencia de interacciones permitiría la unión del sustrato al sitio activo y la activación de la  $C_p$  y del sustrato peróxido<sup>100</sup> y presenta algunas variaciones respecto a la propuesta original de Hall *et al.*

También en 2011, Nagy, Radom, Winterbourn, *et al.* realizaron un trabajo integrativo computacional y experimental cinético, dirigido a explicar la excepcional reactividad de las PRDX2 y 3 frente al  $H_2O_2$  en donde junto a estudios de actividad enzimática presentan el modelado QM (funcional B3LYP y correcciones energéticas obtenidas con la estrategia  $G4^{148}$ ) de las especies participantes en la reacción en fase gaseosa con posterior correcciones por solvente calculadas a nivel CPCM<sup>149,150</sup>/UAHF<sup>146</sup> (en agua y en un medio de menor polaridad como representativo de la enzima). Se utilizó un sistema molecular recortado, en el cual incluyen un grupo guanidinio ( $Gua^+$ ) para simular el efecto de la arginina conservada y una molécula de HF o  $H_2O$  para simular escenarios de catálisis por ácidos de Lewis. Sus resultados muestran el efecto esencial de la Arg en la catálisis de la reacción, atribuyendo una función catalítica a los grupos que donan EdH al S de la  $C_p$  y a los dos átomos de oxígeno del peróxido<sup>151</sup>. En base a esto y a los resultados experimentales propusieron un mecanismo (**Figura 1.8**) en donde las dos Arg del sitio activo actúan donando EdH a los oxígenos del peróxido, haciendo que el O proximal sea mejor electrófilo y facilitando la salida del  $OH^-$ .



**Figura 1.8.** Propuesta mecanística de la oxidación de la C<sub>p</sub> en PRDX2 y PRDX3 con dos Arg conservadas en el sitio activo. Tomada de Nagy, Radom, Winterbourn, *et al*<sup>151</sup>

Posteriormente, en 2014, Zeida *et al.* presentaron el estudio de la reacción en la enzima AhpE mediante simulaciones *umbrella sampling* QM/MM-aditivo, incluyendo en la región QM (funcional PBE<sup>136</sup>) al sustrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y las cadenas laterales de la C<sub>p</sub> y la Arg conservada del sitio activo<sup>112</sup>. Determinaron que la aceleración de la reacción por parte de la proteína no sería debida a que el mecanismo en sí mismo sea distinto al planteado para la cisteína libre en solución, sino a que el sitio activo logra a través de EdH, estabilizar diferencialmente el TS con respecto al complejo de reactivos y además activa a la C<sub>p</sub> y al peróxido (**Figura 1.9**). La proteína logra bajar significativamente la entalpía de activación con un efecto entrópico desfavorable en comparación con la reacción no catalizada.



**Figura 1.9** Estructura del TS en la oxidación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la AhpE. Se muestran en punteado las interacciones por EdH establecidas en el sitio activo. Extraído de Zeida, *et al*<sup>112</sup>.

Ese mismo año Oláh *et al.* estudiaron la forma reducida (tiolato) y oxidada (sulfenato) de la PRDX2<sup>152</sup>, realizando simulaciones de dinámica molecular clásica con posterior optimizaciones

QM/MM describiendo a los residuos del sitio activo (Tyr43, Pro44, Thr48, Val50, Arg127 y a la C<sub>p</sub>) con el nivel de teoría B3LYP/6-31+G(d,p). Además estudiaron como sistema modelo al metanotiolato y metanosulfenato en presencia de diferentes ligandos (CH<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>COOH, CH<sub>3</sub>OH, CH<sub>3</sub>CONH<sub>2</sub>, 2 CH<sub>4</sub>, 2 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) optimizados en fase gaseosa a varios niveles de teoría (B3LYP, M06-2X y MP2) con posterior mejora energética en distintos solventes ( $\epsilon = 4, 10$  y  $20$ ) tratados a nivel PCM y radios UAHF<sup>146</sup>. Los resultados muestran como diferentes elementos enzimáticos en su conjunto permiten optimizar la termodinámica de la peroxidación.

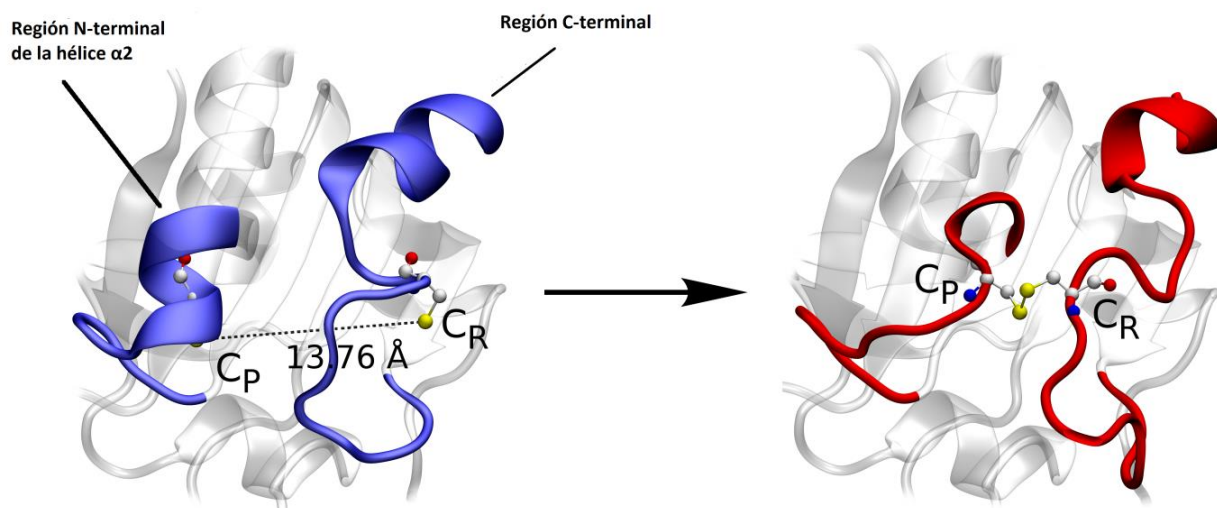
Como se mencionó previamente, el número de sustratos y rango de constantes de velocidad para la reacción de peroxidación es bastante amplio, lo cual indica que las peroxirredoxinas presentan diferentes especificidades por los hidroperóxidos<sup>153-156</sup>. Resultados recientes provenientes de un abordaje experimental y de modelado computacional con simulaciones QM/MM de *umbrella sampling*<sup>141</sup> de la unión de diversos sustratos (hidroperóxidos derivados de ácidos grasos y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a la enzima AhpE indican que dicha especificidad no es debida a que el mecanismo sea diferente sino a que ciertos sustratos se acomodan mejor en el sitio activo con una unión más fuerte, modificando la dinámica de la enzima. Estos ligandos que son reducidos más eficientemente presentan un aumento significativo en su entropía de activación con respecto a aquellos que no son eficientemente reducidos ( $\Delta S^\ddagger = 27$  cal/Kmol entre el hidroperóxido derivado de ácido graso y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>157</sup>.

## 1.6 Reacción de resolución y transición *fully folded* $\leftrightarrow$ *locally unfolded*

En las Prx del tipo 2-Cys las C<sub>p</sub> y C<sub>R</sub> se encuentran a unos 13 - 15 Å<sup>84,158,159</sup> entre sí (**Figura 1.10**), por lo tanto, para que ocurra la formación del enlace disulfuro C<sub>p</sub>-S-S-C<sub>R</sub> (reacción de resolución) debe haber un cambio conformacional en la enzima que las acerque. Este cambio se conoce como transición *fully folded*  $\leftrightarrow$  *locally unfolded* y tiene asociado una constante de equilibrio  $K_{LU}$ , definida como el cociente entre la concentración de enzima en conformación *locally unfolded* (LU) y la concentración de enzima en conformación *fully folded* (FF). Estos estados conformacionales fueron descritos por primera vez en la enzima AhpC por Wood, *et al.*<sup>61</sup>. Mediante la resolución por cristalografía de rayos X determinaron que el *loop* que involucra a la cisteína peroxidática adoptaba distintas conformaciones, las cuales a su vez están asociadas al estado oligomérico de la proteína.

En la conformación FF, el sitio activo se encuentra estructurado, con la C<sub>p</sub> en el fondo de un bolsillo, localizada en el extremo N-terminal de la hélice- $\alpha 2$  y rodeada por los residuos conservados Thr y Arg (**Figura 1.10**). Esta conformación se observa mayoritariamente en estructuras cristalográficas

de Prx reducidas o sobreoxidadas, pero también se ha observado en PRDX6 y AhpE con la C<sub>p</sub> oxidada a ácido sulfénico<sup>160</sup>. Por otra parte, cuando la enzima se encuentra oxidada a estado disulfuro, el sitio activo adopta la conformación LU<sup>161</sup>, caracterizado por presentar el extremo N-terminal de la hélice- $\alpha$ 2 y el segmento C-terminal desenrollados y el enlace disulfuro expuesto al solvente (**Figura 1.10**).



**Figura 1.10** Conformaciones FF y LU de PRDX5. Izquierda, PRDX5 reducida en conformación FF, PDBID 1HD2. Derecha, PRDX5 oxidada en conformación LU, PDBID 2VL2. Se observa la posición de la C<sub>p</sub> y C<sub>R</sub> en la enzima reducida y la formación del enlace disulfuro en la enzima oxidada.

El hecho que ambas conformaciones se encuentren en un equilibrio dinámico, independientemente del estado de oxidación de C<sub>p</sub>, o que C<sub>p</sub>-SH y C<sub>p</sub>-SOH se encuentren atrapadas en las conformaciones FF y LU respectivamente, es algo muy discutido en literatura<sup>84,162</sup>. La dinámica de la transición conformacional se ha estudiado únicamente para la PrxQ de *Arabidopsis thaliana*, perteneciente al grupo de Prx 2-Cys atípicas<sup>163</sup>. A través de estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) de relajación de spin los autores observan una dinámica conformacional extensa en ambos estados de oxidación, pero es extrema en la enzima reducida, lo que indicaría que la conformación FF es más desordenada que la LU. Además determinaron una constante de velocidad global para el intercambio conformacional ( $k_{ex}$ ) de  $1650 \pm 130 \text{ s}^{-1}$ , lo cual indicaría que el mismo no es limitante para la catálisis enzimática. El resto de la evidencia proviene del análisis de estructuras de rayos X<sup>84</sup>. La resolución de estructuras cristalográficas de PRDX4 humana en estado reducido y oxidada a sulfénico mostró que la conformación LU solo se alcanza cuando la enzima está oxidada a sulfénico, indicando que la sulfenilación de C<sub>p</sub> favorece la forma LU. Por otra parte, la reducción con el reductor no específico ditioneol (DTT) de cristales de AhpC oxidados a disulfuro permitió resolver la estructura LU con C<sub>p</sub> reducida, lo cual según los autores, indicaría que el equilibrio FF $\leftrightarrow$ LU es independientemente

del estado de oxidación de la C<sub>p</sub><sup>162</sup>. A su vez, estos experimentos permitieron revelar que el desplegado del extremo C-terminal y el N-terminal de la hélice- $\alpha$ 2 no están coordinados entre sí, ya que se encontraron cristales en donde el extremo C-terminal se encuentra desplegado pero no así el N-terminal de la hélice  $\alpha$ 2.

El equilibrio FF $\leftrightarrow$ LU puede ser alterado, favoreciendo una u otra conformación por diversos factores. Por ejemplo, las modificaciones post traduccionales, mutaciones puntuales, o eliminaciones que ocurran en el extremo C-terminal o que afecten dicha región desorganizando su plegamiento van a aumentar la K<sub>LU</sub><sup>164-167</sup>. Las Prx de 2-Cys típicas eucariotas y algunos protozoarios parásitos presentan el motivo conservado GGLG, localizado en un *loop* entre la hélice  $\alpha$ 4 y la  $\beta$ 5 y el motivo YF en la hélice adicional  $\alpha$ 7, localizada en una extensión del extremo C-terminal<sup>26</sup>. Wood *et al.* postularon que la presencia de dichos motivos enlentece la transición hacia la conformación LU, por lo que el C<sub>p</sub>-SOH se encontraría más tiempo en la conformación FF, favoreciendo la reacción con una segunda molécula de peróxido<sup>56</sup>. De esta manera la transición FF $\leftrightarrow$ LU estaría directamente relacionada con la sensibilidad a sobreoxidarse de las Prx.

La reacción de resolución es de primer orden en todas las Prx. En el caso de Prx 2-Cys atípicas, ambas Cys se encuentran en la misma cadena polipeptídica, mientras que en las Prx 2-Cys típicas la C<sub>p</sub> y C<sub>R</sub> se encuentran en distintos monómeros, pero el dímero tiene una gran estabilidad. La constante de velocidad ( $k_{res}$ ) se ha determinado para varias Prx humanas<sup>168-170</sup> y para AhpC<sup>171</sup> de *Salmonella typhimurium*, obteniéndose valores entre 0.25 - 20 s<sup>-1</sup> en las Prx humanas y 76 s<sup>-1</sup> para AhpC. La constante de velocidad para la misma reacción, pero entre ácido cisteinsulfénico libre y cisteína ( $k_{SS}$ ), se determinó en primera instancia por Luo *et al.* con un valor de 720  $\pm$  70 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> a 25 °C y pH 6<sup>172</sup>. Dichos resultados fueron criticados por Ashby y Nagy debido a que los cursos temporales no coinciden con el modelo propuesto por los autores<sup>173</sup>. Posteriormente, estos autores estudian la reacción utilizando espectroscopía electrónica, y ajustan los datos a un nuevo modelo. Obtienen una constante de velocidad con un límite inferior de 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, la cual es mucho más elevada que la reportada previamente por Luo y colaboradores<sup>174</sup>. Desde el lado computacional Bayse estudió la formación del disulfuro entre Cys y CysSOH a nivel DFT<sup>133</sup>, determinando una barrera de activación en agua de 12.5 kcal/mol que es menor en solventes no polares.

Más allá de las discrepancias en cuanto al valor de la  $k_{SS}$ , cualquiera de los dos datos resultan ser significativamente mayores a los valores de  $k_{res}$  reportados para las distintas Prx. El enlentecimiento de la reacción de resolución en las peroxirredoxinas, que es mayor en las Prx



humanas podría indicar la ganancia de una ventaja evolutiva. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es una molécula involucrada en diversas vías de señalización y la acumulación de Prx oxidada a sulfénico permitiría la reacción entre el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y moléculas blanco que en presencia de Prx no serían capaces de competir por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>175</sup>. Por otra parte, la acumulación de Prx en estado sulfénico podría permitir la formación de disulfuros mixtos con proteínas blanco, actuando así como sensores y transmisoras de señales mediadas por  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>176</sup>.

## 1.7 Sobreoxidación

La sobreoxidación, como se mencionó previamente, ocurre cuando el derivado ácido cisteinsulfénico  $\text{C}_p\text{-SOH}$ , reacciona con una segunda molécula de peróxido para dar ácido cisteinsulfínico ( $\text{C}_p\text{-SO}_2(\text{H})$ ), el cual puede a su vez sufrir sobreoxidación adicional por una tercera molécula de peróxido, dando ácido cisteinsulfónico ( $\text{C}_p\text{-SO}_3(\text{H})$ ). Esta reacción genera una Prx catalíticamente inactiva, ya que no puede ser reducida por tiorredoxina para comenzar una nueva ronda de catálisis. Se ha propuesto que la enzima se debe encontrar en la conformación FF para que el  $\text{C}_p\text{-SOH}$  se sobreoxide, ya que la resolución de estructuras de Prx sobreoxidadas muestran el sitio activo en conformación FF<sup>159,177,178</sup>, también se ha observado dicha conformación en la estructura de Prx3 de *Vibrio vulnificus* que presenta la  $\text{C}_p$  mutada por un Asp, el cual simula a la cisteína sobreoxidada<sup>179</sup>. La transición hacia la estructura LU haría que el  $\text{C}_p\text{-SOH}$  ya no se encuentre en el ambiente óptimo para reaccionar con una segunda molécula de peróxido y favorecería la reacción de resolución, pero no hay evidencia directa de que el  $\text{C}_p\text{-SOH}$  reaccione con peróxido únicamente en la enzima en conformación FF y no LU, en principio ambas reacciones serían posibles.

La constante de velocidad de sobreoxidación ( $k_{\text{SOX}}$ ) se ha determinado para las Prx humanas PRDX2 y PRDX3<sup>170</sup>, y la Prx bacteriana AhpE<sup>105</sup>. Los valores de  $k_{\text{SOX}}$  para las Prx humanas se encuentran en el orden de  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , mientras que para la Prx bacteriana el valor baja significativamente a  $40 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Si bien todas las Prx podrían sufrir sobreoxidación, algunas son inactivadas a concentraciones de peróxido de hidrógeno en el rango submilimolar<sup>63,180,181</sup>, mientras que otras son menos sensibles<sup>26</sup>. Experimentos en donde se somete la PRDX1 a altas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  demostraron que la inactivación es mucho más eficiente cuando la enzima se encuentra pasando a través del ciclo catalítico. Su incubación con 1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no causa inactivación significativa, sin embargo si se incubaba con el sistema tiorredoxina (Trx, TR) y NADPH, sí se observa una inactivación, reflejada en el enlentecimiento del consumo de NADPH<sup>180</sup>. Esto se explica por el hecho de que únicamente el  $\text{C}_p\text{-SOH}$  es el que se sobreoxida.

En cuanto al mecanismo de la reacción, poco se ha reportado en literatura. Para la reacción en el contexto proteico no hay antecedentes y para LMWT existe únicamente el trabajo de Bayse mencionado previamente<sup>133</sup>. Reporta la sobreoxidación del ácido sulfénico de la Cys a sulfínico y a sulfónico utilizando métodos basados en DFT. Los resultados muestran que la sobreoxidación a sulfínico y en menor medida a sulfónico es sensible a la polaridad del entorno, los entornos polares ayudan a la estabilización de la carga negativa del TS disminuyendo la barrera ~5.5 kcal/mol. Por lo tanto las Cys proteicas expuestas al solvente o adyacentes a residuos polares serían más propensas a sobreoxidarse.

Wood *et al.* propusieron los términos “sensibles” y “robustas” para clasificar a las Prx según el grado de susceptibilidad a sobreoxidarse que presenten<sup>26</sup>. En dicho artículo analizan las secuencias aminoacídicas y estructuras cristalográficas de Prx 2-Cys sensibles y robustas. Determinando que la presencia de los motivos GGLG y YF son responsables de dicha sensibilidad. Se postula que el motivo YF en la región C-terminal se empaqueta sobre el sitio activo en conformación FF, lo que retrasa la transición hacia la conformación LU, afectando la velocidad de la reacción de resolución<sup>56,162</sup>. Esta hipótesis coincide con diversos estudios que muestran como las modificaciones post traduccionales<sup>182</sup> o mutaciones/truncaciones<sup>164,165</sup> de dicho motivo o de residuos cercanos<sup>183</sup> afectan la sensibilidad de la enzima a sobreoxidarse.

Debido a que el C<sub>p</sub>-SOH es el reactivo común al paso de resolución y sobreoxidación, se puede decir que ambas reacciones se encuentran en competencia. La ruta que tome durante el ciclo catalítico depende de la velocidad de formación del enlace disulfuro, dada por  $k_{res}[LU]$  y de la velocidad de sobreoxidación, dada por  $k_{SOX}[FF][ROOH]$ . Debido a que la formación del disulfuro requiere a la enzima en conformación LU y la reacción de sobreoxidación a la enzima en conformación FF, la  $K_{LU}$  va a tener un rol clave en favorecer una u otra reacción. Wood *et al.* propusieron que la fracción de proteína inactivada en cada ciclo catalítico va a ser igual al cociente entre la velocidad de sobreoxidación y la suma de la velocidad de sobreoxidación y de resolución<sup>26</sup>:

$$f_{inact} = \frac{k_{SOX}[FF][ROOH]}{k_{SOX}[FF][ROOH] + k_{res}[LU]} \quad (1.27)$$

o lo que es lo mismo,

$$f_{inact} = \frac{k_{SOX}[ROOH]}{k_{SOX}[ROOH] + k_{res}K_{LU}} \quad (1.28)$$

Si se considera que la fracción de inactivación es pequeña, <0.1, se puede reescribir la ecuación como:

$$f_{\text{inact}} \approx \frac{k_{\text{SOX}}[\text{ROOH}]}{k_{\text{res}}K_{\text{LU}}} \quad (1.29)$$

A través de esta ecuación se evidencia que a una dada  $k_{\text{SOX}}$  y  $k_{\text{res}}$ , la  $f_{\text{inact}}$  va a incrementar a medida que se establezca la conformación FF y que cualquier factor que afecte el equilibrio  $\text{FF} \leftrightarrow \text{LU}$  va a influir en la sensibilidad a sobreoxidarse de la Prx.

La mayoría de Prx que presentan los motivos YF y GGLG, y son más sensibles a la sobreoxidación son humanas y pertenecen a la subfamilia de AhpC-Prx1. A su vez, son las únicas peroxirredoxinas que pueden ser reducidas del estado sulfínico a sulfénico mediante la acción de la enzima sulfirredoxina (Srx)<sup>184,185</sup>. Una reacción muy costosa energéticamente ya que requiere la transferencia del fosfato y de la adenosina trifosfato (ATP) al oxígeno del sulfinato, el cual es seguido por el ataque de la cisteína catalítica de la Srx sobre el azufre del sulfinato, formando un tiosulfinato y liberando un grupo fosfato. La resolución de una estructura cristalográfica del complejo covalente Prx-Srx mostró que la región C-terminal de la Prx se despliega por completo, permitiendo la yuxtaposición del motivo GGLG con el de unión a ATP de Srx, el cual es clave para la interacción<sup>186</sup>.

El hecho de que la sensibilidad a la sobreoxidación sea mayor en peroxirredoxinas humanas hace pensar que dicha característica fue seleccionada evolutivamente en los organismos eucariotas y se la relaciona con la señalización a través de peróxido de hidrógeno, lo que dio lugar al desarrollo de la hipótesis “*floodgate*”<sup>26</sup>. Esta teoría indica que para que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  pueda actuar como mensajero a nivel celular, debe ocurrir la inactivación de las peroxirredoxinas cercanas a la fuente de producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de forma tal de que su concentración pueda aumentar localmente. La inactivación de las Prx permitiría la acumulación transitoria de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y su reacción con diversos tioles proteicos<sup>175</sup>, como las fosfatasa de tirosina<sup>187</sup>, fosfolipasas<sup>188</sup>, genes supresores de tumores<sup>189</sup> y quinasas<sup>190</sup>. La reacción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  con estas moléculas blanco es mucho más lenta que con las Prx<sup>191</sup> por lo que la inactivación por sobreoxidación es clave para que ocurran dichas reacciones. También se ha propuesto que la inactivación de las Prx permitiría que el sistema reductor Trx-TR repare otras proteínas oxidadas durante el estrés oxidativo, lo cual sería clave en la supervivencia celular<sup>192</sup>. Otra de las hipótesis es que la sobreoxidación generaría una ganancia de función en las Prx ya que promueve la formación de agregados de alto peso molecular con actividad chaperona<sup>193</sup> o sería importante para adaptar la función de la peroxirredoxina al ritmo circadiano<sup>194,195</sup>.

## 1.8 Reducción de peroxirredoxinas

Esta reacción involucra la reducción del enlace disulfuro en las Prx 2-Cys y la reducción del C<sub>p</sub>-SOH en las Prx 1-Cys.

En el caso de las Prx 2-Cys, el reductor fisiológico por excelencia es la Trx, si bien para algunas Prx existen reductores específicos<sup>196,197</sup>. La reacción de intercambio tiol disulfuro comienza por el ataque nucleofílico de la cisteína N-terminal del motivo conservado CGPC de la Trx sobre la C<sub>R</sub> del enlace disulfuro C<sub>p</sub>-S-S-C<sub>R</sub> de la Prx. Una vez que se forma el disulfuro mixto Prx-Trx, la reacción se resuelve por el ataque nucleofílico de la cisteína C-terminal sobre la N-terminal del motivo CGPC. Este mecanismo fue verificado por la resolución de estructuras cristalográficas del complejo Trx-Ahp1<sup>198</sup>, por espectrometría de masas de fragmentos proteolíticos del complejo triparredoxina peroxidasa-triparredoxina<sup>199</sup> y el estudio mediante el uso de mutantes del complejo AhpC-AhpF<sup>200</sup>.

Desde el lado del modelado, en el Laboratorio de Química Teórica se estudió la reacción de intercambio tiol-disulfuro entre el HS<sup>-</sup> y la cistina utilizando métodos basados en DFT<sup>201</sup>. Los resultados mostraron un estado de transición lineal concertado, consistente con un mecanismo tipo S<sub>N</sub>2. Con respecto a la reacción en entorno proteicos, el grupo de Maria J. Ramos estudió la reducción de un dimetiltiol (H<sub>3</sub>C-S-S-CH<sub>3</sub>) por el tetrapéptido CGGC, que simula al sitio activo<sup>202</sup>. Realizaron cálculos QM con métodos basados en DFT y optimizaron las estructuras en fase gaseosa incluyendo posteriormente los efectos del solvente con COSMO<sup>149</sup>. Los resultados indicaron que la enzima realiza una estabilización diferencial de las Cys involucradas en la catálisis que es capaz de romper la termoneutralidad observada en este tipo de reacciones en donde todas las especies químicas involucradas son las mismas. En el mismo sentido, Roos *et al.* estudiaron con simulaciones de dinámica molecular y cálculos basados en DFT la disociación del enlace disulfuro mixto Prx-S-S-Trx, determinando que la Cys C-terminal del motivo CPGC es activada por EdH específicos formados con los grupos amida del esqueleto peptídico luego de un cambio conformacional<sup>203</sup>.

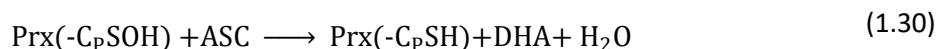
La eficiencia del intercambio tiol-disulfuro, además de depender de factores que afectan la cinética y termodinámica de la reacción, como el pK<sub>a</sub> de la Cys N-terminal del motivo CGPC, la estructura del TS, las cargas de los aminoácidos vecinos, las restricciones estéricas<sup>204</sup>, dependerá de una interacción Trx-Prx óptima, que asegure proximidad física y una complementariedad fisicoquímica que permita que ocurra la reacción. Por ejemplo, en la enzima TSA1 se ha estudiado como la mutación de los residuos Glu50 y Arg146 afecta la topología de la superficie de la enzima, lo cual impide su

reducción eficiente por la Trx<sup>205</sup>. Por otro lado, el estudio de una Prx 2-Cys de plantas reveló que hay ciertos residuos implicados en la interacción con Trx y que la oligomerización de la Prx desfavorece su interacción con la Trx<sup>88</sup>. La cinética de la reacción de reducción no ha sido ampliamente estudiada, y en literatura se reportan las constantes de velocidad de segundo orden para algunas Prx, las cuales se encuentran en el orden de  $10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  <sup>63,168,206</sup>.

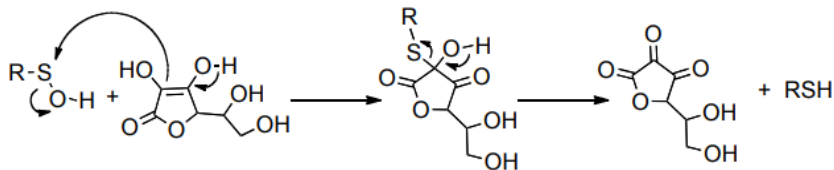
La estructura de la Trx en estado reducido y oxidado es muy similar, sin embargo deben existir diferencias que hagan que las proteínas oxidadas se unan a Trx(-SH)<sub>2</sub> y no a Trx(SS). Un aspecto clave es la superficie hidrofóbica, ya que se ha visto que la mutación de un residuo de Gly por Asp en Trx de *E. coli* inhibe su interacción con la proteína gen 5 del fago T7<sup>207</sup>. Por otro lado, la resolución del complejo Trx-NFκB también mostró que las interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y enlaces de hidrógeno con la Trx(-SH)<sub>2</sub> son clave en la especificidad de la reacción<sup>208</sup>. Mediante estudios de fluorescencia se determinó que el pasaje de estado oxidado a reducido de Trx está acompañado de un cambio conformacional localizado cerca del sitio activo. Este cambio conformacional podría favorecer la unión preferencial de la Trx reducida a las proteínas oxidadas a disulfuro, y la forma oxidada de Trx a la tiorredoxina reductasa<sup>209</sup>.

La reducción de Prx por Trx está implicada en vías de señalización redox ya que se han identificado varias proteínas que son reguladas por Trx<sup>210</sup>. Un sistema que se ha estudiado mucho es la regulación de la quinasa reguladora de la apoptosis (ASK1). Únicamente la Trx1 reducida es capaz de unirse a ASK1, inhibiendo su función. Una vez que se oxida lo libera, activando la ruta de apoptosis dependiente de ASK1<sup>190</sup>. Otra regulación redox ejercida por Trx es la activación del factor de transcripción NF-κB; su unión al ADN blanco requiere la reducción de un enlace disulfuro<sup>211</sup>.

En el caso de las Prx 1-Cys, la identidad del reductor es más versátil. En primera instancia se creía que únicamente podían ser reducidas por agentes que tuvieran tioles<sup>212</sup>, pero posteriormente se descubrió que el ascorbato también es capaz de reducir el C<sub>p</sub>-SOH formado por la reacción de peroxidación, con una eficiencia catalítica similar a la reportada para procesos dependientes de tioles<sup>213</sup> (ec. 1.30). Su capacidad de reducir cisteinsulfénico también fue reportada para la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH)<sup>214</sup>.



Lo Conte y Carroll realizaron una propuesta mecanística<sup>215</sup> que indica al carbono 2 del ascorbato como nucleófilo atacando al átomo de azufre del ácido sulfénico, liberando OH<sup>-</sup> y formando un aducto que luego se fragmenta dando como productos tiol y dehidroascorbato (**Figura 1.11**).



**Figura 1.11** Mecanismo de reducción de cisteinsulfénico por ascorbato propuesto por Lo Conte y Carroll.

En estudios cinéticos más recientes se reportaron las constantes de velocidad de segundo orden para la reacción entre el ascorbato y varias Prx del tipo 1-Cys, las cuales se encuentran en el orden de  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ <sup>216</sup>. En el caso de los reductores tiólicos, el tiol fisiológico más común es el GSH, y el enlace disulfuro mixto Prx-SSG es reducido por la  $\pi$ -GST<sup>69</sup> o por la TR<sup>217</sup>. En el caso de *M. tuberculosis*, recientemente se determinó que el sistema reductor de AhpE es el micotiol (MSH) que actúa junto a la micorreductina-1 (Mrx1) y a la micotiol disulfuro reductasa (MR)<sup>218</sup>. Si bien las Trxs son excelentes reductoras de disulfuros, se conocen casos en que son capaces de reducir el ácido sulfénico formado en C<sub>P</sub><sup>219</sup>.

## 1.9 PRDX5 y PRDX6: ejemplos de Prx 2-Cys atípica y 1-Cys

La peroxirredoxina 5 tiene una amplia localización sub celular, se encuentra en el citosol y en organelos como la mitocondria (presenta secuencia de localización mitocondrial en el extremo N-terminal<sup>220</sup>), peroxisomas (presenta secuencia SQL en el extremo C-terminal<sup>221</sup>) y núcleo.

Se han reportado estructuras tanto de la enzima reducida<sup>78,222</sup> como oxidada, en donde se evidencia la formación del enlace disulfuro intramolecular<sup>158</sup>, lo que permitió confirmar el mecanismo propuesto por Seo y colaboradores que la asignaba al grupo de Prx 2-Cys atípicas<sup>223</sup>. En solución se encuentra asociada en forma de dímeros tipo A independientemente del estado de oxidación, en los cuales la hélice  $\alpha$ 3 de un monómero se encuentra en contacto cercano con la hélice  $\alpha$ 5 del otro. El sitio activo está conformado por la Cys47 (C<sub>P</sub>), Thr44, y Arg127, y la C<sub>R</sub> corresponde al residuo Cys151.

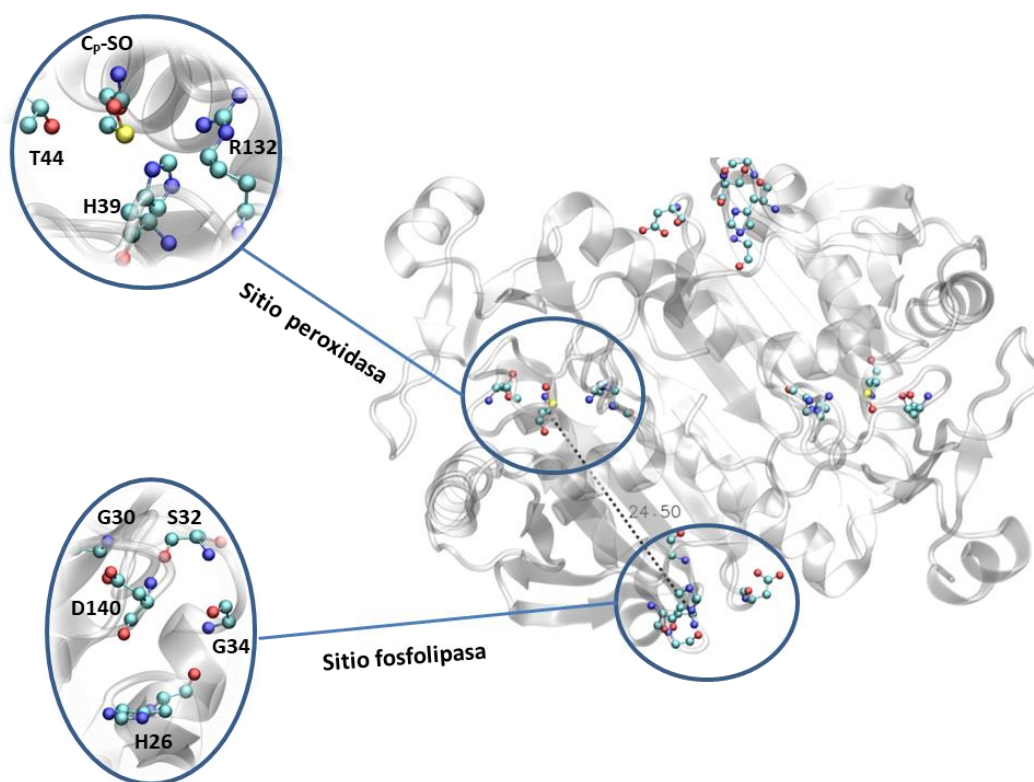
La cinética de peroxidación fue estudiada por primera vez por Dubuisson *et al.*, determinando una  $k$  para la reducción del peroxinitrito del orden de  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  <sup>224</sup>. Posteriormente Trujillo *et al.*, estudiaron la reducción de diversos peróxidos ( $k$  en el orden  $10^5 - 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), la oxidación de Trx2 ( $k = 2 \pm 0.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) y la formación del enlace disulfuro ( $k = 12 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ ), utilizando como reportero el cambio en la fluorescencia intrínseca de la proteína que acompaña al cambio en su estado de oxidación<sup>168</sup>. El tiol de la  $C_p$ , al igual que los de otras peroxirredoxinas es un tiol ácido, lo cual asegura una mayor proporción de tiolato al pH 7.4. Su  $pK_a$  se determinó a través de la reacción con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , obteniéndose un valor de 5.2<sup>168</sup> y a través de la reacción con el alquilante de tioles monobromobimano, obteniéndose un valor de 4.7<sup>104</sup>. Por otro lado, la  $C_R$  presenta una acidez típica de una cisteína libre, con un  $pK_a$  de 8.8<sup>104</sup>. En una etapa previa a mi doctorado estudiamos el efecto de mutar los dos residuos del sitio activo Thr44 y Arg127 en el  $pK_a$  y nucleofilia intrínseca de la  $C_p$ , así como en la reacción de reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>107</sup>. Los resultados obtenidos mostraron que la Arg127 está implicada en la disminución del  $pK_a$  de la  $C_p$  ( $pK_a$  de la mutante 6.1) y es esencial para la reacción de peroxidación, ya que la constante de velocidad de ese paso se torna  $0.65 \pm 0.01 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . La mutación de la Thr44 también afecta la constante de velocidad de la reacción, pero en menor medida ( $k = 4.0 \pm 0.1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). El efecto más grande se observa en que la nucleofilia intrínseca de la  $C_p$  en esta mutante es unas 80 veces mayor que lo esperado según su  $pK_a$  (3.7), mientras que en la enzima *wild type* es unas 25 veces. Esto indica que la función de la Thr44 es la de mantener la nucleofilia de la  $C_p$  baja en ausencia de sustrato, por lo tanto es importante en la especificidad de la enzima.

Con respecto a la sensibilidad a la sobreoxidación, PRDX5 es menos sensible que el resto de las Prx de 2-Cys de mamíferos<sup>35</sup> y no es devuelta al estado sulfénico por la sulfirredoxina<sup>225</sup>. Esto puede ser atribuido al hecho de que PRDX5 no presenta los motivos YF y GGLG que están implicados en la sensibilidad a la sobreoxidación de las peroxirredoxinas.

La PRDX6 es la única peroxirredoxina perteneciente al grupo de 1-Cys en mamíferos<sup>226</sup>. Su localización subcelular es muy amplia, ya que se encuentra en todos los organelos<sup>76</sup>. En solución se encuentra como homodímero tipo B, con una interfaz estabilizada por los residuos hidrofóbicos Leu145, Ile147, Leu148 y Pro150<sup>227-229</sup>. Su estructura se ha resuelto en primera instancia en forma oxidada a sulfénico<sup>159</sup> y más recientemente se ha resuelto en forma reducida y sobreoxidada a ácido sulfínico<sup>228</sup>. Es una proteína versátil, ya que además de poseer actividad peroxidasa, a pHs ácidos presenta actividad fosfolipasa A2 independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (PLA2)<sup>230</sup>. La  $C_p$  se encuentra en la posición 47, y en las posiciones 30 - 34 se localiza el motivo lipasa GX SXG, en donde la Ser32 actúa como nucleófilo catalítico en la reacción de hidrólisis del lípido<sup>231</sup> (**Figura 1.12**). Además del residuo de Ser, se identificó

a la His26 como involucrada en la unión de la proteína a la superficie de los liposomas y al residuo Asp140 como involucrado en la catálisis<sup>232</sup>. Se ha propuesto que tanto la actividad preoxidasa como fosfolipasa dependen del pH del medio, a pH ácido PRDX6 se unen fosfolípidos reducidos y actúa como fosfolipasa, mientras que a pH citosólico se une a fosfolípidos oxidados y actúa como peroxidasa<sup>233</sup>. Los sitios catalíticos peroxidasa y lipasa se encuentran a unos 25 Å entre sí (distancia entre los C $\alpha$  de la C $_p$  y la Ser32) (**Figura 1.12**), por lo que no se espera que haya una interacción directa entre ambos.

El sitio peroxidasa está conformado por la Cys47 (C $_p$ ), Thr44, His39 y Arg132 (**Figura 1.12**). Basándose en la estructura cristalográfica Rhee y colaboradores propusieron un mecanismo para la reacción de peroxidación, en la cual la His39 desprotona al tiol de C $_p$  y junto con la Arg132 estabilizan su carga negativa, lo cual permite que se encuentre en forma de tiolato<sup>227</sup>. La constante de velocidad de reducción de H $_2$ O $_2$  y ONOOH se han determinado para la PRDX6 de rata, obteniéndose valores de  $3.4 \times 10^7$  y  $3.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente<sup>234</sup>. La C $_p$ , al igual que en el resto de las Prx, es una cisteína ácida con un pK $_a$  de 5.2<sup>234</sup>. Se ha estudiado para la PRDX6 bovina la sobreoxidación por H $_2$ O $_2$  y ONOO $^-$  encontrándose que ambas proceden de forma lenta y a concentraciones de peróxido muy elevadas<sup>68</sup>.



**Figura 1.12.** Estructura dimérica de la PRDX6 (PDBID: 1PRX). En bolas y varillas se muestran los sitios activos peroxidasa y fosfolipasa de ambos monómeros y con línea punteada la distancia entre los C $\alpha$  de C $_p$  y la Ser32.



Se han detectado diversas modificaciones post traduccionales en PRDX6 que afectan de una u otra forma su actividad. Por ejemplo, el residuo de Thr177 es fosforilado por la MAPK en células alveolares de ratón y dicha modificación aumenta la actividad fosfolipasa de la enzima<sup>235</sup>. El aumento en la actividad PLA2 es atribuido a que la fosforilación genera un cambio conformacional en la proteína, llevándola a una estructura tipo “*molten globule*”, la cual sería más favorable para la unión de los fosfolípidos<sup>236,237</sup>. Otra modificación caracterizada en PRDX6 es la glicación por metilglioxal, que da lugar a la formación de argpirimidina, un aminoácido modificado de la arginina<sup>238</sup>. También se ha reportado la formación de N-(hidro-5-metil-4-imidazolón-2-il)-ornitina (MG-H1), en la Arg132 de PRDX6, otro derivado de la reacción entre el metilglioxal y el grupo guanidino de la arginina, lo cual explica la disminución observada en la actividad peroxidasa de la enzima<sup>239</sup>. Estas modificaciones ocurren en contextos en los cuales los ratones sometidos a condiciones de hiperglicemia y se relacionan con un retardo en la sanación de las úlceras gástricas diabéticas.

# Capítulo 2: Objetivos

## Objetivo General

En el transcurso de esta tesis de doctorado se buscó profundizar en aspectos tanto mecanísticos como estructurales de las peroxirredoxinas 5 y 6 humanas. Para esto se utilizó una combinación de técnicas del modelado computacional y experimentales, de forma tal de abordar cada uno de los objetivos específicos de la manera más completa posible.

## Objetivos específicos

- ◆ Estudiar el mecanismo detallado a nivel atómico y electrónico de la reacción de reducción de  $H_2O_2$  por PRDX5, determinando la función de los residuos conservados del sitio activo Thr44 y Arg127.
- ◆ Determinar los factores moleculares (oxidación y protonación de la  $C_p$ ) que disparan la transición hacia la conformación *locally unfolded* en PRDX5.
- ◆ Estudiar el paso resolutivo y de sobreoxidación de PRDX5, determinando las constantes de velocidad asociadas y los  $pK_a$  de  $C_p$ -SOH y  $C_R$ -SH junto a su dependencia con la conformación proteica y residuos del entorno.
- ◆ Determinar la función de los residuos conservados del sitio activo Thr44 y Arg127 en la reacción de reducción de PRDX5 por Trx2.
- ◆ Estudiar el mecanismo detallado a nivel atómico y electrónico de la reacción de reducción del ácido cisteinsulfénico por ascorbato en solución y en la enzima PRDX6.

# **Capítulo 3: Mecanismo de reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la C<sub>P</sub> de PRDX5 y función de los residuos conservados Thr44 y Arg127.**

## Resumen del capítulo

Los residuos conservados del sitio activo Thr44 y Arg127 involucrados en la triada catalítica han sido ampliamente estudiados a través de abordajes experimentales y teóricos, ya sea en PRDX5 u otras Prx<sup>78,107,108,111,112,240-244</sup>. Su mutación por residuos con distintas propiedades fisicoquímicas, como su carga, la capacidad de establecer EdH y/o su volumen permitió determinar su importancia y función en la catálisis enzimática.

En el presente capítulo se presenta el estudio del mecanismo a nivel atómico y electrónico de la oxidación de la C<sub>p</sub> en la PRDX5 *wild type* (PRDX5<sup>WT</sup>) y en la mutante PRDX5<sup>T44V</sup>, variante para la cual se reportó actividad de reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>107,144</sup>. De esta forma se pretende ampliar el conocimiento de las funciones específicas que tiene cada residuo en el mecanismo y eficiencia de dicha reacción. Por otro lado, se analizó la estructura y dinámica molecular de las mutantes PRDX5<sup>T44V</sup> y PRDX5<sup>R127Q</sup> y de la enzima WT, realizaron las mutaciones *in silico*. Se determinó el efecto de dichas mutaciones sobre la estructura proteica, explicando así hallazgos experimentales (PRDX5<sup>R127Q</sup> no presenta actividad, pK<sub>a</sub> de C<sub>p</sub> en PRDX5<sup>T44V</sup> es levemente menor al de la enzima WT).

Los resultados obtenidos muestran que tanto la Thr44 como la Arg127 tienen funciones esenciales en la catálisis. La Thr44 está implicada en la modulación de la nucleofilia de C<sub>p</sub>, en la unión del sustrato y en la estabilización del TS, logrados a través de un delicado balance de las interacciones de EdH. En ausencia de sustrato, la Thr44 establece un EdH con el tiolato de C<sub>p</sub> y cuando ingresa el sustrato al sitio activo también interacciona con éste como aceptora de EdH. A medida que la reacción avanza hacia el TS esta interacción acompaña al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta que es atacado por la C<sub>p</sub> y a su vez, el EdH establecido con la C<sub>p</sub> se va debilitando, eventos que permiten el aumento de la nucleofilia de C<sub>p</sub>, le dan especificidad a la enzima por sustratos hidroperóxidos y estabilizan al TS. La Arg127 tiene una función fundamental en mantener la arquitectura del sitio activo, interacciona a través de EdH e interacciones iónicas con el tiolato de la C<sub>p</sub> previo a la unión del sustrato y en el TS aniónico de la reacción (distancia O<sub>R</sub>...NH<sub>2</sub>-Arg 2.8 Å, q del grupo S..HO<sub>R</sub>...O<sub>L</sub>H -0.72 u.a. y q del guanidinio 0.62 u.a.). Además actúa como base, protonando al sulfenato (C<sub>p</sub>-SO<sup>-</sup>) que se forma como producto, dando ácido cisteinsulfénico (C<sub>p</sub>-SOH), el cual es sustrato de la siguiente reacción del ciclo catalítico, la formación del disulfuro intramolecular entre C<sub>p</sub> y C<sub>R</sub>. En cuanto a la descripción del mecanismo, ambos resultaron ser consistentes con reacciones del tipo S<sub>N</sub>2 con TS cercanos a la linealidad ( $\angle$ S..O<sub>R</sub>..O<sub>L</sub> = 168°) y con dos transferencias protónicas post-TS, la primera entre el C<sub>p</sub>-SOH y el grupo saliente OH<sup>-</sup> para dar C<sub>p</sub>-SO<sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O y la segunda entre el C<sub>p</sub>-SO<sup>-</sup> y la Arg para dar nuevamente C<sub>p</sub>-SOH y Arg neutra.

## Metodología

### 3.1 Determinación de la estructura representativa de PRDX5<sup>WT</sup> en solución acuosa

La estructura tridimensional de PRDX5<sup>WT</sup> se obtuvo a partir del *Protein Data Bank* (PDBID 1HD2<sup>78</sup>, correspondiente a un monómero y determinado con rayos X). Se eliminaron los ligandos y las moléculas de agua y posteriormente se agregaron los átomos de H faltantes utilizando el módulo *tleap* del paquete AMBER 12<sup>245</sup>. La C<sub>p</sub> se mantuvo como tiolato ya que presenta un pK<sub>a</sub> entre 4.7 y 5.2<sup>104,168</sup>, por lo que se espera que a pH 7.4 se encuentre 99% desprotonada. Los residuos Glu y Asp se mantuvieron ionizados, His neutras y Arg y Lys protonadas. Para obtener una estructura representativa en solución acuosa se procedió a realizar una minimización de energía clásica en condiciones periódicas. Para esto se neutralizó el sistema con iones K<sup>+</sup> (presente en medio intracelular), se solvató con una caja octaédrica truncada de moléculas de agua TIP3P<sup>140</sup> con una distancia mínima de 12 Å entre los átomos proteicos y los bordes de la caja. Las interacciones no enlazantes se calcularon utilizando una distancia de corte de 10 Å y las interacciones de largo alcance se trataron con el procedimiento *Particle Mesh Ewald*<sup>246</sup> (PME) con un espaciado de 1 Å en la grilla de cargas. El campo de fuerza utilizado fue el Amber *ff99SB* (mejora en los parámetros de diedros del esqueleto peptídico del *ff99*)<sup>247</sup>. Se corrieron dos pasos de minimización: primero se relajaron las moléculas del solvente y contraiones en 2500 pasos de minimización (500 *steepest descent* (SD)<sup>248</sup> y 2000 gradiente conjugado (CG)<sup>249</sup>) manteniendo las coordenadas de la proteína restringidas con una fuerza de 500 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup>. Posteriormente se relajó el sistema completo con 20000 pasos de minimización (500 con SD y 1500 con CG).

### 3.2 Modelado ONIOM QM/MM de la reacción de peroxidación en PRDX5<sup>WT</sup>

El modelado QM/MM se llevó a cabo utilizando el método substractivo ONIOM<sup>132</sup> con el esquema de *embedding* mecánico (el cálculo cuántico (QM) se realiza en ausencia del resto del sistema y las interacciones entre las zonas QM y MM se tratan a nivel clásico (MM))<sup>250</sup>, tal como está implementado en el programa Gaussian09<sup>251</sup>. Los residuos Thr44, Pro45, Gly46, Cys47, la cadena lateral de la Arg127 (grupo guanidinio, C $\gamma$  y C $\delta$ , con sus H, respectivamente) y el sustrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (60 átomos) se trataron a nivel cuántico utilizando el funcional de la densidad B3LYP<sup>137,138</sup> y el conjunto de base 6-31+G(d,p)<sup>252,253</sup>. El resto de los residuos (2357 átomos) se trataron a nivel MM, utilizando el campo de fuerza de Amber *ff96*<sup>247</sup>, el sustrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se parametrizó con el campo de fuerza generalizado de AMBER<sup>254</sup> (*Gaff*) y se derivaron sus cargas a través del procedimiento RESP al igual que

son derivadas las cargas atómicas en el campo de fuerza de Amber *ff96*<sup>247</sup>. Por otro lado, el ácido cisteinsulfénico formado como producto de la reacción (hallazgo posterior a la determinación del TS y camino de reacción) fue parametrizado usando *Gaff*<sup>254</sup> y datos obtenidos de literatura<sup>255</sup>, también se usó el procedimiento RESP<sup>256</sup> para derivar sus cargas.

Para estudiar la reacción, en primer lugar se procedió al posicionamiento del sustrato en el sitio activo. Esto fue realizado manualmente, usando como referencia la única estructura cristalográfica de una peroxirredoxina con el sustrato unido al sitio activo (*Aeropyrum pernix K1*, PDBID 3A2V<sup>257</sup>). Se optimizó la estructura del estado de transición (TS), luego se determinó el camino de reacción (IRC)<sup>127</sup>, calculando 80 puntos hacia reactivos y 80 hacia productos con un paso de integración 0.1 Bohr y utilizando el algoritmo *Euler Predictor-Corrector integrator*<sup>258</sup>. A partir de los extremos del IRC se obtuvieron estructuras de partida para optimizar los complejos inicial (CI) y final (CF). Las optimizaciones de geometría de todas las especies de interés fueron optimizaciones parciales, en donde se permitió el movimiento de los átomos involucrados en la zona QM más aquellos de la zona MM unidos covalentemente a los primeros (Phe43, Ser48, Lys126 y Phe128). La naturaleza de cada punto estacionario fue verificada analizando los valores propios de la *matriz hessiana*. Posteriormente, debido a que las interacciones QM-MM se evalúan a nivel MM, se recalcularon las cargas RESP de la zona QM y se reoptimizó la geometría de cada punto estacionario y se volvió a verificar su naturaleza analizando los valores propios de la *matriz hessiana* obtenida al mismo nivel.

### 3.3 Determinación de fuerza de EdH, cargas atómicas, nucleofilia de C<sub>p</sub> y su evolución en PRDX5<sup>WT</sup>

Para estudiar descriptores de EdH y cargas atómicas se realizó un recorte de la zona QM de estructuras seleccionadas a lo largo del camino de reacción entre el CI y el TS. La valencia del recorte se completó con átomos de hidrógeno en los enlaces que definían la frontera QM/MM. Posteriormente se realizaron cálculos *single-point* a nivel PCM-B3LYP/6-31+G(d,p)<sup>118,137,138,252,253,259</sup> generando las cavidades de forma ajustada al sistema molecular con radios atómicos de Bondi<sup>260</sup> y la constante dieléctrica del acetonitrilo  $\epsilon = 35.7$  por ser representativa de un entorno proteico<sup>107,144</sup>. El cálculo de la energía libre de solvatación incluyó las componentes no electrostáticas (cavitación, solvatación y repulsión), tal como esta implementado en Gaussian 09. Se determinaron los índices de enlace de Wiberg (WBI)<sup>261</sup> como descriptores de la fuerza de los EdH y de los enlaces en formación y ruptura de la reacción y se realizó el análisis poblacional basado en los orbitales naturales (NBO)<sup>262</sup> de forma de obtener las cargas atómicas NPA<sup>263</sup>.

Para obtener la nucleofilia se determinó la energía del orbital de Kohn-Sham ocupado de mayor energía (HOMO-KS). Para esto se realizaron cálculos *single-point* de las mismas estructuras seleccionadas a nivel ONIOM(B3LYP:AMBER) con esquema de *embedding* electrónico<sup>264</sup>.

### 3.4 Determinación de la estructura representativa de la mutante T44V a partir de la enzima WT

No existe estructura cristalográfica de la mutante T44V, por lo que dicha mutación se realizó *in silico* sobre la estructura de la enzima WT (PDBID 1HD2)<sup>78</sup>. La estructura final de la enzima T44V fue obtenida a partir de una minimización de energía de una estructura representativa obtenida a partir de una simulación de dinámica molecular de 5 ns. A continuación se detalla el protocolo utilizado.

Se agregaron iones K<sup>+</sup> para alcanzar la electroneutralidad. El sistema fue situado en una caja cúbica de aguas explícitas TIP3P<sup>140</sup> con una distancia mínima de 12 Å entre los átomos proteicos y el borde. Se realizó una dinámica molecular de 100 ns utilizando el campo de fuerza *ff03.r1*<sup>265</sup> y el módulo *Sander*, tal como está implementada en el programa AMBER 14<sup>266</sup>. El procedimiento fue el siguiente:

- (i) moléculas de agua e iones se relajaron con 2500 pasos de minimización (500 con SD y 2000 con CG) manteniendo las coordenadas de la proteína fijas con una restricción de 500 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup>.
- (ii) relajación del sistema completo con 20000 pasos de minimización (5000 SD y 15000 CG).
- (iii) calentamiento gradual del sistema de 0 a 300 K en un ensemble NVT por 100 ps, seguido por una simulación NPT a 300 K utilizando el termostato de Langevin<sup>267</sup>.
- (iv) simulación de dinámica molecular productiva en ensemble NPT utilizando el baróstato de Berendsen<sup>268</sup>.

Todos los enlaces covalentes que involucran átomos de hidrógeno fueron fijados durante toda la simulación utilizando el algoritmo SHAKE<sup>269</sup>. Las interacciones de largo alcance se modelaron con el procedimiento PME<sup>246</sup> con una distancia de corte de 10 Å. Se utilizó un paso de 2 fs para integrar las ecuaciones del movimiento. De los primeros 5 ns de simulación se obtuvo una estructura representativa que fue minimizada nuevamente para eliminar los efectos de la energía cinética utilizando el procedimiento descrito en (i) y (ii).

### 3.5 Modelado ONIOM QM/MM y descriptores de reactividad en PRDX5<sup>T44V</sup>

El procedimiento realizado fue similar al usado para la enzima WT. La zona QM seleccionada fue la misma (salvo Val en lugar de Thr), pero se amplió la región móvil durante las optimizaciones de



geometría parcial. Además de los átomos QM se permitió la relajación de aquéllos residuos que tuvieran al menos un átomo a unos 4 Å de cualquier átomo QM (Phe43, Ser48, Lys49, Thr50, His51, Lue52, Pro53, Trp84, Lys126, Phe128, Gly146, Thr147, Gly148). La metodología usada también fue la misma que para la enzima WT, incluyendo método QM, conjunto de base, campo de fuerza MM y parametrización del sustrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y del producto ácido cisteinsulfénico. Se caracterizó el TS, se determinó el IRC con las mismas opciones asociadas (sección 3.2) y posteriormente se caracterizaron los CI y CF.

Al igual que para la enzima WT, se realizaron cálculos *single-point* para determinar la energía del HOMO de las especies seleccionadas a lo largo del IRC y se realizaron recortes de estas especies para poder determinar predictores de reactividad como cargas atómicas e índices de enlace de Wiberg. La metodología utilizada fue la misma que para la enzima WT en todos los casos (secciones 3.2 y 3.3).

### 3.6 Dinámica molecular de PRDX5<sup>WT</sup>, PRDX5<sup>T44V</sup> y PRDX5<sup>R127Q</sup>

Para estudiar el efecto de las mutaciones en la estructura proteica de PRDX5, se analizó la dinámica molecular de las mutantes, comparándola con la correspondiente a la proteína WT. La metodología utilizada para las mutantes es la misma que ya se describió en el apartado 3.4. En el caso de la mutante PRDX5<sup>R127Q</sup>, se realizaron dos simulaciones, una con la C<sub>p</sub> en forma tiolato y otra con la C<sub>p</sub> en forma tiol, ya que el pK<sub>a</sub> determinado experimentalmente es de 6.7<sup>107,144</sup>, lo cual indica que a pH 7.4 la fracción tiol/tiolato va a ser cercana a 1.

El análisis de las trayectorias fue hecho con el módulo *cpptraj*<sup>270</sup> del programa AmberTools<sup>271</sup>. Se determinó la fluctuación media cuadrática por residuo (RMSF):

$$\text{RMSF}_i = \sqrt{\frac{1}{t} \sum_{i=1}^t \|r_{ij} - r_{i0}\|^2} \quad (3.1)$$

donde  $r_{i0}$  es la posición del átomo  $i$  a tiempo  $t_0$  y  $r_{ij}$  la posición del átomo  $i$  a tiempo  $t_j$ .

El área superficial accesible al solvente (SASA) de la C<sub>p</sub> fue calculada utilizando el algoritmo LCPO<sup>272</sup> :

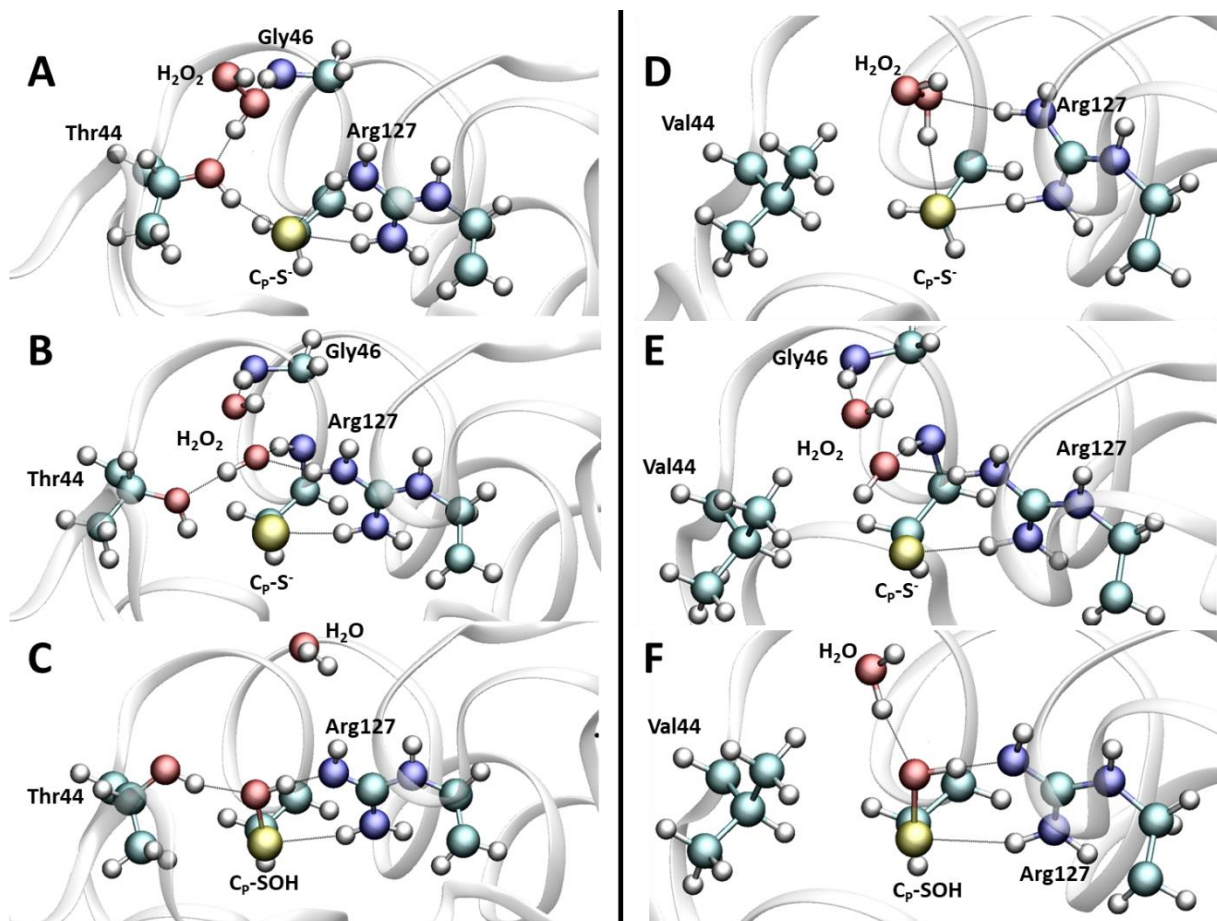
$$SASA_i = P_1 S_i + P_2 \sum_{j \in N(i)} A_{ij} + P_3 \sum_{\substack{j, k \in N(i) \\ k \in N(j) \\ k \neq j}} A_{jk} + P_4 \sum_{j \in N(i)} \left( A_{ij} \sum_{\substack{k \in N(i) \\ k \in N(j) \\ k \neq j}} A_{jk} \right) \quad (3.2)$$

donde el primer término da cuenta del área superficial de una esfera ( $S_i$ ) con radio  $R_i$ , el segundo, de la superposición entre el átomo  $i$  y el  $j$  ( $A_{ij}$ ), perteneciendo  $j$  al grupo de vecinos de  $i$  ( $N(i)$ ) y el tercer y cuarto término son correcciones que dan cuenta de la superposición entre sí de los átomos vecinos de  $i$ . Los parámetros  $P_1$ - $P_4$ , se derivan aplicando regresiones lineales múltiples a datos obtenidos a partir de cálculos numéricos de SASA de un set de moléculas. El método LCPO puede producir ocasionalmente áreas superficiales negativas para aquellos átomos no expuestos, resultado que se interpreta como exposición nula.

## Resultados

### 3.1 Mecanismo de reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por PRDX5<sup>WT</sup> y PRDX5<sup>T44V</sup>

En la **Figura 3.1** se muestran las estructuras de todas las especies involucradas en la reacción de reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por PRDX5<sup>WT</sup> y la mutante T44V (CI, TS y CF).



**Figura 3.1.** Estructuras ONIOM(B3LYP/6-31+G(d,p):AMBER) de CI, TS y CF para la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por PRDX5<sup>WT</sup> (A, B y C) y PRDX5<sup>T44V</sup> (D, E y F). En los diferentes paneles se representa con bolas y varillas al sustrato y a los residuos modelados a nivel QM involucrados en la reacción. Las interacciones de EdH se muestran con líneas sólidas finas.

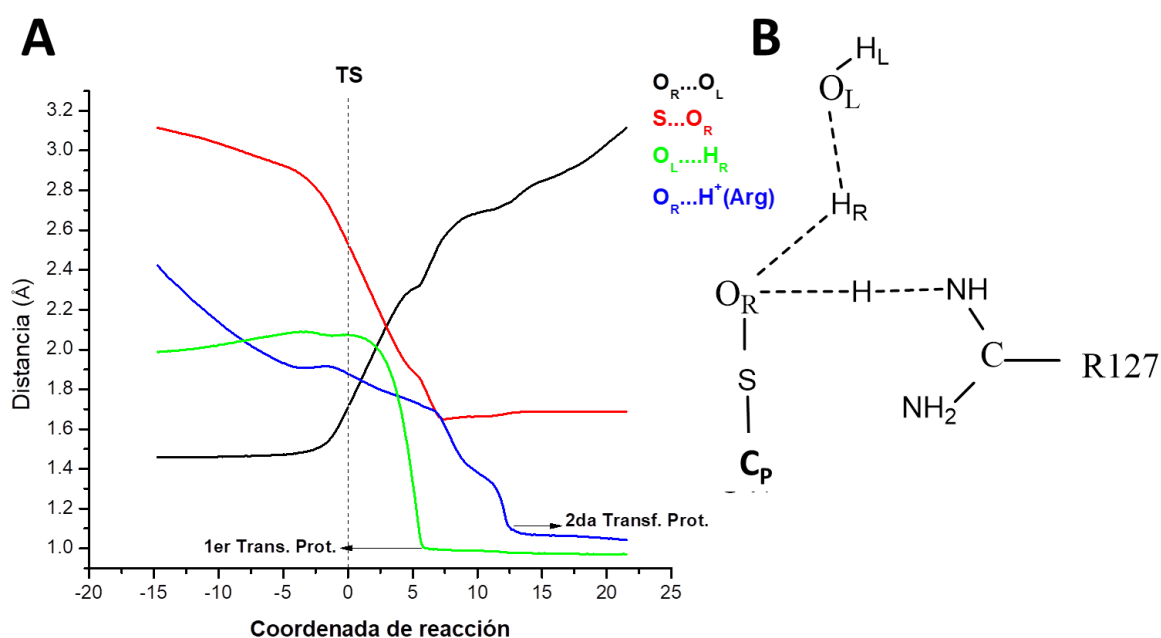
La unión del sustrato a la enzima WT (**Figura 3.1, A**) es establecida a través de una red de EdH con los residuos Thr44 como aceptor y Gly46 como dador. Estas interacciones posicionan al sustrato con el oxígeno reactivo (O<sub>R</sub>) a una distancia de 4.2 Å del átomo de azufre de la C<sub>p</sub> y con un ángulo  $\angle O_L..O_R..S$  de 144° y podrían ser clave en la especificidad de la enzima. Esta es una configuración geométrica acorde con una reacción del tipo S<sub>N</sub>2 y procede a través de un TS lineal (**Figura 3.1, B**). Con respecto a la C<sub>p</sub>, el tiolato se encuentra estableciendo EdH con dos residuos conservados del sitio

activo: Thr44 y Arg127, interacciones que se espera mantengan a la C<sub>p</sub> con una baja nucleofilia en la fase previa a la reacción, antes del ingreso del sustrato al sitio activo. Por otro lado, en la enzima mutante la ausencia de la Thr44 provoca un cambio significativo en el posicionamiento del sustrato, éste actúa como dador de EdH con el tiolato de la C<sub>p</sub> y como aceptor con el grupo NH<sub>2</sub> de la Arg127 (**Figura 3.1, D**), si bien el O<sub>R</sub> se localiza a 3 Å del átomo de azufre, el ángulo ∠O<sub>L</sub>..O<sub>R</sub>..S es 100°, muy lejano a la linealidad, desfavoreciendo el ataque S<sub>N</sub>2. Este posicionamiento no productivo del sustrato en el sitio activo evidencia la importancia del residuo conservado de Thr44 en la unión del sustrato adecuada para el proceso de peroxidación.

Con respecto al TS, tanto en la enzima WT como en la mutante T44V se evidencia una geometría consistente con una reacción del tipo S<sub>N</sub>2, donde el acercamiento del S al O<sub>R</sub> (llevado por el EdH con la Thr44 como brazo que rota debilitando el EdH con C<sub>p</sub>) se acompaña del alejamiento del O<sub>L</sub>. En el TS de PRDX5<sup>WT</sup> la distancia O<sub>R</sub>..S disminuye de 4.2 a 2.5 Å y el ángulo ∠O<sub>L</sub>..O<sub>R</sub>..S aumenta a 168° acercándose a la linealidad y con una distancia O<sub>L</sub>..O<sub>R</sub> de 1.7 Å (**Figura 3.1, B**). Se evidencia un cambio en la red de EdH, a este punto el sitio activo estabiliza al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con 4 EdH (3 con O<sub>R</sub> y 1 con O<sub>L</sub>) a través de las cadenas laterales de la Thr44 y la Arg127, y los grupos amida de la Gly46 y la C<sub>p</sub>, siendo la estabilización del O<sub>L</sub> importante para favorecer su salida. A su vez se pierden dos de los EdH que establecía previamente el tiolato con la Thr44 y la Arg127. La cercanía del grupo guanidinio de la Arg127, cargado positivamente, es importante para estabilizar electrostáticamente el TS aniónico respecto al Cl. En la enzima mutante la geometría del TS es similar respecto a la enzima WT (**Figura 3.1, E**). La red de EdH es igual a la de la enzima WT, con la excepción del EdH entre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la Thr44, es esperable que esto genere una menor estabilización del TS respecto a la lograda en el TS de la enzima WT. Con respecto al grado de avance de la reacción y a la transferencia de carga, existen pequeñas diferencias entre ambos sistemas. En la enzima WT el WBI entre S...O<sub>R</sub> es 0.358 u.a. y la carga total del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es -0.368 u.a., en la mutante T44V estos dos parámetros se tornan 0.303 u.a. y -0.287 u.a., respectivamente. En este sentido, la mutación de la Thr44 provoca que el TS sea levemente más temprano.

Como producto final, en ambas enzimas se obtiene la formación de ácido cisteinsulfénico (C<sub>p</sub>-SOH), la liberación de una molécula de H<sub>2</sub>O y Arg127 neutra (**Figura 3.1, C y F**). Esto se debe a que suceden dos transferencias protónicas sucesivas post-TS: 1) el C<sub>p</sub>-SOH formado por el ataque del tiolato sobre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> transfiere su protón al grupo saliente OH<sup>-</sup> formando una molécula de H<sub>2</sub>O y sulfenato (C<sub>p</sub>-SO<sup>-</sup>); 2) el C<sub>p</sub>-SO<sup>-</sup> abstrae un protón del grupo guanidinio de la Arg127, formando nuevamente C<sub>p</sub>-SOH y Arg neutra. En la **Figura 3.2** se muestran las distancias entre los pares de átomos

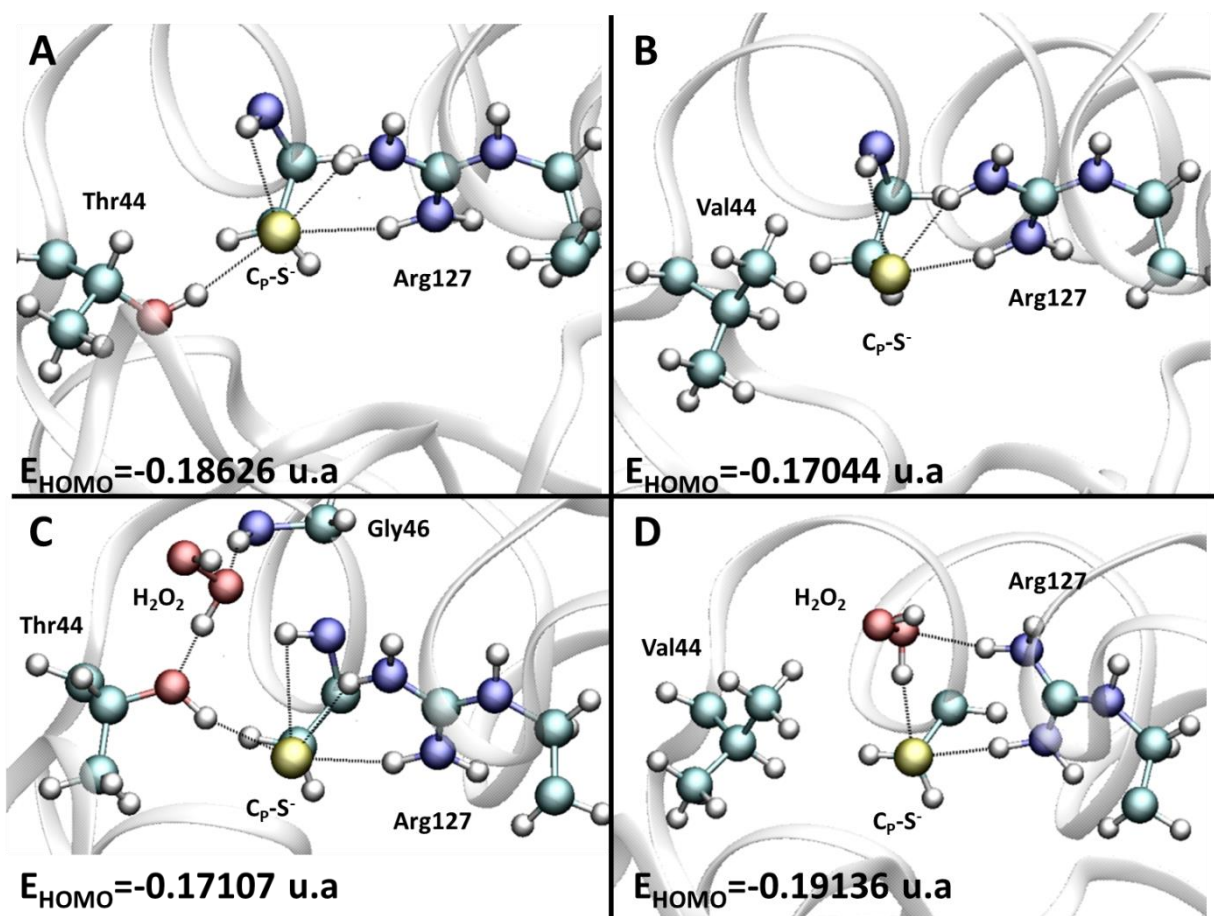
involucrados en las transferencias protónicas y en la coordenada de reacción que muestran como estas transferencias son post-TS (datos de PRDX5<sup>T44V</sup>, lo mismo se observa en WT, información suplementaria de la ref.<sup>107</sup>). Cabe destacar que las transferencias protónicas no tienen ningún efecto catalítico en la reacción ya que ocurren una vez se ha alcanzado el TS pero determinan la naturaleza del producto. Dichas transferencias protónicas que serían desfavorables en medio acuoso debido a los  $pK_a$  de la Arg (11.5<sup>273</sup>) y del C<sub>p</sub>-SOH (5.9 ± 0.1, ver Capítulo 5) se vuelven posibles en un medio menos polar, con baja constante dieléctrica ( $\epsilon$ ) y capacidad limitada para solvatar aniones, como es el caso de las proteínas, que se estima presentan  $\epsilon$  en el rango de 1 - 20 en los sitios activos<sup>274-277</sup> y en particular PRDX5 tiene un sitio activo poco expuesto al solvente (se analizará en la **Figura 3.6**) como la mayoría de las Prx<sup>108</sup>.



**Figura 3.2 A:** Evolución de las distancias de entre pares de átomos involucrados en la coordenada de reacción ( $O_R \cdots O_L$  y  $S \cdots O_R$ ) y pares de átomos involucrados en las transferencias protónicas ( $O_L \cdots H_R$  y  $O_R \cdots H$ -Arg) en PRDX5<sup>T44V</sup>. **B:** Esquema que muestra en línea punteada las transferencias protónicas.

Para obtener información más detallada acerca de la forma en que la mutación en la Thr44 afecta el modo de unión del sustrato y las consecuencias que esto tiene sobre la reacción, se analizó la nucleofilia de la C<sub>p</sub> y la red de EdH en la enzima en estado de “reposo” y con el sustrato ligado al sitio activo, comparando PRDX5<sup>WT</sup> con PRDX5<sup>T44V</sup>. En la **Figura 3.3** se muestran las energías del HOMO-KS

( $E_{\text{HOMO}}$ ) de  $C_p$  y las estructuras ONIOM de ambos sitios activos (PRDX5 WT y T44V) en estado de reposo y con el sustrato  $H_2O_2$  unido al sitio activo.



**Figura 3.3.** Modo de unión del sustrato y su efecto sobre la red de EdH y nucleofilia de  $C_p$ . **A** y **B**: interacciones que establece  $C_p$  con el resto del sitio activo en ausencia del  $H_2O_2$  en la enzima WT y la mutante T44V. **C** y **D**: interacciones que establecen el  $H_2O_2$  y la  $C_p$  con el resto del sitio activo en la enzima WT y T4V.

Comparando **A** y **B** de la **Figura 3.3** La ausencia de la Thr44 genera la pérdida de un EdH entre la  $C_p$  y el sitio activo y se refleja en la energía del HOMO-KS, que aumenta  $9.9 \text{ kcal mol}^{-1}$  con respecto a la enzima WT. Estos resultados confirman que la Thr44 es necesaria para mantener a la  $C_p$  con baja nucleofilia en ausencia de sustrato, apoyando la idea de su función en la especificidad de la enzima. Cuando el sustrato ingresa al sitio activo de la enzima WT, la red de EdH que establecía el tiolato de  $C_p$  cambia levemente, hay una menor estabilización total ( $\Delta WBI_{\text{total}} -0.04$ ) (**Tabla 3.1**). Este pequeño reordenamiento del sitio activo genera un aumento de  $9.5 \text{ kcal mol}^{-1}$  en la energía del HOMO-KS, por lo tanto, la unión del sustrato al sitio activo es clave para activar el aumento en la nucleofilia de  $C_p$ , favoreciendo el ataque nucleofílico sobre el  $H_2O_2$ . Es de esperar que a lo largo del camino de reacción

ocurra un aumento aun mayor de la nucleofilia, debido a que el acercamiento del sustrato al tiolato de la C<sub>p</sub> modifica aun más la red de EdH. Para verificarlo también se estudió la nucleofilia de C<sub>p</sub> desde el CI hasta el TS, junto con los cambios en la red de EdH, estos resultados se detallan más adelante (**Figuras 3.4 y 3.5**).

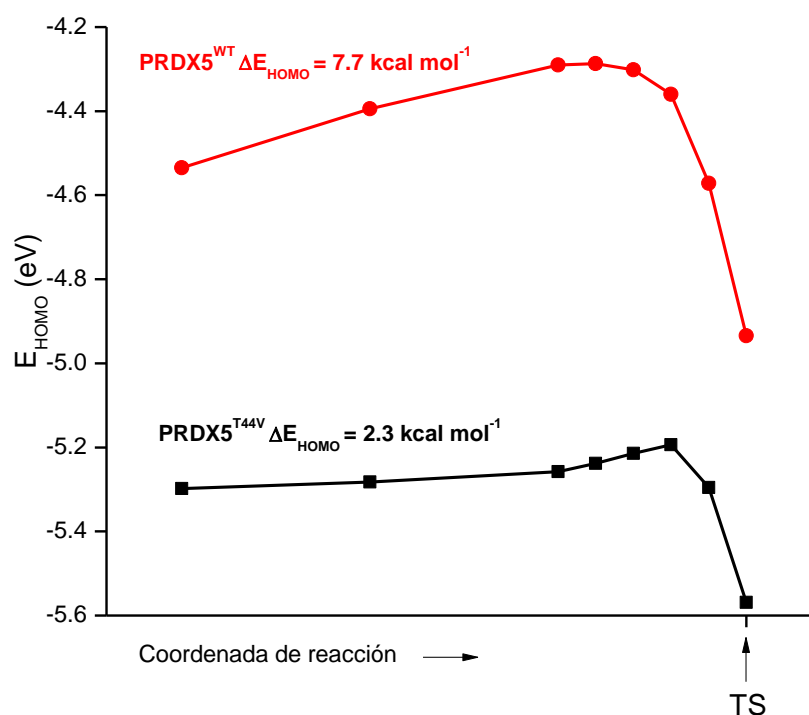
El efecto de la unión del sustrato a la enzima mutante T44V es inverso al observado para la WT: cuando el sustrato ingresa al sitio activo, su posicionamiento “no productivo” genera un fuerte EdH con el tiolato de C<sub>p</sub> (**Tabla 3.1**) que se traduce en una estabilización del HOMO-KS, por lo que la C<sub>p</sub> será aun menos nucleofílica que en su estado de “reposo”, reduciendo notablemente su capacidad de actuar como nucleófilo. Estos resultados muestran que la Thr44 conservada tiene varias funciones clave: mantener baja la nucleofilia de la C<sub>p</sub> en ausencia de sustrato, evitando reacciones inespecíficas y permitir el correcto posicionamiento del sustrato hidropéroxido, acompañándolo hasta el momento de reaccionar.

**Tabla 3.1** Índices de enlace de Wiberg de los EdH que establece el tiolato de C<sub>p</sub> con residuos del sitio activo y el sustrato en la enzima en estado de “reposo” y con el sustrato unido.

Interacción	PRDX5 <sup>WT</sup> sitio activo en “reposo”	PRDX5 <sup>WT</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> unido	PRDX5 <sup>T44V</sup> sitio activo en “reposo”	PRDX5 <sup>T44V</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> unido
C <sub>p</sub> -S <sup>-</sup> ... <sup>ω</sup> NH <sub>2</sub> @Arg127	0.09	0.11	0.14	0.22
C <sub>p</sub> -S <sup>-</sup> ... <sup>ω</sup> NH <sub>2</sub> @Arg127	0.06	0.06	0.08	0
C <sub>p</sub> -S <sup>-</sup> ...NH@C <sub>p</sub>	0.04	0.01	0.05	0
C <sub>p</sub> -S <sup>-</sup> ...OH@Thr44	0.11	0.16	-	-
C <sub>p</sub> -S <sup>-</sup> ...OH@H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	0	-	0.22

En la **Figura 3.3** se muestra el análisis de la evolución de la nucleofilia de la C<sub>p</sub> a lo largo del camino de reacción desde el CI hasta el TS para PRDX5<sup>WT</sup> y PRDX5<sup>T44V</sup>. Puede observarse que la activación de la C<sub>p</sub> continúa una vez que comienza la reacción, a medida que la reacción avanza hacia el TS la energía del HOMO-KS aumenta y llega a un máximo antes del TS, que en la enzima WT corresponde a un aumento de 7.7 kcal mol<sup>-1</sup> (previo al TS el HOMO-KS vuelve a estabilizarse, pero en este punto el ataque nucleofílico ya tiene un avance del 38 % en la ruptura O<sub>R</sub>...O<sub>L</sub> y del 43 % en la formación S...O<sub>R</sub>). En la enzima mutante, también se observa un incremento en la nucleofilia de C<sub>p</sub> a lo largo de la coordenada de reacción, pero este es mucho menor, el HOMO-KS se desestabiliza únicamente 2.3 kcal mol<sup>-1</sup>. Además de presentar una desestabilización menor, el orbital siempre es

más estable que en la enzima WT, lo cual indica una menor nucleofilia. Estos resultados evidencian la importancia del residuo de Thr44 en la modulación de la nucleofilia de  $C_p$ . Previo a la unión del sustrato, la Thr44 mantiene a  $C_p$  con baja nucleofilia, favoreciendo la especificidad de la enzima y una vez que el sustrato se une al sitio activo el grupo OH de la Thr44 que lo sostiene, gira y lo acerca a la  $C_p$  para que inicie la reacción. La pérdida del EdH con el tiolato favorece la activación de la  $C_p$ , aumentando su nucleofilia y permitiendo que se realice el ataque nucleofílico sobre el sustrato.

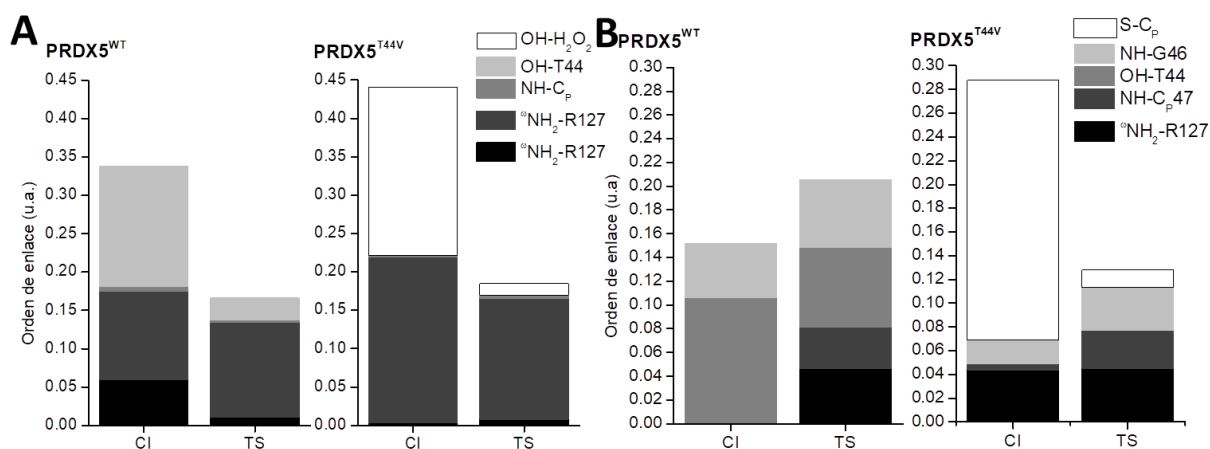


**Figura 3.4** Evolución de la energía del HOMO-KS a lo largo del camino de reacción, desde el CI hacia el TS para PRDX5<sup>WT</sup> y PRDX5<sup>T44V</sup>.

Como se mencionó previamente, la red de EdH en el sitio activo cambia a lo largo de la reacción. En la **Figura 3.5** se muestra la evolución de la intensidad (entre el CI y TS) de los EdH que establece el tiolato de  $C_p$  con los residuos del sitio activo y con el  $H_2O_2$  (**A**) y el  $H_2O_2$  con el sitio activo (**B**) en la enzima WT y la mutante T44V. Tanto en WT como en la mutante, existe una pérdida de EdH entre la  $C_p$  y el sitio activo y el sustrato a medida que la reacción avanza hacia el TS (**Figura 3.5, A**). Esta desestabilización de la  $C_p$  explica el aumento en la energía del HOMO-KS analizado previamente (**Figura 3.4**). En la enzima WT se evidencia que el EdH establecido con el grupo OH de la Thr44 es el más debilitado cuando se alcanza el TS, mostrando su importancia en la modulación de la nucleofilia de la  $C_p$ ; sin embargo, el resto de los EdH no muestran cambios tan significativos. En la mutante T44V



se evidencia un tiolato muy estabilizado en el CI debido al mal posicionamiento del sustrato en el sitio activo, que genera un fuerte EdH tiolato-peróxido y explica por qué la  $C_p$  es menos nucleofílica respecto a la enzima WT ( $E_{HOMO}$  siempre es menor en T44V con respecto a WT, **Figura 3.4**). Este EdH se debilita significativamente en el TS, debido a que en este punto el peróxido se encuentra orientado de forma tal de lograr un ángulo  $\angle S..O_R..O_L$  cercano a la linealidad.



**Figura 3.5** Índices de enlace de Wiberg en el CI y TS de PRDX5<sup>WT</sup> y PRDX5<sup>T44V</sup>. **A:** EdH entre el tiolato de  $C_p$  y el resto del sitio activo y el sustrato. **B:** EdH entre el  $H_2O_2$  y el sitio activo.

En la **Figura 3.5, B** se representa la intensidad de los EdH que establece el  $H_2O_2$  con residuos del sitio activo en el CI y TS en la enzima WT y la mutante T44V. En el caso de la enzima WT hay una mayor estabilización de los átomos  $O_R$  y  $O_L$  del enlace peróxido del sustrato disociándose en el TS, ya que aumenta el número y fuerza de los EdH. Estas interacciones permiten la estabilización diferencial del TS, esencial para disminuir la barrera de activación de la reacción enzimática y favorecer así la catálisis. En la enzima T44V se observa lo contrario, el CI está más estabilizado respecto al TS debido al fuerte EdH establecido entre el  $H_2O_2$  y el átomo de azufre de la  $C_p$  que luego se pierde. Por otro lado, los EdH establecidos con la Gly46 y con uno de los  $^{\omega}NH_2$  de la Arg127 aumentan su fuerza en el TS, favoreciendo a su estabilización, pero no son suficientes para contrarrestar el EdH tiolato-peróxido establecido en el CI.

La modulación en la nucleofilia de  $C_p$  previo a la unión del sustrato al sitio activo y durante el camino de reacción, junto con la estabilización diferencial del TS convierten a la PRDX5 en una excelente reductora de peróxidos, con alta especificidad y eficiencia catalítica. Cuando la Thr44 está ausente, estos efectos se pierden y se ve reflejado en un aumento en la energía de activación, en la enzima WT el  $\Delta G^{\ddagger,298K}$  es  $10.6 \text{ kcal mol}^{-1}$  mientras que en la mutante T44V es  $13.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Con

respecto a la entropía de activación los resultados muestran que en ambos sistemas el efecto entrópico es desfavorable, siendo mayor para PRDX5<sup>WT</sup> ( $-\Delta S^\ddagger = 2.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) que para la mutante T44V ( $-\Delta S^\ddagger = 1.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), atribuido al mayor grado de desorden estructural que presenta T44V. Esta penalización también se reportó para la Prx de *Mycobacterium Tuberculosis* AhpE<sup>112</sup> y para la albúmina sérica humana<sup>117</sup>.

**Tabla 3.2** Entalpía, entropía y energía libre de activación de la reacción de peroxidación en PRDX5<sup>WT</sup> y PRDX5<sup>T44V</sup> determinadas a nivel ONIOM-EE(B3LYP:AMBER).

Sistema	$\Delta H^\ddagger, 298 \text{ K}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^\ddagger, 298 \text{ K}$ (cal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G^\ddagger, 298 \text{ K}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )
PRDX5 <sup>WT</sup>	8.2	-8.4	10.6
PRDX5 <sup>T44V</sup>	12.4	-3.7	13.5

### 3.2 Efecto de las mutaciones T44V y R127Q en la estructura de PRDX5

Para ahondar en la función de los residuos conservados del sitio activo en la estructura proteica se analizó la evolución estructural en simulaciones de dinámica molecular de las mutantes T44V y R127Q, comparando los resultados con los de la enzima WT.

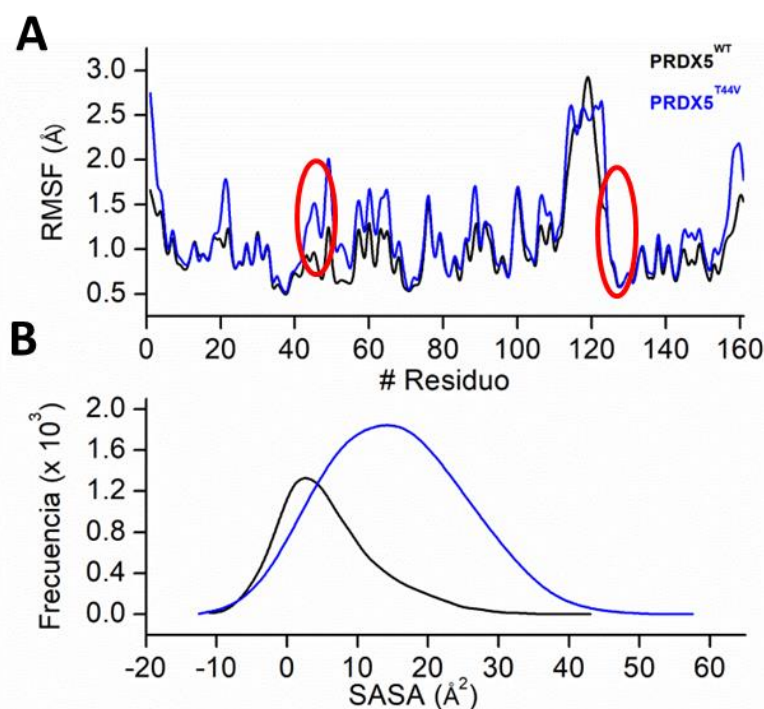
Para la PRDX5<sup>R127Q</sup> se analizó el contenido de estructura secundaria del segmento N-terminal de la hélice- $\alpha 2$  (en donde se ubica la C<sub>p</sub>), en la enzima con C<sub>p</sub> tiol y tiolato. Debido a que experimentalmente se observó una pérdida de actividad casi total y que este tiol se comporta como un LMWT en la curva de Brønsted y no como un tiol catalítico (**Figura 3.8**)<sup>107,144</sup>, se sospechó que la mutación afectaría la estructura del sitio activo. En la **Tabla 3.3** se reportan los porcentajes en que los residuos 45 - 48 se encuentran formando parte de una  $\alpha$ -hélice a lo largo de los 100 ns de la simulación de MD, comparando los valores con los de la enzima WT.

**Tabla 3.3** Porcentaje en conformación  $\alpha$ -hélice y hélice- $\pi$  durante los 100 ns de MD de los residuos del segmento N-terminal de la hélice- $\alpha 2$  que contiene a la C<sub>p</sub> (residuos 45 – 48)

#Residuo	% $\alpha$ -hélice			% hélice- $\pi$		
	PRDX5 <sup>WT</sup> (C <sub>p</sub> -S)	PRDX5 <sup>R127Q</sup> (C <sub>p</sub> -SH)	PRDX5 <sup>R127Q</sup> (C <sub>p</sub> -S)	PRDX5 <sup>WT</sup> (C <sub>p</sub> -S)	PRDX5 <sup>R127Q</sup> (C <sub>p</sub> -SH)	PRDX5 <sup>R127Q</sup> (C <sub>p</sub> -S)
45	89	93	14	0	0	0
46	90	93	14	0	0	0
47	90	93	17	7	1	35
48	87	93	17	7	1	35

Los resultados obtenidos señalan que el segmento N-terminal de la hélice- $\alpha 2$  pierde estructura secundaria cuando la mutante PRDX5<sup>R127Q</sup> se simula con la C<sub>p</sub> ionizada a tiolato, pero en su forma neutra tiol los porcentajes son similares a los de la enzima WT. Estos resultados explican parte de la pérdida de actividad de la enzima resultante al mutar la Arg conservada del sitio activo por una Gln neutra<sup>107,144</sup>. Para realizar el ataque nucleofílico sobre el sustrato de forma eficiente, la C<sub>p</sub> debe estar desprotonada, pero no es posible tener un sitio activo estructurado con C<sub>p</sub>-S<sup>-</sup> y sin Arg127. Por otro lado estos resultados evidencian la importancia de la Arg127 con su carga positiva en la estabilización de la forma tiolato de C<sub>p</sub>, explicando el aumento de pK<sub>a</sub> de 4.7 a 6.7 observado experimentalmente<sup>107,144</sup>. En la mutante PRDX5<sup>T44V</sup>, el sitio activo se mantiene estructurado a lo largo de la simulación, al igual que en la enzima WT, la C<sub>p</sub> se encuentra en estructura  $\alpha$ -hélice durante el 72 % de la simulación. Esto coincide con el hecho que se haya determinado actividad catalítica para esta enzima<sup>107,144</sup>.

En la **Figura 3.6** se muestran los resultados del análisis de flexibilidad y exposición al solvente de la C<sub>p</sub> en PRDX5 WT y T44V.



**Figura 3.6** Flexibilidad de la proteína y exposición al solvente de C<sub>p</sub>. **A:** RMSF por residuo y **B:** SASA de la C<sub>p</sub>, en los 100 ns de MD para la enzima WT y la mutante T44V. En rojo se resalta la región N-terminal de la hélice- $\alpha 2$  en donde contiene a C<sub>p</sub> y el segmento de la hebra- $\beta 6$  que contiene a la Arg127.

Al analizar la movilidad media de los residuos a lo largo de la simulación (**Figura 3.6, A**) se evidencia que la región N-terminal de la hélice- $\alpha 2$  en la mutante T44V presenta una movilidad aumentada con respecto a la observada en la enzima WT, mientras que la región de la hebra- $\beta 6$  que contiene a la Arg127 no se ve alterada (círculos rojos en la **Figura 3.6, A**). La región con mayor movilidad corresponde al segmento entre los residuos 114 - 122, localizados en la hélice- $\alpha 5$ , que se encuentra aislada en la estructura terciaria (**Figura 1.3, B**), lo cual le confiere mayor flexibilidad ya que se establecen pocas interacciones débiles.

Este aumento en la movilidad genera una mayor exposición de la  $C_p$  hacia el solvente, lo cual puede apreciarse en el gráfico de SASA en la **Figura 3.6, B**. La media del SASA de  $C_p$  en la enzima WT (trazo negro) es de  $1 \text{ \AA}^2$ , mientras que para la enzima T44V aumenta a  $16 \text{ \AA}^2$ . Este incremento en la accesibilidad al solvente se traduce en un aumento en la residencia de los EdH que la  $C_p$  establece con moléculas de  $H_2O$ . En la enzima WT hay una residencia del 4 %, mientras que en la enzima mutante este valor aumenta a 14 %. Este efecto también se observó en la enzima mutante T42V de la AhpE de *Mycobacterium tuberculosis*, las simulaciones de dinámica molecular de esta variante presentan mayor número de moléculas de  $H_2O$  en el sitio activo<sup>108</sup>.

Por otro lado, las interacciones con la Arg127 se ven inalteradas, los EdH entre el átomo de azufre de  $C_p$  y los grupos  $^{\omega}NH_2$  de la Arg127 se mantienen en 55 % y 60 %, mientras que en la enzima WT se obtienen residencias de 60 % y 52 %. El hecho de que la intensidad de los EdH estabilizantes con la Arg127 se mantenga igual que en la enzima WT (interacción clave junto con la estabilización electrostática del tiolato para la disminución del  $pK_a$  de la  $C_p$ <sup>107</sup>) y que haya un aumento en la residencia de los EdH con moléculas de  $H_2O$  podría explicar por qué la  $C_p$  es levemente más ácida en la mutante T44V que en la enzima WT (1.1 unidades menor<sup>107,144</sup>).

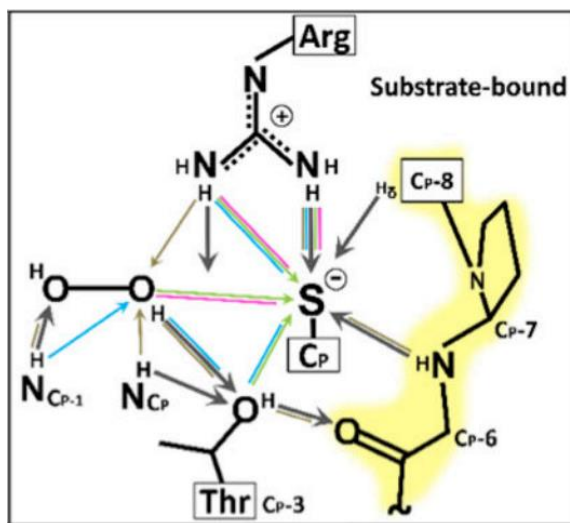
## Discusión

En el presente capítulo se presentó el mecanismo con detalle atómico y electrónico de la reacción de oxidación de  $C_p$  por  $H_2O_2$  en PRDX5 WT y en la mutante T44V. Para obtener más información acerca de la función de los residuos conservados del sitio activo Thr44 y Arg127, se estudió la dinámica de las mutantes T44V y R127Q (de las cuales existen datos reportados<sup>107,144</sup>), comparandolas con la enzima WT.

A través del estudio detallado del mecanismo en la enzima WT, se determinó que el mismo es de tipo  $S_N2$ , con un TS temprano con un avance en la formación del enlace  $S...O_R$  del 43 % y de ruptura  $O_R...O_L$  del 38 % y con una transferencia de carga negativa al  $H_2O_2$  de 0.368 u.a.. La propuesta de mecanismo tipo  $S_N2$  concuerda con los resultados del modelado de la oxidación de diferentes LMWT reportado por Cardey y Enescu (LMWT = metanotiolato<sup>126</sup> y cisteína<sup>128</sup>), por Bayse (LMWT = cisteína)<sup>133</sup>, por Bach, Su y Schlegel (LMWT =  $H_2S$ )<sup>122</sup>, y por Nagy *et al* (LMWT = SH)<sup>151</sup>. El mecanismo mostró tener dos transferencias protónicas post-TS, la primera de ellas es entre el  $O_L$  y el H del  $C_p$ -SOH y también fue observada por estos autores, exceptuando a Nagy, *et al*. En cuanto al mecanismo en el contexto proteico Bonanata *et al.*, estudiaron con optimizaciones QM/MM la oxidación del tiol de la albúmina<sup>117</sup> y Zeida *et al.* modelaron con simulaciones QM/MM la oxidación de la  $C_p$  en la AhpE<sup>112</sup>. Ambos trabajos encuentran también TS consistentes con reacciones del tipo  $S_N2$  y también se observó la primera transferencia protónica, lo que da como producto de la reacción  $C_p$ -SO<sup>-</sup> y  $H_2O$ . La validación de nuestro modelo se basa en que se obtuvo una energía libre de activación de  $10.6 \text{ kcal mol}^{-1}$  y si se utiliza la ecuación de Eyring-Polanyi<sup>278</sup> para convertirla en una constante de velocidad se obtiene un valor de  $k = 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , muy cercano al dato reportado experimentalmente<sup>107,168</sup>.

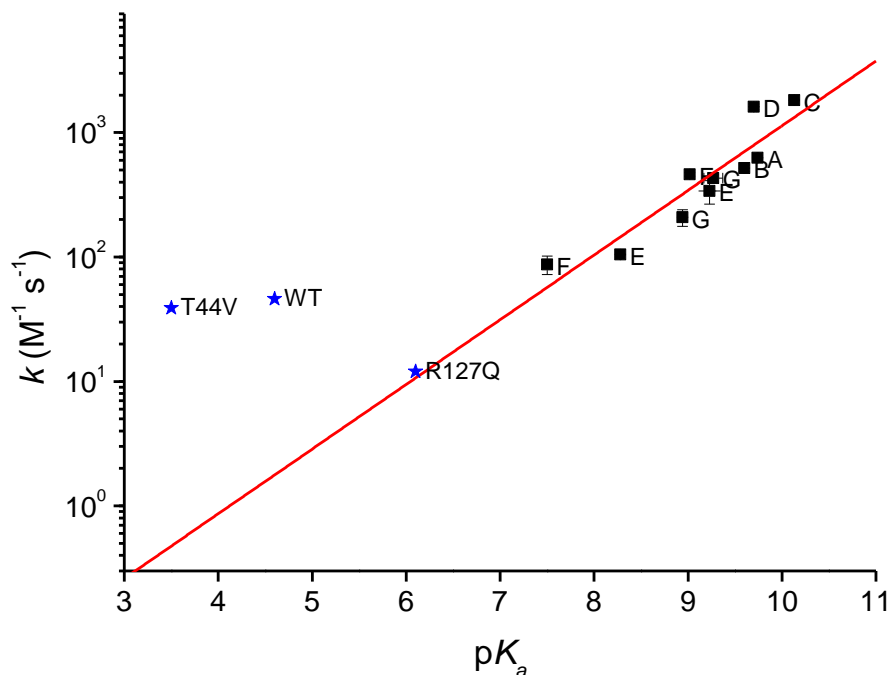
Con respecto al posicionamiento del sustrato en el sitio activo, se obtuvieron resultados consistentes con el “oxygen track” (Figura 1.7, A) propuesto por Hall *et al.*<sup>111</sup>, en donde el peróxido interacciona con el sitio activo a través de EdH con el grupo OH de la Thr44 como aceptor y el grupo amida de la Gly46 como dador, con la excepción de la interacción con la Arg127, que no fue observada en nuestros resultados. Esta interacción también fue propuesta por Ferrer-Sueta *et al.* (Figura 1.7, B)<sup>100</sup> y reportada en la estructura cristalográfica de una Prx de *A. pernix* que contiene  $H_2O_2$  en el sitio activo<sup>257</sup> y en el estudio de AhpE realizado por Zeida *et al.*<sup>112</sup>, pero no fue observada en la simulación de AhpE con  $H_2O_2$  realizada por Pedre *et al.*<sup>108</sup>. Recientemente, Perkins *et al.* resumen la mayoría de las propuestas mecanísticas reportadas en la literatura<sup>279</sup> (Figura 3.7), en donde se evidencian las

diferencias y similitudes entre las propuestas de los distintos autores (en este artículo se incluyen los datos reportados en esta tesis).



**Figura 3.7.** Propuestas de unión del sustrato al sitio activo reportadas por: Hall *et al.*<sup>111</sup> (flechas marrones), esta tesis (flechas azules), Zeida *et al.*<sup>112</sup> (flechas verdes), Nagy *et al.*<sup>151</sup> (flechas rosadas) y Perkins *et al.*<sup>279</sup>, artículo del cual se extrajo la imagen.

Con respecto a la función del residuo Thr44 en la catálisis enzimática, se determinó que el mismo es capaz de modular la nucleofilia de la  $C_p$  previo y durante el transcurso de la reacción. En ausencia de sustrato, el EdH establecido entre el tiolato de  $C_p$  y el grupo OH de la Thr44 estabiliza a la  $C_p$ , disminuyendo su nucleofilia. Una vez que el sustrato ingresa al sitio activo, se produce un pequeño cambio en la red de EdH de la enzima, ya que éste también interacciona con el grupo OH de la Thr44, interacción que puede ser responsable de la especificidad por hidroperóxidos. La pérdida del EdH  $C_p-S^- \dots HO-Thr44$  a medida que el peróxido se va acercando al tiolato de  $C_p$ , es responsable del aumento observado en la nucleofilia de la  $C_p$  (**Figuras 3.4 y 3.5**). Estos hallazgos apoyan lo reportado experimentalmente con respecto a la medida de nucleofilia de la  $C_p$  mediante la reacción con el electrófilo no sustrato  $mBBR^{107}$  en la enzima WT y en la mutante T44V. La mutación de la Thr44 produce un aumento en la nucleofilia intrínseca de  $C_p$  debido a la ausencia del EdH  $Thr44-OH \dots S-C_p$ , evidenciado como un aumento en la  $k_{RS^-}$  con respecto a lo esperado según el  $pK_a$  de  $C_p$  (gráfico de Brønsted para LMWT presentado en la **Figura 3.8**<sup>107,144</sup>).



**Figura 3.8** Gráfico de Brønsted para LMWT (▪) reaccionando con mBBR a 25 °C. Referencias de LMWT: A: N-acetil-L-cisteína, B: betamercaptoetanol, C: captopril, D: ácido 2,3-dimercaptosuccínico, E: cisteína, F: L-cisteína etil éster, G: glutatión. Las constantes de velocidad independiente de pH para PRDX5 se incluyen para comparar pero no se utilizan en la regresión lineal. Extraído de Portillo-Ledema *et al.*<sup>107</sup>.

El análisis a través del gráfico de Brønsted contruido con LMWT permitió determinar que la mutante T44V tiene una mayor nucleofilia que la enzima WT. Si bien la constante de velocidad es mayor a la esperada según el pK<sub>a</sub> de la C<sub>p</sub> en ambos casos, en la mutante T44V el incremento es de 80 veces, mientras que en la enzima WT el mismo es de 25 veces. Dicho aumento en la nucleofilia de C<sub>p</sub> fue atribuido a la falta del EdH Thr-OH...S-C<sub>p</sub>, lo cual concuerda con las medidas de nucleofilia realizadas teóricamente a través de la energía del HOMO-KS (**Figuras 3.3 y 3.4**). Si bien Karplus *et al.* enfatizan que la Thr del sitio activo no se encontraría formando EdH con el tiolato de la C<sub>p</sub>, sino con un oxígeno carbonílico de un residuo cercano<sup>279</sup>, todos nuestros resultados apoyan la existencia del EdH Thr-OH...S-C<sub>p</sub>, que también se observó en AhpE por Zeida *et al.*<sup>112</sup> y Pedre *et al.*<sup>108</sup>.

Mediante el modelado del mecanismo en la mutante T44V se determinó una energía libre de activación 3 kcal mol<sup>-1</sup> mayor que en la enzima WT, lo cual se traduce en una  $k = 7.8 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , también cercana al valor determinado experimentalmente<sup>107,144</sup>. El estudio de la nucleofilia de C<sub>p</sub> en presencia o ausencia del sustrato en el sitio activo mostró que si la Thr44 está ausente, la C<sub>p</sub> tiene

mayor nucleofilia y una vez que el sustrato ingresa al sitio activo, en lugar de activarse, la C<sub>p</sub> pierde nucleofilia, ya que éste interacciona directamente con ella, debido a la ausencia de la Thr44. Por lo tanto, se confirmó la función de la Thr44 en el posicionamiento “productivo” del sustrato en el sitio activo y en la modulación de la nucleofilia de C<sub>p</sub>. Existen resultados en la literatura que muestran la importancia de la Thr en la catálisis: para la PrxQ se mostró que su mutación disminuye la actividad enzimática en un 50 %<sup>241</sup>, también se determinó que su mutación lleva a una disminución del 27 % en una Prx de 2-Cys típica de plantas<sup>88</sup> y una disminución en la  $k_{cat}$  de la reacción con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 14 veces para la AhpC<sup>244</sup> y de 1.5 veces para la triparredoxina peroxidasa<sup>240</sup>. Su función en la afinidad por el sustrato se ha evidenciado para la triparredoxina peroxidasa<sup>240</sup> y la AhpC<sup>244</sup>, determinando una K<sub>M</sub> para las mutantes T49S y T43V 1.6 y 1900 veces mayor con respecto a la enzima WT, respectivamente.

Recientemente, un estudio de AhpE que combina experimentos cinéticos, computacionales y estructurales mostró que la mutación de la Thr disminuye la  $k$  en 3 órdenes de magnitud, y aumenta la exposición al solvente de C<sub>p</sub> tal como se observó para PRDX5 (**Figura 3.6, B**)<sup>108</sup>. Esto permite explicar, en parte, la disminución observada en el valor de  $k$  en la mutante PRDX5<sup>T44V</sup> ya que los solventes apróticos favorecen las reacciones de ataque nucleofílico de tiolatos, por ejemplo la reacción de intercambio tiol disulfuro es 10<sup>3</sup> veces más rápida en dimetilsulfóxido y dimetilformamida que en agua<sup>280</sup> y la alquilación de CH<sub>3</sub>S<sup>-</sup> con CH<sub>3</sub>Br es 10<sup>14</sup> veces más rápida en fase gaseosa que en agua<sup>281</sup>.

Con respecto a la función de la Arg127, se determinó que este residuo está implicado en la estabilización del TS, la estructuración del sitio activo y la protonación del C<sub>p</sub>-SO<sup>-</sup> que se forma como producto de la reacción. Las simulaciones de MD mostraron que el sitio activo de la mutante PRDX5<sup>R127Q</sup> se mantiene estructurado únicamente cuando la C<sub>p</sub> se encuentra en forma tiol, estos resultados coinciden con lo que se observó en la estructura cristalográfica de AhpE (PDBID 4XIH), que muestra un sitio activo estructurado para la mutante R116A, dicha estructura se resolvió a pH 4.5 y siendo el pK<sub>a</sub> de C<sub>p</sub> 6.4 se espera que a ese pH se encuentre mayoritariamente en forma tiol y no tiolato<sup>108</sup>. Estos resultados explican lo observado experimentalmente, en cuanto a que dicha mutante no mostró actividad de reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>107</sup>. Por otro lado, tal como puede observarse en el gráfico de Brønsted presentado en la **Figura 3.8**, la C<sub>p</sub> de la mutante PRDX5<sup>R127Q</sup> se comporta como un tiol de bajo peso molecular, sigue perfectamente la tendencia en el gráfico, lo cual concuerda con un sitio activo desestructurado en donde el tiolato no tiene interacciones específicas con residuos del entorno. La transferencia protónica post-TS, que ocurre entre la Arg127 y el C<sub>p</sub>-SO<sup>-</sup> (**Figura 3.2**), si bien no influye en la velocidad de reacción, permite obtener como producto el C<sub>p</sub>-SOH que es la especie más favorable para la siguiente reacción del ciclo catalítico, la formación del enlace disulfuro con la C<sub>R</sub>. Una vez que la



Arg127 se encuentra desprotonada, podría actuar como base abstrayendo un protón de la C<sub>R</sub>, lo cual la dejaría en forma tiolato, la especie nucleofílica. Esta transferencia protónica podría en principio suceder a través del residuo de Glu143, que se encuentra posicionado entre la Arg127 y la C<sub>R</sub>. Además, la formación del C<sub>p</sub>-SOH podría ser clave para disparar la transición hacia la conformación LU, aspectos que serán abordados en el siguiente capítulo

**Capítulo 4: Transición *fully folded-locally unfolded* en PRDX5.  
Determinantes moleculares que la  
disparan.**

## Resumen del capítulo

En el ciclo catalítico de PRDX5 debe ocurrir un cambio conformacional local (denominado transición FF→LU) que involucra el desplegado parcial de la hélice- $\alpha 2$  que contiene a la  $C_p$  y el movimiento del *loop* C-terminal que contiene a la  $C_R$  (**Figura 1.10**). Este cambio conformacional permite que ocurra la reacción de resolución, ya que disminuye la distancia de 14 Å observada entre la  $C_p$  y la  $C_R$  en las estructuras elucidadas experimentalmente de la proteína reducida<sup>78</sup>.

Para determinar si esta transición estructural depende del estado de oxidación de  $C_p$  y/o de su estado de ionización cuando se encuentra tanto como tiol o ácido sulfénico, se realizaron simulaciones de dinámica molecular convencionales (cMD) en la escala de los microsegundos y cuatro réplicas de 500 ns de dinámica molecular acelerada (aMD) de los siguientes sistemas: PRDX5 reducida, con  $C_p$  en forma tiol y tiolato (PRDX5-SH y PRDX5-S<sup>-</sup>) y PRDX5 oxidada con  $C_p$  en forma sulfénico y sulfenato (PRDX5-SOH y PRDX5-SO<sup>-</sup>).

Basados en el análisis de la evolución del contenido de estructura secundaria, de la distancia  $C_p...C_R$  y la naturaleza y fuerza de red de EdH de  $C_p$  durante la simulación de cada uno de estos cuatro sistemas, concluimos que únicamente cuando  $C_p$  está en la forma oxidada y neutra (no ionizada) PRDX5-SOH, la enzima es capaz de desplegar la región N-terminal de la hélice- $\alpha 2$  para permitir el acercamiento mutuo entre  $C_p$  y  $C_R$  hasta distancias adecuadas para que ocurra la reacción de formación del disulfuro. Las interacciones estabilizantes de EdH y el puente salino que el tiolato de la  $C_p$  establece con los residuos vecinos del sitio activo en la conformación FF se pierden cuando  $C_p$  se oxida y ese sería el disparador que desencadena el desplegado del extremo N-terminal de la hélice- $\alpha 2$ . En la especie sulfenato las interacciones de  $C_p$  con los residuos vecinos son fuertes y producen una estabilización de la conformación FF.

Nuestros resultados son los primeros en mostrar que la  $C_p$  de PRDX5 no sólo se tiene que oxidar para promover la transición FF→LU, sino que además ese derivado sulfénico debe hallarse en el estado neutro, sin pérdida del protón del grupo -SOH tal y como se obtuvo al cierre del paso de peroxidación presentado en el Capítulo 3 de esta tesis. Debido a que la conformación FF sería necesaria para que la sobreoxidación tenga lugar y que por su parte la conformación LU es necesaria para la etapa de resolución, el delicado balance conformacional FF/LU va a influir en la regulación del ciclo catalítico. La estabilización de la forma FF en PRDX5-SOH, puede favorecer la reacción con otra molécula de peróxido, provocando un aumento en la sensibilidad a la sobreoxidación, o puede favorecer la formación de disulfuros mixtos con tioles proteicos. Sin embargo, la transición hacia la

conformación LU, favorece la reacción de resolución y la enzima continua el ciclo catalítico. Debido a que el estado de protonación de C<sub>p</sub>-SOH va a influir en la factibilidad de la transición FF→LU, en principio una forma de regular el ciclo catalítico y la ruta que sigue PRDX5 una vez que se oxida a sulfénico, podría ser mediante la regulación de su pK<sub>a</sub>.

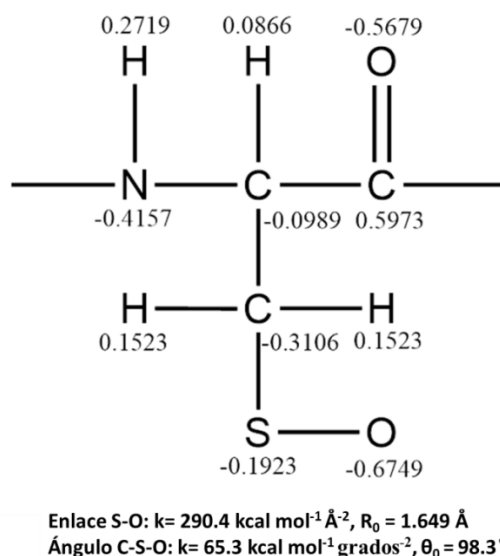
## Metodología

### 4.1 Estructuras proteicas y parametrización de residuos no estándar

La estructura cristalográfica de la PRDX5 en estado reducido se obtuvo del *Protein Data Bank* (PDBID: 1HD2), dicha estructura se utilizó para generar los sistemas con la C<sub>p</sub> en forma tiolato (PRDX5-S<sup>-</sup>), tiol (PRDX5-SH), sulfenato (PRDX5-SO<sup>-</sup>) y ácido sulfénico (PRDX5-SOH). La estructura proteica en forma oxidada a disulfuro se obtuvo también del *Protein Data Bank* (PDBID: 2VL2). Los parámetros para la cisteína oxidada a ácido sulfénico se obtuvieron de la literatura<sup>282</sup>, mientras que el sulfenato fue parametrizado de la siguiente manera:

- Optimización al nivel IEF-B3LYP/6-31G(d)<sup>137,138,253,259</sup> usando agua como solvente de la geometría de la cisteína oxidada a sulfenato respectivamente rematada con un grupo acetilo en el extremo N-terminal y otro N-metilamida en el C-terminal (ACE-CSM-NME).
- Cálculo de las cargas atómicas basadas en el potencial electrostático de Merz-Singh-Kollman<sup>283</sup> con un cálculo *single-point* al nivel HF/6-31G(d)<sup>253,259,284</sup>.
- Determinación de las cargas atómicas usando el procedimiento RESP<sup>256</sup> del módulo *Antechamber* de AmberTools<sup>271</sup> y obtención del resto de los parámetros a partir del campo de fuerza generalizado de AMBER (*Gaff*)<sup>254</sup>.

En la **Figura 4.1** se muestran los valores de las cargas RESP y parámetros de *stretching* y *bending* de la cisteína oxidada a sulfenato (ACE-CSM-NME).



**Figura 4.1** Parámetros *Gaff* y cargas RESP del sistema modelo ACE-CSM-NME empleadas en las simulaciones

## 4.2 Preparación de los sistemas y simulaciones de dinámica molecular convencional (cMD) y acelerada (aMD)

El estado de ionización de cada residuo fue ajustado según lo esperado a pH 7.4, excepto por la C<sub>p</sub> que se simuló como tiol/tiolato para la PRDX5 reducida y como sulfénico/sulfenato para PRDX5 oxidada. Se utilizó el módulo *tleap* de AMBER 14<sup>266</sup> para preparar cada sistema, se agregaron iones K<sup>+</sup> para alcanzar la electroneutralidad, y se solvató con una caja cúbica de moléculas de agua TIP3P<sup>140</sup> que se extendió 12 Å desde la superficie de la proteína. El campo de fuerza utilizado para la proteína fue el *ff99SB*<sup>285</sup>.

Previo a las simulaciones cMD o aMD cada sistema se preparó de la siguiente forma:

- i) Minimización de las moléculas de agua e iones con 250 pasos SD<sup>248</sup> y 250 pasos CG<sup>249</sup>, manteniendo la proteína restringida con una constante de fuerza de 500 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup>.
- ii) Minimización del sistema completo con 500 pasos SD y 500 pasos CG.
- iii) Calentamiento gradual del sistema de 100 a 310 K por 100 ps en un ensemble NVT utilizando el termostato de Langevin<sup>267</sup> y una frecuencia de colisión de 5 ps<sup>-1</sup>.
- iv) Equilibración de la densidad con una simulación de 1 ns en ensemble NPT.

Para el cálculo de las interacciones electrostáticas de largo alcance se utilizó una distancia de corte de 8 Å y el método de PME<sup>246</sup> para tratar las interacciones de largo alcance, los enlaces que involucran átomos de hidrógeno se restringieron con el algoritmo SHAKE<sup>269</sup>, permitiendo el uso de un tamaño de paso de 2 fs para la integración de las ecuaciones de movimiento.

Las simulaciones convencionales se realizaron primero en un ensemble NPT por 100 ns, controlando la presión con el baróstato de Monte Carlo<sup>286</sup> y luego se extendieron 100 ns más en un ensemble NVT para obtener los parámetros necesarios a ser utilizados en las dinámicas aceleradas, posteriormente las cMD se extendieron a 2 μs.

La dinámica molecular acelerada es una técnica de muestreo avanzado que permite el muestreo conformacional mediante el agregado de un potencial de impulso no negativo  $\Delta V(r)$  al verdadero potencial cuando éste es menor que una energía umbral, resultando en la reducción de las barreras locales, lo cual permite que el cálculo evolucione mucho más rápido que una dinámica molecular convencional<sup>287</sup>:

$$V^*(r)=V(r) \quad \text{si } V(r)\geq E \quad (4.1)$$

$$V^*(r)=V(r)+\Delta V(r) \quad \text{si } V(r)<E \quad (4.2)$$

Donde  $V(r)$  es la energía potencial real del sistema,  $V^*(r)$  es la energía potencial modificada y  $E$  la energía umbral. La siguiente ecuación describe la forma del potencial sesgado  $\Delta V(r)$  cuando se utiliza el algoritmo *dual-boost* que aplica un impulso sobre la energía potencial total y sobre la energía de los diedros:

$$V(r) \frac{(E_{\text{pot}} - V(r))^2}{\alpha_{\text{pot}} + E_{\text{pot}} - V(r)} + \frac{(E_{\text{died}} - V_{\text{died}}(r))^2}{\alpha_{\text{died}} + E_{\text{died}} - V_{\text{died}}(r)} \quad (4.3)$$

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

$$E_{\text{pot}}^{\text{tot}} = \langle E_{\text{pot}} \rangle + \alpha_{\text{pot}}, \alpha_{\text{pot}} = a1 * N_{\text{atoms}} \quad (4.4)$$

$$E_{\text{died}}^{\text{tot}} = \langle E_{\text{died}} \rangle + N_{\text{resd}} * b1 + \alpha_{\text{died}}, \alpha_{\text{died}} = \frac{b1 * \lambda * N_{\text{resd}}}{5} \quad (4.5)$$

donde  $\langle E_{\text{pot}} \rangle$  y  $\langle E_{\text{died}} \rangle$  son las energías potenciales total y de diedro promedio, obtenidas a partir de las simulaciones convencionales,  $N_{\text{resd}}$  y  $N_{\text{atoms}}$  son los números de residuos y átomos, y  $\lambda$  el factor de aceleración,  $a1$  y  $b1$  las energías extra por átomo y por residuo, respectivamente (elegidos como  $0.2 \text{ kcal mol}^{-1}$  y  $3.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Se realizaron cuatro simulaciones independientes de 500 ns (asignando velocidades arbitrarias,  $ig = -1$ ), utilizando como punto de partida las coordenadas finales de los 100 ns NVT de cada cMD. A continuación se presenta un resumen con los parámetros de las distintas simulaciones.

**Tabla 4.1.** Parámetros de la aMD (impulsos en  $\text{kcal mol}^{-1}$ ), tiempos de simulación y número de átomos de cada sistema

Sistema	$N_{\text{átomos}}$ proteína	$N_{\text{átomos}}$ sistema	cMD (ns)	aMD (ns)	Impulso $E_{\text{Potencial}}^*$	Impulso $E_{\text{Diedros}}^*$
PRDX5-S <sup>-</sup>	2413	27824	2000	$\lambda = 0.3$ 4 réplicas de 500	$33.93 \pm 6.19$	$23.33 \pm 7.08$
PRDX5-SH	2414	31343	2000		$37.71 \pm 6.49$	$22.51 \pm 6.86$
PRDX5-SO <sup>-</sup>	2414	27825	2000		$31.92 \pm 5.98$	$22.84 \pm 6.95$
PRDX5-SOH	2415	23169	2000		$19.92 \pm 4.99$	$22.01 \pm 6.62$
PRDX5 <sub>S-S</sub>	2412	26436	200	-	-	-

\*Promedios y desviación estándar del potencial de impulso a lo largo de la trayectoria aMD

### 4.3 Análisis de la red de EdH, fluctuaciones estructurales y estructura secundaria

Para analizar la naturaleza de los EdH que establece la  $C_p$  con su entorno en los distintos estados de oxidación y protonación se utilizó el programa HBonanza, que permite el análisis y visualización mediante VMD de las redes de EdH mediante un *script* en Tcl<sup>288</sup>. El criterio seguido para determinar la existencia de EdH es estrictamente geométrico: se considera que se establece un EdH cuando los átomos dador-aceptor se encuentran a una distancia máxima de 3.5 Å y cuando el ángulo dador-H...aceptor se encuentra entre 160 y 180°. Para el análisis se consideraron solo aquellos enlaces de hidrógeno que se encontraban presentes en al menos el 50% de la trayectoria.

Los alineamientos estructurales y el cálculo del desplazamiento cuadrático medio (RMS) se basan en la teoría de la optimización del valor de menor orden (LOVO)<sup>289</sup> implementada en el algoritmo MDLovoFit<sup>290</sup>, que realiza una identificación automática de las regiones estructurales rígidas y móviles. A partir de las trayectorias de cada sistema se determinó el valor  $\Phi$  que indica la fracción de átomos que minimizan el RMSD global. El alineamiento estructural final se realizó utilizando 10000 correspondencias iniciales diferentes entre átomos, de modo de asegurar la convergencia.

La evolución de la estructura secundaria se analizó utilizando el algoritmo DSSP de Kabsch y Sander<sup>291</sup> que se basa en el establecimiento de EdH y características estructurales para clasificar cada residuo dentro de un tipo de estructura secundaria. Dicho algoritmo se encuentra implementado en la utilidad *cpptraj* del AmberTools<sup>270</sup>.

### 4.4 Determinación de los movimientos proteicos más importantes durante la aMD por análisis de los componentes principales (PCA)

Se realizó un análisis de componentes principales de cada simulación, de forma tal de analizar la dinámica proteica. PCA es un método de reducción de variables, que se basa en una transformación lineal que extrae los elementos más importantes en el conjunto original de datos, usando una matriz de covarianza  $C_{ij}$  construida a partir de las coordenadas atómicas que describen los grados de libertad accesibles de la proteína:

$$C_{ij} = \langle (x_i - \langle x_i \rangle) (x_j - \langle x_j \rangle) \rangle \quad (4.6)$$

donde  $x_i$ ,  $x_j$  representan todos los posibles pares de las  $3N$  coordenadas cartesianas del sistema, siendo  $N$  el número de átomos y  $\langle x_i \rangle$ ,  $\langle x_j \rangle$  las coordenadas de la posición promedio en la trayectoria. Luego de la diagonalización se obtiene un conjunto de vectores propios con sus valores propios, que describen los ejes de máxima variancia de la distribución de conformaciones y el porcentaje de la



variancia de las fluctuaciones atómicas contenidas en cada vector. La fracción  $V_i$  de la variancia total contenida en cada vector propio  $\lambda_i$  se expresa como:

$$V_i = \frac{\lambda_i}{\sum_{k=1}^n \lambda_k} \quad (4.7)$$

Cuando la trayectoria original centrada, es proyectada sobre un vector propio, el resultado es llamado componente principal (PC).

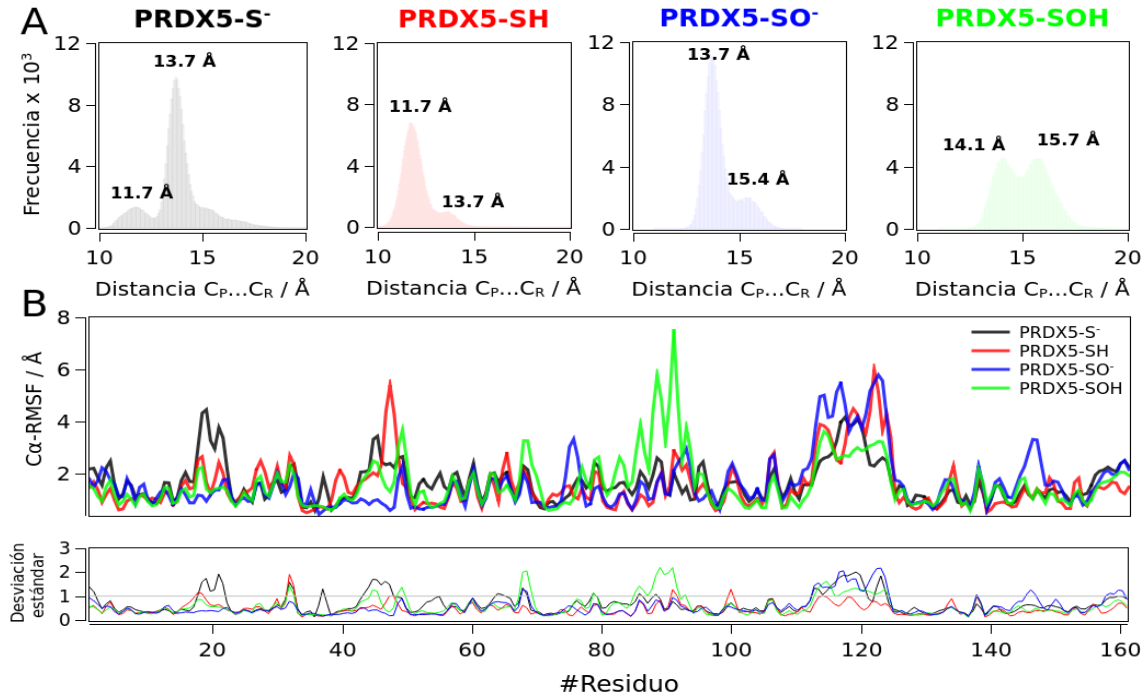
El programa utilizado para para dicho análisis fue el *cpptraj*<sup>270</sup> y se utilizó QtIPLOT<sup>292</sup> para realizar los gráficos de PCA.

## Resultados

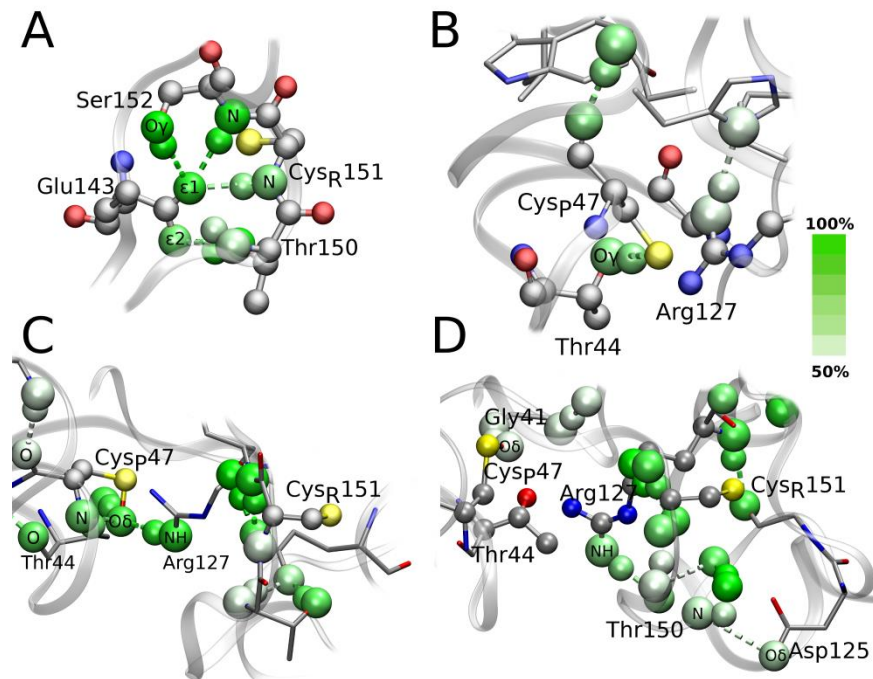
### 4.1 Análisis del efecto del estado de oxidación e ionización de C<sub>p</sub> sobre la estructura de PRDX5 a través de cMD en escala de tiempo de los microsegundos

Para caracterizar el efecto de las variaciones en el estado de oxidación y en la ionización de C<sub>p</sub> sobre la dinámica y los reordenamientos estructurales locales de PRDX5, se analizaron descriptores estructurales tales como C $\alpha$ -RMSF, RMSD, distancia C<sub>p</sub>...C<sub>R</sub> y cambios en la red de EdH del sitio activo a lo largo de los 2  $\mu$ s de simulación cMD para cada sistema en estudio. Los resultados de distancia y C $\alpha$ -RMSF se presentan en la **Figura 4.2**.

De ocurrir un evento de desplegamiento local, como el que se debería dar en la transición FF $\rightarrow$ LU, sería de esperar que se observara una disminución en la distancia entre C<sub>p</sub> y C<sub>R</sub>. En la **Figura 4.2 A** se presenta el gráfico de la distribución de dicha distancia para cada sistema. Independientemente del estado de oxidación y de ionización de C<sub>p</sub> no se observa un acercamiento entre ambos residuos de cisteína durante los 2  $\mu$ s de dinámica molecular convencional; estos residuos permanecen a una distancia cercana al valor hallado en la estructura cristalográfica de la proteína reducida en conformación FF (13.8 Å)<sup>78</sup>. Por otro lado, al analizar el RMSF de los C $\alpha$  de los residuos cercanos a C<sub>p</sub> (**Figura 4.2 B**), se observan valores en el rango de 2 - 6 Å para todos los sistemas, lo que muestra que la dinámica local del extremo N-terminal de la hélice- $\alpha$ 2 no se altera significativamente luego de la oxidación o desprotonación de C<sub>p</sub>. Con respecto al *loop* C-terminal que contienen a la C<sub>R</sub>, se observa que la movilidad es aun menor, sugiriendo que las modificaciones sobre C<sub>p</sub> afectan principalmente el ambiente local que la rodea y no se extienden a lo largo de la proteína. En la **Figura 4.3** se muestran las redes de enlaces de hidrógeno que establecen C<sub>p</sub> y C<sub>R</sub>.



**Figura 4.2** Análisis del efecto estructural de la oxidación y/o la ionización C<sub>p</sub> en las simulaciones cMD. **A:** distribución de la distancia C<sub>p</sub>...C<sub>R</sub> en los 2 μs de simulación se muestra. **B:** perfil de Cα-RMSF por residuo y su desviación estándar calculado con el algoritmo MDLovoFit<sup>290</sup>.



**Figura 4.3** Red de EdH entre C<sub>R</sub>, C<sub>p</sub> y sus entornos locales en PRDX5 con C<sub>p</sub> reducida y en forma tiol (**A**) o tiolato (**B**) y con C<sub>p</sub> oxidada en su forma ácido sulfénico (**C**) o sulfonato (**D**). Átomos en verde indican la frecuencia de aparición del EdH que los involucra en los 2 μs de simulación (ver barra del mismo color a la derecha).

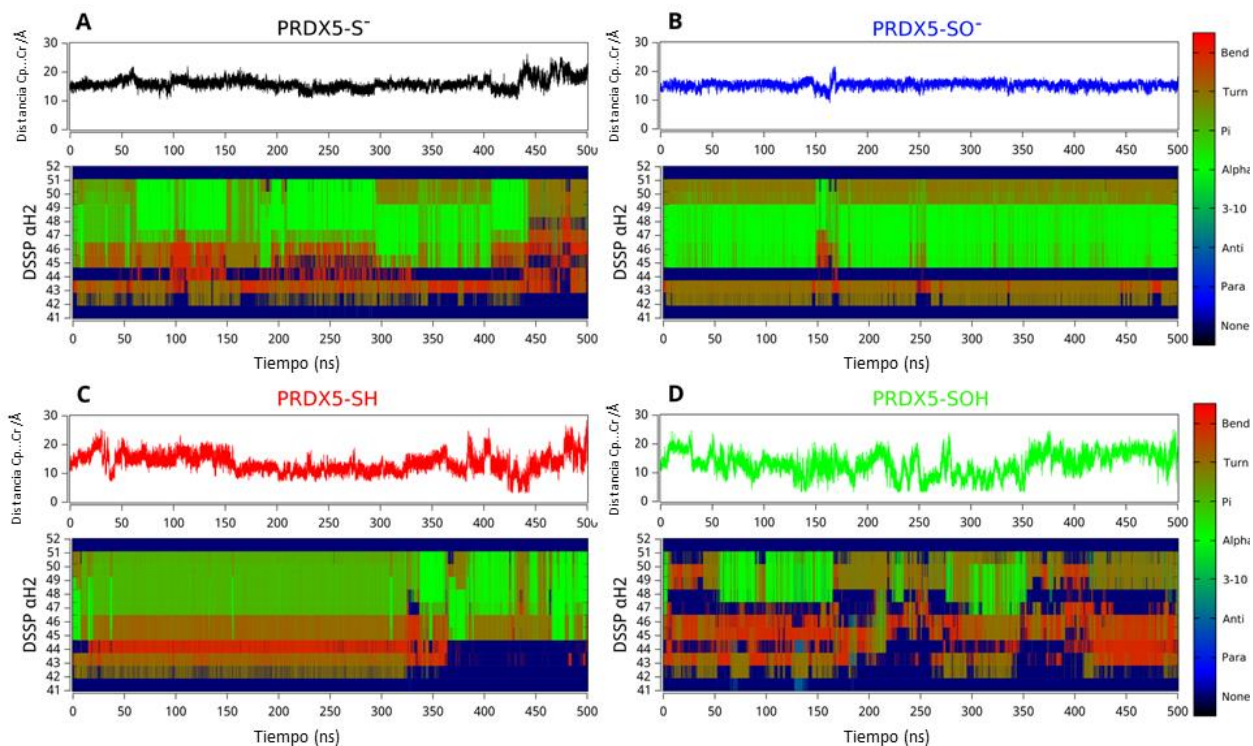
Para  $C_R$  (**Figura 4.3 A**) se evidencian interacciones de EdH que se mantienen más allá del estado de oxidación de  $C_p$ , en concordancia con lo reportado en cuanto a su dinámica (poca fluctuación, **Figura 4.2 B**). Esta red de EdH que persiste en distintos estados de la proteína es conservada involucra el grupo amida y cadenas laterales de la Thr150 y la Ser152 y a la cadena lateral del Glu143. Además, en los sistemas con  $C_p$  reducida (sea en forma tiol o tiolato) se establecen EdH de alta presencia entre la Arg127 conservada del sitio activo y los átomos de oxígeno de la Gly146 y Gly148.

Con respecto a la red de EdH establecida alrededor de  $C_p$  (**Figura 4.3**, paneles **B**, **C** y **D**), en este caso sí se observan diferencias según el estado de oxidación/ionización del residuo. Cuando  $C_p$  se encuentra como tiol no se evidencian EdH que persistan al menos el 50 % de la simulación (resultado no mostrado en la **Figura 4.3**), mientras que cuando lo hace como tiolato sí aparece una interacción con el grupo HO- de la Thr44 conservada del sitio activo con presencia durante el 65 % de la simulación (**Figura 4.3, B**). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el Capítulo 3, donde se aportó evidencia que señala a este EdH como responsable de modular la nucleofilia de la  $C_p$  a la baja mientras la enzima se encuentra “en reposo” y activándola gradualmente una vez que el sustrato ingresa al sitio activo, donde es posicionado mediante un nuevo EdH establecido con la Thr44, el residuo actúa como pivot, rotando y acercando al sustrato hasta  $C_p$  mientras la interacción directa de la Thr44 con ésta se debilita. Por otro lado, una vez que la  $C_p$  se oxida y queda como sulfenato ( $PRDX5-SO^{\cdot-}$ ), establece una red de EdH con los grupos HO- de la Thr44 y la Ser48 y el grupo  $-^{\omega}NH_2$  de la Arg127, que persisten en más del 75 % de la simulación (**Figura 4.3, C**). Sin embargo, cuando la  $C_p$  oxidada se encuentra bajo la forma de ácido sulfénico, la red de EdH es más lábil y únicamente se detecta una interacción transitoria actuando como dadora de H hacia el átomo de oxígeno del esqueleto peptídico de la Gly41 (**Figura 4.3, D**).

## 4.2 Muestreo conformacional avanzado por aMD de PRDX5 considerando oxidación e ionización de $C_p$

La transición FF→LU no sólo implica la reorganización del segmento N-terminal de la hélice- $\alpha 2$  y del *loop* C-terminal de PRDX5, sino también el acercamiento entre  $C_p$  y  $C_R$ , indispensable para que la etapa de resolución del ciclo catalítico tenga lugar luego de la peroxidación. Debido a que las simulaciones convencionales no logran capturar esta transición conformacional local, incluso habiendo llegado a tiempos de simulación en el orden de los  $\mu s$ , se debió acudir a técnicas de muestreo conformacional avanzadas, aplicando al sistema aMD con un factor de aceleración  $\lambda = 0.3$ . El efecto del

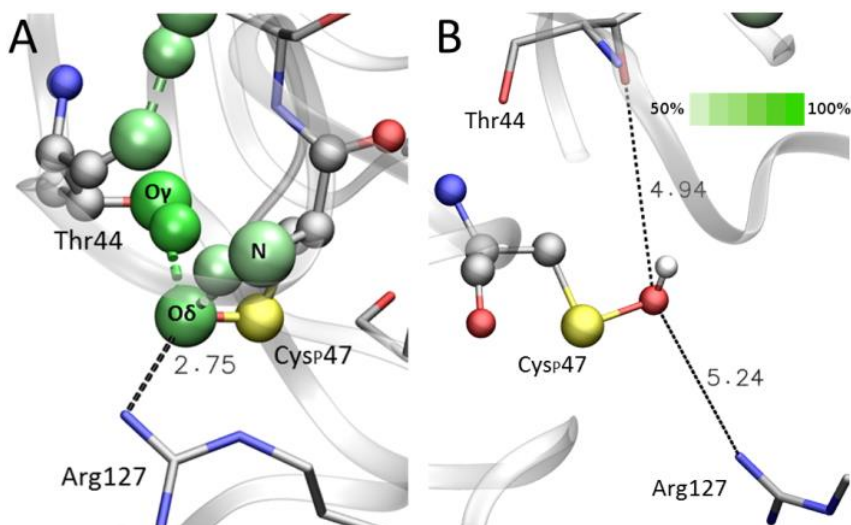
estado de oxidación/ionización de  $C_p$  a lo largo de la dinámica se monitoreó a través de dos descriptores de naturaleza estructural que se muestran en la **Figura 4.4**, a saber, la distancia  $C_p \dots C_R$  y el contenido de estructura secundaria del segmento N-terminal de la hélice- $\alpha 2$  (residuos 42 - 51).



**Figura 4.4** Análisis estructural en los 500 ns de aMD para PRDX5-S<sup>-</sup>, PRDX5-SO<sup>-</sup>, PRDX5-SH y PRDX5-SOH. El cuadro superior de cada panel corresponde a la distancia  $C_p \dots C_R$  en Å (A-negro, B-azul, C-rojo y D-verde) y el inferior al contenido de estructura secundaria DSSP del segmento N-terminal de la hélice- $\alpha 2$  (DSSP  $\alpha H 2$ ).

Para el sistema reducido, ya sea con  $C_p$  en la forma tiolato o como tiol, se puede observar que el segmento N-terminal de la hélice- $\alpha 2$  se mantiene estructurado a lo largo de los 500 ns de la simulación (**Figura 4.4, A y 4.4, C**), siendo más estable en el caso de  $C_p$  tiolato, algo esperable ya éste establece usualmente redes de EdH más fuertes respecto al tiol, tal como se observó con las dinámicas convencionales. Con respecto a los sistemas con la  $C_p$  oxidada, el contenido de estructura secundaria de la hélice- $\alpha 2$  se mantiene únicamente en el caso de PRDX5-SO<sup>-</sup> (**Figura 4.4, B**) mientras que cuando  $C_p$  se encuentra como sulfénico, se evidencia una gran pérdida de estructura  $\alpha$ -hélice (**Figura 4.4, D**). Estos resultados concuerdan con el hecho de que solamente en el sistema PRDX5-SOH se detecta un acercamiento  $C_p \dots C_R$  a distancias menores a 4 Å (y presente únicamente el 0.7% de la simulación), cercanía interatómica adecuada para que pueda formarse el enlace disulfuro.

Para entender mejor por qué únicamente la forma sulfénico de la cisteína y no la sulfenato es capaz de inducir el cambio conformacional FF→LU, logrando acercar ambas cisteínas se analizó la red de EdH que cada especie establece con el ambiente que las rodea (**Figura 4.5**).



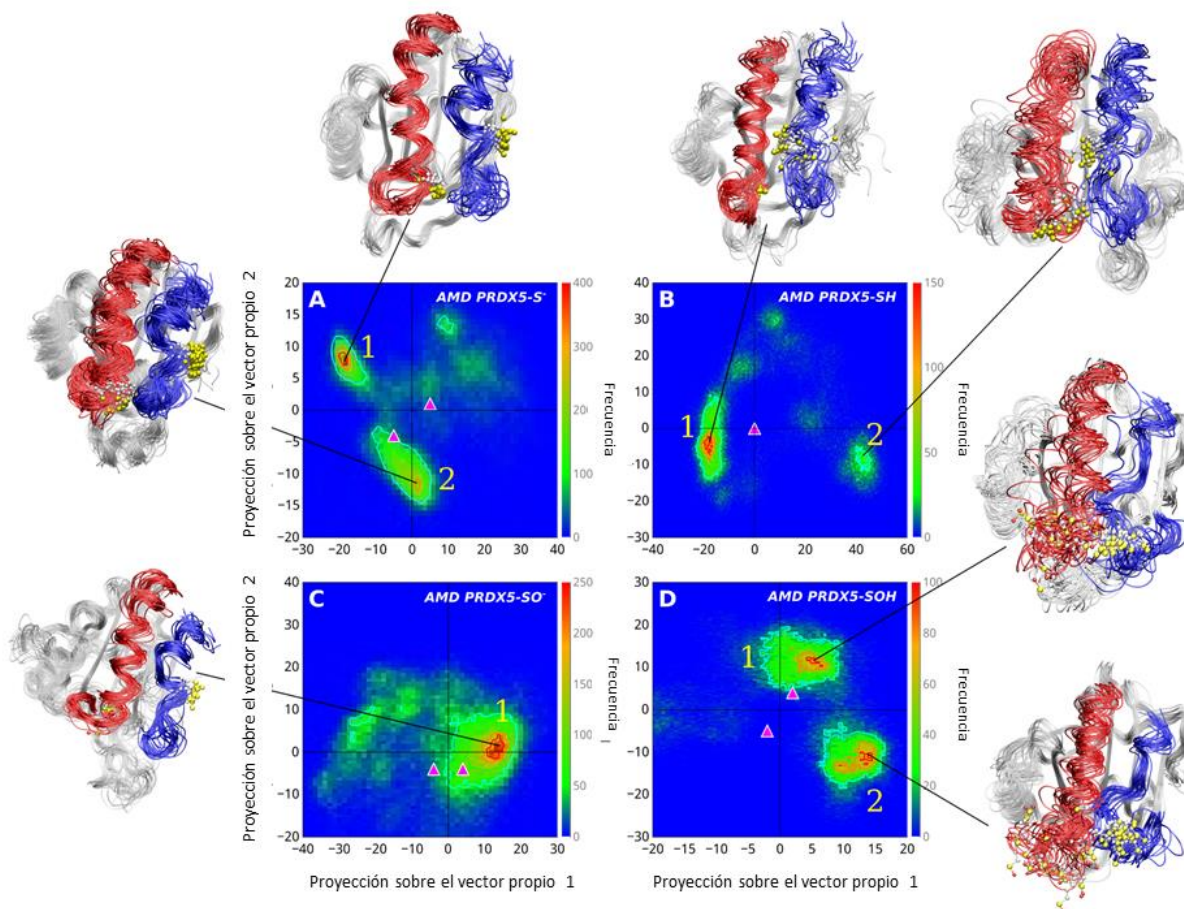
**Figura 4.5** Interacciones de EdH entre la cisteína oxidada a sulfenato (**A**) y a sulfénico (**B**) y su entorno local a lo largo de los 500 ns de dinámica molecular acelerada (aMD).

Como se observa, el sulfenato establece una red de EdH persistente en el sitio activo que incluye a la Thr44 y a la Arg127 conservadas, ambas acutando como ácidos de Brønsted, donantes de H al átomo de oxígeno incorporado a C<sub>p</sub>, por lo que es esperable que a tal cercanía, también se establezca un puente salino con este residuo con carga neta positiva. Dichas interacciones, que están ausentes en la forma sulfénico, irían en la dirección de ayudar a la estabilización de la conformación FF en la proteína oxidada, dificultando el desplegamiento del segmento N-terminal de la hélice- $\alpha$ 2.

### 4.3 Análisis de la transición FF-LU mediante mapas bidimensionales de componentes principales

El análisis de los componentes principales (PCA) permite agrupar las distintas conformaciones que forman parte de la trayectoria de una simulación de dinámica molecular y la identificación de residuos clave involucrados en aquellos movimientos de mayor amplitud. Se espera que el impulso dual (aplicado sobre la energía potencial total y de los diedros) sea capaz de “empujar” al sistema fuera del pozo de energía en donde está la estructura cristalográfica y así poder muestrear otros estados de baja energía.

En la **Figura 4.6** se muestra la representación de los mapas PCA (construidos como PC1 x PC2 y coloreados por frecuencia según se indica en el esquema al lado derecho de cada mapa) obtenidos para cada uno de los cuatro sistemas en estudio: PRDX5-SH, PRDX5-S<sup>-</sup>, PRDX5-SOH y PRDX5-SO<sup>-</sup>.



**Figura 4.6.** Análisis de componentes principales y clusters con estructuras 3D para las poblaciones representativas identificadas a partir del PCA. Gráficos de la proyección de los 500 ns aMD de cada sistema (**A**: PRDX5-S<sup>-</sup>; **B**: PRDX5-SH; **C**: PRDX5-SO<sup>-</sup>; **D**: PRDX5-SOH) sobre el primer y el segundo vector propio. Los triángulos representan la posición de las estructuras obtenidas de la cMD que presentaron mayor frecuencia. Para cada gráfico de PCA se representa una pseudo-trayectoria de los clusters de mayor frecuencia, donde  $C_p$  y  $C_R$  se representan en bolas y varillas.

En los mapas PCA de los cuatro sistemas se evidencia que las estructuras representativas de las simulaciones cMD se localizan en todos los casos cerca del origen en ambos ejes cartesianos (**Figura 4.6**, representados como triángulos). Esto apoya la noción de que en las simulaciones con dinámica molecular convencional el sistema queda “atrapado” en estados cercanos al correspondiente a la estructura cristalográfica de partida. Las simulaciones aMD exhiben mapas con cierto grado de dispersión sobre al menos uno de los ejes, señal de una población más dinámica con mayores variaciones estructurales. Del sistema que contiene a  $C_p-S^-$  surgen dos clusters con alta similitud

estructural (ver los valores del área superficial accesible al solvente, SASA, de  $C_p$  y  $C_R$  en la **Tabla 4.2**), siendo el cluster 2 más flexible en el entorno del *loop* C-terminal (ver la superposición de las estructuras del cluster en la **Figura 4.6 A**). El sistema PRDX5-SH, presenta un comportamiento opuesto en términos de flexibilidad y exposición de la  $C_p$  al solvente. En el cluster 1, la  $C_p$  se encuentra completamente oculta, con un valor de SASA de  $1.7 \text{ \AA}^2$ , mientras que en el cluster 2 el valor de SASA aumenta a  $80 \text{ \AA}^2$ , que representa el 60 % del SASA máximo, usando como referencia el SASA de una Cys en un tripéptido Gly-Cys-Gly<sup>293</sup>, **Tabla 4.2**. El cluster 2 logra capturar conformaciones en donde  $C_p$  y  $C_R$  se encuentran a menos de  $4 \text{ \AA}$  (**Figura 4.4**), pero éste presenta baja frecuencia comparado con el cluster 1 (**Figura 4.5 B**). Con respecto a PRDX5 oxidada, se observa que en el sistema con  $C_p\text{-SO}^-$ , todas las estructuras se agrupan en un único cluster caracterizado por tener una  $C_p$  poco expuesta al solvente (**Tabla 4.2**). Para el sistema con  $C_p\text{-SOH}$ , se observa un escenario más interesante, con dos clusters igualmente poblados en el mapa de PCA (**Figura 4.5, D**). Ambos clusters se caracterizan por tener una  $C_p$  con alta exposición al solvente (68 y 43 % del SASA máximo usando como referencia el tripéptido Gly-CysOH-Gly, **Tabla 4.2**), pero sólo uno de ellos contiene conformaciones en donde  $C_p$  y  $C_R$  se encuentran a una distancia suficiente para que ocurra la reacción de formación del enlace disulfuro.

**Tabla 4.2** Caracterización conformacional por análisis de clusters a partir de las trayectorias de las dinámicas aMD de los cuatro sistemas estudiados.

Sistema	Cluster	SASA ( $\text{\AA}^2$ )	
		$C_p$	$C_R$
PRDX5-S <sup>-</sup>	1	$19.1 \pm 16.6$	$50.9 \pm 8.9$
	2	$22.1 \pm 18.4$	$51.5 \pm 9.9$
PRDX5-SH	1	$1.7 \pm 2.2$	$57.7 \pm 39.4$
	2	$81.7 \pm 29.9$	$15.4 \pm 18.3$
PRDX5-SO <sup>-</sup>	1	$2.5 \pm 5.7$	$59.5 \pm 8.9$
PRDX5-SOH	1	$67.9 \pm 43.7$	$86.2 \pm 33.4$
	2	$108.6 \pm 40.2$	$97.6 \pm 14.1$
Gly-Cys-Gly		$132^a$	
Gly-CysSOH-Gly		$158^b$	

<sup>a</sup>Tomado de la referencia <sup>293</sup> <sup>b</sup>Calculado con cpptraj



La formación de un enlace disulfuro en proteínas no solo implica un acercamiento entre los dos residuos de Cys involucrados, sino una combinación específica de ángulos y diedros<sup>294</sup>. Los resultados obtenidos a partir de los 200 ns de cMD de la PRDX5 en conformación LU y oxidada a disulfuro muestran valores para el diedro  $C_{CP}^{\beta}-S_{CP}^{\gamma}-S_{CR}^{\gamma}-C_{CR}^{\beta}$  de  $-86.1 \pm 9.8^{\circ}$  y para los ángulos  $C_{CP}^{\alpha}-C_{CP}^{\beta}-S_{CP}^{\gamma}$  y  $S_{CR}^{\gamma}-C_{CR}^{\beta}-C_{CR}^{\alpha}$  de  $114.5 \pm 3.5^{\circ}$  y  $115.6 \pm 3.6^{\circ}$ , respectivamente, lo cual concuerda con lo reportado por Petersen *et al*<sup>294</sup>. El análisis de los ángulos involucrados permite determinar qué conformaciones muestreadas en la dinámica molecular acelerada de PRDX5-SOH tienen las características geométricas necesarias para la formación del enlace disulfuro entre  $C_P$  y  $C_R$ . Los ángulos promedio de  $C_{CP}^{\alpha}-C_{CP}^{\beta}-S_{CP}^{\gamma}$  y  $S_{CR}^{\gamma}-C_{CR}^{\beta}-C_{CR}^{\alpha}$  en el cluster 1 son  $115.5 \pm 4.0^{\circ}$  y  $110.8 \pm 3.9^{\circ}$ , respectivamente y para aquellas conformaciones que presentan una distancia  $C_P \dots C_R$  menor a 4 Å, el ángulo diedro  $C_{CP}^{\beta}-S_{CP}^{\gamma}-S_{CR}^{\gamma}-C_{CR}^{\beta}$  se encuentra entre  $-70$  y  $-117^{\circ}$ , el cual es compatible con la formación del enlace disulfuro.

## Discusión

En este capítulo se presentaron los resultados del estudio del efecto que tiene el estado de oxidación y de ionización de la C<sub>p</sub> sobre la conformación FF de PRDX5, estudiado a través de simulaciones de dinámica molecular convencional y acelerada. Los datos obtenidos permitieron determinar los factores que gobiernan la transición FF→LU.

Esta transición es más favorable cuando la C<sub>p</sub> está oxidada, ya que la movilidad de la región N-terminal de la hélice-α2 aumenta significativamente con respecto a la especie reducida, generando una pérdida en el contenido de estructura secundaria que es acompañada por un acercamiento entre C<sub>p</sub> y C<sub>R</sub>, hecho necesario para que ocurra la reacción de resolución. El evento de desplegamiento sólo se observó para la estructura con C<sub>p</sub> oxidada a sulfénico (PRDX5-SOH) y se atribuye a que esta especie no establece ni EdH ni otro tipo de interacciones electrostáticas con los residuos vecinos. De esta manera la conformación FF se desestabiliza, favoreciendo la transición hacia la conformación LU. En el caso en que C<sub>p</sub> se encuentra oxidada, pero presente en forma sulfenato (PRDX5-SO<sup>-</sup>), éste establece un fuerte EdH con la Thr44 y un fuerte puente salino con la Arg127, estabilizando la conformación FF y desfavoreciendo la transición FF→LU.

El hecho que el sulfenato sea incapaz de provocar el desplegamiento de la hélice-α2 es un hallazgo muy interesante y concuerda con los resultados presentados en el Capítulo 3. La reacción de peroxidación da como producto al ácido sulfénico en lugar de un sulfenato, a diferencia de lo observado en la AhpE, una Prx de 1-Cys que no presenta este cambio conformacional en el ciclo catalítico<sup>112</sup>. Los resultados también concuerdan con las estructuras cristalográficas reportadas de PRDX4 en forma reducida y oxidada a sulfénico y a disulfuro, que muestran al equilibrio FF-LU desplazado hacia la forma LU una vez que la C<sub>p</sub> se oxida a ácido sulfénico<sup>84</sup>. No obstante, la conformación LU se observó en la AhpC en estado reducido<sup>162</sup>, pero la reducción de la enzima se realizó en los cristales y con el reductor no específico DTT. Es posible que en el estado sólido la flexibilidad de la enzima se vea afectada y no logre recuperar la conformación FF luego de la reducción, debido a fuerzas de empaquetamiento en el cristal o a que el reductor natural es la AhpF<sup>171</sup>, que podría tener la función de asistir a la Prx en la transición hacia la conformación FF además de catalizar la reducción del enlace disulfuro. Resultados recientes de Perkins *et al.* postulan que la oxidación a sulfenato de la C<sub>p</sub> de PrxQ de *Xanthomonas campestris* sería capaz de promover la transición hacia la conformación LU<sup>279</sup>, sin embargo, los cristales se obtuvieron a pH = 4.5, siendo el pK<sub>a</sub> de sulfénico ~

6<sup>105,295</sup> es esperable que la especie presente en esos cristales sea el C<sub>p</sub>-SOH y no su contraparte ionizada C<sub>p</sub>-SO<sup>-</sup>.

Como se mencionó previamente, el evento de desplegado sólo fue observado en la estructura con C<sub>p</sub> oxidada a ácido sulfénico, y la distancia apropiada para formar el enlace disulfuro se encontró únicamente en el 0.7 % de las estructuras muestreadas en la simulación aMD. Esto indica que la transición tendrá una baja probabilidad de ocurrencia, al parecer la proteína tendría la función de dificultar el paso de resolución. En el Capítulo 5 se mostrarán los resultados de la determinación de pK<sub>a</sub> de las formas C<sub>p</sub>-SOH y la C<sub>R</sub>-SH de PRDX5 que muestran qué a pH mitocondrial (~7.9), las especies más probables van a ser el tiol en C<sub>R</sub> y el sulfenato en C<sub>p</sub>. Si se tiene en cuenta que las especies más favorables para que ocurra la reacción de resolución son el tiolato en C<sub>R</sub> y el sulfénico en C<sub>p</sub> (mejor nucleófilo y mejor electrófilo respecto a la primera posibilidad), se concluye que la proteína introduce un “freno” en el ciclo catalítico a través del enlentecimiento del paso resolutivo. Resta preguntarse, ¿es el enlentecimiento de la reacción de resolución una ventaja evolutiva o se trata de un efecto secundario? Copley *et al.* propusieron un modelo evolutivo en donde establecen que las Prx emergieron de un ancestro tipo Trx, teniendo como eslabón a la proteína de la maduración del citocromo (CMP)<sup>81</sup>. Trx y CMP catalizan reacciones de oxidorreducción de enlaces disulfuros y comparten el motivo conservado CXXC involucrado en la catálisis y una *cis*-Pro necesaria para la unión de sustratos polipeptídicos. Durante la evolución de las Prx, el residuo de *cis*-Pro se sustituyó por una Arg y la Cys N-terminal del motivo CXXC por una Thr. Esto llevó a que en las Prx la Cys C-terminal se convirtiera en la que realiza el ataque nucleofílico sobre el sustrato y a la inserción de la C<sub>R</sub> en la porción C-terminal de la proteína. De esta manera, un sitio activo que estaba especializado en catalizar la reducción de enlaces disulfuro se transformó en otro que reduce peróxidos, acarreado como consecuencia la disminución en la eficiencia de la reacción de resolución.

Por otro lado, debido a que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede actuar como segundo mensajero, es posible que este enlentecimiento sea una ventaja evolutiva. Si se frena la transición hacia la conformación LU, la enzima se va a encontrar más tiempo en estado oxidado a sulfénico, lo que puede tener como consecuencia que la proteína sea más susceptible a la sobreoxidación<sup>296</sup>, lo cual conduciría a la acumulación local de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que se formen disulfuros mixtos entre la Prx y proteínas blanco<sup>176</sup>. Estos efectos podrían estar implicados en la regulación de vías de señalización dependientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>25</sup>.

# **Capítulo 5: Resolución vs. oxidación en PRDX5. Cinética de la formación del enlace disulfuro y sobreoxidación.**

## Resumen del capítulo

En las Prx 2-Cys, el segundo paso del ciclo catalítico involucra la formación de un enlace disulfuro entre el C<sub>p</sub>-SOH, producto del primer paso del ciclo catalítico y la C<sub>R</sub>-SH. Dicha reacción requiere la transición previa de la enzima hacia la conformación LU que acerca a ambas cisteínas. Por otro lado, si previo a la transición a la conformación LU el sulfénico en C<sub>p</sub> reacciona con una segunda molécula de peróxido, la enzima se sobreoxida, inactivándose. Por lo tanto, las reacciones de resolución y sobreoxidación se encuentran en competencia y cuál de ellas será favorecida dependerá de la velocidad de cada una de las reacciones y del equilibrio entre las conformaciones FF y LU.

En este capítulo se presenta el estudio de la reacción de resolución y sobreoxidación en PRDX5 WT. Para abordar la resolución, se determinó su constante de velocidad ( $k_{res}$ ) a diferentes valores de pH y los pK<sub>a</sub>s de las dos cisteínas involucradas, en las formas C<sub>p</sub>-SO(H) y C<sub>R</sub>-S(H). También se determinó el pK<sub>a</sub> de C<sub>R</sub> en la enzima en conformación FF y LU a través de simulaciones de dinámica molecular a pH constante. Con respecto a la reacción de sobreoxidación, la misma se siguió a través del corrimiento ácido en un isoelectroenfoco (IEF), generado por la formación de sulfínico o sulfónico (SO<sub>2</sub><sup>-</sup> y SO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Se recurrió a un ciclo catalítico artificial utilizando al DTT como reductor y mediante la simulación en Gepasí<sup>297</sup> se estimó la constante de velocidad de la reacción de sobreoxidación.

Los resultados muestran que la reacción de resolución presenta una  $k_{res}$  de 18.7 s<sup>-1</sup> a pH 7.4 y el valor de pK<sub>a</sub> del C<sub>p</sub>-SOH es 6.8, mientras que el del C<sub>R</sub>-SH es de 7.4. Las simulaciones de dinámica molecular a pH constante indicaron que la diferencia observada en el pK<sub>a</sub> de C<sub>R</sub> determinado en este experimento y el previamente publicado puede deberse al diferente microambiente en el que se encuentra la Cys. Para el proceso de sobreoxidación se determinó una constante  $k_{SOX}$  de ~170 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>.

La comparación de  $k_{res}$  y  $k_{SOX}$  de PRDX5 con los datos reportados para otras peroxirredoxinas tales como PRDX1, PRDX2, PRDX3 y AhpC, indica que la sensibilidad a la sobreoxidación de cada una de ellas va a depender de la velocidad de formación del enlace disulfuro y de la velocidad de sobreoxidación. Además, debido a que el cambio conformacional FF-LU influye sobre ambas reacciones, éste también va a ser parte de los factores que determinan cuál de los dos caminos va a seguir el C<sub>p</sub>-SOH una vez que se forme. La cinética de la reacción de resolución es diferente entre diversas Prx de 2-Cys y esta característica puede relacionarse con la transducción de señales redox mediadas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

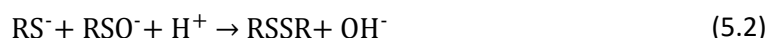
## Metodología

### 5.1 Determinación de la constante de velocidad de la formación del enlace disulfuro entre $C_P$ -SOH y $C_R$ -SH en PRDX5<sup>WT</sup>.

El gen de PRDX5 sin la secuencia mitocondrial se clonó en un vector pQE30 con resistencia a ampicilina y con tag de 6 histidinas. Se transformaron bacterias *E. coli* DE3 y para expresar la proteína se partió de un cultivo O.N. realizando un cambio de escala 1/100 y permitiendo el crecimiento bacteriano hasta una densidad óptica a 600 nm de 0.6. Posteriormente se realizó la inducción de la expresión proteica con 1 mM de Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) por 4 h a 37 °C. El *pellet* bacteriano fue lisado a través de un proceso de sonicación en presencia de 1 mM del inhibidor de proteasas de serina fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), posteriormente se procedió a centrifugar por dos horas a 10000 g para separar la fracción soluble de la insoluble. La fracción soluble fue cargada en una columna de afinidad de  $Ni^{2+}$  en presencia de buffer 20 mM fosfato de sodio, 0.5 M NaCl y 20 mM imidazol, pH 7.4. La cromatografía se realizó en un equipo AKTA Prime, realizando la elución en el mismo buffer pero con un gradiente de 20 a 500 mM de imidazol, las fracciones que contienen la proteína son dializadas O.N. contra un buffer 20 mM fosfato de sodio, 0.5 M NaCl, pH 7.4. La pureza de las distintas fracciones es analizada por electroforesis en gel desnaturizante con SDS.

Para determinar las constantes de velocidad de formación del enlace disulfuro se trabajó en un equipo de flujo detenido asociado a un espectrofluorímetro, siguiendo el aumento en la fluorescencia de PRDX5 al oxidarse, tal como ha sido reportado previamente<sup>168</sup>. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 280 nm y para detectar la fluorescencia un filtro de 320 nm. Cuando se trabaja en condiciones de pseudo-primer orden con exceso de  $H_2O_2$  la reacción de oxidación de la cisteína peroxidática es la limitante, por lo tanto al realizar el gráfico de  $k_{obs}$  vs.  $[H_2O_2]$  se obtiene una tendencia lineal creciente. Sin embargo cuando la concentración de  $H_2O_2$  se incrementa aún más, la reacción limitante pasa a ser la formación del enlace disulfuro, por lo tanto, la  $k_{obs}$  determinada en esas condiciones corresponde a la constante de velocidad de ese proceso y no a la de la oxidación de  $C_P$ , esto ya fue reportado para PRDX5<sup>168</sup>. Por lo tanto, para medir las constantes de velocidad de la resolución se determinó primero a qué concentración de  $H_2O_2$  pasaba a ser limitante la reacción de formación de disulfuro y luego utilizando esa concentración se determinaron las  $k_{obs}$  a diferentes pHs, ya que esta es una reacción que depende de dos especies ionizables: el ácido sulfénico en  $C_P$  y el tiol en  $C_R$  se esperaba obtener una curva con forma de campana, típica para este tipo de reacciones.

Teniendo en cuenta el estado de protonación de las dos especies que intervienen en la reacción de resolución: C<sub>P</sub>-SOH y C<sub>R</sub>-SH, hay cuatro posibles combinaciones. Si consideramos que el tiolato es el mejor nucleófilo y el ácido sulfénico el mejor electrófilo, y que la nucleofilia del tiolato es más importante que la electrofilia del ácido sulfénico en la determinación de la constante de velocidad, las cuatro posibilidades pueden ordenarse desde la más rápida a la más lenta de la siguiente forma:



De esta forma, la ley de velocidad de la reacción de resolución queda determinada como:

$$v = k_{res}[RSH]_t[RSOH]_t \quad (5.5)$$

donde  $[RSH]_t$  y  $[RSOH]_t$  son las concentraciones totales de tiol y ácido sulfénico, respectivamente. La velocidad de la reacción ( $v$ ) es la suma de las velocidades de las cuatro posibles combinaciones y son dependientes del pH según la distribución de las especies involucradas. Por ejemplo, la ley de velocidad de la reacción 1 será:

$$v = k_1 [RS^-][RSOH] \quad (5.6)$$

o lo que es lo mismo,

$$v = k_1 [RSH]_T \left( \frac{K_a^{SH}}{[H^+] + K_a^{SH}} \right) [RSOH]_T \left( \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a^{SOH}} \right) \quad (5.7)$$

Donde  $K_a^{SH}$  and  $K_a^{SOH}$  son las constantes de ionización de C<sub>R</sub>-SH y C<sub>P</sub>-SOH, respectivamente. Por lo tanto, la constante de velocidad aparente a un determinado pH será:

$$k_1^{ap} = k_1 \left( \frac{K_a^{SH}}{[H^+] + K_a^{SH}} \right) \left( \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a^{SOH}} \right) = k_1 \left( \frac{[H^+] K_a^{SH}}{[H^+]^2 + [H^+](K_a^{SH} + K_a^{SOH}) + K_a^{SH} K_a^{SOH}} \right) \quad (5.8)$$

Las constantes de velocidad aparente para las otras tres combinaciones pueden ser derivadas de la misma manera. Debido a que las cuatro combinaciones ocurren en simultáneo, la constante de velocidad total de la resolución será la suma de las constantes de velocidad aparentes:

$$k_{\text{res}}^{\text{ap}} = k_1^{\text{ap}} + k_2^{\text{ap}} + k_3^{\text{ap}} + k_4^{\text{ap}} \quad (5.9)$$

o,

$$k_{\text{res}}^{\text{ap}} = \left( \frac{k_1 [\text{H}^+] K_a^{\text{SH}} + k_2 K_a^{\text{SH}} K_a^{\text{SOH}} + k_3 [\text{H}^+]^2 + k_4 [\text{H}^+] K_a^{\text{SOH}}}{[\text{H}^+]^2 + [\text{H}^+] (K_a^{\text{SH}} + K_a^{\text{SOH}}) + K_a^{\text{SH}} K_a^{\text{SOH}}} \right) \quad (5.10)$$

Esta ecuación permite ajustar el gráfico de  $k_{\text{res}}^{\text{ap}}$  vs. pH y obtener el valor del  $pK_a$  de  $C_p$  y  $C_R$  y las constantes de velocidad independiente del pH para cada escenario.

Para la determinación de las constantes de velocidad se utilizó un sistema de buffer que contiene 30 mM Tris, 15 mM acético y 15 mM MES, además se agregó 120 mM NaCl y 100  $\mu\text{M}$  de ácido pentético (DTPA). La concentración proteica utilizada fue de 1  $\mu\text{M}$ , la cual se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm y utilizando un  $\epsilon = 5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , por otro lado se utilizó  $\text{H}_2\text{O}_2$  200  $\mu\text{M}$ , determinando su concentración mediante la absorbancia a 240 nm y utilizando un  $\epsilon = 39.4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  <sup>298</sup>.

## 5.2 Dinámica molecular a pH constante para determinar el $pK_a$ de $C_R$ en PRDX5<sup>WT</sup> FF y LU

Se realizaron simulaciones a pH constante en solvente explícito utilizando AMBER 16<sup>271</sup>. En la **Figura 5.1** se muestra el diagrama de la implementación de este tipo de procedimiento con el modelo de protonación discreta en AMBER<sup>299</sup>. Tal como está implementado, el muestreo conformacional es realizado con una simulación de dinámica molecular clásica en solvente explícito, mientras que el muestreo del estado de protonación se realiza con el método Monte Carlo<sup>286</sup> en solvente implícito utilizando el modelo de Born generalizado<sup>300</sup>.

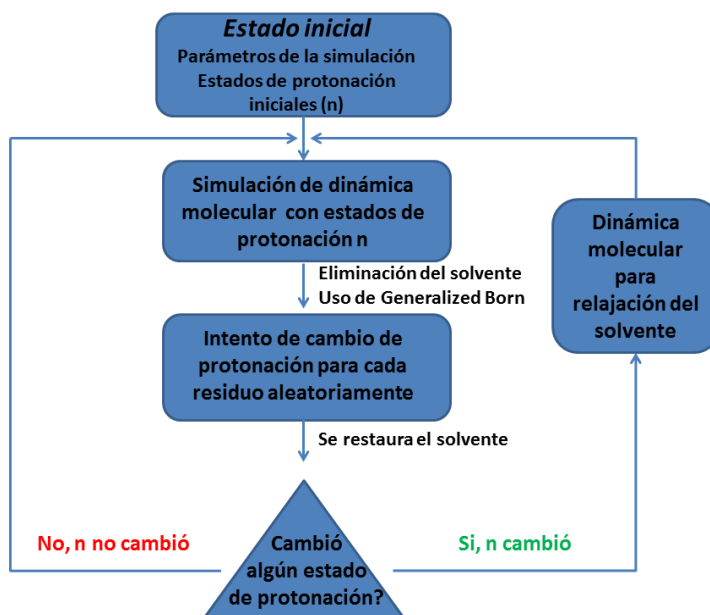
Los cambios en los estados de protonación son aceptados o rechazados después de evaluar su costo energético, en base a la identidad del residuo, ambiente y pH del solvente:

$$\Delta G = k_B T \ln 10 (\text{pH} - \text{p}K_{a,\text{ref}}) + \Delta G_{\text{MM}} - \Delta G_{\text{ref,MM}} \quad (5.11)$$

donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura absoluta, pH el correspondiente a la simulación,  $\text{p}K_{a,\text{ref}}$  es el  $\text{p}K_a$  del compuesto de referencia (en este caso la cisteína rematada con un grupo acetilo en el extremo N-terminal y metilamida en el extremo C-terminal),  $\Delta G_{\text{MM}}$  la contribución de mecánica molecular (interacciones electrostáticas) y  $\Delta G_{\text{ref,MM}}$  la contribución de mecánica molecular a la energía libre de la reacción de protonación para el compuesto de referencia.

El uso de un compuesto de referencia permite la cancelación de los términos de energía de solvatación del protón y la contribución cuántica de la ruptura/formación de enlace.





**Figura 5.1** Diagrama de implementación de la dinámica molecular a pH constante en solvente explícito en el programa AMBER<sup>299</sup>.

Para mejorar el muestreo conformacional, a la simulación dinámica molecular a pH constante se le acopló un muestreo por *Replica Exchange* en la dimensión pH (pH-REMD)<sup>301</sup>.

Se simularon cuatro escenarios distintos:

- i) PRDX5 con  $C_p$  reducida y en conformación FF donde solo se permitió el cambio en el estado de protonación de  $C_R$  (PRDX5<sup>red</sup>- $C_R$ -FF).
- ii) PRDX5 con  $C_p$  reducida y en conformación FF permitiendo el cambio en el estado de protonación de la  $C_R$  y el Glu143 (PRDX5<sup>red</sup>- $C_R$ -Glu143-FF). Glu143 debido a su cercanía a  $C_R$  en la conformación FF.
- iii) PRDX5 con  $C_p$  oxidada a ácido sulfénico y en conformación LU permitiendo la desprotonación de  $C_R$  (PRDX5<sup>oxd</sup>- $C_R$ -LU).
- iv) PRDX5 con  $C_p$  oxidada y en conformación LU permitiendo la desprotonación de  $C_p$  y  $C_R$  (PRDX5<sup>oxd</sup>- $C_p$ - $C_R$ -LU).

De esta manera se determinó el efecto de cambios en la conformación (FF y LU), el estado de oxidación de la  $C_p$  y el estado de protonación del Glu143 sobre el  $pK_a$  de  $C_R$ . El Glu143 se encuentra muy cercano a  $C_R$  en la conformación FF y podría actuar como lanzadera de protones entre la Arg127 y la  $C_R$ , desprotonando a  $C_R$  y protonando a la Arg127 que culminó neutra en la reacción de peroxidación. Por otra parte, el  $C_p$ -SOH se encuentra cercano a  $C_R$  en la conformación LU, previo a la reacción de resolución.

La estructura de PRDX5 reducida en conformación FF fue obtenida del *Protein Data Bank* (PRBID: 1HD2)<sup>78</sup> y la de PRDX5 con C<sub>p</sub> oxidada a sulfénico y en conformación LU de la simulación de dinámica molecular acelerada (descrito en el Capítulo 4, sección 4.2), se seleccionó una estructura en donde los átomos de azufre de C<sub>p</sub> y C<sub>R</sub> se encontraran a una distancia de 4 Å. Se utilizó el campo de fuerza de AMBER *ff10*<sup>247,302</sup> ya que es el compatible para simulaciones a pH constante en AMBER, se obtuvieron parámetros de la literatura para describir el ácido cisteinsulfénico<sup>282</sup> y se utilizó el campo de fuerza TIP3P<sup>140</sup> para describir las moléculas de agua.

Cada estructura fue sometida al siguiente procedimiento:

- i) Minimización de las moléculas de agua y contraiones (500 pasos SD<sup>258</sup> y 2000 CG<sup>249</sup>) con una restricción de 10 kcal mol<sup>-1</sup> sobre la proteína.
- ii) Minimización del sistema completo (5000 pasos SD<sup>258</sup> y 15000 pasos CG<sup>249</sup>) con una restricción de 10 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup> sobre el esqueleto peptídico.
- iii) Calentamiento del sistema a 0 a 300 K con una simulación de 6 ns en ensemble NVT utilizando el termostato de Langevin<sup>267</sup> y una restricción de 1 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup> sobre el esqueleto peptídico.
- iv) Equilibración de la densidad a 1 g cm<sup>-3</sup> a través de dos dinámicas moleculares en ensemble NPT, primero se corrieron 6 ns con una restricción de 0.1 kcal mol<sup>-1</sup> sobre el esqueleto peptídico y luego otros 6 ns pero sin restricciones.
- v) Equilibración en ensemble NVT de 5 ns a cada pH (3 a 12 con un espaciado de una unidad de pH, 10 réplicas en total).
- vi) Simulación de 50 ns a cada pH, realizando intentos de intercambio entre distintas replicas e intentos de cambio en el estado de protonación cada 200 fs y utilizando un tiempo de relajación del solvente de 200 fs.

Para incluir al ácido cisteinsulfénico como residuo titulable, se modificó el archivo *titratable\_residues.py* del módulo *Antechamber* de AmberTools<sup>271</sup>. En él se incluyeron las cargas RESP del ácido cisteinsulfénico en forma neutra y desprotonada (**Tabla 5.1**), su pK<sub>a</sub> obtenido de datos experimentales (7.6)<sup>303</sup> y el ΔG de desprotonación = 83.3 kcal mol<sup>-1</sup>. Este valor fue obtenido a partir de la simulación a pH constante del ácido cisteinsulfénico completado con un grupo acetilo en el extremo N-terminal y un grupo metilamida en el C-terminal (ACE-CSO-NME). La simulación se realizó a pH = pK<sub>a</sub>, con un *initial guess* para el ΔG igual al de la cisteína, el ΔG se fue ajustando hasta que la fracción neutro/desprotonado fue igual a 1.

Los detalles metodológicos de la dinámica molecular a pH constante del compuesto modelo ACE-CSO-NME son los siguientes: i) solvente explícito TIP3P; ii) minimización y calentamiento a 300 K con termostato de Langevin<sup>267</sup>; iii) 2 ns de equilibración de la densidad en ensemble NPT; iv) 2 ns de dinámica molecular en ensemble NVT a pH = 7.6.

**Tabla 5.1** Cargas atómicas RESP (u.a.) calculadas para el ácido cisteinsulfénico en su forma neutra y desprotonada

Tipo de átomo	Cys-SOH	Cys-SO <sup>-</sup>
N	-0.4157	-0.4157
H	0.2719	0.2719
CA	0.0213	-0.0989
HA	0.1124	0.0866
CB	-0.1231	-0.3106
HB2	0.1112	0.1523
HB3	0.1112	0.1523
SG	-0.1086	-0.1923
OD	-0.45	-0.6749
HG	0.44	0
C	0.5973	0.5973
O	-0.5679	-0.5679

Las fracciones de tiol o sulfénico desprotonado ( $f_d$ ) se calcularon con el programa *cphstats* incluido en AmberTools<sup>271</sup>, dichas fracciones se graficaron en función del pH para obtener las curvas de titulación y los  $pK_a$  a través del ajuste a la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$f_d = \frac{1}{1 + 10^{(pK_a - pH)}} \quad (5.12)$$

### 5.3 Estimación de la constante de velocidad de sobreoxidación mediante medida a tiempo final con isoelectroenfoque

Los productos de sobreoxidación de la cisteína Cys-SO<sub>2</sub>(H) y Cys-SO<sub>3</sub>(H) presentan  $pK_a$ s extremadamente ácidos,  $\sim 2^{304}$  y  $\sim 3^{305}$ , respectivamente. Por lo tanto generan un corrimiento ácido en un isoelectroenfoque (IEF), lo cual permite seguir su formación mediante esta técnica. Para estudiar la constante de velocidad de sobreoxidación de  $C_p$  en PRDX5 WT se utilizó un sistema de ciclo catalítico artificial en donde se mezcló PRDX5 68.5  $\mu$ M (concentración necesaria para los geles de IEF) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en concentraciones crecientes (0 - 9.5 mM) y el reductor DTT en exceso (9.6 mM) durante 2 horas a temperatura ambiente a pH 7 en un buffer 30 mM Tris, 15 mM Acético, 15 mM MES con 120 mM NaCl

y 100  $\mu\text{M}$  DTPA. Luego la reacción se detuvo con el alquilante de tioles yodoacetamida 0.5 M y la mezcla de reacción se corrió en un IEF de pH 3 - 10. Por densitometría, utilizando el programa *ImageJ*<sup>306</sup>, se calculó la fracción de PRDX5 sobreoxidada y PRDX5 reducida. Como se conocen todas las constantes de velocidad de las reacciones del ciclo, excepto la de sobreoxidación (**Tabla 5.2**), es posible simular el sistema en Gepasi 3.3<sup>297</sup> y obtener un valor aproximado para la constante de velocidad de sobreoxidación.

**Tabla 5.2** Constantes de velocidad a 25 °C y pH 7.2 para cada una de las reacciones involucradas en el ciclo catalítico artificial de la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por PRDX5, utilizando DTT como agente reductor.

Reacción	$k_{\text{app}}$
$\text{PRDXS}^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{PRDXSOH}$	$4.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1 \text{ a}}$
$\text{PRDXSOH} \rightarrow \text{PRDXSS}$	$22.1 \text{ s}^{-1 \text{ b}}$
$\text{PRDXSS} + \text{DTT} \rightarrow \text{PRDXS}^-$	$4.1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1 \text{ c}}$
$\text{PRDXSO(H)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{PRDXSOx}^-$	$k_{\text{SOX}}$
$\text{DTT}_{\text{red}} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{DTT}_{\text{oxd}} + \text{H}_2\text{O}$	$0.15 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1 \text{ d}}$

<sup>a</sup> Obtenido de la ref <sup>107</sup>

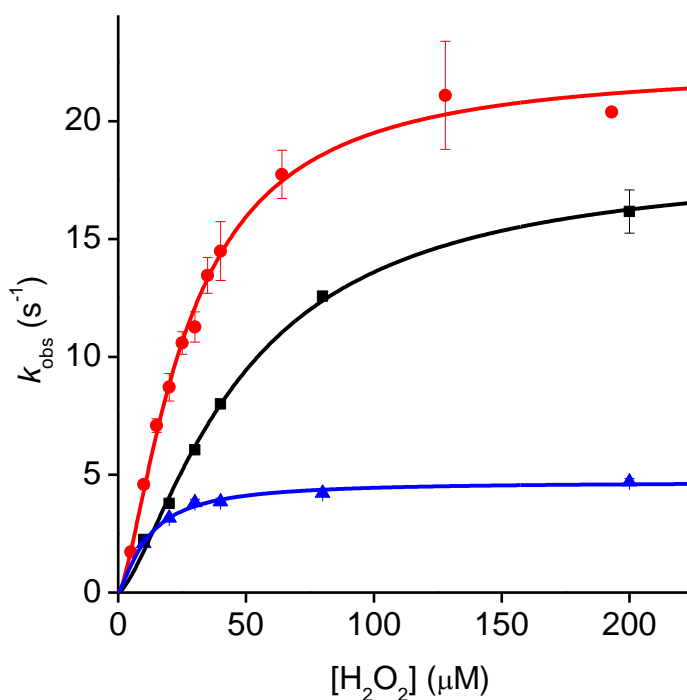
<sup>b</sup> Extrapolada del gráfico 5.3

<sup>c y d</sup> Determinadas por Gerardo Ferrer

## Resultados

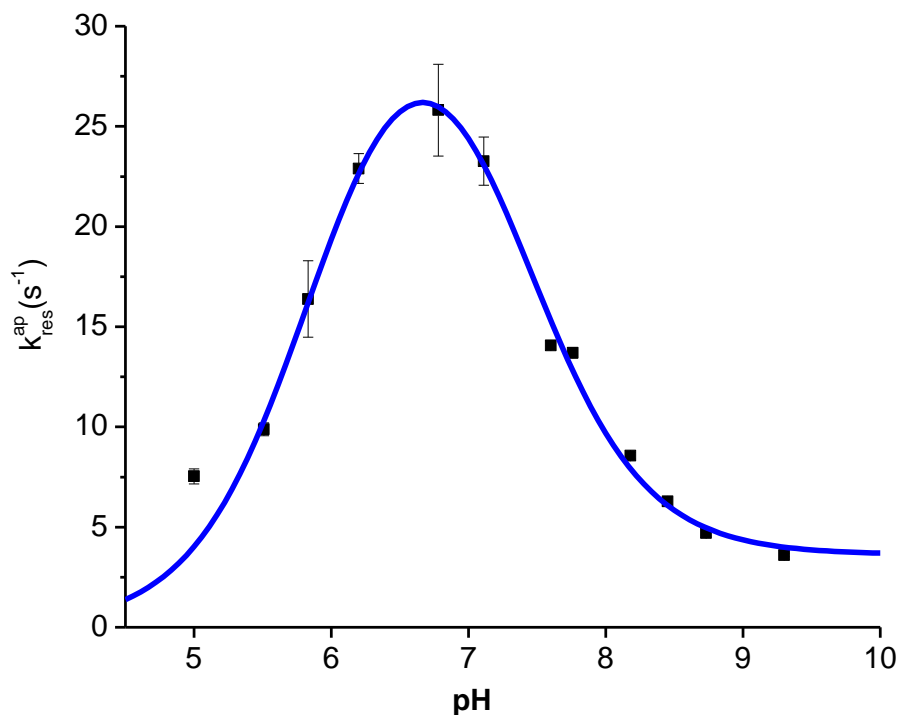
### 5.1 Reacción de resolución, $pK_a$ s de $C_P$ -SOH y $C_R$ -SH y constante de velocidad

La reacción de formación del enlace disulfuro entre el ácido sulfénico de  $C_P$  y el tiol de  $C_R$  se estudió a distintos pH, obteniéndose una curva con forma de campana, típica para las reacciones entre dos especies con propiedades ácido base. Su ajuste a la ec. 5.10 permitió determinar el  $pK_a$  de ambas especies y las constantes de velocidad de la reacción independiente del pH, considerando los diferentes estados de protonación del SOH y SH (ec. 5.1 a 5.3). En la siguiente figura se muestra el gráfico de  $k_{obs}$  vs.  $[H_2O_2]$ , estudiada a tres pHs. Se evidencia que para cada pH hay una porción que presenta dependencia lineal con la concentración de  $H_2O_2$ , lo cual indica que el paso limitante de la reacción es la oxidación de  $C_P$  a ácido sulfénico. Una vez que se incrementa aun más la concentración de  $H_2O_2$ , la  $k_{obs}$  deja de aumentar, esto es atribuido a que el paso limitante de la reacción ya no es la oxidación, sino la formación del enlace disulfuro  $C_P$ -S-S- $C_R$ , fenómeno que se había observado previamente en PRDX5<sup>168</sup>.



**Figura 5.2** Cinética de oxidación de PRDX5 por  $H_2O_2$ . Constantes de velocidad determinadas a 25 °C y a pH 5.84 (■); 7.08 (●) y 8.94 (▲).

A los tres pHs estudiados, a una concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de  $200 \mu\text{M}$ , la  $k_{\text{res}}^{\text{ap}}$  se acerca al límite asintótico. Por esto se seleccionó esta concentración para determinar el resto de las  $k_{\text{res}}^{\text{ap}}$  a los diferentes pHs, obteniéndose el siguiente gráfico.



**Figura 5.3** Perfil de pH de la constante de velocidad de resolución de PRDX5.

El ajuste del gráfico de  $k_{\text{res}}^{\text{ap}}$  vs. pH a la ec. 5.10 se realizó fijando el valor de  $k_4$  en 0 para simplificar el ajuste. Se obtuvieron los valores de  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  y los  $\text{p}K_a$  del grupo tiol de la  $\text{C}_R$  y del grupo sulfénico de la  $\text{C}_p$ , **Tabla 5.3**.

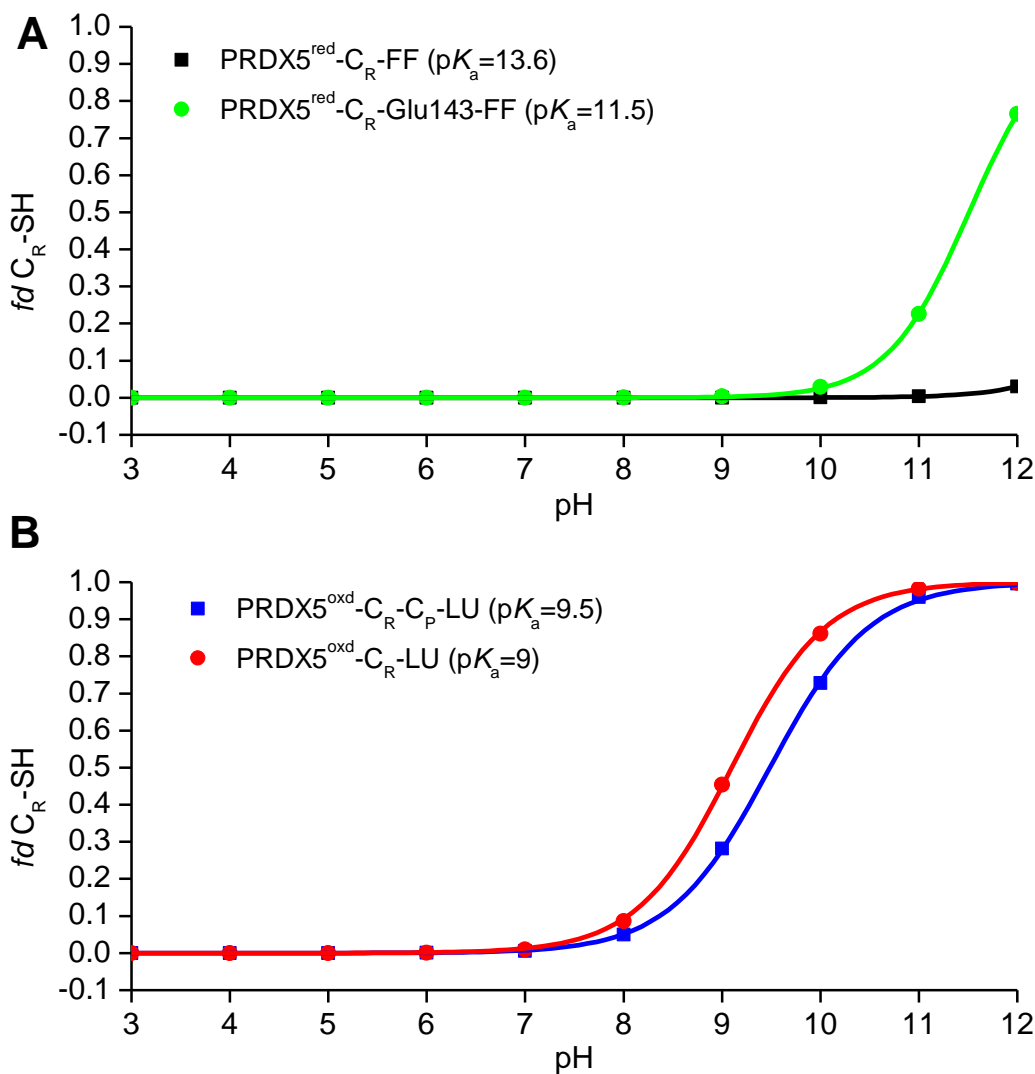
**Tabla 5.3.** Valores obtenidos del ajuste del gráfico de  $k_{\text{res}}^{\text{app}}$  vs. pH con la ec. 5.10.

Parámetro	
$k_1$	$1032 \pm 425 \text{ s}^{-1}$
$k_2$	$3.7 \pm 0.5 \text{ s}^{-1}$
$k_3$	$0 \pm 3.1 \text{ s}^{-1}$
$\text{p}K_a^{\text{SH}}$	$7.35 \pm 0.09$
$\text{p}K_a^{\text{SOH}}$	$5.9 \pm 0.1$

El valor del  $pK_a$  del ácido sulfénico es cercano a los otros dos valores reportados en literatura, 6.6 para AhpE<sup>105</sup> y 6.1 para la mutante C156S de AhpC<sup>307</sup>. Por otro lado, el valor obtenido para el grupo tiol de  $C_R$  es menor al que se había reportado previamente mediante la reacción con mBBBr, donde se obtuvo un valor de 8.5<sup>104</sup>. En dicho experimento la enzima se encontraba en forma reducida y el  $pK_a$  se determinó a partir de la velocidad de alquilación del tiol por mBBBr, en estas condiciones es esperable que la enzima se encuentre en conformación FF. La determinación de  $pK_a$  realizada con el seguimiento de la  $k_{res}^{ap}$  involucra la oxidación de  $C_p$  y la transición hacia la conformación LU, por lo tanto es posible que las diferencias observadas en el  $pK_a$  de  $C_R$  se deban a los diferentes microambientes en los que se encuentra dicho residuo en cada uno de los experimentos. Para verificar esta posibilidad, se realizaron simulaciones a pH constante para titular el  $pK_a$  de la  $C_R$  en dos condiciones diferentes: una en donde la enzima se encuentra reducida y en conformación FF y otra en donde la enzima se encuentra con  $C_p$  oxidada a sulfénico y en conformación LU. Como se mencionó previamente, se ha postulado al residuo de Glu143 como posible responsable de la desprotonación de  $C_R$ , por lo tanto, también se estudió su influencia sobre el  $pK_a$  de  $C_R$ , permitiendo o no su cambio en el estado de protonación mientras se titula a la  $C_R$ .

## 5.2 Influencia de la conformación (FF y LU) y del estado de protonación de $C_p$ y del residuo Glu143 sobre el $pK_a$ de $C_R$

En la **Figura 5.4 A y B** se muestran las curvas de titulación de  $C_R$  en los cuatro escenarios estudiados: diferente conformación proteica (FF o LU) y permitiendo o no el cambio en el estado de protonación de  $C_p$ -SOH y Glu143. Cuando la proteína está en conformación FF y con  $C_p$  reducida a tiol, el  $pK_a$  de  $C_R$  es de 13.6, el cual se encuentra sobreestimado ya que experimentalmente se determinó un valor de 8.5<sup>104</sup>. La inclusión del residuo de Glu143 como tituable disminuye dos unidades el  $pK_a$  de  $C_R$  (**Figura 5.4, A**), esto indica que dicho residuo tiene un efecto significativo en su desprotonación. Si se comparan los paneles **A** y **B** se observa que el  $pK_a$  de  $C_R$  es menor cuando la proteína se encuentra en conformación LU, con una disminución de dos unidades de  $pK_a$ . Si bien los valores absolutos de  $pK_a$  obtenidos son lejanos a los obtenidos experimentales, el  $\Delta pK_a$  sí es cercano al observado experimentalmente. Por otra parte, la inclusión del  $C_p$ -SOH como residuo tituable no afectó el  $pK_a$  de  $C_R$  (**Figura 5.4, B**). Estos resultados, obtenidos mediante simulaciones a pH constante, muestran la misma tendencia que se observó experimentalmente: hay una diferencia en el valor del  $pK_a$  de  $C_R$  según cuál sea la conformación de la enzima.



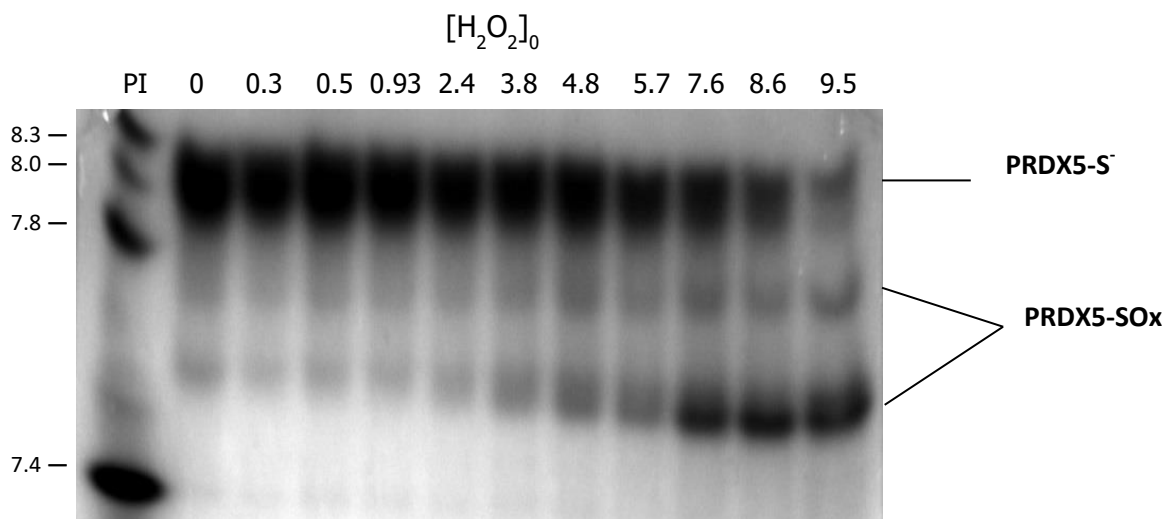
**Figura 5.4** Curvas de titulación de C<sub>R</sub>. **A:** proteína en conformación FF donde se tituló únicamente C<sub>R</sub> (trazo negro) o C<sub>R</sub> y Glu143 (trazo verde). **B:** proteína en conformación LU donde se tituló únicamente C<sub>R</sub> (trazo rojo) o C<sub>R</sub> y C<sub>P</sub>-SOH (trazo azul).

### 5.3 Estimación de la constante de sobreoxidación de C<sub>P</sub>-SOH por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> medida a tiempo final

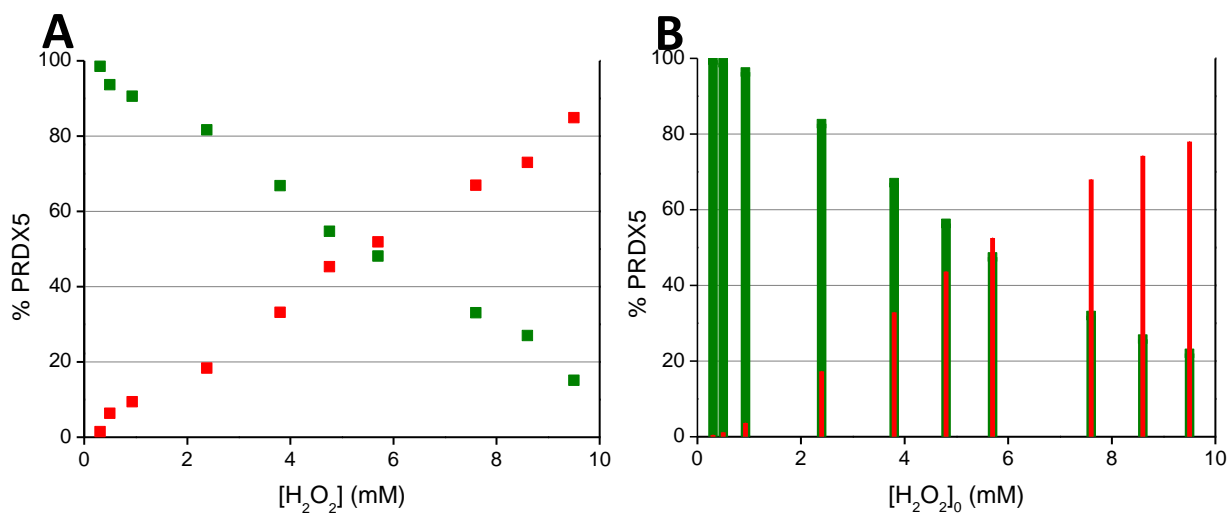
En la **Figura 5.5** se muestra el resultado del isoelectroenfoque de la reacción de sobreoxidación de PRDX5 en el sistema acoplado a DTT como reductor. En primer lugar, se evidencia que el punto isoelectrónico de PRDX5 reducida se encuentra alrededor de 8, el cual está alejado del reportado experimentalmente de 7.07<sup>308</sup>. Por otro lado se evidencia un corrimiento ácido a medida que aumenta la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la muestra, lo cual indicaría un incremento de PRDX5 sobreoxidada. En el carril sin presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se evidencia la presencia de proteína sobreoxidada, lo cual indicaría que durante el proceso de expresión/purificación ésta se sobreoxida. Las bandas observadas en el IEF fueron cuantificadas mediante densitometría y en Gepasi 3.3<sup>297</sup> se simuló el



sistema completo con diferentes  $k_{SOX}$  de forma tal de reproducir el patrón observado experimentalmente. Los resultados se muestran en la **Figura 5.6**.



**Figura 5.5** Isoelectroenfoco de pH 3 - 10 de la mezcla de reacción del ciclo artificial PRDX5 +  $H_2O_2$  + DTT a diferentes concentraciones de  $H_2O_2$ .



**Figura 5.6** Sobreoxidación de PRDX5. **A:** resultados de la cuantificación de las bandas del IEF. **B:** resultados de la simulación con Gepasi utilizando una  $k_{SOX} \sim 170 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .  $\square$  PRDX5 reducida y  $\square$  PRDX5 sobreoxidada.

A partir de la cuantificación del gel y de la simulación en Gepasi se obtuvo una constante de velocidad aproximada para la sobreoxidación de  $170 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

## Discusión

En este capítulo se reportan los  $pK_a$ s del sulfénico formado en  $C_p$  y del tiol en  $C_R$  y la constante de velocidad de la formación del disulfuro en PRDX5. Con respecto a los  $pK_a$ s se evidencia un sulfénico con un  $pK_a = 5.9$ , valor cercano al obtenido para otras dos Prx: AhpE y AhpC<sup>105,307</sup>. El  $pK_a$  obtenido para el grupo tiol de  $C_R$  resultó ser 1.4 unidades menor al obtenido en experimentos previos mediante la alquilación del tiol con mBBr (7.35 vs 8.8)<sup>104</sup>. Dicha diferencia es atribuida al microambiente en el que se encuentra la cisteína en los distintos experimentos. Mientras que en el primero la enzima se encuentra transitando entre las conformaciones FF y LU, en el segundo la enzima se encuentra mayoritariamente en conformación FF. Además, la oxidación de  $C_p$  podría afectar el residuo de Glu143 a través de la Arg127 y éste a su vez podría también afectar el  $pK_a$  de  $C_R$ . Las simulaciones a pH constante, en donde se tituló a la  $C_R$  en la enzima en ambas conformaciones mostraron un corrimiento del  $pK_a$  cercano a lo observado experimentalmente. Resultados similares fueron obtenidos en las enzimas AhpC, PRDX1 y PRDX2, con corrimientos entre 0.5 y 1 unidad de  $pK_a$ <sup>295</sup>. En función de la nucleofilia del tiolato y la electrofilia del sulfénico, es esperable que la reacción más favorecida cinéticamente sea la de  $C_p$ -SOH con  $C_R$ -S<sup>-</sup>, sin embargo, los  $pK_a$ s indican que a pH 7.4 hay mayor proporción de  $C_p$ -SO<sup>-</sup> y  $C_R$ -SH, lo cual desfavorece la reacción. Con respecto a la constante de velocidad de la reacción entre un ácido cisteínsulfénico y una cisteína ( $k_{SS}$ ), hay dos valores reportados en literatura:  $720 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ <sup>172</sup> y límite inferior de  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ <sup>174</sup>, ambos a pH = 6. Para poder comparar la reacción entre  $C_p$ -SOH y  $C_R$ -SH en la enzima con la que ocurre en solución hay que recurrir al cálculo de molaridades efectivas, un término empírico utilizado para relacionar la cinética y equilibrio de reacciones intramoleculares e intermoleculares. Si se define como el cociente entre la constante de velocidad de la reacción intramolecular ( $k_{res}^{ap}$ ) y la constante de velocidad de segundo orden de la misma reacción intermolecular ( $k_{SS}$ ):

$$M_{eff} = k_{res}^{ap} / k_{SS} \quad (5.13)$$

utilizando la  $k_{SS} = 720 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y una  $k_{res}^{ap} = 19.5 \text{ s}^{-1}$  (extrapolada del gráfico de la **Figura 5.3** a pH 6),  $M_{eff} = 27 \text{ mM}$ . Si se asume que  $C_p$ -SOH y  $C_R$ -SH se encuentran restringidos en una esfera de  $13 \text{ \AA}$  de radio (distancia entre  $C_p$  y  $C_R$  observada en el cristal de PRDX5 reducida<sup>78</sup>), la concentración efectiva es de  $117 \text{ mM}$ , más de 4 veces mayor a la  $M_{eff}$ . Esto indica que la probabilidad de encuentro de  $C_p$  y  $C_R$  está restringida en la enzima en comparación a lo que ocurre en solución, la proteína actúa como una barrera estérica que enlentece la formación del enlace disulfuro. Existen tres ejemplos en literatura

que muestran como ciertas modificaciones son capaces de acelerar la formación del disulfuro. La nitración de la Tyr193 en PRDX2 que favorece la conformación LU, acelerando la reacción de resolución<sup>182</sup>; la mutación de un residuo de cisteína no involucrado en la catálisis en una micotiol peroxidasa de *Corynebacterium glutamicum* que hace que la  $k_{res}$  sea 5 veces mayor a la obtenida para la enzima *wild type*<sup>309</sup> y por último la mutación de Leu109 por Met en PfaOP que afecta la velocidad de resolución, disminuyendo la susceptibilidad de la enzima a sobreoxidarse<sup>310</sup>.

Los resultados de los  $pK_a$ s de  $C_p$ -SOH y  $C_R$ -SH, el análisis de la constante de velocidad y la transición hacia la conformación LU (Capítulo 4), muestran que la reacción de resolución no está favorecida en la enzima:

- i) las especies más favorables para la reacción ( $C_p$ -SOH y  $C_R$ -S<sup>-</sup>) no son las más abundantes
- ii) hay un enlentecimiento en la velocidad de reacción con respecto a la misma reacción bimolecular en solución
- iii) la transición hacia la conformación LU no es muy probable

En la siguiente tabla se muestra la  $k_{res}^{ap}$  para PRDX5 y su comparación con otras tres Prx del tipo 2-Cys : PRDX1 y PRDX2 (humanas) y AhpC (bacteriana)<sup>295</sup>.

**Tabla 5.4** Constante de velocidad a pH 7.4 para la reacción entre  $C_p$ -SOH y  $C_R$ -SH de distintas Prx<sup>295</sup>.

Prx	$k_{res}^{app} (s^{-1})$
AhpC	104.8
PRDX5	18.7
PRDX1	12.9
PRDX2	0.64

A partir de las  $k_{res}^{ap}$  presentadas en la **Tabla 5.4** se evidencia que el paso resolutorio ocurre con diferente constante de velocidad según el tipo de peroxirredoxina. La  $k_{res}^{ap}$  obtenida para AhpC es 5, 8 y 164 veces mayor que la correspondiente a PRDX5, PRDX1 y PRDX2, respectivamente. Este resultado indicaría que durante la evolución de las Prx humanas se enlenteció la formación del enlace disulfuro y ha llevado a plantear diversas hipótesis. En primera instancia, si la proteína se encuentra más tiempo como sulfénico sería más susceptible a la sobreoxidación<sup>56</sup>. La sobreoxidación de las Prx es reversible únicamente en el caso de las Prx 2-Cys típicas a través de la sulfirredoxina, pero la reacción es muy costosa energéticamente ya que se consume una molécula de ATP por sulfínico reducido a sulfénico<sup>184</sup>. Si la Prx se encuentra inactivada por sobreoxidación, la concentración local de peróxidos

va a aumentar, lo cual permite la regulación redox de distintas proteínas que reaccionan lento con dichos peróxidos, como por ejemplo las fosfatasa de tirosina<sup>187</sup>. Este fenómeno se conoce como la teoría “*floodgate*” y se ha demostrado para PRDX3 en la regulación de la producción de cortisona<sup>311</sup>. Además, la enzima sobreoxidada podría establecer nuevas interacciones proteicas que no ocurrían previamente<sup>312</sup> o ganar una nueva actividad (*e.g.* actividad chaperona)<sup>195</sup>. En segunda instancia, el ácido sulfénico de C<sub>p</sub> podría reaccionar con tioles proteicos, formando disulfuros mixtos y regulando a la proteína blanco, de esta forma las Prx actuarían como sensores y transmisoras de señales por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>176</sup>. Finalmente, la cinética diferencial entre distintas Prx que coexisten en ciertos compartimentos celulares podría significar que las Prx actúan de forma complementaria, combinando la función antioxidante y de sensoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>295</sup>.

La constante de velocidad de sobreoxidación aproximada para PRDX5 se encuentra en el orden de 170 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. En literatura están reportadas las constantes de dos Prx 2-Cys: PRDX2 y PRDX3 la cual es para ambos casos 12000 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup><sup>170</sup>. Si se analiza únicamente la k<sub>SOX</sub> se esperaría que tanto PRDX2 como PRDX3 sean sensibles a la sobreoxidación mientras que PRDX5 sea robusta, sin embargo, se ha demostrado que PRDX3 es robusta<sup>313</sup>. La diferencia subyace en la k<sub>res</sub>, si bien PRDX2 y PRDX3 tienen la misma k<sub>SOX</sub>, sus velocidades de formación del enlace disulfuro son bien distintas, en el caso de PRDX2 k<sub>res</sub> es 2 s<sup>-1</sup> mientras que en PRDX3 es aproximadamente 10 veces mayor<sup>170</sup>. Por otro lado, la k<sub>res</sub> de PRDX5 se encuentra en el mismo orden que la de PRDX3, lo cual concuerda con el hecho de que también sea una Prx robusta<sup>35</sup>. Por lo tanto, la sensibilidad a la sobreoxidación de las Prx dependerá de la velocidad de sobreoxidación y de resolución, ya que ambas reacciones compiten por el mismo sustrato (C<sub>p</sub>-SOH).

# **Capítulo 6: Reducción de PRDX5 por Trx2. Constantes de velocidad y función de los residuos Thr44 y Arg127.**

## Resumen del capítulo

En este capítulo se presentan los resultados del estudio de la reducción del enlace disulfuro formado entre  $C_P$  y  $C_R$  en PRDX5 por tiorredoxina 2 humana (Trx2), con especial énfasis en el efecto de las mutaciones de los residuos conservados del sitio activo Thr44 y Arg127 en dicha reacción. Para abordar este estudio se determinaron las constantes de velocidad de la reducción de PRDX5<sup>WT</sup>, PRDX5<sup>T44V</sup> y PRDX5<sup>R127Q</sup> por Trx2 y se realizaron simulaciones de dinámica molecular de las distintas variantes en estado oxidado a disulfuro.

Las constantes de velocidad obtenidas para las dos mutantes resultaron ser levemente mayores a la obtenida para la enzima *wild type*. Lo cual indicó que tanto la Thr44 como la Arg127 no son esenciales para que ocurra la reducción de PRDX5. Para poder explicar el aumento en la constante de velocidad se realizaron simulaciones de dinámica molecular de PRDX5 oxidada a disulfuro en su forma *wild type* y las dos mutantes T44V y R127Q. Se analizó si existe algún cambio en la posición y exposición del residuo de Lys49, ya que se ha propuesto que estaría involucrado en la interacción con la tiorredoxina<sup>83,314</sup>. Los resultados obtenidos muestran una correlación entre la constante de velocidad y la exposición al solvente de dicho residuo, a mayor exposición, mayor constante de velocidad. En la mutante T44V, que presenta el mayor valor de  $k$ , la exposición al solvente de la Lys49 tiene una media de  $85 \text{ \AA}^2$ , mientras que para la mutante R127Q se observan dos poblaciones, una con un SASA de  $15 \text{ \AA}^2$  y otra con un SASA de  $85 \text{ \AA}^2$ , al igual que se observaba para la mutante T44V. Estos valores son considerablemente mayores si se comparan con los obtenidos para la WT, ya que en este sistema no hay un valor de SASA mayoritario, sino que el mismo varía en la simulación de 0 a  $150 \text{ \AA}^2$ .

Los cambios observados en el SASA de la Lys49 son atribuidos a que en la enzima WT, este residuo tiene una alta movilidad, tal como se observa en el RMSF y cuando se muta la treonina o arginina el mismo se rigidiza, lo cual coincide con que el SASA de la Lys49 en la enzima WT no tenga un valor definido como en el caso de las mutantes, sino que fluctúa ampliamente. Los resultados obtenidos mostraron que los residuos del sitio activo claves para el paso de peroxidación, no son necesarios para que ocurra la reducción del enlace disulfuro por Trx2. Además, dicha reacción podría ser más eficiente mejorando la interacción Prx-Trx.

## Metodología

### 6.1 Determinación de la constante de velocidad de reducción de PRDX5 WT, T44V y R127Q por Trx2

La PRDX5 humana WT (número de acceso al GenBank NM\_012094), sus dos variantes T44V y R127Q y la Trx2 humana (número de acceso al GenBank U78678), clonadas en un vector pQE30 sin la secuencia de envío a la mitocondria y con un tag de 6 residuos de histidina, se expresaron en cepas de *Escherichia coli* DE3. Se partió de un cultivo O.N en medio Luria Bertani a partir de este se realizó un cambio de escala 1/100 y se realizó un crecimiento, hasta llegar a una densidad óptica a 600 nm de 0.6. La inducción se realizó con 1 mM de IPTG por 4 h a 37° C. Las mutaciones puntuales se realizaron mediante PCR utilizando los primers 5'-GCC TTC GTC CCG GGA TGT TCC A-3' (*forward*) y 5'-TCC CGG GAC GAA GGC CCC AGG-3' (*reverse*) para la mutante T44V y 5'-CGT CTT AAG CAG TTC TCC ATG G-3' (*forward*), 5'-CCA TGG AGA ACT GCT TAA GAC- 3' (*reverse*) para la mutante R127Q.

La reacción de reducción de PRDX5<sup>WT</sup> y las dos mutantes T44V y R127Q por la Trx2 se realizó en un buffer Tris/Acético/MES conteniendo 30mM Tris, 15 mM acético, 15 mM MES, 120 mM NaCl y 100 µM de DTPA a pH 7.2 y 25 °C. La cinética se siguió a través del decaimiento total de la fluorescencia proveniente de los triptófanos proteicos, tal como se ha reportado previamente<sup>168</sup>. Se trabajó en condiciones de pseudo-primer orden, con [PRDX5 WT]<sub>0</sub> = 0.25 µM, [PRDX5 T44V]<sub>0</sub> = 0.17 µM y [PRDX5 R127Q]<sub>0</sub> = 0.5 µM, utilizando Trx2 en exceso, presente en el rango de concentraciones de 2 - 27 µM. Se utilizó un espectrofluorímetro asociado a un equipo de flujo detenido (Applied Photophysics SX-20), con una  $\lambda_{ex}$  = 280 nm y un filtro de detección para la emisión de 320 nm; el cambio en la emisión de fluorescencia se siguió por al menos cuatro tiempos de vida media, ajustando los cursos temporales a una ecuación de cinética de primer orden:

$$Y = Ae^{-k_{obs}t + b} \quad (6.1)$$

Donde  $k_{obs}$  corresponde a la constante de velocidad observada de pseudo primer orden, que es posteriormente graficada en función de la concentración de Trx2 inicial, para obtener la constante de velocidad aparente de segundo orden ( $k_{ap}$ ):

$$k_{obs} = k_{ap} [Trx2] \quad (6.2)$$

## 6.2 Simulación de dinámica molecular de PRDX5<sup>WT</sup>, PRDX5<sup>T44V</sup> y PRDX5<sup>R127Q</sup> oxidadas a disulfuro

Las coordenadas atómicas de PRDX5<sup>WT</sup> oxidada a disulfuro se obtuvieron del *Protein Data Bank* (PDBID: 2VL2<sup>158</sup>) y a partir de estas se construyeron las mutantes PRDX5<sup>T44V</sup> y PRDX5<sup>R127Q</sup> sustituyendo el residuo de treonina por valina y el de arginina por glutamina, respectivamente. Cada sistema se preparó utilizando el módulo *tLeap* de AMBER. Se agregaron átomos de hidrógeno faltantes, iones K<sup>+</sup> para neutralizar el sistema y se solató con una caja octaédrica truncada de moléculas de agua parametrizadas con TIP3P<sup>140</sup> que se extiende 12 Å desde la superficie proteica. El campo de fuerza utilizado para parametrizar las proteínas fue el *ff14SB*<sup>315</sup> (mejora en los parámetros de las cadenas laterales y esqueleto peptídico con respecto a su antecesor *ff99SB*<sup>247</sup>). Las interacciones de largo alcance se trataron con el procedimiento PME<sup>246</sup> utilizando una distancia de corte de 8 Å. Todos los enlaces covalentes que involucran átomos de hidrógeno fueron fijados durante toda la simulación utilizando el algoritmo SHAKE<sup>269</sup>, lo que permitió usar un paso de 2 fs para integrar las ecuaciones del movimiento.

El protocolo de dinámica molecular seguido fue el siguiente:

- i) Minimización de las moléculas de agua y contraiones con 4000 pasos en SD y 1000 en GC manteniendo las coordenadas de la proteína fijas con una constante de fuerza de 500 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup>.
- ii) Minimización del sistema completo con 4000 pasos en SD y 1000 en GC.
- iii) Calentamiento gradual de 0 a 300 K utilizando el termostato de Langevin<sup>267</sup> y una frecuencia de colisión de 2 ps<sup>-1</sup> en ensemble NVT.
- iv) Equilibración de la densidad por 5 ns a 300 K en ensemble NPT utilizando el baróstato de Montecarlo<sup>286</sup>.
- v) Simulación de dinámica molecular en ensemble NVT por 100 ns a 300 K.

La estabilidad estructural de las simulaciones se monitoreó mediante la desviación media cuadrática (RMSD) de las posiciones de los átomos del esqueleto peptídico C, C $\alpha$ , N y O (ec. 6.3):

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \|r_{ij} - r_{i0}\|^2} \quad (6.3)$$

donde N es el número total de átomos,  $r_{ij}$  la posición del átomo i a tiempo j y  $r_{i0}$  la posición del átomo i a tiempo 0.



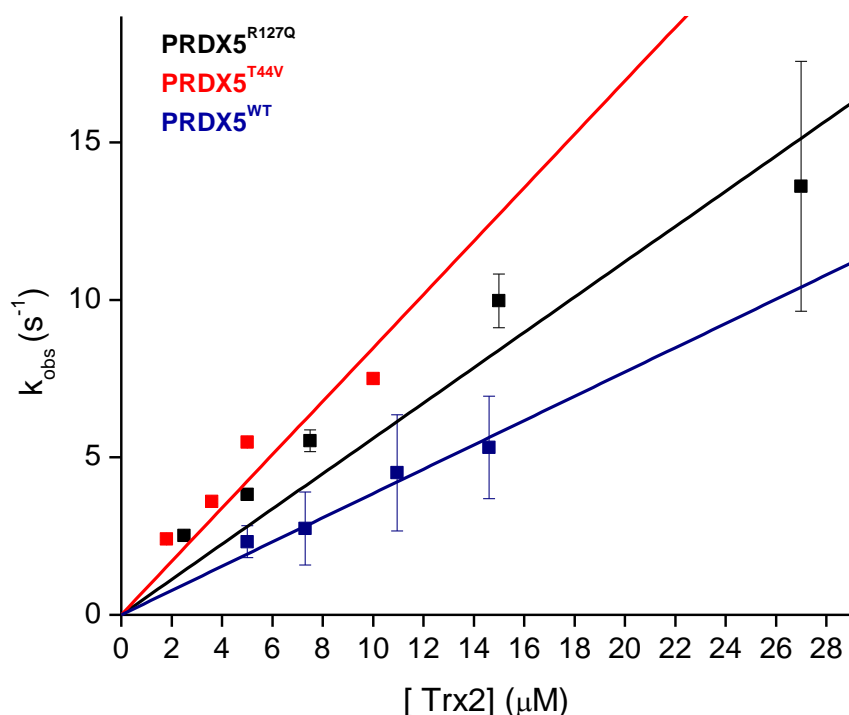
Además, se analizó la movilidad de los residuos en los 100 ns de simulación a través del RMSF (ec. 3.1). Se determinó el área superficial expuesta al solvente del residuo de Lys49 en todos los sistemas mediante el algoritmo LCPO<sup>272</sup> (ec. 3.2) y se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para obtener una estructura representativa en cada sistema y realizar una comparación estructural. El procedimiento fue el mismo que le descrito en la sección 4.4 del Capítulo 4.

El programa utilizado para para dicho análisis fue el *cpptraj*<sup>270</sup> y se utilizó QtiPlot<sup>292</sup> para realizar los gráficos de PCA.

## Resultados

### 6.1 Efecto de las mutaciones T44V y R127Q de PRDX5 sobre la reacción de reducción por Trx2

Se determinaron las constantes de velocidad de la reducción del enlace disulfuro intramolecular de PRDX5 en la enzima *wild type* y en las mutantes PRDX5<sup>T44V</sup> y PRDX5<sup>R127Q</sup> para determinar si los residuos de Thr44 y Arg127 son necesarios en dicho paso del ciclo catalítico. Para esto se utilizó como agente reductor a la Trx2, que es mitocondrial y reductor natural de PRDX5 cuando se encuentra en dicho organelo<sup>224</sup>. A continuación se muestran los gráficos de segundo orden de  $k_{\text{obs}}$  vs. [Trx2] para las tres reacciones estudiadas.



**Figura 6.1** Gráfico de segundo orden de  $k_{\text{obs}}$  vs. [Trx2] para PRDX5<sup>WT</sup>, PRDX5<sup>T44V</sup> y PRDX5<sup>R127Q</sup>. Pendientes de la regresión lineal:  $3.8 \pm 0.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $8.5 \pm 0.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y  $5.6 \pm 0.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente.

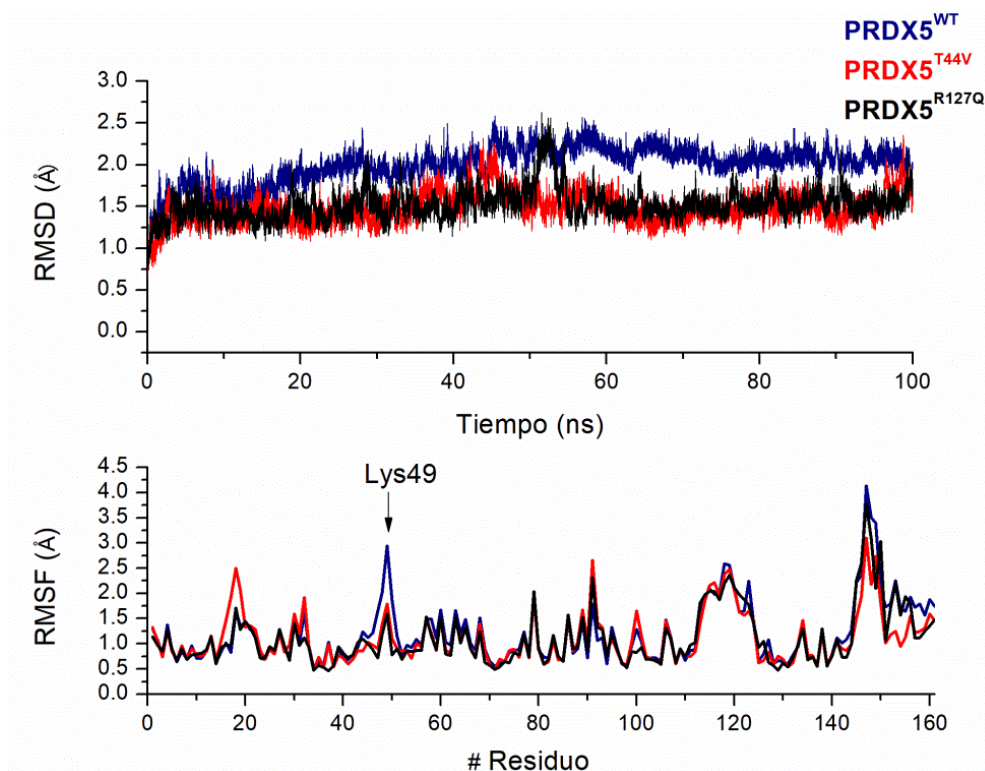
Los resultados obtenidos muestran en primer lugar una  $k_{\text{ap}}$  para la enzima *wild type* que concuerda con lo que ya se había reportado previamente<sup>168</sup>. Por otro lado, las constantes de velocidad en las enzimas mutantes resultaron ser levemente mayores que en la enzima *wild type*, siendo el incremento más notorio en el caso de la mutante T44V. Estos resultados muestran en primer lugar que ninguno de los residuos conservados del sitio activo es esencial para el paso de reducción del ciclo

catalítico. Esto era esperado, ya que como se puede observar en la **Figura 1.10** del Capítulo 1, una vez que se forma el enlace disulfuro el mismo se encuentra expuesto al solvente y lejano de los residuos del sitio activo.

Por otro lado, si bien se esperaba que los residuos de Thr y Arg no fueran esenciales para el paso resolutivo, no se esperaba observar un aumento en la constante de velocidad de la reducción del disulfuro por Trx2. Para explicar esto recurrimos a la simulación de dinámica molecular de PRDX5 oxidada a disulfuro, en su forma *wild type* y las dos mutantes. Si bien no se conoce la forma del complejo PRDX5-Trx2, se ha propuesto que la interacción esta mediada mayoritariamente por la “inserción” del residuo de Lys49 de PRDX5 en una “cavidad negativa” formada por una triada de residuos de aspartato de Trx2 (Asp58, Asp60 y Asp61)<sup>83,314</sup>.

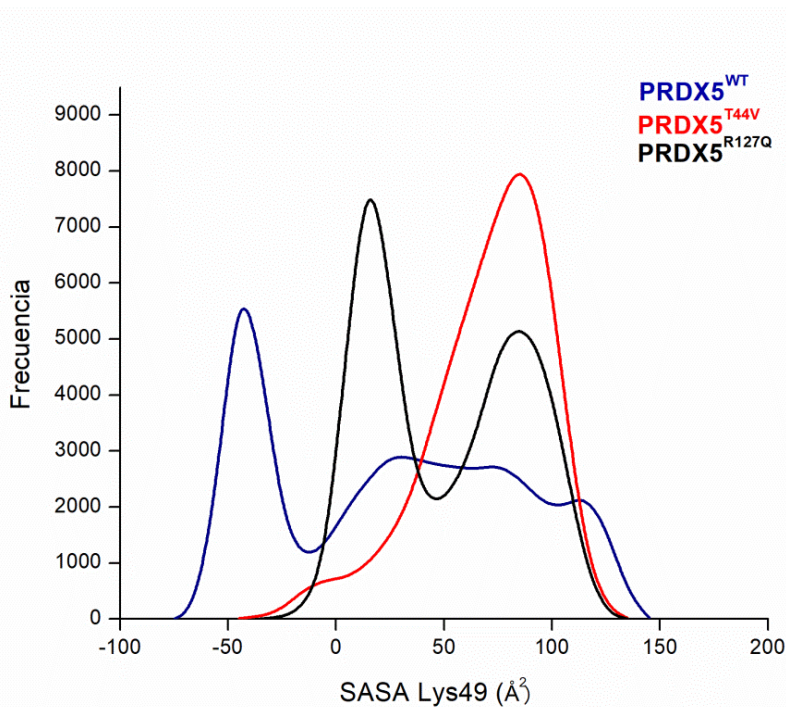
## 6.2 Efecto de las mutaciones T44V y R127Q en la estructura de PRDX5 oxidada a disulfuro

A continuación se muestra el análisis de RMSD del esqueleto peptídico y RMSF por residuo obtenido para los tres sistemas en estudio durante los 100 ns de simulación.



**Figura 6.2** Evolución temporal del RMSD del esqueleto peptídico (gráfico superior) y RMSF por residuo (gráfico inferior) para los tres sistemas en estudio.

Tal como se muestra en la **Figura 6.2** todos los sistemas presentan bajo RMSD, que se encuentra en el entorno de los 1.5 - 2 Å, estando en la cota superior el de PRDX5 WT. La fluctuación de los residuos es muy similar entre los distintos sistemas, sin embargo se observa una diferencia significativa sobre el residuo de Lys49. La movilidad de esta lisina es mayor en la enzima WT que en las mutantes. Para ahondar más en el efecto que tienen las mutaciones en dicho residuo, se analizó su área superficial accesible al solvente (SASA) en cada sistema, los resultados se muestran en forma de histograma en la **Figura 6.3**.

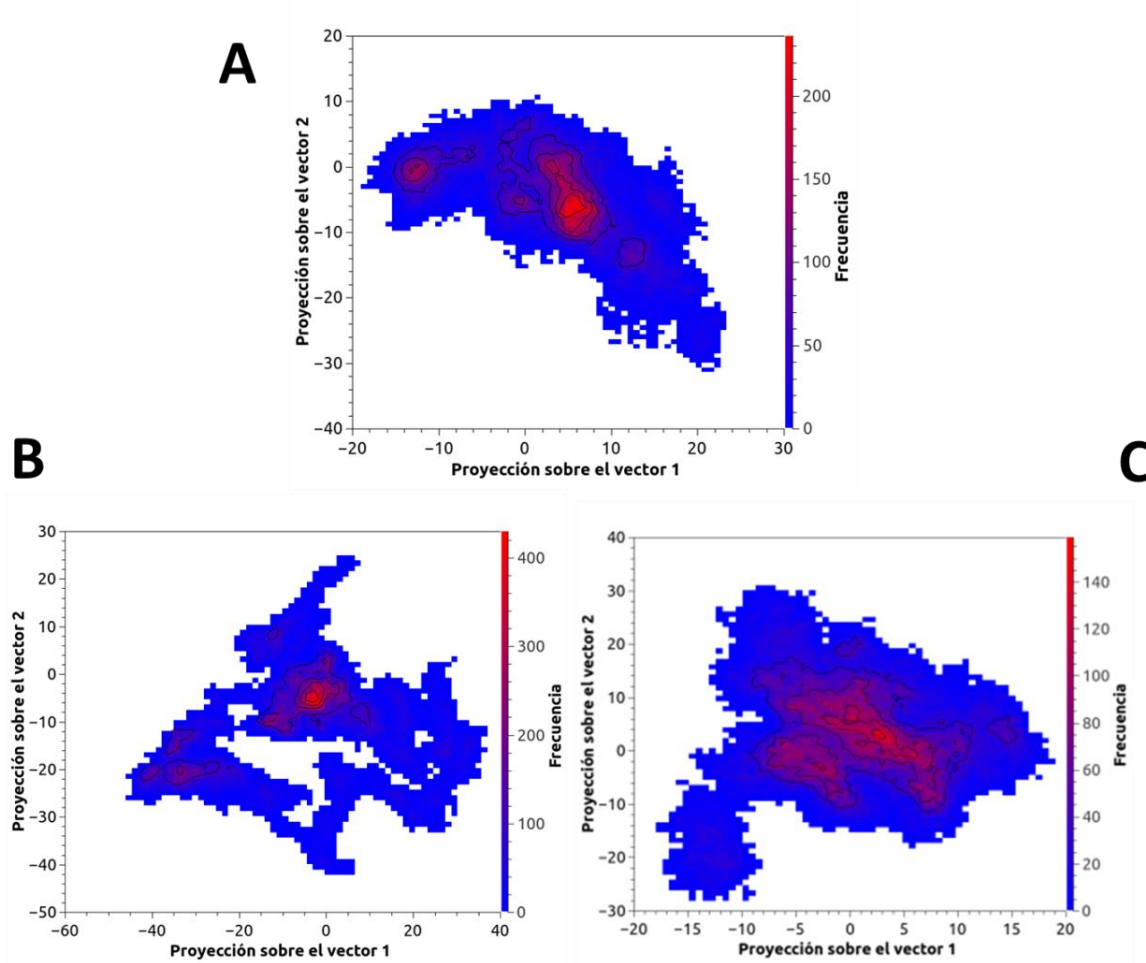


**Figura 6.3** Gráfico en forma de histograma del área superficial accesible al solvente del residuo de Lys49 en los tres sistemas estudiados.

Tal como se muestra en la **Figura 6.3**, la exposición al solvente de la Lys49 aumenta significativamente en las dos enzimas mutantes. En la enzima WT se observa un máximo a SASA negativo, el cual no tiene un significado físico y representa 0 Å<sup>2</sup>. Además, se observa una exposición que varía entre 0 y 145 Å<sup>2</sup> con una frecuencia menor. Esto indica que la Lys49 varía entre una posición en la cual está completamente interna y otra en la que está expuesta al solvente (145 Å<sup>2</sup> representan el 69 % del SASA máximo que puede tener una Lys<sup>293</sup>). En el caso de la mutante T44V, sistema para el cual se observó la constante de velocidad mayor (**Figura 6.1**), se observa un único pico cerca de los 85 Å<sup>2</sup>, la cual representa el 43 % del SASA máximo de la Lys<sup>293</sup>. Para la mutante R127Q, el SASA de la Lys49 también es mayor que en la enzima WT, se observa un pico pronunciado a 15 Å<sup>2</sup> y otro de menor

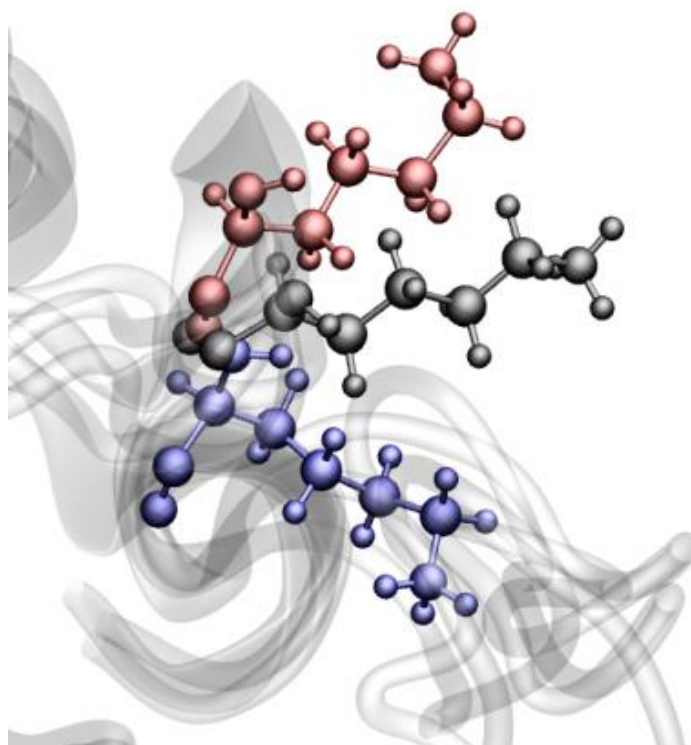
frecuencia a  $85 \text{ \AA}^2$ . Estos resultados permitieron correlacionar el SASA de la Lys49, con la constante de velocidad de la reacción de resolución. A mayor exposición de la lisina, mayor eficiencia en la reducción del disulfuro en PRDX5 por parte de Trx2. La gran variación en el SASA de la Lys49 observada en la enzima WT coincide con el hecho que este residuo tenga una gran movilidad en comparación con las enzimas mutantes (RMSF en la **Figura 6.2**).

Para comparar las estructuras de los tres sistemas se realizó un análisis de componentes principales de cada trayectoria. Se graficó la proyección de la trayectoria sobre los vectores propios 1 y 2, que dan cuenta de la mayor variancia. A partir de estos gráficos se extrajo una estructura representativa de cada sistema, analizando la posición que ocupaba la Lys49. En la **Figura 6.4** se muestran los gráficos de PCA, en donde se puede observar cómo se agrupan las distintas conformaciones muestreadas a lo largo de la simulación y cuáles presentan mayor frecuencia.



**Figura 6.4** Análisis de componentes principales. Gráficos de la proyección de los 100 ns de simulación de cada sistema. **A:** PRDX5<sup>WT</sup>; **B:** PRDX5<sup>T44V</sup>; **C:** PRDX5<sup>R127Q</sup>.

Tal como se muestra en los gráficos de PCA, en todos los sistemas existe una conformación más frecuente que el resto (coloreada con rojo). Además, la diferencia entre todas las conformaciones muestreadas no son significativamente grandes (el rango de los ejes X e Y es de 40 Å en la mayoría de los casos), esto era esperado, ya que se realizó una simulación de dinámica molecular convencional que no explora significativamente el espacio conformacional. En la **Figura 6.5** se muestra una superposición de las estructuras obtenidas de las zonas con mayor frecuencia de cada gráfico de PCA, evidenciando la posición de la Lys49 en cada sistema.



**Figura 6.5** Superposición de las conformaciones más representativas (extraídas del análisis de PCA) de los 100 ns de dinámica molecular de PRDX5<sup>WT</sup> (azul) PRDX5<sup>T44V</sup> (rojo) y PRDX5<sup>R127Q</sup> (gris) en donde se muestra la posición del residuo de Lys49 en cada sistema

A partir de la superposición de las tres estructuras se evidencia que el residuo Lys49 se encuentra más expuesto al solvente en las dos mutantes con respecto a la enzima WT, lo cual concuerda con los resultados obtenidos del cálculo del área superficial expuesta al solvente de dicho residuo (**Figura 6.3**). Los resultados estructurales obtenidos otorgaron una posible explicación del aumento observado en la constante de velocidad de la reducción del disulfuro en PRDX5 por Trx2.

## Discusión

La reducción del enlace disulfuro en las Prx 2-Cys mediante la reacción de intercambio tiol-disulfuro catalizada por Trx permite recuperar a la enzima reducida, de forma tal de iniciar una nueva ronda de catálisis. Las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas entre las Prx y Trx le otorgan especificidad a dicha reacción<sup>204</sup>. La cinética se ha estudiado para varios sistemas: PRDX2 y PRDX5, la triparredoxina del *Trypanosoma cruzi*, Tpx de *E. coli* y AhpC de *Salmonella typhimurium*, determinando valores de k en el orden de  $10^4 - 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ <sup>63,168,171,316,317</sup>. La función de los residuos conservados del sitio activo en dicha reacción no ha sido estudiada, pero sí existen reportes experimentales que muestran cómo la mutación de residuos cercanos al enlace disulfuro (Glu50 y Arg126) en TSA1 de *Saccharomyces cerevisiae* afecta notablemente su reducción por Trx<sup>205</sup>. Atribuyendo dichos cambios a que estos residuos serían importantes en la interacción entre ambas proteínas

Los resultados presentados en este capítulo muestran que los residuos conservados del sitio activo Thr44 y Arg127 no son necesarios para la reducción del enlace disulfuro en PRDX5 por Trx2. Por el contrario, su mutación favoreció la reacción ya que se observó un aumento en la constante de velocidad en las enzimas mutantes con respecto a la determinada para la enzima WT. Dicho aumento podría deberse a una mayor exposición al solvente del residuo Lys49, el cual se ha propuesto como clave en la interacción PRDX5-Trx2<sup>83,314</sup>. Un efecto similar se observó en la peroxirredoxina Ahp1, en donde la resolución de estructuras cristalográficas mostrará que el residuo Lys32 está involucrado en la interfaz entre Ahp1 y Trx2 y su mutación afecta la unión entre ambas proteínas<sup>198</sup>. Si bien no resulta inmediata la relación entre una mejor unión del complejo PRDX5-Trx2 y un aumento en la constante de velocidad de la reacción, una posible explicación es que la unión más favorable entre ambas enzimas sea capaz de estabilizar mejor el estado de transición con respecto al complejo enzima-sustrato y así favorecer la reacción.

La oxidación de Trx por Prx está involucrada en la señalización ya que únicamente la forma oxidada de Trx es capaz de participar en distintas vías de señalización. Por ejemplo, únicamente las formas reducidas de Trx1 y Trx2 se unen a ASK1 inhibiendo su actividad quinasa, mientras que la oxidación de Trx lleva a la disociación del complejo Trx-ASK1, permitiendo a ASK1 actuar como quinasa<sup>190</sup>. Trx1 también es capaz de regular al NF- $\kappa$ B mediante la reducción de un residuo de Cys, lo cual le permite su unión al ADN<sup>210</sup>. Debido a que Trx está involucrada en distintos mecanismos de señalización, resulta de suma importancia determinar los factores que aceleran o enlentecen su oxidación, favoreciendo o inhibiendo ciertas vías de señalización.

# **Capítulo 7: Mecanismo de la reducción del ácido sulfénico por ascorbato. Modelado en solución y en PRDX6.**



## Resumen del capítulo

En este capítulo se presentan los resultados del modelado de la reacción de reducción del ácido sulfénico de una Prx 1-Cys por el ascorbato en un modelo material que representa el proceso en solución y en el contexto de la enzima PRDX6 humana. El paso de reducción en el ciclo catalítico de la enzima es de gran importancia ya que la devuelve a su estado original, lo que permite entrar en una nueva ronda de catálisis. El descubrimiento de que las peroxirredoxinas pueden ser reducidas por ascorbato de forma muy eficiente revolucionó el paradigma de que sólo compuestos con grupo tiol participaban en dicho paso del ciclo catalítico. Los resultados presentados aquí describen por primera vez el mecanismo de reacción entre el ácido sulfénico y el ascorbato en forma general (sistema modelo en solución) y de manera más importante aun, en el contexto específico de una peroxirredoxina.

La reducción del ácido sulfénico por ascorbato procede a través de un mecanismo tipo  $S_N2$  tanto en solución como en PRDX6. En el sistema modelo en solución no se encontró evidencia estructural ni energética que apoye la idea de que las moléculas de  $H_2O$  alrededor del ácido sulfénico y el ascorbato tengan una función catalítica (sugerida en las reacciones similares con dimedona<sup>318,319</sup>), sin embargo, se reveló su importancia en la protonación del grupo saliente  $OH^-$ , lo que favorece la termodinámica de la reacción. Con respecto al mecanismo en el contexto de PRDX6, se caracterizaron las especies a lo largo del camino de reacción, determinando que la misma es del tipo concertada, con un estado de transición cercano a la linealidad ( $\langle C2_{ASC} \dots S^y_{CP} \dots O^{\delta}_{CP} = 175^\circ$ ). El TS es estabilizado por el fortalecimiento de un EdH y de un puente salino con la Arg155. La reacción presenta una catálisis ácido-base mediada por la Arg155, ya que hay una transferencia protónica hacia el grupo saliente  $OH^-$  en el TS. La energía libre de activación es de  $11.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ , por lo que dicha reacción se encuentra extremadamente favorecida en el contexto de la enzima, ya que para el sistema modelo en solución, el escenario más favorable, con dos moléculas de  $H_2O$  presentó una energía libre de activación de  $22 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Con respecto a la termodinámica, la reacción también se encuentra favorecida en el contexto de la enzima, la energía libre de reacción es  $-34.3 \text{ kcal mol}^{-1}$  mientras que en los modelos mínimos únicamente se encontró una reacción exotérmica en el escenario con dos moléculas de  $H_2O$ , y la misma es de  $-5.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

## Metodología

### 7.1 Modelado de la reducción de ácido metanosulfénico por ascorbato

Las estructuras geométricas de reactivos, complejos iniciales, estados de transición y complejos finales (CI, TS y CF) de la reacción entre el ácido metanosulfénico y ascorbato en cuatro escenarios diferentes ( $n$  moléculas de agua explícita con  $n = 0, 1, 2$  y  $3$ ) fueron optimizadas con Gaussian 09<sup>320</sup>. La inclusión de las moléculas de agua se fundamenta en el hecho que se ha reportado para una reacción similar (sustitución nucleofílica del metanosulfénico por dimedona) que las moléculas de agua participan activamente pre orientando los reactivos y actuando como lanzaderas de protones<sup>318,319</sup>.

Se utilizó el nivel de teoría  $\omega$ B97XD/6-31+G(d,p),<sup>252,253,321</sup> y el solvente se describió implícitamente con el modelo IEF-PCM<sup>118</sup> y se utilizaron radios atómicos de Bondi<sup>260</sup> para construir cavidades ajustadas a la forma molecular, calculando las componentes no electrostáticas a la energía libre de solvatación (dispersión, repulsión y cavitación). La naturaleza de cada punto estacionario fue verificada a través del análisis de los valores propios de la *matriz hessiana* al mismo nivel. Se determinaron los caminos de reacción (IRC) a partir de cada TS con el algoritmo HPC de Hratchian y Schlegel<sup>322</sup>, utilizando un tamaño de paso de 0.1 Bohr. La energética de la reacción fue mejorada a través de cálculos *single-point* con el método post Hartree-Fock MP2<sup>124</sup> y el mismo conjunto de base y descripción continua del solvente. La termoquímica de cada reacción fue calculada al nivel de teoría IEFPCM- $\omega$ B97XD/6-31+G(d,p),<sup>252,253,321</sup> a 298 K tal como esta implementado en Gaussian 09<sup>320</sup>.

Para caracterizar el avance de la reacción en cada escenario se determinaron a partir de un análisis de orbitales naturales de enlace de Weinhold<sup>262</sup> los índices de enlace de Wiberg (WBI)<sup>261</sup> y cargas atómicas NPA<sup>263</sup> de los enlaces y átomos involucrados en la coordenada de reacción, respectivamente, a través de un cálculo *single-point* a nivel MP2/6-31+G(d,p) sobre las estructuras optimizadas a nivel DFT.

### 7.2 Dinámica molecular de PRDX6 con C<sub>p</sub> oxidada a ácido sulfénico

La estructura cristalográfica de PRDX6 oxidada fue obtenida a partir del *Protein Data Bank* (PDBID: 1PRX), manteniendo la proteína como dímero, ya que se ha confirmado dicho estado oligomérico en solución acuosa<sup>229</sup>. Se eliminaron ligandos y moléculas de agua, y los residuos ionizables (Arg, Lys, Asp y Glu) se simularon con el estado de protonación esperado a pH 7.4, exceptuando a la His39 del sitio activo que se simuló protonada en los nitrógenos  $\epsilon$  y  $\delta$ , ya que se ha propuesto que actúa como base en la catálisis enzimática<sup>159</sup>. Se utilizó el campo de fuerza de Amber

*ff14SB*<sup>315</sup> que mejora la descripción de las cadenas laterales de los aminoácidos y para describir al ácido cisteinsulfénico se utilizaron parámetros obtenidos de la literatura<sup>282</sup>. El sistema se neutralizó con contraiones K<sup>+</sup> y se situó en una caja octaédrica truncada de moléculas de agua parametrizadas con el campo de fuerza TIP3P<sup>140</sup>.

Posteriormente se procedió a realizar un protocolo de minimización seguida de dinámica molecular:

- i) Minimización energética de las moléculas de agua y contraiones con 2500 pasos de minimización (500 en SD y 2000 en CG) manteniendo las coordenadas de la proteína fijas con una constante de fuerza de 500 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup>.
- ii) Minimización del sistema completo con 20000 pasos (5000 en SD y 15000 en CG).
- iii) Calentamiento gradual de 0 a 310 K utilizando el termostato de Langevin<sup>267</sup> en un ensemble NVT por 5 ns.
- iv) Equilibración de la densidad con una simulación de 5 ns en ensemble NPT a 310 K utilizando el baróstato de Monte Carlo<sup>286</sup>.
- v) Simulación de dinámica molecular de 100 ns en ensemble NVT a 310 K controlando la temperatura con el termostato de Langevin<sup>267</sup>.

Todos los enlaces covalentes que involucran átomos de hidrógeno fueron fijados durante la simulación utilizando el algoritmo SHAKE<sup>269</sup>. Las interacciones de largo alcance se trataron con el procedimiento PME<sup>246</sup> con una distancia de corte de 8.0 Å y se utilizó un paso de 2 fs para integrar las ecuaciones del movimiento.

Se realizó un análisis de *clusters* para agrupar conformaciones proteicas similares a lo largo de la simulación, utilizando el algoritmo *Average-linkage* que determina la similitud entre distintas conformaciones en base al RMSD promedio entre todas las estructuras obtenidas a lo largo de la simulación, este algoritmo es uno de los más recomendados<sup>323</sup>.

### 7.3 Parametrización del ascorbato

La geometría molecular del ascorbato se obtuvo a nivel IEFPCM-MP2/6-31+G(d,p)<sup>124,252,253</sup> y se calcularon las cargas Merz-Singh-Kollman<sup>283,324</sup> basadas en el potencial electrostático a través de un cálculo *single-point* a nivel HF/6-31G(d) utilizando el programa Gaussian09<sup>320</sup>. Las cargas RESP<sup>256</sup> del ligando, consistentes con las del campo de fuerza utilizado para la proteína, se derivaron con el módulo *Antechamber* del programa AMBER 14<sup>266</sup> y el resto de los parámetros se obtuvieron del campo de fuerza *Gaff*<sup>254</sup>.

#### 7.4 Docking molecular del ascorbato en el sitio activo de PRDX6 con C<sub>P</sub> oxidada a ácido cisteinsulfénico

A partir del *clustering* de los 100 ns de simulación de dinámica molecular del homodímero de PRDX6 se obtuvo una estructura representativa para realizar el *docking* molecular con ligando flexible del ascorbato en el sitio activo, utilizando el programa AutoDock4.2<sup>325</sup>. Los archivos de entrada fueron preparados con la utilidad AutoDockTools<sup>325</sup> usando las cargas de Gasteiger-Marsili<sup>326</sup> para el ligando y la proteína. Se utilizó una grilla de 20×20×20 puntos con un espaciado de 0.375 Å entre los puntos, centrada en el átomo de azufre de la C<sub>P</sub>. Se realizaron 50 corridas con el algoritmo genético Lamarckiano<sup>327</sup>, utilizando una población de 150 individuos y un número máximo de evaluaciones energéticas de 2.5 x 10<sup>6</sup>.

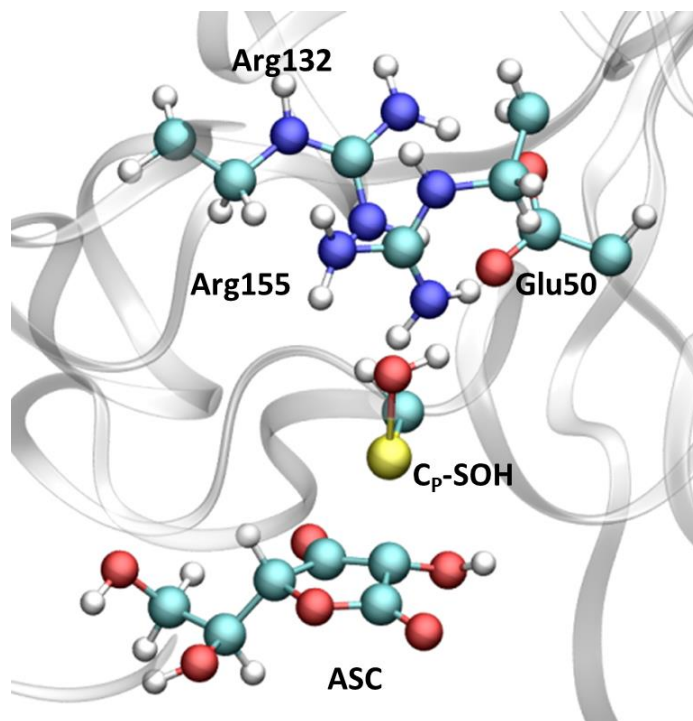
#### 7.5 Dinámica molecular del complejo PRDX6-ASC

El *cluster* con menor energía de unión obtenido a través del *docking* molecular se utilizó como estructura de partida para realizar la simulación de dinámica molecular del complejo PRDX6-ASC. Los parámetros utilizados en la simulación son los mismos que se utilizados son los mismos que se emplearon la PRDX6 sin ligando (sección 7.2) a diferencia de que aquí se realizó con restricciones sobre la coordenada de reacción (la distancia C2<sub>ASC</sub>...S<sup>Y</sup><sub>CP</sub> se restringió a 3 Å con una constante de fuerza de 200 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup>). A partir de los 100 ns de simulación se realizó un análisis de *cluster* para obtener una estructura representativa del complejo PRDX6-ASC que se minimizó energéticamente para posteriormente ser utilizada como punto de partida para modelar la reacción de reducción del C<sub>P</sub>-SOH por el ascorbato.

Se utilizó el módulo *cptraj*<sup>270</sup> de análisis de AMBER para determinar el RMSD (ec. 6.3) , RMSF (ec. 3.1) y enlaces de hidrógeno entre el ascorbato y el sitio de unión en PRDX6, utilizando 3 Å para la distancia de corte dador...aceptor y 135° para el ángulo de corte dador-H...aceptor.

#### 7.6 Modelado ONIOM QM/MM de la reducción de C<sub>P</sub>-SOH por ascorbato

El modelado de la reacción se realizó utilizando el método substractivo QM/MM ONIOM<sup>132</sup> con su esquema de *embedding* mecánico. A través de la inspección visual se seleccionaron como residuos QM, además de la C<sub>P</sub> y el ascorbato, los residuos Arg132, Arg155 y Glu50, ya que se encuentran interaccionando a través de EdH con el grupo hidroxilo del C<sub>P</sub>-SOH y podrían ser importantes en la estabilización del TS y/o protonación del grupo saliente OH<sup>-</sup> (**Figura 7.1**).



**Figura 7.1** Estructura molecular de PRDX6 en complejo con el ASC obtenida a partir de la minimización MM del cluster más poblado de los 100 ns de MD. Se destacan los átomos modelados a nivel QM (61 átomos)

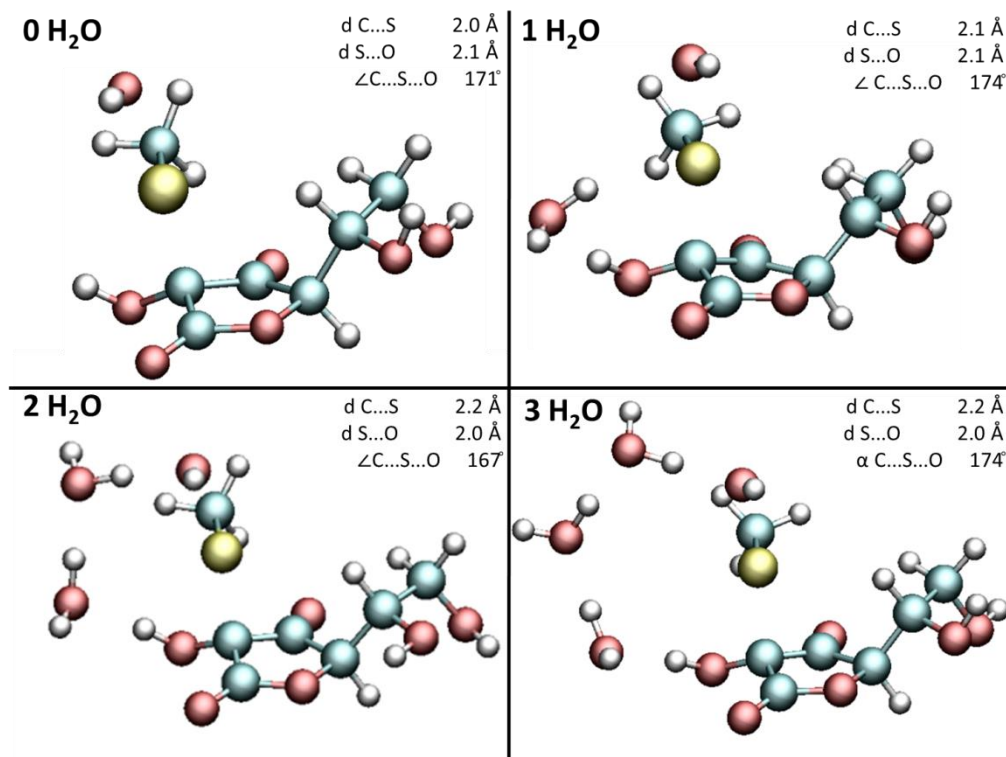
Los átomos QM fueron modelados al nivel  $\omega$ B97XD/6-31+G(d,p)<sup>321,252,253</sup> y el resto de la proteína y moléculas de agua que se encuentran a 12 Å del ASC se modelaron a nivel MM con el campo de fuerza de Amber *ff96*<sup>247</sup> y TIP3P<sup>140</sup>, respectivamente. Se realizaron optimizaciones de geometría parcial para determinar la estructura del TS, a partir de la cual se calculó el IRC (80 puntos hacia reactivos y 80 hacia productos, paso de integración 0.1 Bohr) con el algoritmo *Euler Predictor-Corrector integrator*<sup>258</sup> y posteriormente se optimizaron las estructuras de CI y CF, permitiendo la relajación de los residuos localizados a 8 Å del ASC (42 residuos y 5 moléculas de H<sub>2</sub>O). Una vez obtenidas las estructuras se verificó su naturaleza analizando los valores propios de la *matriz hessiana* al mismo nivel. Todas las estructuras fueron sometidas a un proceso de recálculo de cargas RESP de la zona QM y reoptimización con posterior análisis de los valores propios de la *matriz hessiana*.

Para determinar los WBI y cargas atómicas NPA se completó la zona QM con átomos de hidrógeno en donde se encontraba la frontera QM-MM, y se realizaron cálculos *single-point* en acetonitrilo ( $\epsilon = 35.7$ ) como representativa de sitios activos<sup>107,144</sup> al nivel IEFPCM- $\omega$ B97XD/6-31+G(d,p), utilizando radios atómicos de Bondi<sup>260</sup> para generar las cavidades moleculares y calculando las componentes no electrostáticas de la energía de solvatación (cavitación, dispersión y repulsión).

## Resultados

### 7.1 Modelado de la reducción de ácido metanosulfénico por ASC en solución acuosa

Las estructuras de los TS caracterizados en cada escenario (**Figura 7.2**) muestran cómo las moléculas de agua se orientan para permitir establecer el mayor número de interacciones estabilizantes con el ASC y el C<sub>p</sub>-SOH. En los escenarios de 2 y 3 H<sub>2</sub>O, las interacciones ocurren con el grupo saliente OH<sup>-</sup> y con un grupo alcohol del heterociclo del ASC (unido al C2), mientras que en el escenario de 1 H<sub>2</sub>O las interacciones se producen con el S del CH<sub>3</sub>SOH y el grupo alcohol del heterociclo del ASC. Con respecto a la geometría de cada TS, tal como se aprecia en la **Figura 7.2**, la variación más importante entre los distintos escenarios es en el ángulo  $\angle C_{ASC}\dots O-S_{sulfénico}$ , los escenarios de 1 y 3 H<sub>2</sub>O presentan una mayor linealidad que los de 0 y 2 H<sub>2</sub>O.



**Figura 7.2.** Estructura molecular de los TS a nivel IEFPCM- $\omega$ B97XD/6-31+G(d,p) de cada escenario. Se reportan los parámetros geométricos correspondientes a la coordenada de reacción: distancias  $S_{sulfénico}\dots C_{ASC}$  y  $S_{sulfénico}\dots O_{sulfénico}$  y ángulo  $C_{ASC}\dots O-S_{sulfénico}$ .

En la **Tabla 7.1** se reportan los WBI sobre la coordenada de reacción y las cargas atómicas NPA sobre el carbanión del ASC y sobre el azufre del CH<sub>3</sub>SOH en el TS.

**Tabla 7.1** TS de la reducción del CH<sub>3</sub>SOH por ASC en cuatro escenarios distintos. WBI y cargas atómicas NPA calculados a nivel IEFPCM-MP2// $\omega$ B97XD/6-31+G(d,p) sobre los enlaces y átomos involucrados en la coordenada de reacción (S y O del CH<sub>3</sub>SOH y C del ASC).

Escenario	WBI (u.a.)		Cargas atómicas NPA (u.a.)	
	S <sub>sulfénico</sub> ...C <sub>ASC</sub>	S <sub>sulfénico</sub> ...O <sub>sulfénico</sub>	SOH <sub>sulfénico</sub>	ASC
0 H <sub>2</sub> O	0.649	0.266	-0.76	-0.51
1 H <sub>2</sub> O	0.618	0.281	-0.46	-0.53
2 H <sub>2</sub> O	0.480	0.376	-0.30	-0.65
3 H <sub>2</sub> O	0.448	0.395	-0.28	-0.68

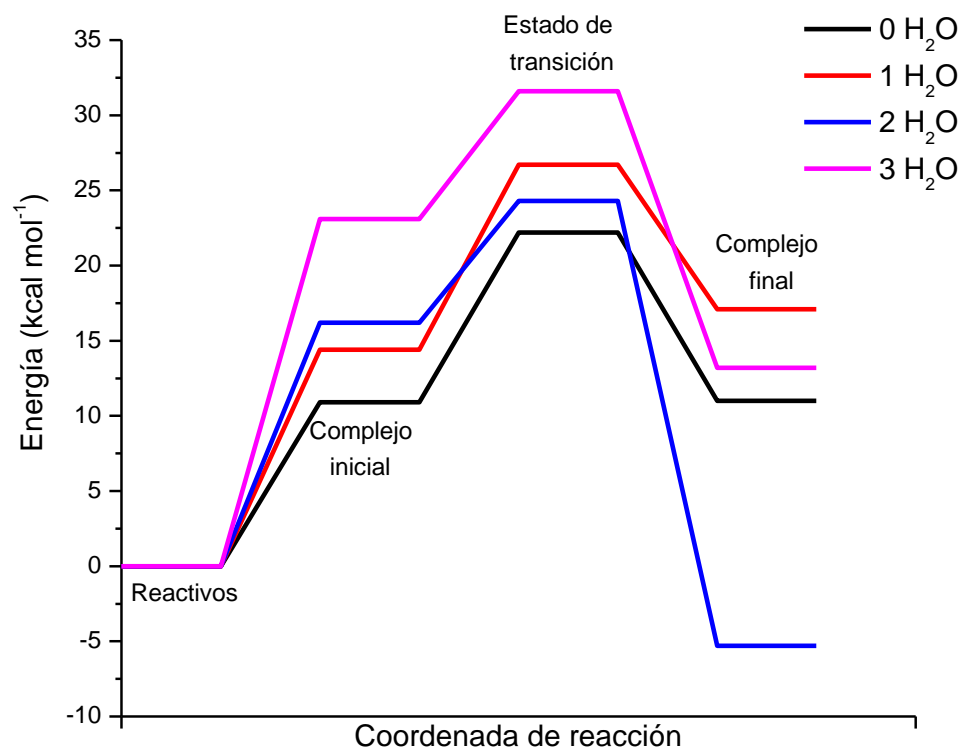
El análisis de WBI indica que el número de moléculas de agua consideradas influye sobre cuán temprano o tardío es el TS correspondiente. A medida que aumenta la cantidad de moléculas de H<sub>2</sub>O explícitas en el modelo, el enlace que debe formarse S<sub>sulfénico</sub>...C<sub>ASC</sub> entre el ASC y el CH<sub>3</sub>SOH tiene menor densidad electrónica, se observa una disminución de 0.2 u.a. en el WBI entre el escenario sin H<sub>2</sub>O y el que incluye 3 moléculas H<sub>2</sub>O. Por otro lado, el enlace que debe romperse S<sub>sulfénico</sub>...O<sub>sulfénico</sub> presenta un incremento de 0.13 u.a. En función de esto, a medida que aumenta el número de moléculas de H<sub>2</sub>O con interacción directa, el TS se vuelve más temprano. La misma tendencia se observa en las cargas atómicas, a medida que aumenta el número de moléculas de H<sub>2</sub>O, la transferencia de carga desde el ASC hacia el átomo de azufre del CH<sub>3</sub>SOH es menor, indicando nuevamente un TS más temprano. En concordancia con esto, a medida que aumenta el número de H<sub>2</sub>O, la carga sobre el átomo de oxígeno del grupo saliente OH<sup>-</sup> se vuelve menos negativa, lo cual coincide con el incremento en los WBI sobre el enlace S<sub>sulfénico</sub>...O<sub>sulfénico</sub> del CH<sub>3</sub>SOH.

Por otro lado, para caracterizar la reacción en los distintos escenarios se determinó la energía libre de activación y de reacción, incluyendo el análisis de la entropía. Los datos obtenidos se reportan en la **Tabla 7.2** y en la **Figura 7.3**.

**Tabla 7.2** Energética relativa<sup>a</sup> (kcal mol<sup>-1</sup>) de la reacción de reducción de ácido metanosulfénico por ASC calculada a 298 K y a nivel IEFPCM-MP2// $\omega$ B97XD/6-31+G(d,p) con correcciones térmicas a nivel IEFPCM- $\omega$ B97XD/6-31+G(d,p).

Escenario	$\Delta G^{Cl\text{-reactivos}}$	$-T\Delta S^{Cl\text{-reactivos}}$	$\Delta G^\ddagger$	$\Delta G_{rxn}$
no H <sub>2</sub> O	10.9	12.5	22.2	11.0
1 H <sub>2</sub> O	14.4	20.6	26.7	17.1
2 H <sub>2</sub> O	16.2	30.5	24.3	-5.3
3 H <sub>2</sub> O	23.1	39.3	31.6	13.2

<sup>a</sup> Tomando como 0 la energía de los reactivos separados al infinito al mismo nivel de cálculo y la cantidad correspondiente de moléculas de H<sub>2</sub>O.



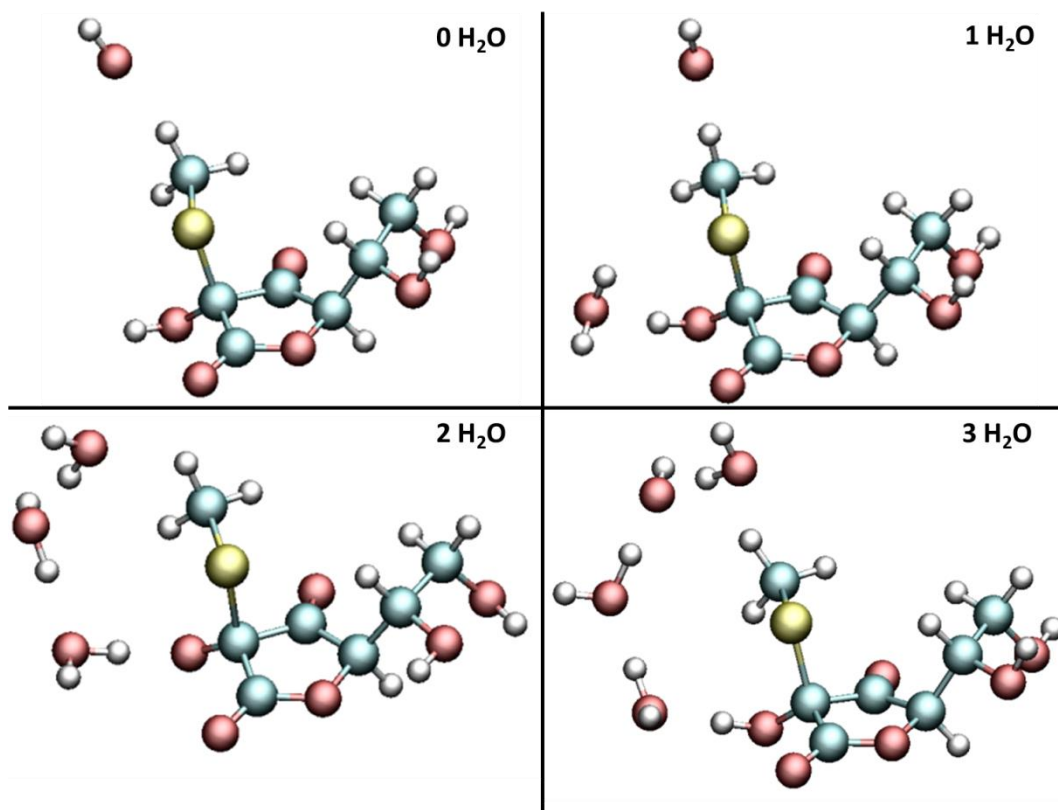
**Figura 7.3** Perfil de energía libre calculado a nivel IEFPCM-MP2// $\omega$ B97XD/6-31+G(d,p) con correcciones térmicas IEFPCM- $\omega$ B97XD/6-31+G(d,p) para la reacción de reducción de ácido metanosulfénico por ascorbato en los cuatro escenarios distintos.

El perfil energético presentado en la **Figura 7.3** muestra diferencias claras entre los distintos escenarios de posible participación de moléculas de H<sub>2</sub>O estudiados. Con respecto a la energía libre del complejo inicial, en todos los casos éste es menos estable que los reactivos separados al infinito (**Tabla 7.2**,  $\Delta G^{\text{Cl-reactivos}}$ ). Dicha desestabilización es mayor a medida que aumenta el número de moléculas de H<sub>2</sub>O en el sistema, producto del efecto entrópico desfavorable (**Tabla 7.2**,  $\Delta S^{\text{Cl-reactivos}}$ ). Con respecto a la cinética de la reacción, se observa que la inclusión de moléculas de H<sub>2</sub>O no disminuye la barrera energética de activación con respecto a lo observado en el escenario de 0 H<sub>2</sub>O, lo que indica que las mismas no tienen una función catalítica (**Tabla 7.2**,  $\Delta G^\ddagger$ ). Al no existir datos experimentales de la constante de velocidad de reducción del sulfénico en un tiol de bajo peso molecular por ascorbato, no es posible comparar los resultados obtenidos y determinar cuál escenario es el modelo más adecuado, pero sí se evidencia que en el contexto enzimático los residuos que sean capaces de establecer interacciones estabilizantes con el TS van a influir en la catálisis, disminuyendo la energía libre de activación.

Con respecto a la energía libre de reacción, todos los escenarios, excepto el de 2 H<sub>2</sub>O, muestran una reacción endergónica. En el escenario de 2 H<sub>2</sub>O, la energía libre de reacción es de -5.3



kcal mol<sup>-1</sup>, esto es debido a que en este escenario, a diferencia del resto, se produce una cadena de transferencia protónica desde un grupo alcohol del ASC hacia las moléculas de H<sub>2</sub>O que termina protonando el grupo saliente OH<sup>-</sup> el cual es una especie muy básica. Este escenario es el único que culmina sin la presencia de un grupo OH<sup>-</sup>, ya que en el escenario de 3 H<sub>2</sub>O si bien el grupo saliente se protona, igualmente se obtiene un complejo final con un OH<sup>-</sup> en la cadena de aguas (**Figura 7.4**)



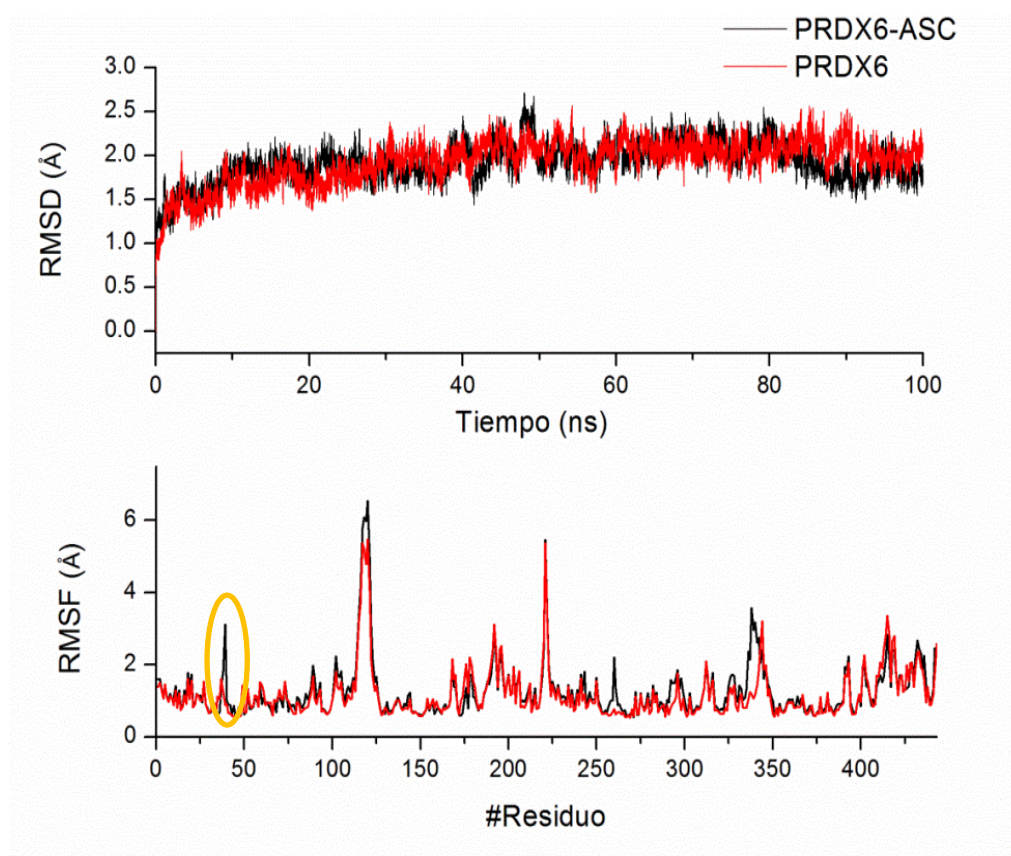
**Figura 7.4** Estructura molecular IEFPCM- $\omega$ B97XD/6-31+G(d,p) de los complejos finales obtenidos en cada escenario.

Los resultados obtenidos mostraron que las moléculas de H<sub>2</sub>O en las disposiciones consideradas no tienen un efecto catalítico en la reducción del metanosulfénico, por el contrario desfavorecen el avance de reacción, aumentando la barrera de activación. Sin embargo, sus propiedades próticas si son importantes, ya que permiten regular la termodinámica de la reacción.

## 7.2 Dinámica molecular de PRDX6 y del complejo PRDX6-ASC

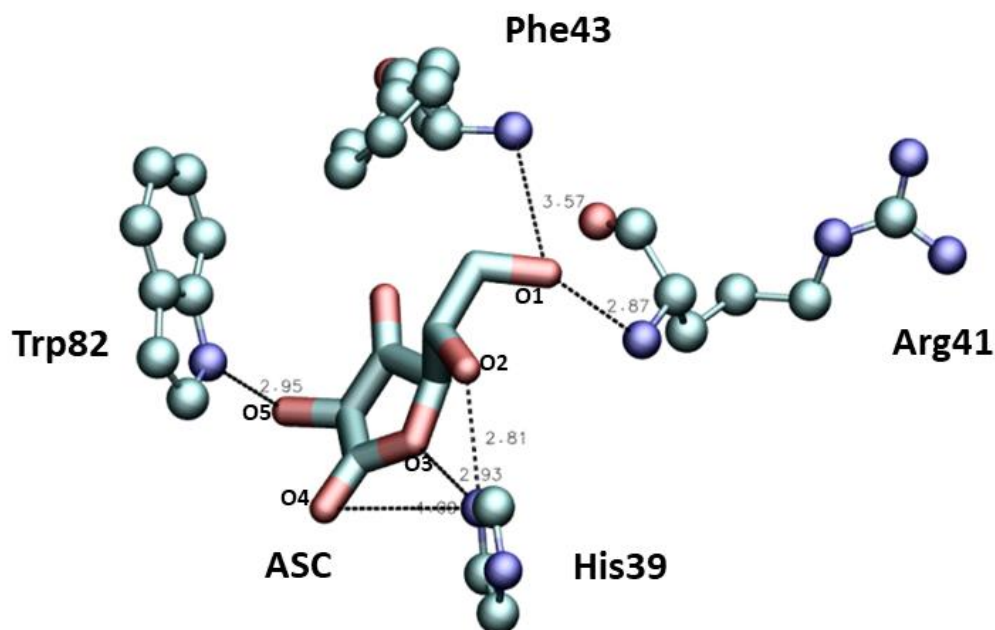
Para verificar la estabilidad estructural, tanto de PRDX6 como del complejo PRDX6-ASC, se analizó el RMSD y RMSF de cada sistema en las simulaciones de 100 ns. Los resultados presentados en **Figura 7.5** indican que ambos sistemas alcanzan la estabilidad estructural aproximadamente a los 20 ns, con un RMSD cercano a los 2 Å, que se mantiene constante en los 100 ns de simulación. Por otro

lado, es evidente que la introducción del ASC en el sitio activo de PRDX6 no genera grandes cambios en su estructura, ya que no hay diferencias significativas entre PRDX6 y el complejo PRDX6-ASC. Con respecto a la fluctuación media de los residuos, se puede observar que en términos generales es similar para ambos sistemas, salvo una diferencia significativa en la región del sitio activo (región marcada con un óvalo amarillo en la **Figura 7.5**). Cuando el ligando se une al sitio activo aumenta la movilidad de los residuos aproximadamente 2 Å, esto puede deberse a que el ASC es una molécula voluminosa y por lo tanto es necesario crear una cavidad en el sitio activo que permita su posicionamiento estable, alterando el entorno inmediato.



**Figura 7.5** RMSD del esqueleto peptídico y RMSF por residuo en los 100 ns de simulación de PRDX6 y del complejo PRDX6-ASC. En amarillo se señala la región del sitio activo del monómero con el ascorbato ligado.

Se analizaron anivel clásico las interacciones de EdH que establece el ASC con el entorno de la proteína para determinar cuáles residuos son importantes en su unión al sitio activo. En la **Figura 7.6** y **Tabla 7.3** se evidencian dichos residuos y las interacciones que establece a través de EdH.



**Figura 7.6** Posicionamiento del ASC en el sitio activo PRDX6 e interacciones de EdH (líneas punteadas en gris) establecidas durante la simulación.

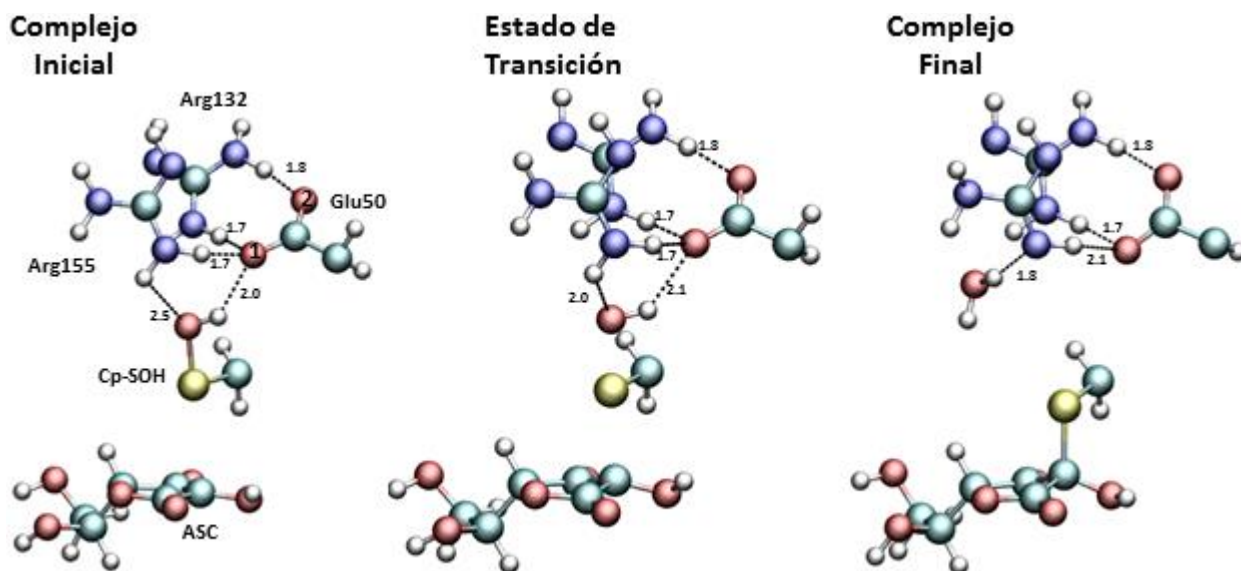
**Tabla 7.3** Interacciones de EdH entre el ASC y los residuos de PRDX6 establecidas durante los 100 ns de simulación

Aceptor EdH	Dador EdH	Ocupación (%)	Distancia (Å)	Ángulo (°)
ASC@O5	Trp82@NH	46	2.9	155
ASC@O4	His39@NH	26	2.8	150
ASC@O3	His39@NH	54	2.8	152
ASC@O2	His39@NH	6	2.9	141
ASC@O1	Arg41@NH	22	2.9	160
ASC@O1	Phe43@NH	11	2.9	160

A partir del análisis de los EdH se puede apreciar que el ASC presenta gran capacidad para actuar como aceptor de EdH en el sitio activo de PRDX6: interactúa con cuatro residuos proteicos, los grupos laterales de la His39 y el Trp82 y los nitrógenos amídicos de los residuos Arg41 y Phe43.

### 7.3 Modelado ONIOM del mecanismo de reducción de C<sub>p</sub>-SOH por ASC en PRDX6

Se determinaron las estructuras de todas las especies involucradas en el primer paso de la reacción entre el ASC y el C<sub>p</sub>-SOH de PRDX6 (**Figura 7.7**).



**Figura 7.7** Estructuras ONIOM( $\omega$ B97XD/6-31+G(d,p):AMBER) del complejo inicial, estado de transición y complejo final de la reacción de reducción del C<sub>p</sub>-SOH en PRDX6 por ascorbato. En punteado se muestran los EdH establecidos en cada sistema.

Tal como se muestra en la **Figura 7.7**, en el complejo inicial de la reacción el ácido cisteinsulfénico se encuentra estableciendo un EdH con el Glu50 y otro con la Arg155. El Glu50, a su vez se encuentra estableciendo tres EdH con los residuos Arg155 y Arg128, cuya fuerza se reporta a través de los índices de enlace de Wiberg en la **Tabla 7.4**. Esta red de EdH no cambia significativamente a medida que la reacción avanza hacia el TS, tal como puede apreciarse en la evolución de las distancias de dichos enlaces (**Figura 7.7**) y en su fuerza (**Tabla 7.4**). Únicamente se ve afectado el EdH entre el grupo saliente OH<sup>-</sup> y la Arg155 que proporciona el protón necesario al grupo saliente OH<sup>-</sup> para formar la molécula de H<sub>2</sub>O a medida que avanza la reacción desde el CI al TS, con una disminución de la distancia de 0.5 Å y un aumento significativo en el WBI (**Tabla 7.4**).

**Tabla 7.4** WBI (u.a.) a nivel IEFPCM- $\omega$ B97XD/6-31+G(d,p) de los EdH presentes a lo largo de la coordenada de reacción de la reducción del C<sub>p</sub>-SOH por ASC.

Aceptor EdH	Dador EdH	Complejo Inicial	Estado de Transición	Complejo Final
Glu50@O1	C <sub>p</sub> @OH	0.023	0.014	0
Glu50@O1	Arg155@NH <sub>2</sub>	0.065	0.063	0.022
Glu50@O1	Arg132@NH <sub>2</sub>	0.084	0.093	0.105
Glu50@O2	Arg132@NH <sub>2</sub>	0.073	0.075	0.076
C <sub>p</sub> @OH	Arg155@NH <sub>2</sub>	0.005	0.032	0.714

El grupo saliente OH<sup>-</sup> tiene una carga de -1 u.a. sobre el átomo de oxígeno en el TS y se encuentra muy cercano a los dos grupos guanidinio de los residuos de Arg155 y Arg132, por lo tanto existe una estabilización diferencial del TS a través de interacciones electrostáticas y del fortalecimiento de un EdH.

Con respecto a la caracterización del estado de transición, este es del tipo temprano ya que tiene un avance del 26 % de la coordenada de reacción, con una distancia C<sub>ASC</sub>...S<sub>sulfénico</sub> de 2.4 Å y S<sub>sulfénico</sub>...O<sub>sulfénico</sub> de 1.9 Å y un ángulo <C<sub>ASC</sub>...S<sub>sulfénico</sub>...O<sub>sulfénico</sub> de 175°, lo cual indica que la reacción es del tipo S<sub>N</sub>2 en referencia al ataque nucleofílico. Un aspecto muy interesante en esta reacción es que la coordenada de reacción no solo involucra la formación del enlace C<sub>ASC</sub>...S<sub>sulfénico</sub> y la ruptura del enlace S<sub>sulfénico</sub>...O<sub>sulfénico</sub>, sino que también involucra la transferencia protónica acoplada desde uno de los grupos NH<sub>2</sub> del guanidino de la Arg155 hacia el grupo saliente OH<sup>-</sup>, para dar como producto final una molécula de agua y arginina neutra (ver complejo final en la **Figura 7.7**). La energía libre de activación es 11.3 kcal mol<sup>-1</sup>, la cual se transforma en una k = 3.2 x 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> si se utiliza la ecuación de Eyring-Polanyi<sup>278</sup>:

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad (6.1)$$

donde k<sub>B</sub> es la constante de Boltzmann, T la temperatura, h la constante de Planck, R la constante de los gases y ΔG<sup>‡</sup> la energía libre de activación. Por otra parte, la energía libre de reacción es -34.2 kcal mol<sup>-1</sup>, indicando que la misma es favorable termodinámicamente.

## Discusión

Si bien en primera instancia se había propuesto que únicamente compuestos con grupo tiol estarían implicados en la reducción de las Prx<sup>212</sup>, en el año 2007 se descubrió que también el ascorbato es capaz de realizar esta función<sup>213</sup>. En dicho artículo, Netto y colaboradores muestran que el ascorbato presenta una constante de especificidad  $k_{\text{cat}}/K_M$  en el orden de  $10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (según se utiliza la  $K_M$  del ascorbato o el  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) para la PRDX6 de rata, valores comparables a los obtenidos cuando se utiliza el sistema reductor GSH<sup>328</sup>. Esto permitió ampliar el panorama de los posibles reductores de las Prx 1-Cys. Más recientemente, un estudio sistemático de la cinética de dicha reacción en diversas Prx (bacterianas, de levaduras y de plantas), también realizado en el laboratorio del Dr. Netto, mostró que el valor de  $k$  se encuentra en el orden de  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y dado que el ascorbato presenta una concentración intracelular en el rango milimolar<sup>329</sup> es esperable que esta reacción tenga relevancia biológica. Un punto interesante de la reducción de sulfénico por ASC es que dicha reacción no ocurre en todos los sulfénicos proteicos. Si bien se ha reportado la reducción de Prx<sup>213</sup> y de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH)<sup>214</sup> (en dónde proponen un intermediario covalente entre la enzima oxidada y el ASC), un estudio de Turell, *et al.*<sup>330</sup> demostró que el ASC no es capaz de reducir el ácido sulfénico de la albúmina. En el plasma hay diversos tioles (cisteína, cisteinglicina, homocisteína y glutatión) capaces de mantener a la albumina reducida, y se encuentran en gran medida formando disulfuros mixtos proteicos<sup>331</sup>. Si bien los valores de  $k$  no son muy grandes ( $2.9 - 55 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), la abundancia de estos tioles hace que su capacidad reductora sea relevante biológicamente<sup>332</sup>.

La reacción de reducción del sulfénico por ASC no se ha modelado, únicamente Carrol, *et al.* propuso un mecanismo en dónde el carbanión del ASC ataca al azufre del sulfénico y se libera  $\text{OH}^-$ <sup>215</sup>. En este capítulo el modelado de ese mecanismo se realizó primero en un sistema modelo en solución de metanosulfénico y luego en el contexto de la enzima PRDX6. Al modelar la reacción en el sistema mínimo en presencia o ausencia de distinto número de moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  se determinó que éstas no tienen una función catalítica, ya que no se observó una disminución en la barrera de activación. Sin embargo, sí ayudan a la protonación del grupo saliente (tal como se observó para el escenario de 2  $\text{H}_2\text{O}$ ) lo cual estabiliza el producto y favorece la termodinámica de la reacción. La reacción más similar que se ha reportado es la sustitución nucleofílica de la dimedona sobre el ácido sulfénico<sup>319</sup>. En este estudio se reportó que la presencia de una o dos moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  cataliza la reacción, mientras que la presencia de tres no favorece la catálisis. Dichos resultados fueron confirmados más recientemente

con un nuevo estudio teórico que muestra la importancia de las moléculas de H<sub>2</sub>O para el correcto posicionamiento de los reactivos y en la transferencia de protones con el grupo saliente OH<sup>-</sup> <sup>318</sup>, al igual que se observó para la reacción con ASC. Otro aspecto importante es que ambos estudios coinciden en que la reacción es del tipo S<sub>N</sub>2 con ataque nucleofílico del carbanión de la dimedona sobre el azufre del sulfénico, lo cual apoya los resultados obtenidos en esta tesis.

Con respecto a la reacción en la enzima, se determinó que el sitio de unión del ASC involucra a los residuos His39, Arg41, Phe43 y Trp82. El Trp82 es un residuo conservado a lo largo de todas las Prx, la His39 está involucrada en la formación del sitio activo y es necesaria para que la enzima pueda ser reducida por ASC<sup>213</sup> y la Phe43 forma parte de la interfaz tipo-A<sup>333</sup>. Existen reportadas en literatura únicamente dos estructuras de Prx 1-Cys con ligandos, una de *Plasmodium yoelii* (PDBID 3TB2)<sup>334</sup> y otra perteneciente a *Vibrio vulnificus* (PDB ID 5K2J), la cual contiene al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unido al sitio activo. En el caso de la primera, la C<sub>p</sub> se encuentra sobreoxidada a ácido sulfínico e interaccionando con una molécula de glicerol y se establecen interacciones con dos residuos catalíticos: C<sub>p</sub> y Arg129. En el caso de la segunda, el ligando es H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e interacciona con los residuos catalíticos Thr45 y Arg124 y con una Ser que ocupa el lugar de la C<sub>p</sub>. Por otro lado, cercano al grupo sulfénico de la C<sub>p</sub> se encuentra la triada Arg132-Glu50-Arg155 estableciendo una red de EdH. Estos residuos son conservados en las subfamilias AhpC-Prx1, Prx6 y AhpE, tienen una función estructural en el sitio activo<sup>333</sup> y se ha propuesto que disminuyen el pK<sub>a</sub> del grupo tiol de la C<sub>p</sub><sup>335</sup>.

Con respecto al mecanismo de reacción, se confirmó que el mismo es de tipo S<sub>N</sub>2, con ataque nucleofílico del carbanión del ascorbato sobre el azufre del sulfénico, acoplado a una transferencia protónica que da como grupo saliente H<sub>2</sub>O. Por lo tanto existe el efecto de catálisis ácida específica en esta reacción, en donde la Arg155 actúa como ácido de Brønsted. Es la primera vez que se observa una catálisis ácida en Prx ya que se han reportado transferencias protónicas en la reacción de peroxidación (Capítulo 3 y ref. <sup>112,157</sup>), pero siempre son post-TS, por lo que no influyen en la barrera energética de la reacción. Por otro lado, la energía libre de activación es consistente con los datos experimentales reportados de k<sup>216</sup>, lo cual valida el modelo utilizado.

# **Capítulo 8: Conclusiones y perspectivas.**



En esta tesis de doctorado se estudiaron a través de un abordaje integrativo teórico y experimental diversas propiedades del sitio activo y etapas del ciclo catalítico de dos peroxirredoxinas (Prx) humanas: PRDX5 (WT y mutantes T44V y R127Q) y PRDX6. En mamíferos, la PRDX5 es la única perteneciente al grupo de las Prx 2-Cys atípicas, mientras que la PRDX6 es la única correspondiente al grupo de las Prx 1-Cys. Los resultados obtenidos en su conjunto, aportan nuevas evidencias sobre aspectos clave relacionados con los mecanismos y cambios conformacionales subyacentes al ciclo catalítico de estas enzimas. El abordaje de problemas enzimáticos desde enfoques experimentales y de modelado computacional en conjunto es cada vez más común en el estudio de la estructura y mecanismos de enzimas, ya que son complementarios y permiten dar respuestas más completas a las preguntas más frecuentes que se realizan los investigadores interesados en la enzimología, e incluso plantear sobre la marcha, en el diálogo estrecho entre ambos enfoques, nuevas preguntas para la investigación integrada.

Mediante el abordaje realizado se logró profundizar, llegando hasta el nivel de detalle electrónico, en el conocimiento del mecanismo de reacción de distintas etapas de los ciclos catalíticos de estas dos enzimas como la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por  $\text{C}_p\text{-S}^-$  en PRDX5 y la reducción del  $\text{C}_p\text{-SOH}$  en PRDX6 por ASC con especial atención dirigida a elucidar la función que cumplen residuos clave de la arquitectura proteica en sus sitios activos; determinar constantes de velocidad de diversas reacciones, como las de resolución y sobreoxidación en PRDX5 y reducción por Trx2; estudiar el efecto estructural y sobre la reactividad de la enzima que provocan mutaciones de residuos conservados del sitio activo en PRDX5 y finalmente estudiar cambios conformacionales asociados a la oxidación de la  $\text{C}_p$  de PRDX5, identificando sus determinantes a nivel molecular y atómico.

Con respecto a los objetivos específicos planteados para esta tesis doctoral, el estudio del mecanismo de reacción de la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por PRDX5<sup>WT</sup> y la mutante PRDX5<sup>T44V</sup> abordado en el Capítulo 3 permitió corroborar que, como ocurre en otras enzimas de esta familia, el mismo es esencialmente del tipo  $\text{S}_{\text{N}}2$  (TS casi lineal, temprano y concertado para el ataque nucleofílico sobre el sustrato). Además, se suma a esta visión mecanística la evidencia de dos transferencias protónicas post-TS con participación directa del residuo Arg127 que llevan a la formación de  $\text{C}_p\text{-SOH}$ . Se determinó que la función del residuo Thr44 es múltiple, e incluye la modulación de la nucleofilia del tiolato de la  $\text{C}_p$  a través de un EdH con éste, la participación en la unión del sustrato actuando como aceptora de EdH desde el OH proximal del mismo (lo que explicaría la especificidad por sustratos hidroperóxidos), responsable de su adecuado posicionamiento para que la reacción tenga lugar en el sitio activo en conformación FF y la estabilización diferencial del TS respecto al complejo

enzima-sustrato. La interacción de la Thr44 con el sustrato actuando como aceptor de EdH, que rota desde su posición inicial para ubicarlo ante la C<sub>p</sub> al momento justo de iniciar la reacción, implica también que a medida que avanza esta fase inicial, la interacción con C<sub>p</sub> se debilita, promoviendo su activación a través de un aumento de su nucleofilia. El residuo Arg127 es por su parte esencial en la estabilización del tiolato de C<sub>p</sub> mostrándose aquí con detalle atómico que su sustitución por una Gln lleva a que el sitio activo pierda su estructura cuando la C<sub>p</sub> se encuentra desprotonada. A la vez, es clave por su efecto electrostático y capacidad de actuar como dadora de EdHs en la estabilización diferencial del TS determinante de la cinética del proceso y en la recuperación de la forma neutra del producto (perdida después del TS debido a la transferencia protónica desde el C<sub>p</sub>-SOH hacia el grupo saliente OH<sup>-</sup> para formar H<sub>2</sub>O) cediendo un protón que neutraliza al C<sub>p</sub>-SO<sup>-</sup>. La formación final del C<sub>p</sub>-SOH, como se ve sucesivamente en el Capítulo 4, es clave para que ocurra la transición hacia la conformación LU y por lo tanto para favorecer la reacción de resolución.

El estudio de la transición FF→LU en PRDX5 permitió determinar que la oxidación a ácido sulfénico de la C<sub>p</sub> modifica la naturaleza de las interacciones débiles del sitio activo que mantienen su arquitectura, que desestabilizaría la conformación FF típica del estado reducido de la enzima y favorecería la transición hacia la conformación LU. Durante 2 μs de simulación cMD y 500 ns de simulación aMD, únicamente se halló a la forma oxidada y neutra de C<sub>p</sub> localizada a una distancia menor a 4 Å de la C<sub>R</sub> en el 0.7 % de las estructuras examinadas en la muestra. Este resultado indicaría que la transición hacia la conformación LU es un evento de baja frecuencia en la evolución dinámica de la estructura de PRDX5, desencadenado únicamente tras la oxidación a esa forma neutra del producto.

El estudio experimental de la reacción de resolución de PRDX5 permitió determinar una constante de velocidad a pH 7.4 para la reacción entre C<sub>p</sub>-SO(H) y C<sub>R</sub>-S(H) de 18.7 s<sup>-1</sup> y valores de pK<sub>a</sub> de 5.9 y 7.4 para las especies C<sub>p</sub>-SO(H) y C<sub>R</sub>-S(H), respectivamente. La comparación entre la constante de velocidad de la reacción en la proteína y la correspondiente a la reacción entre cisteína libre y ácido cisteinsulfénico libre, permitió determinar que la proteína enlentece la reacción de formación del disulfuro C<sub>p</sub>-SS-C<sub>R</sub> con respecto a lo que sucede en solución, además los pK<sub>a</sub>s de C<sub>p</sub>-SOH y C<sub>R</sub>-SH no son los óptimos para que a pH 7.4 haya la mayor cantidad posible del mejor electrófilo (C<sub>p</sub>-SOH) y mejor nucleófilo (C<sub>R</sub>-S<sup>-</sup>) entre las formas neutras y disociadas de este par de reactivos. Estos resultados, junto a los obtenidos con respecto a la transición FF→LU, indican que la reacción de resolución implica un “freno” en el ciclo catalítico, el cual podría ser una ventaja evolutiva relacionada con la función señalizadora del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o un efecto secundario de la evolución de las Prx a partir de las Trx. Por otra parte, mediante simulaciones de dinámica molecular a pH constante, se determinó que el estado de

protonación del residuo Glu143, presente en el entorno de la C<sub>R</sub>, ejerce un efecto significativo sobre su pK<sub>a</sub> y se pudo obtener evidencia para sustentar la idea de que el valor de pK<sub>a</sub> de C<sub>R</sub> se ve afectado por la conformación enzimática (FF o LU). El estudio de la sobreoxidación mostró que la PRDX5 presenta una  $k_{SOX} \approx 170 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , la cual es menor a la reportada para otras Prx y además, en sí misma, no es indicativa de cuan robusta o sensible sea una Prx a la sobreoxidación, ya que esto también depende de las  $k_{res}$  y  $K_{LU}$ .

En cuanto a la reducción de PRDX5 por Trx2, se determinó que los residuos conservados del sitio activo Thr44 y Arg127 no son necesarios para que ocurra dicha reacción. Se determinó que el residuo Lys49, posiblemente involucrado en la interacción Prx-Trx se encuentra más expuesto en las mutantes PRDX5<sup>T44V</sup> y PRDX5<sup>R127Q</sup>, lo que podría explicar el leve aumento en la constante de velocidad determinada para la reducción de las mutantes por Trx2.

Con respecto a la reducción del ácido sulfénico de una Prx 1-Cys por ASC, en primer lugar se avanzó en determinar características del proceso reactivo en un contexto más simple que el de la proteína oxidada a sulfénico, trabajando sobre la reacción en solución acuosa, abordada con un modelo simplificado pero representativo. Allí se pudo determinar que las moléculas de H<sub>2</sub>O del medio que podrían establecer interacciones específicas con el sistema reaccionante no tienen un efecto catalítico sobre la reacción, pero sí son importantes en su termodinámica, asistiendo en la protonación del grupo saliente OH<sup>-</sup> y provocando que la reacción sea exergónica. El mecanismo en PRDX6, presentó una energía libre de activación de 11.3 kcal mol<sup>-1</sup>, la cual es consistente con las constantes de velocidad determinadas experimentalmente. A diferencia de todos los mecanismos elucidados hasta el momento en contextos proteicos de distintas Prx, en esta reacción se determinó una estructura para el TS que indica que en forma concertada al ataque nucleofílico del ASC sobre el C<sub>p</sub>-SOH ocurriría también catálisis ácida específica por parte de residuos del entorno, que involucra específicamente una transferencia protónica desde la Arg155 y la participación en su posicionamiento de los residuos Arg132 y Glu50, por lo tanto la protonación del grupo saliente OH<sup>-</sup> inicia ya desde el TS de la reacción, lo cual es algo novedoso para este tipo de sistemas.

En su conjunto, los resultados obtenidos en el marco de esta tesis de posgrado aportan nuevas evidencias sobre las funciones específicas de ciertos residuos conservados en las reacciones de peroxidación y reducción, los determinantes moleculares que disparan la transición FF→LU, y finalmente cuales podrían ser las bases de la señalización por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En cuanto a la continuidad de este trabajo a futuro, en relación con los resultados presentados y discutidos en el Capítulo 5, se comenzó a estudiar el mecanismo de la formación del enlace disulfuro entre C<sub>p</sub>-SOH y C<sub>r</sub>-SH en PRDX5. Se realizaron varias exploraciones con optimizaciones QM/MM con ONIOM, o con QM/MM aditivo utilizando el programa ChemShell 3.4<sup>336</sup> y con simulaciones de dinámica molecular QM/MM utilizando el programa Lio<sup>337</sup>. Hasta el momento, dada la complejidad del proceso que acopla el cambio conformacional con la transformación química no se ha podido resolver aun el mecanismo, pero sí se ha logrado obtener una simulación sesgada de Jarzynski con una barrera energética compatible con lo que se deriva de los datos experimentales y se está intentando obtener un TS a partir de una estructura inicial extraída de esa simulación que reúne las características estructurales esperadas para este proceso. Por otro lado, para explorar la función del residuo Glu143 en la desprotonación de C<sub>r</sub> de PRDX5 mediante mutantes, se logró obtener los plásmidos con las inserciones de las mutantes E143A y E143Q pero la expresión y purificación de las proteínas no se ha concretado con éxito hasta el momento.

En cuanto a las perspectivas del trabajo realizado con PRDX6, durante el último año de los estudios doctorales co-dirigí junto con la Dra. Laura Coitiño una tesina de graduación de la licenciatura en bioquímica en donde se estudió entre otras cosas el efecto de la glicación de la Arg132 del sitio activo en la estructura y reactividad enzimática<sup>338</sup>. Los resultados obtenidos permitieron determinar que la glicación afecta notoriamente el pK<sub>a</sub> de C<sub>p</sub>, lo cual compromete la disponibilidad de tiolato, sin tener un efecto significativo en la estructura proteica. Se espera poder madurar posteriormente a la conclusión de esta tesis en esta línea de investigación.

# Referencias

- (1) Sies, H., and Jones, D. (2007) Oxidative Stress, in *Encyclopedia of Stress* (Fink, G., Ed.) 2nd ed., pp 45–48. Academic Press, New York.
- (2) Sies, H. (1985) Oxidative Stress: Introductory Remarks, in *Oxidative Stress* (Sies, H., Ed.), pp 1–8. Academic Press, London.
- (3) Sies, H. (1986) Biochemistry of Oxidative Stress. *Angew. Chemie* 25, 1058–1071.
- (4) Wruck, C. J., Fragoulis, A., Gurzynski, A., Brandenburg, L.-O., Kan, Y. W., Chan, K., Hassenpflug, J., Freitag-Wolf, S., Varoga, D., Lippross, S., and Pufe, T. (2011) Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 844–850.
- (5) Bowler, R. P., and Crapo, J. D. (2002) Oxidative stress in allergic respiratory diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110, 349–356.
- (6) Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I., and Tschopp, J. (2010) Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 11, 136–140.
- (7) Dhalla, N. S., Temsah, R. M., and Netticadan, T. (2000) Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J. Hypertens.* 18, 655–673.
- (8) Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., and Mahajan, R. T. (2009) Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr. Neuropharmacol.* 7, 65–74.
- (9) Babizhayev, M. A., Stokov, I. A., Nosikov, V. V, Savel'yeva, E. L., Sitnikov, V. F., Yegorov, Y. E., and Lankin, V. Z. (2015) The Role of Oxidative Stress in Diabetic Neuropathy: Generation of Free Radical Species in the Glycation Reaction and Gene Polymorphisms Encoding Antioxidant Enzymes to Genetic Susceptibility to Diabetic Neuropathy in Population of Type I Diabetic Patient. *Cell Biochem. Biophys.* 71, 1425–1443.
- (10) Sosa, V., Moline, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., and LLeonart, M. E. (2013) Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res. Rev.* 12, 376–390.
- (11) Ignarro, L. J. (1990) Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 535–560.
- (12) Wood, P. M. (1988) The potential diagram for oxygen at pH 7. *Biochem. J.* 253, 287–289.
- (13) Koppenol, W. H. (1993) The centennial of the Fenton reaction. *Free Radic. Biol. Med.* 15, 645–651.
- (14) Ford, E., Hughes, M. N., and Wardman, P. (2002) Kinetics of the reactions of nitrogen dioxide with glutathione, cysteine, and uric acid at physiological pH. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 1314–1323.
- (15) Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos, C. C., and De Menezes, S. L. (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 841–859.

- (16) Ferrer-Sueta, G., and Radi, R. (2009) Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem. Biol.* *4*, 161–177.
- (17) Trujillo, M., Alvarez, B., and Radi, R. (2016) One- and two-electron oxidation of thiols: mechanisms, kinetics and biological fates. *Free Radic. Res.* *50*, 150–171.
- (18) Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996) Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* *333*, 49–58.
- (19) Squadrito, G. L., and Pryor, W. A. (2002) Mapping the Reaction of Peroxynitrite with CO<sub>2</sub>: Energetics, Reactive Species, and Biological Implications. *Chem. Res. Toxicol.* *15*, 885–895.
- (20) Gray, B., and Carmichael, A. J. (1992) Kinetics of superoxide scavenging by dismutase enzymes and manganese mimics determined by electron spin resonance. *Biochem. J.* *281*, 795–802.
- (21) Marinho, H. S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H., and Antunes, F. (2014) Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol.* *2*, 535–562.
- (22) Brand, M. D. (2016) Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* *100*, 14–31.
- (23) Go, Y.-M., Chandler, J. D., and Jones, D. P. (2015) The cysteine proteome. *Free Radic. Biol. Med.* *84*, 227–245.
- (24) Sies, H., and Chance, B. (2001) The steady state level of catalase compound I in isolated hemoglobin-free perfused rat liver. *FEBS Lett.* *11*, 172–176.
- (25) Stocker, S., Van Laer, K., Mijuskovic, A., and Dick, T. P. (2018) The Conundrum of Hydrogen Peroxide Signaling and the Emerging Role of Peroxiredoxins as Redox Relay Hubs. *Antioxid. Redox Signal.* *28*, 558–573.
- (26) Wood, Z. A., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2003) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* *300*, 650–653.
- (27) Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., and Toledano, M. B. (2002) A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* *111*, 471–481.
- (28) Sies, H. (2017) Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* *11*, 613–619.
- (29) Babior, B. M. (1978) Oxygen-Dependent Microbial Killing by Phagocytes. *N. Engl. J. Med.* *298*, 659–668.
- (30) Segal, A. W., and Coade, S. B. (1978) Kinetics of oxygen consumption by phagocytosing human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *84*, 611–617.
- (31) Itou, T., Iida, T., and Kawatsut, H. (1996) Kinetics of oxygen metabolism during respiratory burst in Japanese eel neutrophils. *Dev. Comp. Immunol.* *20*, 323–330.
- (32) Klebanoff, S. J. (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* *77*, 598–625.

- (33) Jiang, Q., Griffin, D. A., Barofsky, D. F., and Hurst, J. K. (1997) Intraphagosomal chlorination dynamics and yields determined using unique fluorescent bacterial mimics. *Chem. Res. Toxicol.* *10*, 1080–1089.
- (34) Kamata, H., Honda, S.-I., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., and Karin, M. (2005) Reactive oxygen species promote TNF $\alpha$ -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* *120*, 649–661.
- (35) Woo, H. A., Kang, S. W., Kim, H. K., Yang, K.-S., Chae, H. Z., and Rhee, S. G. (2003) Reversible oxidation of the active site cysteine of peroxiredoxins to cysteine sulfinic acid. Immunoblot detection with antibodies specific for the hyperoxidized cysteine-containing sequence. *J. Biol. Chem.* *278*, 47361–47364.
- (36) Caltagirone, A., Weiss, G., and Pantopoulos, K. (2001) Modulation of cellular iron metabolism by hydrogen peroxide. Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the expression and function of iron-responsive element-containing mRNAs in B6 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *276*, 19738–19745.
- (37) Brazzolotto, X., Gaillard, J., Pantopoulos, K., Hentze, M. W., and Moulis, J. M. (1999) Human cytoplasmic aconitase (Iron regulatory protein 1) is converted into its [3Fe-4S] form by hydrogen peroxide in vitro but is not activated for iron-responsive element binding. *J. Biol. Chem.* *274*, 21625–21630.
- (38) Pantopoulos, K., and Hentze, M. W. (1995) Rapid responses to oxidative stress mediated by iron regulatory protein. *EMBO J.* *14*, 2917–2924.
- (39) Claiborne, A., Miller, H., Parsonage, D., and Ross, R. P. (1993) Protein-sulfenic acid stabilization and function in enzyme catalysis and gene regulation. *FASEB J.* *7*, 1483–1490.
- (40) Roos, G., and Messens, J. (2011) Protein sulfenic acid formation: from cellular damage to redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* *51*, 314–326.
- (41) Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2008) Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* *45*, 549–561.
- (42) Vieceli Dalla Sega, F., Zambonin, L., Fiorentini, D., Rizzo, B., Caliceti, C., Landi, L., Hrelia, S., and Prata, C. (2014) Specific aquaporins facilitate Nox-produced hydrogen peroxide transport through plasma membrane in leukaemia cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1843*, 806–814.
- (43) Winterbourn, C. C. (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* *4*, 278–286.
- (44) Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine* 5th ed. Oxford Scholarship Online, Oxford.
- (45) Rose, R. C., and Bode, A. M. (1993) Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *FASEB J.* *7*, 1135–1142.
- (46) Niki, E. (1987) Interaction of ascorbate and alpha-tocopherol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *498*, 186–199.
- (47) Winterbourn, C. C. (1993) Superoxide as an intracellular radical sink. *Free Radic. Biol. Med.* *14*, 85–90.

- (48) O'Neill, P. (1983) Pulse radiolytic study of the interaction of thiols and ascorbate with OH adducts of dGMP and dG: implications for DNA repair processes. *Radiat. Res.* 96, 198–210.
- (49) Wardman, P., and von Sonntag, C. (1995) Kinetic factors that control the fate of thiol radicals in cells. *Methods Enzymol.* 251, 31–45.
- (50) Zelko, I. N., Mariani, T. J., and Folz, R. J. (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 337–349.
- (51) Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (1983) Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* 306, 284.
- (52) Switala, J., and Loewen, P. C. (2002) Diversity of properties among catalases. *Arch. Biochem. Biophys.* 401, 145–154.
- (53) Brigelius-Flohé, R., and Maiorino, M. (2013) Glutathione peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830, 3289–3303.
- (54) Collet, J.-F., and Messens, J. (2010) Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 1205–1216.
- (55) Mashamaite, L. N., Rohwer, J. M., and Pillay, C. S. (2015) The glutaredoxin mono- and di-thiol mechanisms for deglutathionylation are functionally equivalent: implications for redox systems biology. *Biosci. Rep.* 35, e00173.
- (56) Wood, Z. A., Schröder, E., Harris, J. R., and Poole, L. B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 32–40.
- (57) Sohling, B., Parther, T., Rucknagel, K. P., Wagner, M. A., and Andreesen, J. R. (2001) A selenocysteine-containing peroxiredoxin from the strictly anaerobic organism *Eubacterium acidaminophilum*. *Biol. Chem.* 382, 979–986.
- (58) Kim, K., Kim, I. H., Lee, K. Y., Rhee, S. G., and Stadtman, E. R. (1988) The isolation and purification of a specific “protector” protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O<sub>2</sub> mixed-function oxidation system. *J. Biol. Chem.* 263, 4704–4711.
- (59) Chae, H. Z., Robison, K., Poole, L. B., Church, G., Storz, G., and Rhee, S. G. (1994) Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91, 7017–7021.
- (60) Ellis, H. R., and Poole, L. B. (1997) Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry* 36, 13349–13356.
- (61) Wood, Z. A., Poole, L. B., Hantgan, R. R., and Karplus, P. A. (2002) Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry* 41, 5493–5504.
- (62) Reeves, S. A., Parsonage, D., Nelson, K. J., and Poole, L. B. (2011) Kinetic and Thermodynamic Features Reveal That *E. coli* BCP Is an Unusually Versatile Peroxiredoxin. *Biochemistry* 50, 8970–8981.



- (63) Manta, B., Hugo, M., Ortiz, C., Ferrer-Sueta, G., Trujillo, M., and Denicola, A. (2009) The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. *Arch. Biochem. Biophys.* *484*, 146–154.
- (64) Poole, L. B. (2007) The catalytic mechanism of peroxiredoxins. *Subcell. Biochem.* *44*, 61–81.
- (65) Karplus, P. A., and Hall, A. (2007) Structural survey of the peroxiredoxins. *Subcell. Biochem.* *44*, 41–60.
- (66) Pedrajas, J. R., Miranda-Vizuet, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J. A., and Spyrou, G. (2000) Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* *275*, 16296–16301.
- (67) Lee, S. P., Hwang, Y. S., Kim, Y. J., Kwon, K. S., Kim, H. J., Kim, K., and Chae, H. Z. (2001) Cyclophilin a binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* *276*, 29826–29832.
- (68) Peshenko, I. V, and Shichi, H. (2001) Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* *31*, 292–303.
- (69) Fisher, A. B. (2011) Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A(2) activities. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 831–844.
- (70) Chae, H. Z., Uhm, T. B., and Rhee, S. G. (1994) Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 7022–7026.
- (71) Rhee, S. G., Kang, S. W., Chang, T. S., Jeong, W., and Kim, K. (2001) Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* *52*, 35–41.
- (72) Hanschmann, E.-M., Lonn, M. E., Schutte, L. D., Funke, M., Godoy, J. R., Eitner, S., Hudemann, C., and Lillig, C. H. (2010) Both thioredoxin 2 and glutaredoxin 2 contribute to the reduction of the mitochondrial 2-Cys peroxiredoxin Prx3. *J. Biol. Chem.* *285*, 40699–40705.
- (73) Soito, L., Williamson, C., Knutson, S. T., Fetrow, J. S., Poole, L. B., and Nelson, K. J. (2011) PREX: PeroxiRedoxin classification indEX, a database of subfamily assignments across the diverse peroxiredoxin family. *Nucleic Acids Res.* *39*, D332-7.
- (74) Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., and Sayers, E. W. (2013) GenBank. *Nucleic Acids Res.* *41*, D36-42.
- (75) Harper, A. F., Leuthaeuser, J. B., Babbitt, P. C., Morris, J. H., Ferrin, T. E., Poole, L. B., and Fetrow, J. S. (2017) An Atlas of Peroxiredoxins Created Using an Active Site Profile-Based Approach to Functionally Relevant Clustering of Proteins. *PLOS Comput. Biol.* *13*, e1005284.
- (76) Poole, L. B., and Nelson, K. J. (2016) Distribution and Features of the Six Classes of Peroxiredoxins. *Mol. Cells* *39*, 53–59.
- (77) Liao, S.-J., Yang, C.-Y., Chin, K.-H., Wang, A. H.-J., and Chou, S.-H. (2009) Insights into the alkyl peroxide reduction pathway of *Xanthomonas campestris* bacterioferritin comigratory protein from the trapped intermediate-ligand complex structures. *J. Mol. Biol.* *390*, 951–966.
- (78) Declercq, J.-P., Evrard, C., Clippe, A., Stricht, D. Vander, Bernard, A., and Knoops, B. (2001) Crystal

structure of human peroxiredoxin 5, a novel type of mammalian peroxiredoxin at 1.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 311, 751–759.

(79) Deponte, M., and Becker, K. (2005) Biochemical characterization of *Toxoplasma gondii* 1-Cys peroxiredoxin 2 with mechanistic similarities to typical 2-Cys Prx. *Mol. Biochem. Parasitol.* 140, 87–96.

(80) Berman, H. M., Battistuz, T., Bhat, T. N., Bluhm, W. F., Bourne, P. E., Burkhardt, K., Feng, Z., Gilliland, G. L., Iype, L., Jain, S., Fagan, P., Marvin, J., Padilla, D., Ravichandran, V., Schneider, B., Thanki, N., Weissig, H., Westbrook, J. D., and Zardecki, C. (2002) The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 58, 899–907.

(81) Copley, S. D., Novak, W. R. P., and Babbitt, P. C. (2004) Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry* 43, 13981–13995.

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

(83) Smeets, A., Evrard, C., Landtmeters, M., Marchand, C., Knoop, B., and Declercq, J.-P. (2005) Crystal structures of oxidized and reduced forms of human mitochondrial thioredoxin 2. *Protein Sci.* 14, 2610–2621.

(84) Cao, Z., Tavender, T. J., Roszak, A. W., Cogdell, R. J., and Bulleid, N. J. (2011) Crystal structure of reduced and of oxidized peroxiredoxin IV enzyme reveals a stable oxidized decamer and a non-disulfide-bonded intermediate in the catalytic cycle. *J. Biol. Chem.* 286, 42257–42266.

(85) Perkins, A., Nelson, K. J., Parsonage, D., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2015) Peroxiredoxins: Guardians Against Oxidative Stress and Modulators of Peroxide Signaling. *Trends Biochem. Sci.* 40, 435–445.

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

(87) Cao, Z., Bhella, D., and Lindsay, J. G. (2007) Reconstitution of the mitochondrial PrxIII antioxidant defence pathway: general properties and factors affecting PrxIII activity and oligomeric state. *J. Mol. Biol.* 372, 1022–1033.

(88) König, J., Lotte, K., Plessow, R., Brockhinke, A., Baier, M., and Dietz, K.-J. (2003) Reaction mechanism of plant 2-Cys peroxiredoxin. Role of the C terminus and the quaternary structure. *J. Biol. Chem.* 278, 24409–24420.

(89) Seidel, T., Seefeldt, B., Sauer, M., and Dietz, K.-J. (2010) In vivo analysis of the 2-Cys peroxiredoxin oligomeric state by two-step FRET. *J. Biotechnol.* 149, 272–279.

(90) Phalen, T. J., Weirather, K., Deming, P. B., Anathy, V., Howe, A. K., van der Vliet, A., Jönsson, T. J., Poole, L. B., and Heintz, N. H. (2006) Oxidation state governs structural transitions in peroxiredoxin II that correlate with cell cycle arrest and recovery. *J. Cell Biol.* 175, 779–789.

(91) Lim, J. C., Choi, H.-I., Park, Y. S., Nam, H. W., Woo, H. A., Kwon, K.-S., Kim, Y. S., Rhee, S. G., Kim, K., and Chae, H. Z. (2008) Irreversible oxidation of the active-site cysteine of peroxiredoxin to cysteine sulfonic acid for enhanced molecular chaperone activity. *J. Biol. Chem.* 283, 28873–28880.

(92) Parsonage, D., Youngblood, D. S., Sarma, G. N., Wood, Z. A., Karplus, P. A., and Poole, L. B. (2005)

Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Biochemistry* 44, 10583–10592.

(93) König, J., Galliardt, H., Jütte, P., Schäper, S., Dittmann, L., and Dietz, K.-J. (2013) The conformational bases for the two functionalities of 2-cysteine peroxiredoxins as peroxidase and chaperone. *J. Exp. Bot.* 64, 3483–3497.

(94) Yewdall, N. A., Peskin, A. V., Hampton, M. B., Goldstone, D. C., Pearce, F. G., and Gerrard, J. A. (2018) Quaternary structure influences the peroxidase activity of peroxiredoxin 3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 497, 558–563.

(95) Barranco-Medina, S., Kakorin, S., Lazaro, J. J., and Dietz, K.-J. (2008) Thermodynamics of the dimer-decamer transition of reduced human and plant 2-cys peroxiredoxin. *Biochemistry* 47, 7196–7204.

(96) Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., Thomson, L., Flohe, L., and Radi, R. (2007) Kinetics of peroxiredoxins and their role in the decomposition of peroxynitrite. *Subcell. Biochem.* 44, 83–113.

(97) Winterbourn, C. C., and Metodiewa, D. (1999) Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 322–328.

(98) Barton, J. P., Packer, J. E., and Sims, R. J. (1973) Kinetics of the reaction of hydrogen peroxide with cysteine and cysteamine. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1547–1549.

(99) Hill, B. G., Reily, C., Oh, J.-Y., Johnson, M. S., and Landar, A. (2009) Methods for the determination and quantification of the reactive thiol proteome. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 675–683.

(100) Ferrer-Sueta, G., Manta, B., Botti, H., Radi, R., Trujillo, M., and Denicola, A. (2011) Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 434–450.

(101) Whitesides, G. M., Lilburn, J. E., and Szajewski, R. P. (1977) Rates of thiol-disulfide interchange reactions between mono- and dithiols and Ellman's reagent. *J. Org. Chem.* 42, 332–338.

(102) Nelson, K. J., Parsonage, D., Hall, A., Karplus, P. A., and Poole, L. B. (2008) Cysteine pK(a) values for the bacterial peroxiredoxin AhpC. *Biochemistry* 47, 12860–12868.

(103) Ogusucu, R., Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L. E. S., and Augusto, O. (2007) Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 326–334.

(104) Sardi, F., Manta, B., Portillo-Ledesma, S., Knoops, B., Comini, M. A., and Ferrer-Sueta, G. (2013) Determination of acidity and nucleophilicity in thiols by reaction with monobromobimane and fluorescence detection. *Anal. Biochem.* 435, 74–82.

(105) Hugo, M., Turell, L., Manta, B., Botti, H., Monteiro, G., Netto, L. E. S., Alvarez, B., Radi, R., and Trujillo, M. (2009) Thiol and sulfenic acid oxidation of AhpE, the one-cysteine peroxiredoxin from *Mycobacterium tuberculosis*: kinetics, acidity constants, and conformational dynamics. *Biochemistry* 48, 9416–9426.

(106) Harris, T. K., and Turner, G. J. (2002) Structural basis of perturbed pKa values of catalytic groups in enzyme active sites. *IUBMB Life* 53, 85–98.

- (107) Portillo-Ledesma, S., Sardi, F., Manta, B., Tourn, M. V., Clippe, A., Knoops, B., Alvarez, B., Coitiño, E. L., and Ferrer-Sueta, G. (2014) Deconstructing the catalytic efficiency of peroxiredoxin-5 peroxidatic cysteine. *Biochemistry* 53, 6113–6125.
- (108) Pedre, B., van Bergen, L. A. H., Palló, A., Rosado, L. A., Dufe, V. T., Molle, I. Van, Wahni, K., Erdogan, H., Alonso, M., Proft, F. De, and Messens, J. (2016) The active site architecture in peroxiredoxins: a case study on Mycobacterium tuberculosis AhpE. *Chem. Commun.* 52, 10293–10296.
- (109) Roos, G., Foloppe, N., and Messens, J. (2013) Understanding the pK(a) of redox cysteines: the key role of hydrogen bonding. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 94–127.
- (110) van Bergen, L. A. H., Alonso, M., Palló, A., Nilsson, L., De Proft, F., and Messens, J. (2016) Revisiting sulfur H-bonds in proteins: The example of peroxiredoxin AhpE. *Sci. Rep.* 6.
- (111) Hall, A., Parsonage, D., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2010) Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on transition-state stabilization. *J. Mol. Biol.* 402, 194–209.
- (112) Zeida, A., Reyes, A. M., Lebrero, M. C. G., Radi, R., Trujillo, M., and Estrin, D. A. D. A. (2014) The extraordinary catalytic ability of peroxiredoxins: a combined experimental and QM/MM study on the fast thiol oxidation step. *Chem. Commun. (Camb).* 50, 10070–10073.
- (113) Kortemme, T., and Creighton, T. E. (1995) Ionisation of cysteine residues at the termini of model alpha-helical peptides. Relevance to unusual thiol pKa values in proteins of the thioredoxin family. *J. Mol. Biol.* 253, 799–812.
- (114) Sengupta, D., Behera, R. N., Smith, J. C., and Ullmann, G. M. (2005) The alpha helix dipole: screened out? *Structure* 13, 849–855.
- (115) Rullmann, J. A., Bellido, M. N., and van Duijnen, P. T. (1989) The active site of papain. All-atom study of interactions with protein matrix and solvent. *J. Mol. Biol.* 206, 101–118.
- (116) Aqvist, J., Luecke, H., Quioco, F. A., and Warshel, A. (1991) Dipoles localized at helix termini of proteins stabilize charges. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 2026–2030.
- (117) Bonanata, J., Turell, L., Antmann, L., Ferrer-Sueta, G., Botasini, S., Méndez, E., Alvarez, B., and Coitiño, E. L. (2017) The thiol of human serum albumin: Acidity, microenvironment and mechanistic insights on its oxidation to sulfenic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 108, 952–962.
- (118) Tomasi, J., Mennucci, B., and Cammi, R. (2005) Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.* 105, 2999–3093.
- (119) Cramer, C. J. (2002) Essentials of Computational Chemistry Theories and Models (Wiley & Sons, Ltd., J., Ed.).
- (120) Náray-Szabó, G., and Warshel, A. (Eds.). (1997) Computational Approaches to Biochemical Reactivity.
- (121) Groenhof, G. (2013) Introduction to QM/MM simulations. *Methods Mol. Biol.* 924, 43–66.
- (122) Bach, R. D., Su, M.-D., and Schlegel, H. B. (1994) Oxidation of Amines and Sulfides with Hydrogen Peroxide and Alkyl Hydrogen Peroxide. The Nature of the Oxygen-Transfer Step. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 5379–5391.

- (123) Jensen, F. (2007) Introduction to Computational Chemistry (Wiley & Sons, Ltd., J., Ed.) 2nd ed.
- (124) Frisch, M. J., Head-Gordon, M., and Pople, J. A. (1990) A direct MP2 gradient method. *Chem. Phys. Lett.* *166*, 275–280.
- (125) Pople, J. A., Head-Gordon, M., and Raghavachari, K. (1987) Quadratic configuration interaction. A general technique for determining electron correlation energies. *J. Chem. Phys.* *87*, 5968–5975.
- (126) Cardey, B., and Enescu, M. (2005) A computational study of thiolate and selenolate oxidation by hydrogen peroxide. *ChemPhysChem* *6*, 1175–1180.
- (127) Fukui, K. (1981) The path of chemical reactions - the IRC approach. *Acc. Chem. Res.* *14*, 363–368.
- (128) Cardey, B., and Enescu, M. (2007) Selenocysteine versus Cysteine Reactivity : A Theoretical Study of Their Oxidation by Hydrogen Peroxide. *J. Phys. Chem. A* *3*, 673–678.
- (129) Tomasi, J., Mennucci, B., Cammi, R., Jacopo Tomasi, \*,†, Benedetta Mennucci, † and, and Cammi‡, R. (2005) Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.* *105*, 2999–3093.
- (130) Humbel, S., Sieber, S., and Morokuma, K. (1996) The IMOMO method: Integration of different levels of molecular orbital approximations for geometry optimization of large systems: Test for n-butane conformation and SN2 reaction: RCl+Cl<sup>-</sup>. *J. Chem. Phys.* *105*, 1959–1967.
- (131) Coitiño, E. L., Truhlar, D. G., and Morokuma, K. (1996) Correlated capped subsystem calculations as a way to include electron correlation locally: a test for substituent effects on bond energies. *Chem. Phys. Lett.* *259*, 159–164.
- (132) Dapprich, S., Komáromi, I., Byun, K. S., Morokuma, K., and Frisch, M. J. (1999) A new ONIOM implementation in Gaussian98. Part I. The calculation of energies, gradients, vibrational frequencies and electric field derivatives. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* *461–462*, 1–21.
- (133) Bayse, C. A. (2011) Transition states for cysteine redox processes modeled by DFT and solvent-assisted proton exchange. *Org. Biomol. Chem.* *9*, 4748–4751.
- (134) Tran, F., Blaha, P., Schwarz, K., and Novák, P. (2006) Hybrid exchange-correlation energy functionals for strongly correlated electrons: Applications to transition-metal monoxides. *Phys. Rev. B* *74*, 155108.
- (135) Andreas, K. (2011) The COSMO and COSMO-RS solvation models. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* *1*, 699–709.
- (136) Adamo, C., and Barone, V. (1999) Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model. *J. Chem. Phys.* *110*, 6158–6170.
- (137) Lee, C., Yang, W., and Parr, R. G. (1988) Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* *37*, 785–789.
- (138) Becke, A. D. (1993) A new mixing of Hartree–Fock and local density-functional theories. *J. Chem. Phys.* *98*, 1372.
- (139) González Lebrero, M. C., Bikiel, D. E., Elola, M. D., Estrin, D. A., and Roitberg, A. E. (2002) Solvent-induced symmetry breaking of nitrate ion in aqueous clusters: A quantum-classical simulation study. *J.*

*Chem. Phys.* **117**, 2718–2725.

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

(141) Shankar, K., M., R. J., Djamal, B., H., S. R., and A., K. P. (2004) THE weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. *J. Comput. Chem.* **13**, 1011–1021.

(142) Zeida, A., Babbush, R., Lebrero, M. C. G., Trujillo, M., Radi, R., and Estrin, D. A. (2012) Molecular basis of the mechanism of thiol oxidation by hydrogen peroxide in aqueous solution: challenging the S(N)2 paradigm. *Chem. Res. Toxicol.* **25**, 741–746.

(143) Mulliken, R. S. (1955) Electronic Population Analysis on LCAO–MO Molecular Wave Functions. I. *J. Chem. Phys.* **23**, 1833–1840.

(144) Portillo-Ledesma, S. (2012) Estudio teórico experimental de la peroxirredoxina V humana. Tesina de graduación de la Licenciatura en Bioquímica. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

(145) Zhao, Y., and Truhlar, D. G. (2008) The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other function. *Theor. Chem. Acc.* **120**, 215–241.

(146) Barone, V., Cossi, M., and Tomasi, J. (1997) A new definition of cavities for the computation of solvation free energies by the polarizable continuum model. *J. Chem. Phys.* **107**, 3210–3221.

(147) van Bergen, L. A. H., Roos, G., and De Proft, F. (2014) From Thiol to Sulfonic Acid: Modeling the Oxidation Pathway of Protein Thiols by Hydrogen Peroxide. *J. Phys. Chem. A* **118**, 6078–6084.

(148) Curtiss, L. A., Redfern, P. C., and Raghavachari, K. (2007) Gaussian-4 theory. *J. Chem. Phys.* **126**, 84108.

(149) Klamt, A., and Schuurmann, G. (1993) COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 799–805.

(150) Cossi, M., Rega, N., Scalmani, G., and Barone, V. (2003) Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. *J. Comput. Chem.* **24**, 669–681.

(151) Nagy, P., Karton, A., Betz, A., Peskin, A. V., Pace, P., O'Reilly, R. J., Hampton, M. B., Radom, L., and Winterbourn, C. C. (2011) Model for the Exceptional Reactivity of Peroxiredoxins 2 and 3 with Hydrogen Peroxide: A kinetic and computational study. *J. Biol. Chem.* **286**, 18048–18055.

(152) Olah, J., van Bergen, L., De Proft, F., and Roos, G. (2015) How does the protein environment optimize the thermodynamics of thiol sulfenylation? Insights from model systems to QM/MM calculations on human 2-Cys peroxiredoxin. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **33**, 584–596.

(153) Castro, H., Budde, H., Flohe, L., Hofmann, B., Lunsdorf, H., Wissing, J., and Tomas, A. M. (2002) Specificity and kinetics of a mitochondrial peroxiredoxin of *Leishmania infantum*. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 1563–1574.

(154) Parsonage, D., Karplus, P. A., and Poole, L. B. (2008) Substrate specificity and redox potential of

AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 8209–8214.

(155) Parsonage, D., Desrosiers, D. C., Hazlett, K. R. O., Sun, Y., Nelson, K. J., Cox, D. L., Radolf, J. D., and Poole, L. B. (2010) Broad specificity AhpC-like peroxiredoxin and its thioredoxin reductant in the sparse antioxidant defense system of *Treponema pallidum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 6240–6245.

(156) Reyes, A. M., Hugo, M., Trostchansky, A., Capece, L., Radi, R., and Trujillo, M. (2011) Oxidizing substrate specificity of *Mycobacterium tuberculosis* alkyl hydroperoxide reductase E: kinetics and mechanisms of oxidation and overoxidation. *Free Radic. Biol. Med.* *51*, 464–473.

(157) Zeida, A., Reyes, A. M., Lichtig, P., Hugo, M., Vazquez, D. S., Santos, J., Gonzalez Flecha, F. L., Radi, R., Estrin, D. A., and Trujillo, M. (2015) Molecular Basis of Hydroperoxide Specificity in Peroxiredoxins: The Case of AhpE from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* *54*, 7237–7247.

(158) Smeets, A., Marchand, C., Linard, D., Knoop, B., and Declercq, J.-P. (2008) The crystal structures of oxidized forms of human peroxiredoxin 5 with an intramolecular disulfide bond confirm the proposed enzymatic mechanism for atypical 2-Cys peroxiredoxins. *Arch. Biochem. Biophys.* *477*, 98–104.

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

(160) Hall, A., Nelson, K., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2011) Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 795–815.

(161) Hirotsu, S., Abe, Y., Okada, K., Nagahara, N., Hori, H., Nishino, T., and Hakoshima, T. (1999) Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 12333–12338.

(162) Perkins, A., Nelson, K. J., Williams, J. R., Parsonage, D., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2013) The sensitive balance between the fully folded and locally unfolded conformations of a model peroxiredoxin. *Biochemistry* *52*, 8708–8721.

(163) Ådén, J., Wallgren, M., Storm, P., Weise, C. F., Christiansen, A., Schröder, W. P., Funk, C., and Wolf-Watz, M. (2011) Extraordinary  $\mu$ s-ms backbone dynamics in *Arabidopsis thaliana* peroxiredoxin Q. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* *1814*, 1880–1890.

(164) Koo, K. H., Lee, S., Jeong, S. Y., Kim, E. T., Kim, H. J., Kim, K., Song, K., and Chae, H. Z. (2002) Regulation of thioredoxin peroxidase activity by C-terminal truncation. *Arch. Biochem. Biophys.* *397*, 312–318.

(165) Sayed, A. A., and Williams, D. L. (2004) Biochemical characterization of 2-Cys peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* *279*, 26159–26166.

(166) Parmigiani, R. B., Xu, W. S., Venta-Perez, G., Erdjument-Bromage, H., Yaneva, M., Tempst, P., and Marks, P. A. (2008) HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 9633–9638.

(167) Randall, L., Manta, B., Nelson, K. J., Santos, J., Poole, L. B., and Denicola, A. (2016) Structural changes upon peroxynitrite-mediated nitration of peroxiredoxin 2; nitrated Prx2 resembles its disulfide-oxidized form. *Arch. Biochem. Biophys.* *590*, 101–108.

- (168) Trujillo, M., Clippe, A., Manta, B., Ferrer-Sueta, G., Smeets, A., Declercq, J.-P. P., Knoops, B., and Radi, R. (2007) Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: Taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* *467*, 95–106.
- (169) Carvalho, L. A. C., Truzzi, D. R., Fallani, T. S., Alves, S. V., Toledo, J. C. J., Augusto, O., Netto, L. E. S., and Meotti, F. C. (2017) Urate hydroperoxide oxidizes human peroxiredoxin 1 and peroxiredoxin 2. *J. Biol. Chem.* *292*, 8705–8715.
- (170) Peskin, A. V., Dickerhof, N., Poynton, R. A., Paton, L. N., Pace, P. E., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. C. (2013) Hyperoxidation of peroxiredoxins 2 and 3: rate constants for the reactions of the sulfenic acid of the peroxidatic cysteine. *J. Biol. Chem.* *288*, 14170–14177.
- (171) Parsonage, D., Nelson, K. J., Ferrer-Sueta, G., Alley, S., Karplus, P. A., Furdui, C. M., and Poole, L. B. (2015) Dissecting Peroxiredoxin Catalysis: Separating Binding, Peroxidation, and Resolution for a Bacterial AhpC. *Biochemistry* *54*, 1567–1575.
- (172) Luo, D., Smith, S. W., and Anderson, B. D. (2005) Kinetics and mechanism of the reaction of cysteine and hydrogen peroxide in aqueous solution. *J. Pharm. Sci.* *94*, 304–316.
- (173) Ashby, M. T., and Nagy, P. (2006) On the kinetics and mechanism of the reaction of cysteine and hydrogen peroxide in aqueous solution. *J. Pharm. Sci.* *95*, 15–18.
- (174) Ashby, M. T., and Nagy, P. (2007) Revisiting a proposed kinetic model for the reaction of cysteine and hydrogen peroxide via cysteine sulfenic acid. *Int. J. Chem. Kinet.* *39*, 32–38.
- (175) Rhee, S. G., Kang, S. W., Jeong, W., Chang, T.-S., Yang, K.-S., and Woo, H. A. (2005) Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr. Opin. Cell Biol.* *17*, 183–189.
- (176) Stocker, S., Maurer, M., Ruppert, T., and Dick, T. P. (2018) A role for 2-Cys peroxiredoxins in facilitating cytosolic protein thiol oxidation. *Nat. Chem. Biol.* *14*, 148–155.
- (177) Mizohata, E., Sakai, H., Fusatomi, E., Terada, T., Murayama, K., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2005) Crystal structure of an archaeal peroxiredoxin from the aerobic hyperthermophilic crenarchaeon *Aeropyrum pernix* K1. *J. Mol. Biol.* *354*, 317–329.
- (178) Nakamura, T., Yamamoto, T., Inoue, T., Matsumura, H., Kobayashi, A., Hagihara, Y., Uegaki, K., Ataka, M., Kai, Y., and Ishikawa, K. (2006) Crystal structure of thioredoxin peroxidase from aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. *Proteins* *62*, 822–826.
- (179) Ahn, J., Jang, K. K., Jo, I., Nurhasni, H., Lim, J. G., Yoo, J. W., Choi, S. H., and Ha, N. C. (2018) Crystal structure of peroxiredoxin 3 from *Vibrio vulnificus* and its implications for scavenging peroxides and nitric oxide. *IUCr* *5*, 82–92.
- (180) Yang, K.-S., Kang, S. W., Woo, H. A., Hwang, S. C., Chae, H. Z., Kim, K., and Rhee, S. G. (2002) Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. *J. Biol. Chem.* *277*, 38029–38036.
- (181) Chae, H. Z., Chung, S. J., and Rhee, S. G. (1994) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* *269*, 27670–27678.
- (182) Randall, L. M., Manta, B., Hugo, M., Gil, M., Batthyany, C., Trujillo, M., Poole, L. B., and Denicola,



- A. (2014) Nitration transforms a sensitive peroxiredoxin 2 into a more active and robust peroxidase. *J. Biol. Chem.* 289, 15536–15543.
- (183) Haynes, A. C., Qian, J., Reisz, J. A., Furdui, C. M., and Lowther, W. T. (2013) Molecular basis for the resistance of human mitochondrial 2-Cys peroxiredoxin 3 to hyperoxidation. *J. Biol. Chem.* 288, 29714–29723.
- (184) Biteau, B., Labarre, J., and Toledano, M. B. (2003) ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425, 980–984.
- (185) Woo, H. A., Chae, H. Z., Hwang, S. C., Yang, K.-S., Kang, S. W., Kim, K., and Rhee, S. G. (2003) Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science* 300, 653–656.
- (186) Jönsson, T. J., Johnson, L. C., and Lowther, W. T. (2008) Structure of the sulphiredoxin–peroxiredoxin complex reveals an essential repair embrace. *Nature* 451, 98–101.
- (187) Lee, S. R., Kwon, K. S., Kim, S. R., and Rhee, S. G. (1998) Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 273, 15366–15372.
- (188) Leslie, N. R., Bennett, D., Lindsay, Y. E., Stewart, H., Gray, A., and Downes, C. P. (2003) Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *EMBO J.* 22, 5501–5510.
- (189) Kwon, J., Lee, S.-R., Yang, K.-S., Ahn, Y., Kim, Y. J., Stadtman, E. R., and Rhee, S. G. (2004) Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16419–16424.
- (190) Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., and Ichijo, H. (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* 17, 2596–2606.
- (191) Winterbourn, C. C. (2013) The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods Enzymol.* 528, 3–25.
- (192) Day, A. M., Brown, J. D., Taylor, S. R., Rand, J. D., Morgan, B. A., and Veal, E. A. (2012) Inactivation of a peroxiredoxin by hydrogen peroxide is critical for thioredoxin-mediated repair of oxidized proteins and cell survival. *Mol. Cell* 45, 398–408.
- (193) Jang, H. H., Lee, K. O., Chi, Y. H., Jung, B. G., Park, S. K., Park, J. H., Lee, J. R., Lee, S. S., Moon, J. C., Yun, J. W., Choi, Y. O., Kim, W. Y., Kang, J. S., Cheong, G.-W., Yun, D.-J., Rhee, S. G., Cho, M. J., and Lee, S. Y. (2004) Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* 117, 625–635.
- (194) O’Neill, J. S., and Reddy, A. B. (2011) Circadian clocks in human red blood cells. *Nature* 469, 498–503.
- (195) Edgar, R. S., Green, E. W., Zhao, Y., van Ooijen, G., Olmedo, M., Qin, X., Xu, Y., Pan, M., Valekunja, U. K., Feeney, K. A., Maywood, E. S., Hastings, M. H., Baliga, N. S., Mellow, M., Millar, A. J., Johnson, C. H., Kyriacou, C. P., O’Neill, J. S., and Reddy, A. B. (2012) Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature* 485, 459–464.

- (196) Poole, L. B., Reynolds, C. M., Wood, Z. A., Karplus, P. A., Ellis, H. R., and Li Calzi, M. (2000) AhpF and other NADH:peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low Mr thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 267, 6126–6133.
- (197) Nogoceke, E., Gommel, D. U., Kiess, M., Kalisz, H. M., and Flohe, L. (1997) A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biol. Chem.* 378, 827–836.
- (198) Lian, F.-M., Yu, J., Ma, X.-X., Yu, X.-J., Chen, Y., and Zhou, C.-Z. (2012) Structural Snapshots of Yeast Alkyl Hydroperoxide Reductase Ahp1 Peroxiredoxin Reveal a Novel Two-cysteine Mechanism of Electron Transfer to Eliminate Reactive Oxygen Species. *J. Biol. Chem.* 287, 17077–17087.
- (199) Budde, H., Flohe, L., Hofmann, B., and Nimtz, M. (2003) Verification of the interaction of a tryparedoxin peroxidase with tryparedoxin by ESI-MS/MS. *Biol. Chem.* 384, 1305–1309.
- (200) Jonsson, T. J., Ellis, H. R., and Poole, L. B. (2007) Cysteine reactivity and thiol-disulfide interchange pathways in AhpF and AhpC of the bacterial alkyl hydroperoxide reductase system. *Biochemistry* 46, 5709–5721.
- (201) Cuevasanta, E., Lange, M., Bonanata, J., Coitino, E. L., Ferrer-Sueta, G., Filipovic, M. R., and Alvarez, B. (2015) Reaction of Hydrogen Sulfide with Disulfide and Sulfenic Acid to Form the Strongly Nucleophilic Persulfide. *J. Biol. Chem.* 290, 26866–26880.
- (202) Carvalho, A. T. P., Fernandes, P. A., Swart, M., Van Stralen, J. N. P., Bickelhaupt, F. M., and Ramos, M. J. (2009) Role of the variable active site residues in the function of thioredoxin family oxidoreductases. *J. Comput. Chem.* 30, 710–724.
- (203) Roos, G., Foloppe, N., Van Laer, K., Wyns, L., Nilsson, L., Geerlings, P., and Messens, J. (2009) How Thioredoxin Dissociates Its Mixed Disulfide. *PLOS Comput. Biol.* 5, e1000461.
- (204) Jensen, K. S., Hansen, R. E., and Winther, J. R. (2009) Kinetic and thermodynamic aspects of cellular thiol-disulfide redox regulation. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 1047–1058.
- (205) Tairum Jr., C. A., de Oliveira, M. A., Horta, B. B., Zara, F. J., and Netto, L. E. S. (2012) Disulfide Biochemistry in 2-Cys Peroxiredoxin: Requirement of Glu50 and Arg146 for the Reduction of Yeast Tsa1 by Thioredoxin. *J. Mol. Biol.* 424, 28–41.
- (206) Pineyro, M. D., Arcari, T., Robello, C., Radi, R., and Trujillo, M. (2011) Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 507, 287–295.
- (207) Huber, H. E., Russel, M., Model, P., and Richardson, C. C. (1986) Interaction of mutant thioredoxins of *Escherichia coli* with the gene 5 protein of phage T7. The redox capacity of thioredoxin is not required for stimulation of DNA polymerase activity. *J. Biol. Chem.* 261, 15006–15012.
- (208) Qin, J., Clore, G. M., Kennedy, W. M., Huth, J. R., and Gronenborn, A. M. (1995) Solution structure of human thioredoxin in a mixed disulfide intermediate complex with its target peptide from the transcription factor NF kappa B. *Structure* 3, 289–297.
- (209) Stryer, L., Holmgren, A., and Reichard, P. (1967) Thioredoxin. A Localized Conformational Change Accompanying Reduction of the Protein to the Sulfhydryl Form\*. *Biochemistry* 6, 1016–1020.

- (210) Berndt, C., Lillig, C. H., and Holmgren, A. (2007) Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292, H1227–H1236.
- (211) Matthews, J. R., Wakasugi, N., Virelizier, J. L., Yodoi, J., and Hay, R. T. (1992) Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res.* 20, 3821–3830.
- (212) Rhee, S. G., Chae, H. Z., and Kim, K. (2005) Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 1543–1552.
- (213) Monteiro, G., Horta, B. B., Pimenta, D. C., Augusto, O., and Netto, L. E. S. (2007) Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 4886–91.
- (214) You, K. S., Benitez, L. V., McConachie, W. A., Allison, W. S., K-S, Y., Benitez, L. V., McConachie, W. A., and 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 - Enzymol.* 384, 317–330.
- (215) Lo Conte, M., and Carroll, K. S. (2013) The chemistry of Thiol oxidation and detection, in *Oxidative Stress and Redox Regulation* (Jakob, U., and Reichmann, D., Eds.), pp 1–42. Springer Netherlands, Dordrecht.
- (216) Anschau, V., Ferrer-Sueta, G., Portillo-Ledesma, S., and Netto, L. E. S. (2014) Kinetic Characterization of Sulfenic Acid Reduction in 1-Cys Peroxiredoxins by Ascorbat. *21st Annu. Meet. Soc. Free Radic. Biol. Med.* 76, s138.
- (217) Greetham, D., and Grant, C. M. (2009) Antioxidant activity of the yeast mitochondrial one-Cys peroxiredoxin is dependent on thioredoxin reductase and glutathione in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 29, 3229–3240.
- (218) Hugo, M., Van Laer, K., Reyes, A. M., Vertommen, D., Messens, J., Radi, R., and Trujillo, M. (2014) Mycothiol/mycoredoxin 1-dependent reduction of the peroxiredoxin AhpE from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 289, 5228–5239.
- (219) Lindahl, M., and Florencio, F. J. (2003) Thioredoxin-linked processes in cyanobacteria are as numerous as in chloroplasts, but targets are different. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 16107–16112.
- (220) Nguyen-Nhu, N. T., Berck, J., Clippe, A., Duconseille, E., Cherif, H., Boone, C., Van der Eecken, V., Bernard, A., Banmeyer, I., and Knoops, B. (2007) Human peroxiredoxin 5 gene organization, initial characterization of its promoter and identification of alternative forms of mRNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1769, 472–483.
- (221) Yamashita, H., Avraham, S., Jiang, S., London, R., Van Veldhoven, P. P., Subramani, S., Rogers, R. A., and Avraham, H. (1999) Characterization of human and murine PMP20 peroxisomal proteins that exhibit antioxidant activity in vitro. *J. Biol. Chem.* 274, 29897–29904.
- (222) Declercq, J. P., and Evrard, C. (2001) A twinned monoclinic crystal form of human peroxiredoxin 5 with eight molecules in the asymmetric unit. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 57, 1829–1835.

- (223) Seo, M. S., Kang, S. W., Kim, K., Baines, I. C., Lee, T. H., and Rhee, S. G. (2000) Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J. Biol. Chem.* 275, 20346–20354.
- (224) Dubuisson, M., Vander Stricht, D., Clippe, A., Etienne, F., Nauser, T., Kissner, R., Koppenol, W. H., Rees, J.-F., and Knoop, B. (2004) Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase. *FEBS Lett.* 571, 161–165.
- (225) Woo, H. A., Jeong, W., Chang, T.-S., Park, K. J., Park, S. J., Yang, J. S., and Rhee, S. G. (2005) Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins. *J. Biol. Chem.* 280, 3125–3128.
- (226) Kang, S. W., Baines, I. C., and Rhee, S. G. (1998) Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *J. Biol. Chem.* 273, 6303–6311.
- (227) Choi, H. J., Kang, S. W., Yang, C. H., Rhee, S. G., and Ryu, S. E. (1998) Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 5, 400–406.
- (228) Kim, K. H., Lee, W., and Kim, E. E. (2016) Crystal structures of human peroxiredoxin 6 in different oxidation states. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 477, 717–722.
- (229) Zhou, S., Sorokina, E. M., Harper, S., Li, H., Ralat, L., Dodia, C., Speicher, D. W., Feinstein, S. I., and Fisher, A. B. (2016) Peroxiredoxin 6 homodimerization and heterodimerization with glutathione S-transferase pi are required for its peroxidase but not phospholipase A2 activity. *Free Radic. Biol. Med.* 94, 145–156.
- (230) Kim, T. S., Sundaresh, C. S., Feinstein, S. I., Dodia, C., Skach, W. R., Jain, M. K., Nagase, T., Seki, N., Ishikawa, K., Nomura, N., and Fisher, A. B. (1997) Identification of a human cDNA clone for lysosomal type Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 and properties of the expressed protein. *J. Biol. Chem.* 272, 2542–2550.
- (231) Chen, J. W., Dodia, C., Feinstein, S. I., Jain, M. K., and Fisher, A. B. (2000) 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J. Biol. Chem.* 275, 28421–28427.
- (232) Manevich, Y., Reddy, K. S., Shuvaeva, T., Feinstein, S. I., and Fisher, A. B. (2007) Structure and phospholipase function of peroxiredoxin 6: identification of the catalytic triad and its role in phospholipid substrate binding. *J. Lipid Res.* 48, 2306–2318.
- (233) Manevich, Y., Shuvaeva, T., Dodia, C., Kazi, A., Feinstein, S. I., and Fisher, A. B. (2009) Binding of peroxiredoxin 6 to substrate determines differential phospholipid hydroperoxide peroxidase and phospholipase A(2) activities. *Arch. Biochem. Biophys.* 485, 139–149.
- (234) Toledo, J. C. J., Audi, R., Ogusucu, R., Monteiro, G., Netto, L. E. S., and Augusto, O. (2011) Horseradish peroxidase compound I as a tool to investigate reactive protein-cysteine residues: from quantification to kinetics. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 1032–1038.
- (235) Wu, Y., Feinstein, S. I., Manevich, Y., Chowdhury, I., Pak, J. H., Kazi, A., Dodia, C., Speicher, D. W., and Fisher, A. B. (2009) Mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation of peroxiredoxin 6 regulates its phospholipase A(2) activity. *Biochem. J.* 419, 669–679.

- (236) Rahaman, H., Zhou, S., Dodia, C., Shuvaeva, T., Feinstein, S. I., and Fisher, A. B. (2012) Phosphorylation of Prdx6 mediated by MAPkinase induces conformational change with concomitant increase in its phospholipase A2 activity. *FASEB J.* 26, 997.2-997.2.
- (237) Rahaman, H., Zhou, S., Dodia, C., Feinstein, S. I., Huang, S., Speicher, D., and Fisher, A. B. (2012) Increased phospholipase A2 activity with phosphorylation of peroxiredoxin 6 requires a conformational change in the protein. *Biochemistry* 51, 5521–5530.
- (238) Takagi, T., Naito, Y., Oya-Ito, T., and Yoshikawa, T. (2012) The role of methylglyoxal-modified proteins in gastric ulcer healing. *Curr. Med. Chem.* 19, 137–144.
- (239) Oya-Ito, T., Naito, Y., Takagi, T., Shima, K., Itoh, Y., and Yoshikawa, T. (2013) PSS46 - Relevance of Methylglyoxal Modification of Peroxiredoxin 6 to the Development of Diabetic Complications. *Free Radic. Biol. Med.* 65, S32.
- (240) Flohe, L., Budde, H., Bruns, K., Castro, H., Clos, J., Hofmann, B., Kansal-kalavar, S., Krumme, D., Menge, U., Plank-schumacher, K., Sztajer, H., Wissing, J., and Wylegalla, C. (2002) Tryparedoxin Peroxidase of *Leishmania donovani* : Molecular Cloning , Heterologous Expression , Specificity , and Catalytic Mechanism 397, 324–335.
- (241) Lamkemeyer, P., Laxa, M., Collin, V., Li, W., Finkemeier, I., Schöttler, M. A., Holtkamp, V., Tognetti, V. B., Issakidis-Bourguet, E., Kandlbinder, A., Weis, E., Miginiac-Maslow, M., and Dietz, K. J. (2006) Peroxiredoxin Q of *Arabidopsis thaliana* is attached to the thylakoids and functions in context of photosynthesis. *Plant J.* 45, 968–981.
- (242) Tairum, C. A., Santos, M. C., Breyer, C. A., Geyer, R. R., Nieves, C. J., Portillo-Ledesma, S., Ferrer-Sueta, G., Toledo, J. C., Toyama, M. H., Augusto, O., Netto, L. E. S., and De Oliveira, M. A. (2016) Catalytic Thr or ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms. *Sci. Rep.* 6.
- (243) Montemartini, M., Kalisz, H. M., Hecht, H. J., Steinert, P., and Flohé, L. (1999) Activation of active-site cysteine residues in the peroxiredoxin-type tryparedoxin peroxidase of *crithidia fasciculata*. *Eur. J. Biochem.* 264, 516–524.
- (244) Nelson, K. J., Perkins, A., Van Swearingen, A. E. D., Hartman, S., Brereton, A. E., Parsonage, D., Salisbury, F. R., Karplus, P. A., and Poole, L. B. (2018) Experimentally Dissecting the Origins of Peroxiredoxin Catalysis. *Antioxid. Redox Signal.* 28, 521–536.
- (245) Case, D. A., Darden, T. A., Cheatham, T. E., Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., Luo, R., Walker, R. C., Zhang, W., Merz, K. M., Roberts, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Swails, J., Goetz, A. W., Kolossváry, I., Wong, K. F., Paesani, F., Vanicek, J., Wolf, R. M., Liu, J., Wu, X., Brozell, S. R., Steinbrecher, T., Gohlke, H., Cai, Q., Ye, X., Wang, J., Hsieh, M. J., Cui, G., Roe, D. R., Mathews, D. H., Seetin, M. G., Salomon-Ferrer, R., Sagui, C., Babin, V., Luchko, T., Gusarov, S., Kovalenko, A., and Kollman, P. A. (2012) AMBER12. University of California, San Francisco.
- (246) Toukmaji, A., Sagui, C., Board, J., and Darden, T. (2000) Efficient particle-mesh Ewald based approach to fixed and induced dipolar interactions. *J. Chem. Phys.* 113, 10913–10927.
- (247) Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D. C., Fox, T., Caldwell, J. W., and Kollman, P. A. (1995) A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 5179–5197.

- (248) Levitt, M., and Lifson, S. (1969) Refinement of protein conformations using a macromolecular energy minimization procedure. *J. Mol. Biol.* *46*, 269–279.
- (249) Watowich, S. J., Meyer, E. S., Hagstrom, R., and Josephs, R. (2004) A stable, rapidly converging conjugate gradient method for energy minimization. *J. Comput. Chem.* *9*, 650–661.
- (250) Bakowies, D., and Thiel, W. (1996) Hybrid Models for Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Approaches. *J. Phys. Chem.* *100*, 10580–10594.
- (251) Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, J. A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J. M., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, Foresman, J. B., Ortiz, J. V, Cioslowski, J., and Fox, D. J. (2009) Gaussian 09, Revision A.02. Gaussian, Inc., Wallingford CT.
- (252) Clark, T., Chandrasekhar, J., Spitznagel, G. W., and Schleyer, P. V. R. (1983) Efficient diffuse function-augmented basis sets for anion calculations. III. The 3-21+G basis set for first-row elements, Li-F. *J. Comput. Chem.* *4*, 294–301.
- (253) Hehre, W. J., Ditchfield, R., and Pople, J. A. (1972) Self-Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian-Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules. *J. Chem. Phys.* *56*, 2257–2261.
- (254) Wang, J. M., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. a, and Case, D. a. (2004) Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* *25*, 1157–1174.
- (255) Kóňa, J., and Brinck, T. (2006) A combined molecular dynamics simulation and quantum chemical study on the mechanism for activation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide. *Org. Biomol. Chem.* *4*, 3468–3478.
- (256) Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W. D., and Kollman, P. A. (1993) A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: The RESP model. *J. Phys. Chem.* *97*, 10269–10280.
- (257) Nakamura, T., Kado, Y., Yamaguchi, T., Matsumura, H., Ishikawa, K., and Inoue, T. (2010) Crystal structure of peroxiredoxin from *Aeropyrum pernix* K1 complexed with its substrate, hydrogen peroxide. *J. Biochem.* *147*, 109–115.
- (258) Hratchian, H. P., Frisch, M. J., and Schlegel, H. B. (2010) Steepest descent reaction path integration using a first-order predictor-corrector method. *J. Chem. Phys.* *133*, 224101.
- (259) Frisch, M. J., Pople, J. A., and Binkley, J. S. (1984) Self-consistent molecular orbital methods 25. Supplementary functions for Gaussian basis sets. *J. Chem. Phys.* *80*, 3265–3269.
- (260) Bondi, A. (1964) van der Waals Volumes and Radii. *J. Phys. Chem.* *68*, 441–451.

- (261) Wiberg, K. B. (1968) Application of the Pople-Santry-Segal Cndo Method To the Cyclopropylcarbiny and Cyclobutyl Cation and To Bicyclobutane'. *Tetrahedron* 24, 1083–1096.
- (262) Foster, J. P., and Weinhold, F. (1980) Natural Hybrid Orbitals. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 7211–7218.
- (263) Reed, A., Weinstock, R., and Weinhold, F. (1985) Natural population analysis. *J. Chem. Phys.* 83, 735.
- (264) Chung, L. W., Sameera, W. M. C., Ramozzi, R., Page, A. J., Hatanaka, M., Petrova, G. P., Harris, T. V, Li, X., Ke, Z., Liu, F., Li, H.-B., Ding, L., and Morokuma, K. (2015) The ONIOM Method and Its Applications. *Chem. Rev.* 115, 5678–5796.
- (265) Duan, Y., Wu, C., Chowdhury, S., Lee, M. C., Xiong, G., Zhang, W., Yang, R., Cieplak, P., Luo, R., Lee, T., Caldwell, J., Wang, J., and Kollman, P. (2003) A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J. Comput. Chem.* 24, 1999–2012.
- (266) Case, D. A., Babin, V., Berryman, J. T., Betz, R. M., Cai, Q., Cerutti, D. S., Cheatham, T. E., Darden, T. A., Duke, R. E., Gohlke, H., Goetz, A. W., Gusarov, S., Homeyer, N., Janowski, P., Kaus, J., Kolossváry, I., Kovalenko, A., Lee, T. S., LeGrand, S., Luchko, T., Luo, R., Madej, B., Merz, K. M., Paesani, F., Roe, D. R., Roitberg, A., Sagui, C., Salomon-Ferrer, R., Seabra, G., Simmerling, C. L., Smith, W., Swails, J., Walker, Wang, J., Wolf, R. M., Wu, X., and Kollman, P. A. (2014) AMBER14. University of California, San Francisco.
- (267) Hünenberger, P. H. (2005) Thermostat algorithms for molecular dynamics simulations. *Adv. Polym. Sci.* 173, 105–147.
- (268) Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A., and Haak, J. R. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 81, 3684–3690.
- (269) Ryckaert, J. P., Ciccotti, G., and Berendsen, H. J. C. (1977) Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* 23, 327–341.
- (270) Roe, D. R., and Cheatham III, T. E. (2013) PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *J Chem Theory Com* 9, 3084–3095.
- (271) Case, D.A., Betz, R.M., Cerutti, D.S., Cheatham, T.E., III, Darden, T.A., Duke, R.E., Giese, T.J., Gohlke, H., Goetz, A.W., Homeyer, N., Izadi, S., Janowski, P., Kaus, J., Kovalenko, A., Lee, T.S., LeGrand, S., Li, P., Lin, C., Luchko, T., Luo, R., Madej, B., Mermelstein, D., Merz, K.M., Monard, G., Nguyen, H. Nguyen, H. T., Omelyan, I., Onufriev, A., Roe, D.R., Roitberg, A., Sagui, C., Simmerling, C.L., Botello-Smith, W.M., Swails, J., and Walker, R.C., Wang, J., Wolf, R.M., Wu, X., Xiao, L. and Kollman, P. A. (2016) AMBER16. University of California, San Francisco.
- (272) Weiser, J., Shenkin, P. S., and Still, W. C. (1999) Approximate atomic surfaces from linear combinations of pairwise overlaps (LCPO). *J Comput Chem* 20, 217–230.
- (273) Clarke, E. R., and Martell, A. E. (1970) Metal chelates of arginine and related ligands. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 32, 911–926.
- (274) Gilson, M. K., and Honig, B. H. (1986) The dielectric constant of a folded protein. *Biopolymers* 25,

2097–2119.

(275) Nakamura, H., Sakamoto, T., and Wada, A. (1988) A theoretical study of the dielectric constant of protein. *Protein Eng.* *2*, 177–183.

(276) Simonson, T., Perahia, D., and Brünger, A. T. (1991) Microscopic theory of the dielectric properties of proteins. *Biophys. J.* *59*, 670–690.

(277) Simonson, T., and Perahia, D. (1995) Internal and interfacial dielectric properties of cytochrome c from molecular dynamics in aqueous solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 1082–1086.

(278) Polanyi, J. C. (1972) Concepts in reaction dynamics. *Acc. Chem. Res.* *5*, 161–168.

(279) Perkins, A., Parsonage, D., Nelson, K. J., Ogba, O. M., Cheong, P. H. Y., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2016) Peroxiredoxin Catalysis at Atomic Resolution. *Structure* *24*, 1668–1678.

(280) Singh, R., and Whitesides, G. M. (1990) Degenerate intermolecular thiolate-disulfide interchange involving cyclic five-membered disulfides is faster by .apprx.10<sup>3</sup> than that involving six- or seven-membered disulfides. *J. Am. Chem. Soc.* *112*, 6304–6309.

(281) Olmstead, W. N., and Brauman, J. I. (1977) Gas-phase nucleophilic displacement reactions. *J. Am. Chem. Soc.* *99*, 4219–4228.

(282) Defelipe, L. A., Lanzarotti, E., Gauto, D., Marti, M. A., and Turjanski, A. G. (2015) Protein Topology Determines Cysteine Oxidation Fate: The Case of Sulfenyl Amide Formation among Protein Families. *PLoS Comput. Biol.* *11*, 1–25.

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

(284) Roothaan, C. C. J. (1951) New Developments in Molecular Orbital Theory. *Rev. Mod. Phys.* *23*, 69–89.

(285) Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., and Simmerling, C. (2006) Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins* *65*, 712–725.

(286) Åqvist, J., Wennerström, P., Nervall, M., Bjelic, S., and Brandsdal, B. O. (2004) Molecular dynamics simulations of water and biomolecules with a Monte Carlo constant pressure algorithm. *Chem. Phys. Lett.* *384*, 288–294.

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

(288) Durrant, J. D., and McCammon, J. A. (2011) HBonanza: a computer algorithm for molecular-dynamics-trajectory hydrogen-bond analysis. *J. Mol. Graph. Model.* *31*, 5–9.

(289) Andreani, R., Martínez, J. M., Martínez, L., and Yano, F. S. (2009) Low Order-Value Optimization and applications. *J. Glob. Optim.* *43*, 1–22.

(290) Martínez, L. (2015) Automatic Identification of Mobile and Rigid Substructures in Molecular Dynamics Simulations and Fractional Structural Fluctuation Analysis. *PLoS One* *10*.



- (291) Kabsch, W., and Sander, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577–2637.
- (292) Vasilef, I. (2013) QtiPlot: data analysis and scientific visualization. Universiteit Utrecht, Utrecht, Netherlands.
- (293) Miller, S., Janin, J., Lesk, A. M., and Chothia, C. (1987) Interior and surface of monomeric proteins. *J. Mol. Biol.* 196, 641–656.
- (294) Petersen, M. T., Jonson, P. H., and Petersen, S. B. (1999) Amino acid neighbours and detailed conformational analysis of cysteines in proteins. *Protein Eng.* 12, 535–548.
- (295) Portillo-Ledesma, S., Randall, L. M., Parsonage, D., Dalla Rizza, J., Karplus, P. A., Poole, L. B., Denicola, A., and Ferrer-Sueta, G. (2018) Differential Kinetics of Two-Cysteine Peroxiredoxin Disulfide Formation Reveal a Novel Model for Peroxide Sensing. *Biochemistry*.
- (296) Hall, A., Karplus, P. A., and Poole, L. B. (2009) Typical 2-Cys Peroxiredoxins: Structures, mechanisms and functions. *FEBS J.* 276, 2469–2477.
- (297) Mendes, P. (1993) GEPASI: a software package for modelling the dynamics, steady states and control of biochemical and other systems. *Comput. Appl. Biosci.* 9, 563–571.
- (298) Nelson, D. P., and Kiesow, L. A. (1972) Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). *Anal. Biochem.* 49, 474–478.
- (299) Swails, J. M., York, D. M., and Roitberg, A. E. (2014) Constant pH replica exchange molecular dynamics in explicit solvent using discrete protonation states: Implementation, testing, and validation. *J. Chem. Theory Comput.* 10, 1341–1352.
- (300) Mongan, J., Case, D. A., and McCammon, J. A. (2004) Constant pH molecular dynamics in generalized Born implicit solvent. *J. Comput. Chem.* 25, 2038–2048.
- (301) Itoh, S. G., Damjanovic, A., and Brooks, B. R. (2011) pH replica-exchange method based on discrete protonation states. *Proteins* 79, 3420–3436.
- (302) Cheatham, T. E. 3rd, Cieplak, P., and Kollman, P. A. (1999) A modified version of the Cornell et al. force field with improved sugar pucker phases and helical repeat. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 16, 845–862.
- (303) Enami, S., Hoffmann, M. R., and Colussi, A. J. (2009) Simultaneous detection of cysteine sulfenate, sulfinate, and sulfonate during cysteine interfacial ozonolysis. *J. Phys. Chem. B* 113, 9356–9358.
- (304) Burkhard, R. K., Sellers, D. E., DeCou, F., and Lambert, J. L. (1959) The pK<sub>a</sub>'s of Aromatic Sulfinic Acids. *J. Org. Chem.* 24, 767–769.
- (305) Chang, Y.-C., Huang, C.-N., Lin, C.-H., Chang, H.-C., and Wu, C.-C. (2010) Mapping protein cysteine sulfonic acid modifications with specific enrichment and mass spectrometry: an integrated approach to explore the cysteine oxidation. *Proteomics* 10, 2961–2971.
- (306) Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671.

- (307) Poole, L. B., and Ellis, H. R. (2002) Identification of cysteine sulfenic acid in AhpC of alkyl hydroperoxide reductase. *Methods Enzymol.* 348, 122–136.
- (308) Hochstrasser, D. F., Frutiger, S., Paquet, N., Bairoch, A., Ravier, F., Pasquali, C., Sanchez, J. C., Tissot, J. D., Bjellqvist, B., and Vargas, R. (1992) Human liver protein map: a reference database established by microsequencing and gel comparison. *Electrophoresis* 13, 992–1001.
- (309) Pedre, B., Van Molle, I., Villadangos, A. F., Wahni, K., Vertommen, D., Turell, L., Erdogan, H., Mateos, L. M., and Messens, J. (2015) The *Corynebacterium glutamicum* mycothiol peroxidase is a reactive oxygen species-scavenging enzyme that shows promiscuity in thiol redox control. *Mol. Microbiol.* 96, 1176–1191.
- (310) Staudacher, V., Djuika, C. F., Koduka, J., Schlossarek, S., Kopp, J., Büchler, M., Lanzer, M., and Deponte, M. (2015) Plasmodium falciparum antioxidant protein reveals a novel mechanism for balancing turnover and inactivation of peroxiredoxins. *Free Radic. Biol. Med.* 85, 228–236.
- (311) Kil, I. S., Lee, S. K., Ryu, K. W., Woo, H. A., Hu, M.-C., Bae, S. H., and Rhee, S. G. (2012) Feedback control of adrenal steroidogenesis via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent, reversible inactivation of peroxiredoxin III in mitochondria. *Mol. Cell* 46, 584–594.
- (312) Pace, P., Peskin, A., Han, M.-H., Hampton, M., and Winterbourn, C. (2013) Hyperoxidized peroxiredoxin 2 interacts with the protein disulfide- isomerase ERp46. *Biochem. J.* 453, 475–485.
- (313) Cox, A. G., Pearson, A. G., Pullar, J. M., Jonsson, T. J., Lowther, W. T., Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2009) Mitochondrial peroxiredoxin 3 is more resilient to hyperoxidation than cytoplasmic peroxiredoxins. *Biochem. J.* 421, 51–58.
- (314) Kim, S. J., Woo, J. R., Hwang, Y. S., Jeong, D. G., Shin, D. H., Kim, K., and Ryu, S. E. (2003) The tetrameric structure of *Haemophilus influenzae* hybrid Prx5 reveals interactions between electron donor and acceptor proteins. *J. Biol. Chem.* 278, 10790–10798.
- (315) Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., and Simmerling, C. (2015) ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* 11, 3696–3713.
- (316) Flohé, L., Budde, H., Bruns, K., Castro, H., Clos, J., Hofmann, B., Kansal-Kalavar, S., Krumme, D., Menge, U., Plank-Schumacher, K., Sztajer, H., Wissing, J., Wylegalla, C., and Hecht, H.-J. (2002) Tryparedoxin Peroxidase of *Leishmania donovani*: Molecular Cloning, Heterologous Expression, Specificity, and Catalytic Mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 324–335.
- (317) Noguera, M. E., Vazquez, D. S., Ferrer-Sueta, G., Agudelo, W. A., Howard, E., Rasia, R. M., Manta, B., Cousido-Siah, A., Mitschler, A., Podjarny, A., and Santos, J. (2017) Structural variability of *E. coli* thioredoxin captured in the crystal structures of single-point mutants. *Sci. Rep.* 7.
- (318) Wagner, G. (2013) Mechanistic aspects of the reaction of dimedone derivatives with sulfenic acids and other sulfur compounds—a computational study. *Tetrahedron* 69, 7243–7252.
- (319) Freeman, F., Adesina, I. T., La, J. Le, Lee, J. Y., and Poplawski, A. A. (2013) Conformers of cysteine and cysteine sulfenic acid and mechanisms of the reaction of cysteine sulfenic acid with 5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione (dimedone). *J. Phys. Chem. B* 117, 16000–16012.

- (320) M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Had, D. J. F. (2013) Gaussian 09 Rev. D.01. Wallingford, CT, USA.
- (321) Lin, Y. S., Li, G. De, Mao, S. P., and Chai, J. Da. (2013) Long-range corrected hybrid density functionals with improved dispersion corrections. *J. Chem. Theory Comput.* 9, 263–272.
- (322) Hratchian, H. P., and Schlegel, H. B. (2004) Accurate reaction paths using a Hessian based predictor–corrector integrator. *J. Chem. Phys.* 120, 9918–9924.
- (323) Shao, J., Tanner, S. W., Thompson, N., and Cheatham III, T. E. (2007) Clustering molecular dynamic trajectories: 1. Characterizing the performance of different clustering algorithms. *J. Chem. Theory Comput.* 3, 2312–2334.
- (324) Singh, U. C., and Kollman, P. A. (1984) An approach to computing electrostatic charges for molecules. *J. Comput. Chem.* 5, 129–145.
- (325) Morris, G., and Huey, R. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* 30, 2785–2791.
- (326) Gasteiger, J., and Marsili, M. (1980) Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* 36, 3219–3228.
- (327) Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., and Olson, A. J. (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 19, 1639–1662.
- (328) Manevich, Y., and Fisher, A. B. (2005) Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 1422–1432.
- (329) Rumsey, S. C., and Levine, M. (1998) Absorption, transport, and disposition of ascorbic acid in humans. *J. Nutr. Biochem.* 9, 116–130.
- (330) Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Ferrer-Sueta, G., Souza, J. M., Duran, R., Freeman, B. A., Radi, R., and Alvarez, B. (2008) Reactivity of sulfenic acid in human serum albumin. *Biochemistry* 47, 358–367.
- (331) Turell, L., Radi, R., and Alvarez, B. (2013) The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic. Biol. Med.* 65, 244–253.
- (332) Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Radi, R., and Alvarez, B. (2009) Sulfenic acid—a key intermediate in albumin thiol oxidation. *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877, 3384–3392.
- (333) Nelson, K. J., Knutson, S. T., Soito, L., Klomsiri, C., Poole, L. B., and Fetrow, J. S. (2011) Analysis of the peroxiredoxin family: using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis. *Proteins* 79, 947–964.
- (334) Vedadi, M., Lew, J., Artz, J., Amani, M., Zhao, Y., Dong, A., Wasney, G. A., Gao, M., Hills, T., Brokx, S., Qiu, W., Sharma, S., Diassiti, A., Alam, Z., Melone, M., Mulichak, A., Wernimont, A., Bray, J., Loppnau, P., Plotnikova, O., Newberry, K., Sundararajan, E., Houston, S., Walker, J., Tempel, W., Bochkarev, A., Koziaradzki, I., Edwards, A., Arrowsmith, C., Roos, D., Kain, K., and Hui, R. (2007) Genome-scale protein expression and structural biology of *Plasmodium falciparum* and related

Apicomplexan organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 151, 100–110.

(335) Yuan, Y., Knaggs, M. H., Poole, L. B., Fetrow, J. S., and Salsbury, F. R. J. (2010) Conformational and oligomeric effects on the cysteine pK(a) of tryparedoxin peroxidase. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 28, 51–70.

(336) Metz, S., Kästner, J., Sokol, A. A., Keal, T. W., and Sherwood, P. (2014) ChemShell—a modular software package for QM/MM simulations. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 4, 101–110.

(337) Nitsche, M. A., Ferreria, M., Mocskos, E. E., and González Lebrero, M. C. (2014) GPU Accelerated Implementation of Density Functional Theory for Hybrid QM/MM Simulations. *J. Chem. Theory Comput.* 10, 959–967.

(338) Sastre, S. (2018) Modificaciones post-traduccionales de la peroxirredoxina 6 humana: consecuencias de su fosforilación y glicación. Tesina de graduación de la Licenciatura en Bioquímica. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

# Anexo: Publicaciones

Los resultados presentados en el marco de la tesis de posgrado dieron lugar a la publicación de los siguientes artículos en revistas arbitradas internacionales:

Portillo-Ledesma, S., Sardi, F., Manta, B., Tourn, M. V., Clippe, A., Knoops, B., Alvarez, B., Coitiño, E. L., and Ferrer-Sueta, G. (2014) Deconstructing the catalytic efficiency of peroxiredoxin-5 peroxidatic cysteine. *Biochemistry* 53, 6113–6125.

Portillo-Ledesma, S., Randall, L. M., Parsonage, D., Dalla Rizza, J., Karplus, P. A., Poole, L. B., Denicola, A., and Ferrer-Sueta, G. (2018) Differential Kinetics of Two-Cysteine Peroxiredoxin Disulfide Formation Reveal a Novel Model for Peroxide Sensing. *Biochemistry*.

Tairum, C. A., Santos, M. C., Breyer, C. A., Geyer, R. R., Nieves, C. J., Portillo-Ledesma, S., Ferrer-Sueta, G., Toledo, J. C., Toyama, M. H., Augusto, O., Netto, L. E. S., and De Oliveira, M. A. (2016) Catalytic Thr or Ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms. *Sci. Rep.* 6.

Actualmente se está trabajando en la fase final de la escritura de:

Artículo derivado del Capítulo 4: Molecular Determinants of Fully-Folded to Locally-Unfolded Transition in the Catalytic Cycle of Human Peroxiredoxin 5, an Atypical 2-Cys Based Peroxidase, Portillo-Ledesma, S.; Vázquez, D., Santos, J, Ferrer-Sueta, G, Coitiño, E.L. (2018), en preparación.

Artículo derivado de los resultados de la mutante T44V presentados en el Capítulo 3.