A grayscale micrograph showing a dense field of human erythrocytes (red blood cells). The cells are roughly spherical and appear as light-colored, slightly irregular shapes against a darker background. The overall texture is granular and uniform.

Purificación y caracterización bioquímica de la peroxirredoxina II de eritrocito humano

Bruno Manta. Trabajo Especial 2 - Licenciatura en Bioquímica.
Tutor: Dra. Ana Denicola; Laboratorio de Fisiología Biológica, Facultad de Ciencias

Trabajo Especial 2
Bruno Manta

Tutor: Dra. Ana Denicola

2006

Carátula: Figura compuesta en base a la imagen de microscopía electrónica de decámetro de la triparredoxina peroxidasa de *Trypanosoma brucei*. Adaptado de [36]

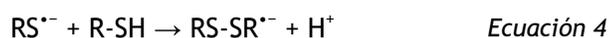
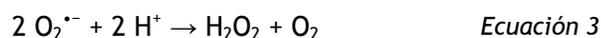
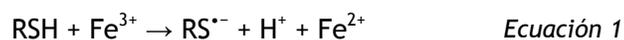
| | | |
|----------|--|----|
| 1 | Introducción | 3 |
| 1.1 | Peroxirredoxinas | 3 |
| 1.2 | Clasificación | 5 |
| 1.3 | Ciclo catalítico y oligomerización | 7 |
| 1.4 | Varias funciones para una misma enzima | 8 |
| 1.5 | Estrés oxidativo y defensas antioxidantes en el glóbulo rojo | 10 |
| 1.6 | Peroxirredoxinas en el glóbulo rojo | 11 |
| 1.6.1 | Aislamiento y caracterización de NKEF | 11 |
| 1.6.2 | Torina, Calpromotina y la regulación del canal Gardos | 12 |
| 1.6.3 | MER5/Aop1 | 14 |
| 1.6.4 | Las Prx en la fisiología del eritrocito | 15 |
| 2 | Objetivos | 17 |
| 2.1 | Objetivo general | 17 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 17 |
| 3 | Materiales y Métodos | 18 |
| 3.1 | Reactivos | 18 |
| 3.2 | Purificación de la Prx | 18 |
| 3.3 | Identificación de la Prx | 19 |
| 3.3.1 | Análisis electroforético | 19 |
| 3.3.2 | Identificación por anticuerpos anti-Prx | 19 |
| 3.3.3 | Cromatografía de exclusión molecular (SEC) | 19 |
| 3.3.4 | Espectrometría de masa | 19 |
| 3.4 | Reducción de tioles proteicos de la Prx | 20 |
| 3.5 | Cuantificación de tioles | 20 |
| 3.6 | Dosificación de proteínas | 20 |
| 3.7 | Cuantificación de peróxido de hidrógeno y peroxinitrito | 21 |
| 3.8 | Actividad peroxidasa por el método del tiocianato | 21 |
| 3.9 | Estudios cinéticos de la Prx | 21 |
| 3.9.1 | Estudio de la reacción de la Prx con peróxido de hidrógeno por cinética de estado estacionario | 21 |
| 3.9.2 | Estudio de la reacción de la Prx con peróxido de hidrógeno por fluorescencia de Trx | 22 |
| 3.9.3 | Estudio de la reacción de Prx con peroxinitrito por velocidades iniciales | 22 |
| 3.9.4 | Estudio de la reacción de Prx con peroxinitrito por ensayos de competencia | 23 |
| 4 | Resultados y discusión | 25 |
| 4.1 | Purificación de la Prx de eritrocito | 25 |
| 4.2 | Conclusión <i>objetivo específico 1</i> | 29 |
| 4.3 | Actividad peroxidasa de la Prx | 30 |
| 4.4 | Conclusión <i>objetivo específico 2</i> | 34 |
| 4.5 | Reacción de la Prx con peroxinitrito | 34 |
| 4.6 | Conclusión <i>objetivo específico 3</i> | 39 |
| 4.7 | Discusión general | 40 |
| 4.8 | Referencias | 43 |

1 INTRODUCCIÓN

1.1 PEROXIRREDOXINAS

Las peroxirredoxinas (Prx) son un grupo de peroxidases de 20-30 kDa presentes en abundancia en todos los organismos estudiados hasta el momento. Las Prx catalizan la reducción de un amplio rango de hidroperóxidos a expensas de tioles intrínsecos sin la participación de cofactores. En términos generales, se consideran enzimas de una eficiencia catalítica baja ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [1] en comparación con otras peroxidases bien caracterizadas como la catalasa ($10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [2]) y la glutatión peroxidasa (Gpx, $10^8 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$ [3]). Esta menor eficiencia catalítica se ve compensada, en algunos casos, por su mayor concentración y su compartimentalización que las ubica en casi todos los organelos subcelulares [4,5]. En los últimos años se ha acumulado evidencia que apunta a considerar que las Prx, en particular las de mamíferos, presentan otras funciones además de su potencial rol antioxidante, incluyendo la modulación de los niveles de H_2O_2 inducidos por factores de crecimiento [6,7] y la participación en las cascadas de señalización involucradas en proliferación celular [8,9,10], diferenciación [11,12] y apoptosis [1,13]

Las Prx fueron originalmente identificadas en las levaduras *Sacharomises cerevisae* bajo el nombre de “*thiol-specific antioxidant proteins*” (TSA), debido a los trabajos pioneros del grupo de Earl Stadtman. En un artículo de 1988 este grupo reporta el aislamiento y purificación de una proteína citosólica de levadura, de 27 kDa, capaz de inhibir la inactivación de la glutamina sintetasa por un sistema oxidante constituido por Fe^{3+} , O_2 y un reductor como ser el ditiotreitól (DTT) o el ácido ascórbico (sistema MCO, de “*metal catalized-oxidation*”) [14]. La combinación de estos tres elementos en solución acuosa determina la generación de un poderoso sistema productor de especies reactivas del oxígeno (ERO) y del azufre [15], como consecuencia de la siguiente serie de reacciones (considerando un tiol reductor cualquiera, RSH):



Esta cadena de propagación puede ser interrumpida por agentes quelantes con fuerte afinidad por Fe^{2+} o por enzimas que descompongan el H_2O_2 , como ser la catalasa [15,16]. En este contexto, la TSA fue identificada como una proteína capaz de proteger a la glutamina sintetasa (GS) de las especies reactivas producidas por este sistemas, por lo que se denominó “proteína protectora” (*protector protein*). Su capacidad protectora demostró ser dependiente de las cisteínas que poseía TSA en su secuencia primaria (C47 y C170), ya que la actividad protectora sólo se registró cuando ambos tioles se encontraban reducidos. A su vez, la protección dependía de la presencia de tioles en el medio de reacción, ya que al cambiar el reductor de DTT a ascorbato, la inactivación de la GS por el sistema MCO no era inhibible por la TSA [14,17]. Si bien en su momento, esta observación se interpretó como una posible actividad enzimática atrapadora de radicales del azufre (en particular del radical tiilo, RS^\cdot , o disulfilo, RS-SR^\cdot) más que como actividad peroxidasa, logró llamar la atención sobre esta emergente familia de enzimas antioxidantes, localizando tempranamente la importancia de sus grupos tiol [14]. Un año después se clonó y caracterizó una enzima de 22 kDa (denominada C22) presente en *Salmonella typhimurium* [18] y *Escherichia coli*, capaz de reducir hidroperóxidos y alquilhidroperóxidos (ROOH) usando como poder reductor dinucleótidos de nicotina y adenina (NADH o NADPH) [19]. La actividad “NAD(P)H peroxidasa” de esta enzima requería de la presencia de otro componente presente en el extracto bacteriano, una proteína de 57 kDa (denominada C57) cuya función era desconocida. La identificación de C57 como una flavoenzima de 57 kDa homóloga a la conocida tioredoxina reductasa de mamíferos permitió completar la caracterización de este sistema reductor de ROOH, el cual fue renombrado Ahp (de alquilhidroperóxido reductasa) con sus 2 componentes: AhpC (C22, peroxidasa) y AhpF (C57, flavoenzima reductora de la peroxidasa) [18].

Durante los años subsiguientes se identificaron proteínas homólogas a TSA en otros organismos [20]. El análisis de las bases de datos existentes arrojó que existían 25 secuencias homólogas a TSA tanto en bacterias como en mamíferos [21], 12 de las cuales estaban provenientes de genomas de mamíferos y habían sido identificados en años anteriores sin hacer referencia a su actividad peroxidasa [20]. Debido a la capacidad tanto de AhpC como de TSA de reducir hidroperóxidos a expensas de tioles reductores, se denominó “peroxirredoxinas” a esta nueva familia de peroxidases [17,21].

El descubrimiento y caracterización de un sistema de enzimas peroxidases sin cofactor, como es el caso de las Prx, fue relativamente simultáneo a la valorización de la importancia de los sistemas redox biológicos basados en calcógenos (fundamentalmente azufre, selenio y oxígeno) y, a su vez, al desarrollo de nuevas técnicas que permitían estudiarlos. En la actualidad sabemos

que una parte importante de las enzimas que participan en reacciones de óxido-reducción sustenta su actividad catalítica en las cadenas laterales de aminoácidos como la cisteína, la metionina, la selenocisteína, la selenometionina, y la tirosina [22].

1.2 CLASIFICACIÓN

Desde 1994 a la fecha se han identificado cientos de Prx. La homogeneidad en cuanto a las características de las Prx identificadas originalmente se fue perdiendo y actualmente constituyen un grupo complejo con un amplio espectro de sustratos sobre los que pueden actuar y varios sistemas reductores. Sin embargo, es posible extraer algunas generalidades que nos permiten clasificarlas. Todas las Prx conocidas poseen una cisteína estrictamente conservada en el dominio aminoterminal (dentro de una secuencia VCP o similar) que sustenta la actividad peroxidática y un número importante de éstas -pero no todas- poseen una segunda cisteína conservada en la región carboxiterminal [1,20]. Esta observación llevó a clasificar las Prx en dos grupos, denominados 1-Cys Prx y 2-Cys Prx en función de la presencia o ausencia de la segunda cisteína. Esta clasificación posee sustento tanto a nivel de secuencia como de mecanismo catalítico. En ambos grupos la cisteína aminoterminal es la que reacciona con el peróxido, mientras que sólo en las 2-Cys Prx la cisteína carboxiterminal participa del mecanismo catalítico [5,20]. Existen evidencias estructurales y mecanísticas que permiten dividir el grupo de las 2-Cys Prx en dos subgrupos denominados “típicas” y “atípicas”. Esta división se basa en diferencias en el mecanismo mediante el cual la cisteína aminoterminal recupera la forma reducida luego de reaccionar con el peróxido [4,5].

La mayoría de los organismos producen más de una isoforma de Prx, siendo el caso de los mamíferos, donde se han identificado 6 subgrupos (denominadas I-VI), el que reviste mayor complejidad (Tabla 1) [23,24,25,26]. Su clasificación interna refiere a diferencias en su secuencia y localización subcelular. Los subgrupos I a IV contienen a todas las 2-Cys Prx típicas, clasificadas en función de su compartimentalización subcelular y ubicación en el genoma, mientras que el subgrupo V refiere a todas las 2-Cys Prx atípicas y el VI a las 1-Cys Prx [5].

TABLA 1. Los seis subgrupos de Prx en mamíferos. *Adaptado de [5]*

| Subtipo | 2-Cys Prx | | | | | 1-Cys Prx |
|--|--|--|---------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|----------------------|
| | Típicas | | | | Atípicas | |
| | Prx I | Prx II | Prx III | Prx IV | Prx V | Prx VI |
| Nomenclatura previa | TPx-A NKEF-A MSP23 OSF3 HBP23 PAG | TPx-B NKEF-B PRP Calpromatina Torina Banda 8 TSA | AOP-1 SP22 MER5 | AOE372 TRANK | AOEB166 PMP20 AOPP | ORF6 LTW4 AOP2 |
| Localización subcelular | Citosol / Núcleo | Citosol / Membrana | Mitocondria | Citosol / Golgi / Extracel | Mitocondria / Peroxisoma / Citosol | Citosol |
| Longitud del polipéptido | 199 | 198 | 256 clivado en 63-64 | 271 clivado en 36-37 | 214 clivado en 52- 53 | 224 |
| Localización cromosoma humano | 1q34.1 | 13q12 | 10q125-q26 | 110p22.13 | 11q13 | 1q23.3 |
| Interacción con otras proteínas o ligandos | c-Abl Presenilina-1 Hemos Factor de inhibición de la migración de macrófagos (MMIF) Ciclofilinas | Proteínas 7.2b (estomatina) Presenilina-1 Membrana del eritrocito Ciclofilina | Ciclofilina Cadenas A de la abrina | Heparina Ciclofilina | Ciclofilina | Ciclofilina |

Si bien la mayoría de la investigación sobre Prx se ha centrado en mamíferos, o bacterias *E.coli* o *S.thyphimurium*, es importante notar que la diversidad y complejidad de Prx en plantas es similar a la de estos grupos y, sin embargo, utilizan una clasificación diferente a la presentada. La nomenclatura más utilizada para las Prx de plantas las clasifican en cuatro grupos llamados 1-Cys Prx y 2-Cys Prx, Prx tipo II y Prx Q, donde las 1-Cys Prx y 2-Cys Prx representan los grupos VI y I-IV de mamíferos, respectivamente; las Prx tipo II incluye a las 2-Cys Prx atípicas además de isoformas secretadas al floema y las Prx Q se refiere a un subgrupo de Prx plastídicas ausente en animales [27], que presentan importante homología con las proteínas bacterianas BCP (*bacterioferritin comigratory protein*) [28], que también han sido clasificadas como Prx [29]. Debemos mencionar que las Prx, tanto animales como de plantas, también han sido clasificadas utilizando como criterio la secuencia de residuos conservados en torno al sitio activo y resultando en la definición de 5 grupos denominados Prx tipo A, B, C, D y E, que corresponden a los grupos 2-Cys Prx típicas, 1-Cys Prx, Prx Q /BCP y subgrupo I y II de las 2-Cys Prx atípicas, respectivamente [30].

1.3 CICLO CATALÍTICO Y OLIGOMERIZACIÓN

Las Prx más estudiadas han sido las 2-Cys Prx típicas en las cuales el ciclo catalítico involucra la oxidación del tiol de la cisteína aminoterminal (altamente conservada en torno a la posición 50 [1]) a ácido sulfénico (Cys-SOH) y la rápida reacción de éste con el tiol de la cisteína carboxiterminal de otro monómero para formar un disulfuro. La alta reactividad del tiol con hidroperóxidos a pH fisiológico es consecuencia de su bajo pKa. La activación de esta Cys -denominada cisteína peroxidática (C_P) por ser la que reacciona con el hidroperóxido- resulta, en la mayoría de los casos, de la formación de un puente de hidrógeno con un histidina cercana y de la interacción con un residuo de arginina cargado positivamente, formando una “tríada catalítica” altamente conservada en las 2-Cys Prx [1,31]. Por otro lado, la fácil formación de un disulfuro intermolecular es posible debido a que los monómeros de Prx presentan oligomerización, siendo la unidad mínima un homodímero “cabeza-cola” que posiciona al tiol de la C_P espacialmente cercano al tiol con el que forma el disulfuro (cisteína de resolución, C_R [32,33]), como se esquematiza en la Figura 1. Se acepta que el mecanismo catalítico de las 2 Cys Prx típicas es del tipo “ping-pong” (enzima bisustrática sin formación de complejo ternario [34]), aunque algunos han reportado desviaciones de este comportamiento por motivos aún no del todo claros [35,36].

Este mecanismo catalítico requiere que la unidad funcional mínima de las 2-Cys Prx típicas sea un homodímero, ya que el intermediario del ciclo es un disulfuro C_P - C_R que será reducido por el segundo sustrato, en general tiorredoxina u otras proteínas con actividad disulfuro reductasa. Como veremos más adelante el estado nativo de estas enzimas es un decámero formado por cinco homodímeros en un ordenamiento toroidal (α_2)₅ [5]. La obtención de estructuras cristalográficas de 2-Cys Prx con la C_P en diferentes estados de oxidación permitió asociar estados de oligomerización a estados funcionales de la enzima y fue tempranamente reconocido que debía existir un intercambio dinámico de estados de oligomerización durante el ciclo catalítico [32]. Los primeros resultados indicaban que la forma reducida de estas enzimas se presenta como monómero o como decámero [37,38] y forma oxidada como dímeros formados por puentes disulfuro [5,39]. Sin embargo, datos cristalográficos [40] y estudios en solución indican que las 2-Cys Prx decamerizan en todos sus estados de oxidación [41,42,43], lo que plantea interrogantes acerca de la dinámica de los cambios de oligomerización durante el ciclo catalítico. La relación entre la oligomerización y la actividad cobró relevancia al identificarse que formas de alto peso molecular de la enzima -con más de 20 subunidades- que presentan actividad chaperona, y la demostración de que la actividad peroxidasa reside en las especies de menor peso molecular (dímeros a decámeros) [44,45].

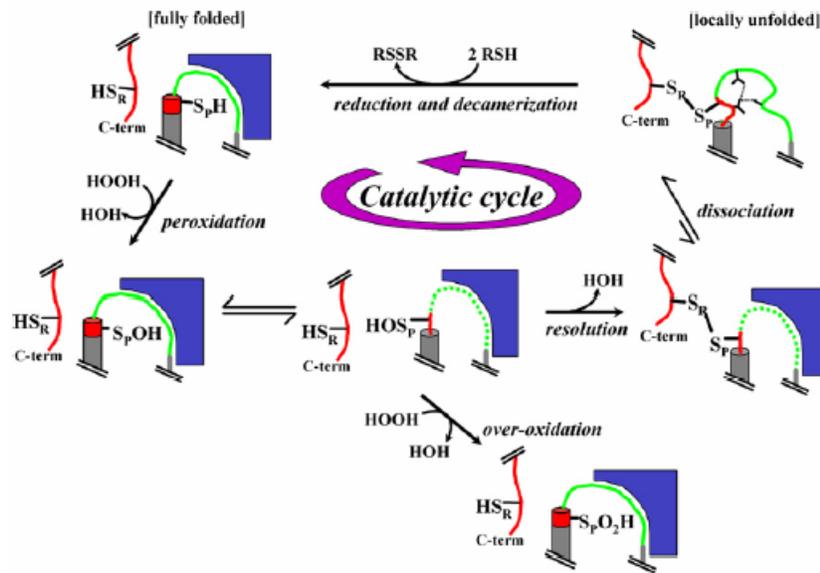


Figura 1. Ciclo catalítico y la oligomerización redox-dependiente de las 2-Cys Prx típicas. Esta imagen muestra el ciclo catalítico de las 2-Cys Prx típicas, presentando además información sobre las alteraciones en el estado de oligomerización que acompañan los cambios en el estado redox. El C_p -loop y la hélice subsiguiente al sitio activo de una subunidad del homodímero (residuos 40-49) se representan en verde, una región cercana de un homodímero adyacente (residuos 73-84) en azul y el extremo carboxiterminal de la otra subunidad del mismo homodímero que posee C_r en rojo. La C_p se representa en diferentes estados de oxidación: cisteína (S_pH), ácido cisteínsulfénico (S_pOH), ácido cisteínsulfínico (S_pO_2H) o disulfuro con la C_r perteneciente al otro monómero del homodímero (S_p-S_r). El extremo aminoterminal que posee C_p es representado como un cilindro gris. El brazo flexible que éste extremo con el resto de la proteína, se representa como un cilindro rojo con una línea sólida verde para indicar su estado plegado, o como una línea verde punteada para representar su estado desplegado. Las flechas unidireccionales representan pasos de oxidación y las bidireccionales representan equilibrios asociados a distintas conformaciones de la enzima. Tomado de [46].

1.4 VARIAS FUNCIONES PARA UNA MISMA ENZIMA

Como hemos comentado, la función peroxidasa de las Prx se solapa con la de otras actividades enzimáticas que, al menos en sus eficiencias catalíticas, aparecen como más optimizadas para esa función. Esto llevó a un intenso trabajo en busca del rol de la Prx en la fisiología celular, coincidiendo con una serie de avances que determinaron la revalorización del rol del H_2O_2 como mensajero intracelular [47,48,49]. El H_2O_2 en eucariotas presenta un rol dual, siendo por un lado un oxidante muy difusible, y por otro una molécula de señalización [50]. Se considera que las Prx de mamíferos y levaduras, abundantes en el citosol, participan de manera esencial en las cascadas de transducción de señales redox mediadas por H_2O_2 [39]. Bajas concentraciones intracelulares de H_2O_2 (del orden nM - μM) son controladas por las defensas antioxidantes de la célula, mientras que frente a un aumento transitorio de los niveles de H_2O_2 -por ejemplo en respuesta a factores de crecimiento- se produce la sobreoxidación del tiol reactivo de las Prx a ácido sulfínico ($Cys-SO_2H$) o sulfónico ($Cys-SO_3H$), inactivando la enzima [51]. Esta "ruptura" de la barrera antioxidante permite una fuga de H_2O_2 que resulta en la oxidación de tioles reactivos

de otras proteínas blanco [50], siendo de particular importancia enzimas reguladoras como las fosfatasa de tirosinas 1B [52,53]. La inactivación de las Prx por sobreoxidación es revertida enzimáticamente por reducción del residuo cisteinsulfínico por acción de la enzima sulfiredoxina en eucariotas o por una proteína homóloga a p53 denominada sestrina en bacterias, restituyendo la barrera antioxidante [54,55,56].

Sin embargo, su potencial como enzima antioxidante en la detoxificación de hidroperóxidos no puede ser dejado de lado, como demuestran experimentos con levaduras mutantes [57,58] o ratones *knock-out* [59,60], que describiremos más adelante. Recientemente se ha visto que las Prx son capaces de reducir catalíticamente un peróxido inorgánico como el peroxinitrito (ONOO^-)¹ [61,62,63,64]. El ONOO^- es conocido como un potente agente oxidante y nitrante que se forma *in vivo* en la reacción de terminación, controlada por difusión, entre los radicales óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) y superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) (Figura 2). Su potencial citotóxico se debe a que puede reaccionar directamente con biomoléculas críticas, en particular tioles [65] y hemoproteínas [66,67], o protonarse a ácido peroxinitroso (ONOOH , $\text{pK}_a = 6.8$ [68]) el cual deriva a la formación de las especies radicalares tóxicas (radical hidroxilo, $\cdot\text{OH}$ y dióxido de nitrógeno, $\cdot\text{NO}_2$ [68]). La reacción directa con CO_2 , de concentración mM a nivel tisular, también lleva a la producción de radicales (radical carbonato, $\text{CO}_3\cdot^-$, y $\cdot\text{NO}_2$) y ambos mecanismos pueden conducir a la modificación de tirosinas proteicas a nitrotirosina (Tyr-NO_2), que se ha considerado un marcador de peroxinitrito [69].

A diferencia de lo que sucede con las especies reactivas del oxígeno (ERO), no existen sistemas enzimáticos caracterizados que eliminen especies reactivas del nitrógeno (ERN) como ser el ONOO^- . Sin embargo, recientemente se ha demostrado que cepas de *S.typhimurium* mutantes de para el gen de la AhpC son particularmente sensibles a las ERN, resistencia que es recuperada al ser transformadas con este gen [70]. Sumado a esto, una serie de trabajos posteriores determinaron que algunas 2 Cys Prx de procariotas [61,63], eucariotas unicelulares [62,64] y humanos [71] pueden reducir catalíticamente al peroxinitrito a nitrito (NO_2^-) con velocidades del orden de 10^6 - $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, mayores inclusive que las obtenidas para H_2O_2 . Esto otorga un interés adicional a la Prx como posible sistema enzimático que elimine ERN.

¹ Los nombres recomendados por IUPAC para el peroxinitrito anión (ONOO^-) y el ácido peroxinitroso (ONOOH) son *oxoperoxonitrato (1-)* y *oxoperoxinitrato de hidrógeno*, respectivamente. En este trabajo el término peroxinitrito es utilizado indistintamente para referirse a ambas especies ONOO^- y ONOOH , a no ser que se indique lo contrario.

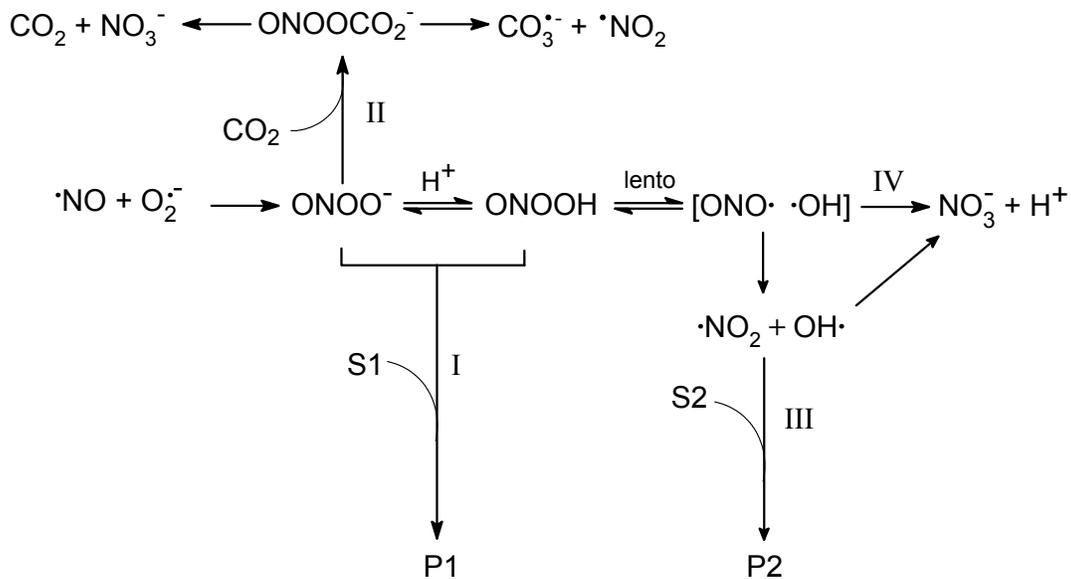


Figura 2: Esquema de la formación y reacciones del peroxinitrito. El peroxinitrito formado *in vivo* puede reaccionar con blancos biológicos (representados como S1 y S2) a través de la reacción directa (vía I) o a través de los radicales formados por su homólisis (vía III), para dar productos de oxidación (P1) o de nitración / hidroxilación (P2). La reacción con CO₂ (vía II) es importante en sistemas biológicos dada su alta concentración plasmática y tisular, generando la especie ONOOCO₂⁻ que puede, también, descomponerse a especies radicalares por homólisis del enlace peroxo. La reacción que nos interesa caracterizar es la vía I siendo S1 la Prx con el tiol reducido (Cys-SH) y P1 la Prx con el tiol oxidado (Cys-SOH).

1.5 ESTRÉS OXIDATIVO Y DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN EL GLÓBULO ROJO

La vida media de los glóbulos rojos (GR) en humanos es de 120-150 días y deben mantenerse funcionales a pesar de portar grandes cantidades de una proteína potencialmente pro-oxidante como es la hemoglobina, O₂ y una membrana rica en lípidos poliinsaturados [2]. El riesgo oxidativo está compuesto, principalmente, por la producción de ERO como consecuencia del proceso de autooxidación de la oxyhemoglobina (HbO₂) [72,73] así como por la liberación del hierro hémico como resultado de la oxidación de la hemoglobina (Hb) por el propio H₂O₂ formado endógenamente o difusible a través de la membrana [74]. Además, los GR están expuestos constantemente a situaciones de estrés mecánico debido a deformaciones físicas que sufren en los vasos de menor diámetro y cuenta con la particularidad de una baja actividad metabólica y la imposibilidad de sintetizar nuevos lípidos o proteínas para reemplazar los dañados [2].

Otro posible agente oxidante al que está expuesto el GR en el torrente sanguíneo es el ONOO⁻ que se forma *in vivo* en la luz de los vasos y se ha demostrado que puede difundir dentro del GR [75,76]. Debido a su alta concentración en el compartimiento vascular y a la abundancia de

canales aniónicos (Banda 3 [75]) en la membrana del GR, la HbO₂ ha sido propuesta como uno de los blancos más importantes del ONOO⁻ formado intravascularmente, resultando en la oxidación de la HbO₂ a metahemoglobina (MetHb) con la consecuente liberación de O₂⁻ y la isomerización del ONOO⁻ a nitrato (NO₃⁻) [66,67]. Los GR cuentan con enzimas que detoxifican las ERO como ser superóxido dismutasa (SOD), catalasa y Gpx. En general, se acepta que estas enzimas constituyen la primera línea de defensa antioxidante de esta célula y que pueden rendir cuenta de las ERO formadas [2].

1.6 PEROXIRREDOXINAS EN EL GLÓBULO ROJO

Se han caracterizado cuatro Prx en los GR. Tres de ellas, denominadas MER5/Aop1 [77,78], NKEF-A y NKEF-B [79], pertenecen al subgrupo de las 2-Cys Prx típicas [80,81] y la cuarta (denominada AOP2, de *antioxidant protein 2*) pertenece a las 1-Cys Prx [82,83]. La caracterización de estas enzimas en los GR comenzó mucho antes que las Prx existiesen como familia y es por ello que los roles originalmente propuestos, así como su nomenclatura, no refleja su pertenencia a la familia de la Prx.

1.6.1 Aislamiento y caracterización de NKEF

La citotoxicidad de los linfocitos asesinos (*Natural Killer*, NK) contra ciertos tipos de células tumorales aumenta significativamente en presencia de GR [84,85]. Una serie de trabajos enfocados a determinar cuál era la base bioquímica de este “potenciamento” localizaron y purificaron una proteína citosólica capaz de simular la estimulación que producía el GR entero. Denominaron a este factor soluble NKEF (*Natural Killer Enhancing Factor*) [79]. El peso molecular aparente de esta proteína era de 300-400 kDa en estado nativo, y presentaba un patrón electroforético en SDS-PAGE de una única banda de 48 kDa en condiciones no reductoras y de una banda de 24 kDa en condiciones reductoras, indicando la presencia de un dímero unido por disulfuro. La búsqueda del gen que codificaba para esta proteína llevó a la identificación y clonado de dos genes distintos, denominados NKEF-A y NKEF-B. Ambos genes codificaban para proteínas de 199 y 198 aminoácidos respectivamente. Si bien la función biológica de estas proteínas era desconocida, presentaban un importante grado de homología con otras proteínas de organismos tan diferentes como mamíferos o procariotas, la mayoría de ellas también de función desconocida [16].

Experimentos posteriores llevaron a la identificación del producto del gen NKEF-B como una proteína sumamente abundante en el GR y capaz de proteger la inactivación de la GS por un sistema MCO, de manera análoga a la TSA [16]. Simultáneamente a este trabajo se publicó un artículo que, inspirado en los trabajos originales del grupo de Stadtman [14] se purificaba y caracterizaba una “proteína protectora” del GR (denominada HRPRP, de *Human Red blood cell Potector Protein*) [86]. Ambos trabajos posicionaron a la NKEF como una nueva e importante defensa antioxidante en los eritrocitos de mamíferos. Posteriormente se caracterizó el sistema reductor de disulfuros compuesto por la tiorredoxina (Trx) - tiorredoxina reductasa (TR) en GR, lo que proveía de un sistema reductor completo dependiente de NADPH para sustentar la actividad peroxidasa de la Prxzima, resultando en el cambio de denominación de NKEF a “peroxidasa humana asociada a tiorredoxina” (TPx, de *thioredoxin-dependet peroxidase* [87]). Fue recién en años posteriores que se identificó que el GR maduro poseía las isoformas A y B de la NKEF, correspondientes a ambos genes, y que solo la forma reducida de la isoforma A (menos del 1% del total de NKEF) presenta la actividad “NKEF” [88]. Por su parte, la isoforma B resultó ser en la que recaía la actividad antioxidante, como se demostró al transfectar una línea celular de epitelio humana con este gen [89]. Estudios en GR maduros de porcino demostraron que la isoforma más abundante (99%) es la B (o HRPRP) y aportaron un resultado de particular importancia al determinar que NKEF-B constituye la segunda proteína más abundante del eritrocito, luego de la hemoglobina [80], situación que se conserva en el caso de los humanos². Asumiendo un peso molecular de 23 kDa para la NKEF-B de GR humano se puede estimar la concentración de esta proteína dentro del glóbulo en 0.24 mM [91] contra 5 mM Hb [75].

1.6.2 Torina, Calpromotina y la regulación del canal Gardos

Un estudio de la literatura existente permite mostrar que la Prx de GR no había pasado tan inadvertida como se cree. Es probable que la primera evidencia de la existencia de las Prx, que se remonta a la década del 70, haya sido en este tipo celular. Los estudios ultraestructurales de J.R.Harris [92] con proteínas de membrana de glóbulos rojos revelaban la presencia de grandes complejos macromoleculares extrínsecos, que se separaban fácilmente de la membrana por tratamiento con detergentes. Estos complejos aparecían al microscopio electrónico como estructuras circulares y huecas en el centro [93]. Y recibieron originalmente nombres acorde a su apariencia: “torina” y “proteína cilindro hueco” (HCP de *hollow cilynder protein*) o más simplemente “cilindrina”. La torina y la cilindrina fueron tempranamente identificadas como dos proteínas distintas, con diferente coeficiente de sedimentación (9.0 S y 22.5 S respectivamente)

² Moore y colaboradores [90] plantean que en humanos se trata de la tercer proteína más adunbante luego de la Hb y la anhidrasa carbónica.

y con diferente patrón de migración en SDS-PAGE. Es interesante notar que las subunidades que componían la torina migraban con un peso molecular aparente de ~20 kDa [93]. La torina se presenta como una estructura con forma de anillo conteniendo 10 subunidades, fácilmente distingible de la “cilindrina”, un anillo heptamérico caracterizado más adelante como la subunidad 20S del proteasoma [81]. Varios trabajos caracterizaron a la “torina” del glóbulo rojo como una proteína sumamente abundante, que se asocia a la membrana plasmática y a otras proteínas de membrana [94]. Como se notó en años posteriores, la torina es la forma decamérica de la Prx NKEF-B [81].

Un camino distinto fue el que llevó a la identificación de la mayoría de las propiedades bioquímicas de lo que hoy sabemos es la 2-Cys Prx más abundante del GR. A finales de la década del '80 se identificó una proteína citoplasmática necesaria para estimular el transporte de K^+ en la membrana del eritrocito y fue rápidamente asociada al canal Gardos [90,91]. El “efecto Gardos” se refiere a la permeabilidad dependiente de Ca^{2+} de la membrana del eritrocito al ión K^+ [95]. Este transporte de iones se da vía un transportador conocido como canal Gardos, que desde la década del cincuenta ha llamado la atención de los fisiólogos ya que se asocia a la deshidratación de los GR en pacientes con anemia falciforme y su actividad aparece incrementada en las etapas tempranas del desarrollo del GR [96]. En 1991, Moore y colegas demostraron que la funcionalidad de este canal requería de la interacción de una proteína citosólica de 22 kDa que -según los autores- era desconocida hasta el momento. Denominaron a esta proteína “calpromotina” por promover, en presencia de Ca^{2+} , el eflujo de K^+ a través del canal Gardos [91]. La calpromotina presentaba algunas características como ser la asociación a membrana y dos estados de oligomerización distintos, denominados de bajo y alto peso molecular. La dinámica de este cambio de oligomerización era sensible a ácido iodoacético y a proteasas activadas por leupeptina [97], que en el GR son mayoritariamente las llamadas μ - y m-calpaínas, proteasas de cisteína dependientes de Ca^{2+} [98] que, como se ha reportado, degradan las Prx del glóbulo durante su purificación [80].

La asociación a membrana es otra de las propiedades tempranamente identificadas por este grupo que merece atención. Utilizando una resina de afinidad generada por la unión covalente de la calpromotina a una matriz de agarosa, pudieron demostrar que la calpromotina -cuya forma unida a membrana activaba el canal de potasio dependiente de Ca^{2+} de manera aún desconocida- se unía a membrana asociándose a una proteína del citoesqueleto submembranoso del GR llamada banda 7.2b o estomatina [99]. Es interesante notar que la estomatina es deficiente en pacientes con estomatocitosis, una rara patología en la cual los GR de los pacientes presentan forma “de copa” debido al aumento de permeabilidad de la membrana

tanto al Na⁺ como al K⁺ [100]. En los trabajos mencionados la calpromotina es siempre estudiada en su relación con la activación del canal Gardos. Años después, la secuenciación de la misma, mostrando una alta homología de secuencia con proteínas como TSA, permitió identificar a calpromotina con NKEF-B [101].

Si bien los trabajos de Moore y colegas son reveladores, más lo es la existencia de trabajos previos en los que se mostraba la existencia de una proteína citosólica del GR que se unía a membrana en presencia de Ca²⁺. Esta proteína, denominada en su momento y conocida hasta la actualidad como Banda 8, presentaba un peso molecular de aproximadamente 24 kDa y un punto isoelectrico de 5.35 [102,103], ambos muy similares a los reportado por otros autores para la Prx de GR [104].

1.6.3 MER5/Aop1

Un estudio genético sobre el desarrollo de una línea celular murina de eritroleucemia identificó un gen de alta expresión en etapas tempranas del desarrollo denominado MER5 [77], cuyo producto es una proteína de 28 kDa imprescindible para el desarrollo de la línea eritroblástica [105]. MER5 en humanos es conocido como AOP1 (*antioxidant protein 1*) ya que presenta actividad antioxidante como peroxidasa en experimentos *in vitro* [78]. El gen que codifica para AOP1 presenta una alta similitud de secuencia con el gen de AhpC de *S.typhimurium* y *E.coli*, pudiendo inclusive complementar un mutante de *E.coli* deficiente en este gen [78]. AOP1/MER5 representan la misma proteína que NKEF-B y que la calpromotina, y su temprana aparición en la línea de desarrollo eritroblástica es coincidente con trabajos posteriores sobre el desarrollo de glóbulos rojos murinos que mostraron que las Prx son imprescindibles para que el GR se desarrolle y comience a acumular hemoglobina [12], así como su posible rol en la activación del canal Gardos que también se da en las etapas tempranas del desarrollo del GR [96].

Las investigaciones realizadas con MER5/AOP1 aportaron importantes datos a la comprensión de la dinámica de las Prx en el GR. Durante la purificación de AOP1 de glóbulos rojos humanos (denominada hTSA1 en [106]), la proteína nativa resultó fragmentada a una forma de menor peso molecular por acción de proteasas presentes en el glóbulo. La secuenciación de la proteína nativa y de la fragmentada demostró que la hTSA1 (AOP1) había recibido un corte entre los aminoácidos Val-186 y Asp-187, perdiendo el extremo C-terminal. Esta forma fragmentada puede oligomerizar de igual manera que la nativa, y mantiene la misma actividad antioxidante; pero no se une a la membrana del eritrocito, lo que apunta directamente al brazo carboxiterminal como

responsable de esta interacción. Además, de manera coincidente con los trabajos realizados con la calpromotina, la presencia de Ca^{2+} favorecía esta interacción [106]. Los resultados de este grupo, junto a la existencia de abundantes datos sobre la calpromotina y su relación con el Ca^{2+} han abierto una puerta para analizar desde otra óptica resultados clásicos que aún no poseían explicación convincente, como ser que el daño oxidativo de las membranas de los eritrocitos es mayor en condiciones de altas concentraciones de Ca^{2+} [107] así como los motivos por los cuales el Ca^{2+} modifica la homeostasis de K^+ en el GR [108].

1.6.4 Las Prx en la fisiología del eritrocito

Desde hace varias décadas se conoce el rol central de la catalasa en las defensas antioxidantes de varios tipos celulares, y particularmente en el eritrocito. A esto se le sumó la Gpx como una enzima con una eficiencia catalítica y especificidad de sustrato que la situaba como el complemento ideal de la catalasa en las defensas antioxidantes [3]. Sin embargo, su participación en las defensas antioxidantes del GR ha sido puesta en duda en los últimos años, en buena medida debido al desarrollo de animales *knock-out* para estas enzimas que mostraron un desarrollo normal y GR con una capacidad antioxidante ligeramente menor pero no comprometida [109,110]. Por el contrario, la deficiencia en la expresión de Prx resulta, en todos los casos estudiados, en fenotipos con cierto grado de patología. El caso del GR no difiere de la regla, y los modelos de ratones transgénicos para las dos 2-Cys Prx típicas más importantes (Prx I y II en Tabla 1) han aportado información sobre la importancia fisiológica de estas proteínas [59,60]. Los ratones *knock-out* para la Prx II (NKEF-B, torina, calpromotina o Banda 8) son fértiles y comienzan su desarrollo normalmente [60]. Sin embargo, rápidamente desarrollan esplenomegalia por una sobrecarga inusual del bazo, debido mayoritariamente a la acumulación de cuerpos de Heinz. Presentan, además, un mayor número de células de morfología anormal en la fracción de glóbulos rojos densos [60]. En estas células de morfología anormal, se observa una mayor cantidad de proteínas oxidadas, lo que es coincidente con una mayor cantidad de ERO, como se determinó usando pruebas fluorimétricas. Presentan un hematocrito menor al normal, mientras que -para compensar la hemostasis- presenta una mayor cantidad de reticulocitos y de eritropoyetina. A su vez, los GR de estos ratones tratados con H_2O_2 presentan una mayor cantidad de MetHb, un incremento en el porcentaje de tioles de proteínas de membrana que se encuentran oxidadas, así como mayor cantidad de productos de peroxidación lipídica [60]. Es interesante notar que esta situación también se encuentra en GR de pacientes con anemia falciforme [5,111]. En el caso de los ratones *knock-out* para la Prx I (NKEF-A), desarrollan un cuadro de anemia hemolítica además de un acortamiento en el promedio de vida debido, fundamentalmente, al desarrollo de tumores [59], lo cual puede asociarse a su rol inmunoregulador más que antioxidante.

Independientemente de la participación de las Prx en vías de señalización u otros procesos regulatorios, parece claro que la actividad peroxidática de estas enzimas juega un rol importante al menos en el contexto de la fisiología del GR. A su vez, un trabajo reciente en donde se modela el impacto de las tres peroxidasas (catalasa, Gpx y Prx) en las defensas antioxidantes del GR insita a pensar que la actividad peroxidasa de la Prx es esencial para el correcto funcionamiento del GR [112]. El objetivo del presente trabajo es purificar la Prx de GR humano, que denominaremos Prx II a lo largo del resto del trabajo, y caracterizar cinéticamente la enzima purificada, en particular su reactividad con H_2O_2 y $ONOO^-$.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Purificar la Prx de GR y caracterizar su reactividad con peróxido de hidrógeno y peroxinitrito.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Purificar la Prx de GR humano. Diseñar y optimizar un procedimiento de purificación en escala preparativa.
2. Estudiar la actividad peroxidasa de la enzima frente a peróxido de hidrógeno.
3. Caracterizar la reactividad de la enzima con peroxinitrito .

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 REACTIVOS

Las enzimas Trx y TR de *E.coli* fueron adquiridas en Sigma (USA), así como la catalasa, glucosa oxidasa, seroalbúmina bovina (BSA) y citocromo c. Los demás reactivos generales utilizados fueron de calidad analítica y provistos por Sigma (USA) o AppliChem (Alemania): DTT, NADPH, ácido dietilentiainopentacético (dpta), ácido etilendiaminotetraacético (edta), ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), tiocianato de potasio (KSCN), ácido tricloroacético (TCA) y sulfato ferroso amoniacal ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$).

3.2 PURIFICACIÓN DE LA PRX

La Prx II de GR se purifica según se ha descrito [86], con ligeras modificaciones, a partir de sangre humana desplasmatazada obtenida en el Servicio Nacional de Sangre del Ministerio de Salud Pública y manipulada en cumplimiento de las normativas de bioseguridad dispuestas por el Poder Ejecutivo, en Decreto 317/994. Brevemente; un lisado de glóbulos rojos (GR) humanos previamente lavados con amortiguador isotónico (PBS, 145 mM NaCl, 5 mM H_2PO_4 , 0.1 mM dpta, pH 7.4), clarificado por centrifugación a 10.000 g y filtrado en algodón, se siembra en una columna de intercambio aniónico DEAE-Sepharosa CL-6B (Sigma-Aldrich) previamente equilibrada en amortiguador 20 mM Tris, 5 mM DTT, 0.1 mM dpta pH 7.4. La elución se realiza con un gradiente lineal de fuerza iónica 0-400 mM KCl en el mismo amortiguador. La Prx eluye como un pico amplio entre 150 - 250 mM KCl identificado por su absorbancia a 280 nm. Este pico se concentra por ultrafiltración por presión de N_2 (Amicon) hasta un volumen adecuado y se siembra en una columna de Sephadex-G75 (Sigma-Aldrich) previamente equilibrada con amortiguador 50 mM fosfato de sodio, 5 mM DTT, 0.1 mM dpta, colectándose las fracciones de manera automatizada con un colector de fracciones (RediFrac, Pharmacia). Mayoritariamente, la Prx sale en el volumen muerto de esta columna dado que, en solución, a pH fisiológico y en presencia de un agente reductor, se encuentra como una forma de peso molecular mayor a 75 kDa. El primer pico de absorbancia a 280 nm se ensaya para actividad peroxidasa con el método del tiocianato (ver más adelante) y se concentra por ultrafiltración hasta aprox 2 mg/mL. La Prx se alícuota en amortiguador 50 mM fosfato de sodio, 0.1 mM dpta, 150 mM NaCl pH 7.4, bajo argón a -80°C hasta el momento de su uso. Todas las etapas se realizan a 4°C .

3.3 IDENTIFICACIÓN DE LA PRX

3.3.1 Análisis electroforético

Las fracciones de la purificación se analizan por electroforesis desnaturalizante y reductora en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE con β -mercaptoetanol) al 12 %, según el procedimiento desarrollado por Laemmli [113]. El revelado de las proteínas se realiza por tinción con Azul de Coomassie o nitrato de plata, según se indique.

3.3.2 Identificación por anticuerpos anti-Prx

Las fracciones de la purificación, separadas por SDS-PAGE 12 % según se indicó, fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa y reveladas por Western-Blot con un anticuerpo contra la proteína de fusión recombinante MBP-Tpx de *Equinococcus granulosus* (1/2000), desarrollado por A. Agorio (Cátedra de Inmunología, Facultad de Química [114]), y revelados con anticuerpo secundario anticonejo conjugado a fosfatasa alcalina (1/6000) y quimioluminiscencia (ECL, BioRad), con tiempo de exposición de 5 y 2 min. Para estos experimentos se utiliza la proteína recombinante *Eg-Tpx* como control.

3.3.3 Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

50 μ g de la Prx purificada se siembran en una columna de SEC TSK G2000SW (Tosoh Biosciences, Japón) previamente equilibrada con amortiguador fosfato de sodio 100 mM, 150 mM NaCl, 0.1 mM dtpa, pH 7.4, acoplada a un HPLC (Serie 1100, Agilent) con flujo de 0.5 mL/min y detección a 210 nm. Los dos picos que eluyen se analizan por SDS-PAGE 12 %.

3.3.4 Espectrometría de masa

Los picos separados por SEC en la columna TSK se colectan e identifican mediante el perfil triptico resuelto por análisis por espectrometría de masa MALDI-TOF. Estos experimentos se realizan en colaboración con el Dr. A. Ricciardi (Unidad Mixta de Control de Calidad de

Biocientíficos) y con los Drs. R. Durán y C. Cerveñansky (Unidad Asociada de Bioquímica Analítica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable).

3.4 REDUCCIÓN DE TIOLES PROTEÍCOS DE LA PRX

La Prx se reduce tratándola con un exceso de 10 veces de DTT durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) o durante toda la noche a 4°C. El exceso de reductor se remueve inmediatamente antes del uso de la proteína mediante gel filtración en PD10 (Amersham-Pharmacia) para los experimentos de rutina. Para los experimentos de cinética rápida el exceso de reductor se remueve por columna HiTrap (Amersham Biosciences) acoplada a HPLC (LC 306, Gilson) con flujo de 1.0 mL/min, detección a 280 nm y colección manual en tubos con tapa de goma. En ambos casos el amortiguador de elución fue fosfato de sodio 100 mM, 0.1 mM dtpa, pH 7, extensivamente degaseado antes del uso.

3.5 CUANTIFICACIÓN DE TIOLES

La cuantificación de tioles se realiza de acuerdo al método de Ellman [115], que se basa en la reacción a pH alcalino, en amortiguador pirofosfato de sodio 100 mM, pH 8.5, del DTNB con los grupos tiol reducidos, produciendo el anión coloreado 5-tio-3-nitrobenzoato (TNB) que presenta un máximo de absorbancia a 412 nm con un coeficiente de absorción molar (ϵ) de 14150 M⁻¹cm⁻¹ [116].

3.6 DOSIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas se mide por el método de Bradford [117], usando BSA como estándar. Para los experimentos de rutina la concentración de Prx se estima a 280 nm, con un $\epsilon = 18000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, calculado según la fórmula $\epsilon_{280} = (5500 \times n_{\text{Trp}}) + (1490 \times n_{\text{Tyr}}) + (125 \times n_{\text{S-S}})$ por la herramienta *ProtParam* disponible en www.expasy.org.

3.7 CUANTIFICACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO Y PEROXINITRITO

La solución de H_2O_2 se cuantifica inmediatamente antes de ser utilizada por espectrofotometría a 240 nm utilizando un ϵ de $43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. El ONOO^- se sintetizó en un reactor de flujo detenido a partir de NaNO_2 y H_2O_2 en medio ácido y se cuantificó a 302 nm utilizando un ϵ de $1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [68]. Las soluciones stock de peroxinitrito, almacenados a -80°C , fueron tratadas con dióxido de manganeso granular para eliminar el H_2O_2 remanente de la síntesis, inmediatamente antes de ser usado [118].

3.8 ACTIVIDAD PEROXIDASA POR EL MÉTODO DEL TIOCIANATO

Para identificar la Prx en las distintas fracciones de la purificación se utiliza el método de medida de actividad peroxidasa publicado por Kawazu et al [119]. Brevemente, las fracciones de interés se incuban con 5 mM de DTT durante 10 minutos a TA. Luego se agrega H_2O_2 y se incuba durante otros 10 min a TA. La reacción se detiene mediante el agregado de TCA (7.5 % (v/v) final) y el H_2O_2 remanente se hace reaccionar con 2 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ y 250 mM KSCN, para formar el complejo ferritioyanato ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{SCN})_6$) que se determina por su absorbancia a 475 nm. La curva de calibración se realiza en cada experimento con concentraciones de H_2O_2 0-500 μM .

3.9 ESTUDIOS CINÉTICOS DE LA PRX

3.9.1 Estudio de la reacción de la Prx con peróxido de hidrógeno por cinética de estado estacionario

El consumo de H_2O_2 por la Prx se estudia mediante una reacción acoplada con el sistema heterólogo Trx-TR y NADPH, siguiendo la desaparición de NADPH a 340 nm en espectrofotómetro (Shimadzu UV-1603) durante 3 minutos [34]. La reacción se dispara con el agregado de H_2O_2 y las condiciones del ensayo se ajustan de manera que el paso limitante sea el consumo del H_2O_2 por parte de la Prx [34,120,121]. Para estimar K_M a partir de estos datos se realizaron simulaciones con el programa Gepasi, versión 3.1 [122].

3.9.2 Estudio de la reacción de la Prx con peróxido de hidrógeno por fluorescencia de Trx

Otra forma de estudiar el consumo de H_2O_2 por la Prx es mediante la desactivación de la fluorescencia de la Trx al ser oxidada. Esta estrategia se basa en que el espectro de fluorescencia intrínseca de la Trx difiere entre la enzima oxidada o reducida [123]. La Prx se incubaba con Trx reducida y la reacción se disparaba con el agregado de H_2O_2 . La concentración de Trx se ajustaba para que esté en franco exceso frente a Prx, pero no puede ser mayor de 5-10 μM debido al fenómeno de filtro interno de la fluorescencia del Trp. El consumo catalítico de H_2O_2 se sigue mediante la caída en la fluorescencia intrínseca de la Trx ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 340$) en espectrofluorímetro (Series 2, Amicon-Bowman). Estrategias similares han sido utilizadas para obtener parámetros cinéticos de otras Prx que, al igual que ésta, tienen K_M muy bajo para su primer sustrato [41]. La reducción de la Trx previo a los experimentos se realiza incubando la enzima con 1-10 nM TR y 200 μM NADPH en amortiguador fosfato de sodio 100 mM, 0.1 mM dpta, pH 7.4, 1 hora a TA. El exceso de NADPH se remueve por gel filtración en PD10 inmediatamente antes de usar la Trx y la concentración contaminante de TR (~nM) se considera que no interfiere.

3.9.3 Estudio de la reacción de Prx con peroxinitrito por velocidades iniciales

Dada la corta vida media del ONOO^- a pH 7.4 (0.9 s^{-1} a 37°C y 0.26 s^{-1} a 25°C, [68]), su reactividad con la enzima se estudia por espectrofotometría de flujo detenido (SF17MV, Applied Photophysics), con tiempos de mezclado menores a 2 ms. Se sigue la descomposición del peroxinitrito (25 μM) a 310 nm ($\epsilon = 1600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [63], donde la interferencia con la absorbancia de la Prx es menor que a 302 nm) en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, 0.1 mM dpta, pH 7.4 a 25°C en ausencia o en presencia de Prx (0-50 μM) [62,63]. Debido a que para trabajar en condiciones de pseudo-primer orden de Prx respecto a ONOO^- se requieren concentraciones muy altas de proteína (ya que las concentraciones iniciales de ONOO^- mínimas para obtener un buen registro de absorbancia a 310 nm son del orden de 20 μM), optamos por estudiar esta reacción por el método de las velocidades iniciales a diferentes concentraciones de Prx. En este caso, la caída de absorbancia a 310 nm entre los 2-10 ms se ajusta a una recta (para incrementar la exactitud de las determinaciones de constantes de velocidad, 200 medidas fueron adquiridas durante los primeros 20 ms y 200 puntos adicionales fueron adquiridos hasta 10-20 s, donde más del 90 % del ONOO^- ya se descompuesto). Para calcular velocidades iniciales de descomposición de peroxinitrito, las pendientes fueron divididas por el ϵ del ONOO^- a 310 nm (1600 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y multiplicado por 1.2. Este coeficiente de corrección proviene de considerar que la absorbancia a 310 nm deriva del peroxinitrito anión (ONOO^-), que representa el 80 % de la concentración total

de peroxinitrito a pH 7.4. La relación entre las velocidades observadas (k_{obs}) para cada concentración de Prx permite obtener una recta de cuya pendiente se obtiene k_2 , la constante cinética de segundo orden de la reacción entre el $ONOO^-$ y la Prx. En todos los casos, el pH final fue controlado en la mezcla luego del experimento y fue de 7.4 ± 0.3 .

3.9.4 Estudio de la reacción de Prx con peroxinitrito por ensayos de competencia

Otra forma de determinar la k_2 entre la enzima reducida y el $ONOO^-$ es por ensayos de competencia, utilizando otro blanco de $ONOO^-$ cuya constante de velocidad de segundo orden sea conocida. A tales efectos se utiliza la porfirina de manganeso 5,10,15,20-tetrakis[N-metilpiridinio-4-*il*]porfirina ($Mn^{III}TM-4-PyP$) [62,63], la cual es rápidamente oxidada por $ONOO^-$ a su forma $O=Mn^{IV}$ con $k_2 = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 25°C [124]. Brevemente, el ensayo de competencia consiste en oxidar una concentración conocida de $Mn^{III}TM-4-PyP$ por $ONOO^-$ en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de Prx en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, 0.1 mM dpta, pH 7.4 a 25°C , siguiendo la desaparición de la especie Mn^{III} a 462 nm. Esta reacción debe hacerse en espectrofotómetro con accesorio de flujo detenido (SF17MV; Applied Photophysics) porque la especie $O=Mn^{IV}$ es muy inestable y se reduce rápidamente a Mn^{III} . A partir de los cursos temporales de oxidación de la $Mn^{III}TM-4-PyP$ se calcula el porcentaje de oxidación (PO) de la porfirina por $ONOO^-$ como

$$PO = \frac{\Delta Abs_{462} \text{ en presencia de Prx}}{\Delta Abs_{462} \text{ en ausencia de Prx}} \times 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

El valor de PO decrece a medida que aumentamos la concentraciones de enzima. El porcentaje de inhibición (PI) de la oxidación, definido como $1 - PO$, se incrementa al aumentar la concentración de Prx y puede ser ajustado a una función hiperbólica del tipo

$$PI = 1 - PO = \frac{ax}{b + x} \quad \text{Ecuación 7}$$

donde a corresponde al porcentaje inicial de oxidación de la porfirina por $ONOO^-$ (en ausencia de enzima que compita por el oxidante) y b corresponde a la concentración de Prx que inhibe en un 50% el porcentaje inicial de oxidación de esa concentración de porfirina por esa concentración de $ONOO^-$. A partir de este tratamiento se obtiene un valor de $[Prx]$ que representa una situación tal que

$$k_{Mn^{III}TM-4-PyP}^{ONOO^-} \times [Mn^{III}TM-4-PyP] = k_{Prx}^{ONOO^-} \times [Prx] \quad \text{Ecuación 8}$$

lo cual permite el cálculo de la $k_{\text{Prx}}^{\text{ONOO}^-}$ [63]. La $k_{\text{Mn}^{\text{III}}\text{Tm-4-PyP}}^{\text{ONOO}^-}$ de la porfirina con el ONOO^- se determina individualmente en cada experimento como control interno. Tanto estos experimentos como los de cinética rápida directa fueron realizados en colaboración con la Dra. M. Trujillo (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PURIFICACIÓN DE LA PRX DE ERITROCITO

La purificación de Prx a partir de GR se realiza según lo descrito por Lim *et al.* [86], con algunas modificaciones. Primeramente los GR se lavan varias veces con PBS (isotónico) y luego se lisan por shock osmótico en amortiguador fosfato de sodio 5 mM, 1 mM edta, 5 mM DTT, pH 7.4. El primer paso de la purificación es una cromatografía de intercambio aniónico DEAE-Sepharosa a pH 7.4 del lisado de GR, clarificado por centrifugación y filtrado para eliminar restos de materiales membranosos. La Hb, componente proteico mayoritario del lisado, a pH 7.4 se encuentra mayoritariamente con carga positiva ($pI = 6.9$ [125]), no interacciona con la resina y eluye con el volumen muerto.

La elución de las proteínas retenidas en la columna se realiza con un gradiente de fuerza iónica (0-400 mM KCl), luego de lavar la columna con 5-10 volúmenes con amortiguador a pH 7.4. La elución se sigue por absorbancia a 280 nm y se obtiene, en todos los casos, un perfil cromatográfico con un pico central (Figura 3A) que eluye entre 150 y 250 mM KCl, como han reportado otros autores [14,80]. Es importante destacar que el pico proteico eluido de la DEAE-Sepharosa aún posee contaminación con Hb, que se visualiza por su intensa absorción a 410 nm (Figura 3A).

El segundo paso de la purificación consiste en una separación por exclusión molecular en Sephadex-G75, previamente equilibrada con amortiguador a pH 7.4, en la cual se siembra el pico eluido de la DEAE-Sepharosa concentrado por ultrafiltración. Como se ve en la Figura 3B, las proteínas que eluyen juntas de la DEAE se separan en dos picos en esta etapa, donde cada uno representa ~50% del total de proteína. El Pico I no es retardado por la columna, lo que indica un peso molecular >75 kDa. Nuevamente, el contaminante que presenta absorción en la región del visible coeluye con este pico. La identidad de las proteínas presentes en el Pico II, no fue estudiada en detalle, pero otros resultados parecen indicar que se trata de, al menos, una mezcla de dímeros covalentes de Prx no reducible por β -mercaptoetanol (Figura 4, carril 4) y albúmina sérica humana (HSA), como comentaremos más adelante.

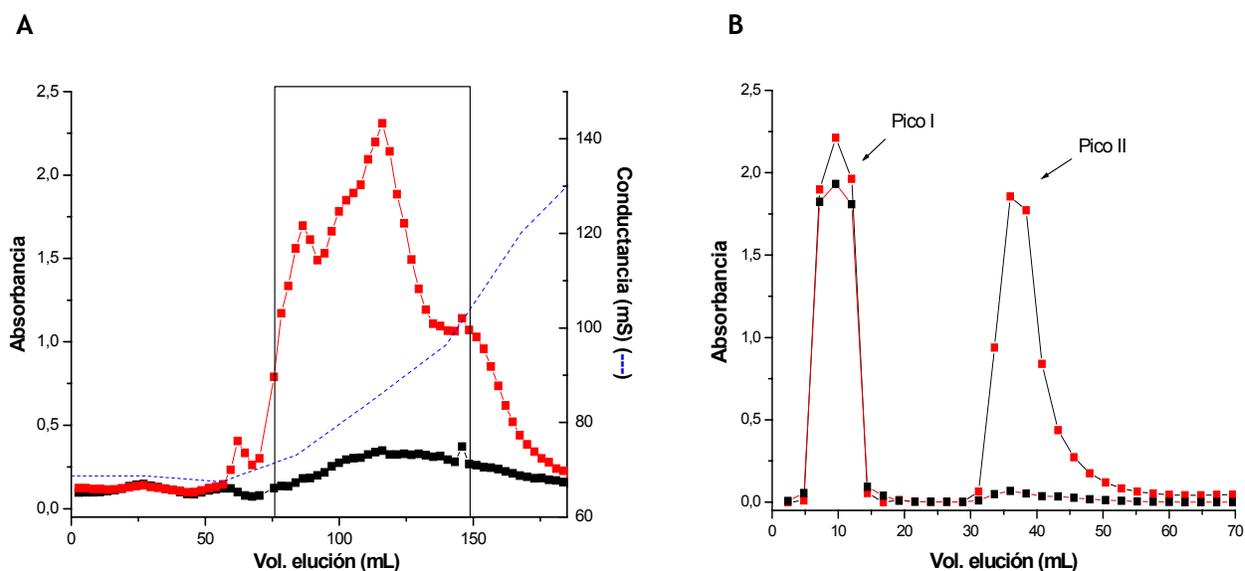


Figura 3. Cromatogramas de las etapas de cromatografía de intercambio aniónico y de exclusión molecular. En A se muestra el cromatograma de elución de la DEAE-Sepharosa, registrando la absorbancia a 280 nm (■) y a 410 nm (■), así como el registro en paralelo de la conductividad de la solución a la salida de la columna (---). En B se muestra el cromatograma de elución de la Sephadex-G75, registrando la absorbancia a 280 nm (■) y a 577 nm (■). En B se sembró la fracción eluída de la DEAE-Sepharosa indicada en A dentro del rectángulo.

El análisis de la composición de las fracciones en los distintos pasos de purificación se realiza mediante electroforesis (SDS-PAGE, Figura 4) y muestra un enriquecimiento progresivo en una banda de 22 kDa correspondiente al monómero de la Prx. Es importante notar que la banda de 22 kDa es identificable directamente en el lisado de GR (Figura 4, carril 1), constituyendo la tercer proteína más abundante, luego de la Hb (que migra como monómero de 16 kDa) y la anhidrasa carbónica (AC, que migra como monómero de 30 kDa). Como se puede ver al comparar los carriles 1, 2 y 3 en la Figura 4, el paso de intercambio aniónico permite deshacerse de la mayoría de la Hb. Sin embargo, la absorbancia en la región del visible que presentan las fracciones con mayor cantidad de proteínas muestra un espectro característico de hemoproteínas (datos no mostrados), lo cual condice con una contaminación con Hb o unión de grupos hemo por la Prx, como se ha reportado para otras 2-Cys Prx típicas [126]. Es importante notar que la fracción más purificadas (Figura 4, carril 4) no presenta una única banda sino que aparecen bandas proteicas de alto peso molecular. Esto ha sido observado también por otros autores, fundamentalmente en Prx purificadas de tejido y, particularmente, en las Prx purificadas de GR. En general, estas bandas se asignan a oligómeros de la propia Prx más que a proteínas contaminante [80]. En concordancia con esto, las bandas de alto peso molecular, al igual que la banda correspondiente a 22 kDa, son reconocidas por un anticuerpo desarrollado contra la tioredoxina peroxidasa (TPx) de *E.granulosus*, la cual presenta un 65.3% de identidad de secuencia con la Prx de GR (datos no mostrados). Esto permite suponer que se tratan, mayoritariamente, de oligómeros de la Prx.

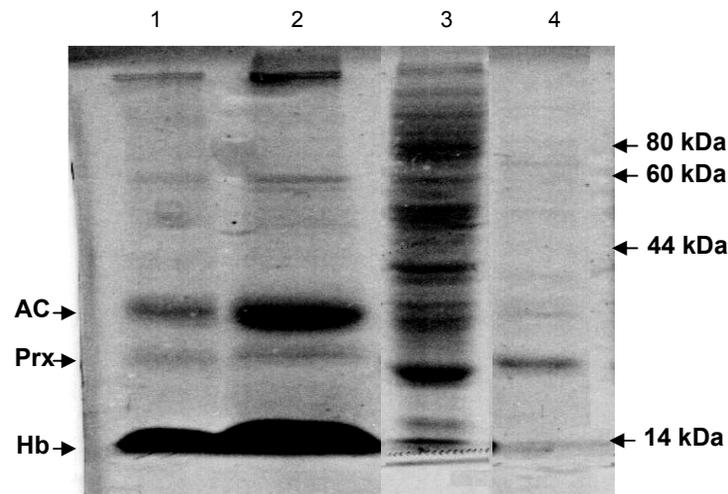


Figura 4. SDS-PAGE de las fracciones de la purificación de Prx. Se sembraron muestras de las diferentes etapas de la purificación: Lisado de GR (línea 1), volumen muerto de la DEAE-Sepharosa (línea 2), pico de la DEAE-Sepharosa dializado contra amortiguador fosfato 50 mM pH 7.4, 0,1 mM edta (línea 3), pico I de la gel filtración (Figura 2B, línea 4). A la derecha se indican los peso moleculares de los marcadores y sobre el constado izquierdo se indica las bandas correspondientes a AC, Prx y Hb (ver texto). Con el objetivo de visualizar representativamente el componente mayoritario de cada fracción la cantidad de proteína sembrada difiere de un carril a otro. Tinción con Azul de Coomasie.

El Pico I que eluye de la separación por exclusión molecular posee $2,0 \pm 0,4$ moles de tiol por mol de proteína, medidos por el método de Ellman en ausencia de agente desnaturizante. Esto es coincidente con lo esperado, así como con los resultados obtenidos por otros autores. Por su parte, la actividad peroxidasa de esta fracción fue ensayada por el método del tiocianato, según se indica en Materiales y Métodos. Se observa que esta fracción cataliza la descomposición de H_2O_2 a expensas de un tiol reductor externo (Figura 5).

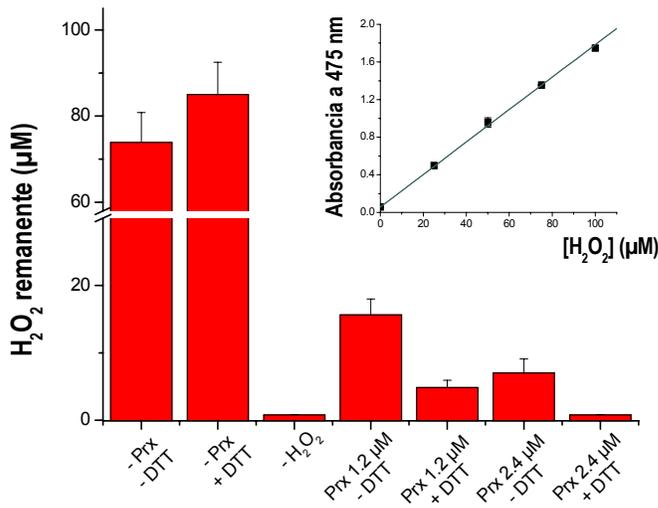


Figura 5. Consumo de H_2O_2 por el Pico I de la exclusión molecular. En la figura se muestra el consumo de H_2O_2 dependiente de tioles externo por 1.2 y 2.4 μM de proteína en amortiguador Tris-HCl 25 mM, 1 mM edta, pH 7.4 con o sin 0.5 mM de DTT presente en el medio (n=3). El peróxido remanente se ensayo según el método publicado en [119], resumido en Materiales y Métodos. *Inserto:* Curva de calibración para concentraciones de H_2O_2 de 0-100 μM (n= 3, $R^2= 0.996$).

En resumen, la asignación del Pico I de la separación por exclusión molecular como Prx II se basa primariamente en tres resultados, que son: *i*) su exclusión de la resina Sephadex-G75, lo que indica un peso molecular superior a 75 kDa coincidentemente con lo reportado para otras Prx que decamerizan en solución (Figura 3B), *ii*) su comportamiento electroforético en condiciones reductoras como una banda de 22 kDa (Figura 4), *iii*) su capacidad para consumir peróxido de manera dependiente de tioles (Figura 5).

Para obtener una confirmación de la identidad de estas fracciones optamos por su identificación por espectrometría de masa. Para ello, el eluido de la DEAE-Sepharosa se sembró en una columna TSK-G2000W acoplada a HPLC (Figura 6A), previamente calibrada usando como estándares proteicos de peso molecular las proteínas glucosa oxidasa (180 kDa), BSA (66 kDa) y citocromo c (12 kDa) (Figura 6A, inserto). Análogamente a lo obtenido en la separación por Sephadex-G75, obtuvimos 2 picos. El Pico I representa una proteína de peso molecular >200 kDa, mientras que el Pico eluye con un tiempo de retención correspondiente a una proteína de ~60 kDa, según la calibración interna. El análisis electroforético mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 6B) muestra que el Pico I, correspondiente a una proteína que en solución posee un peso molecular >200 kDa, migra como una única banda de 22 kDa, indicando que se trata de un homooligómero de, al menos, 9-10 subunidades. Por su parte, el Pico II se comporta hidrodinamicamente como una proteína de ~60 kDa y migra en la electroforesis reductora como una banda única de 66 kDa.

Estos picos proteicos fueron colectados y la identificación inequívoca del Pico I como Prx II de GR se realiza por espectrometría de masa de los fragmentos trípticos (Figura 6C). Por otro lado, tomando en conjunto los resultados obtenidos para el Pico 2, es de esperar que se trate de un monómero de 66 kDa, el cual es difícil de asignar ya que dentro del proteoma citosólico del eritrocito humano no existen proteínas monoméricas de 66 kDa [127]. Resultados preliminares de MALDI-TOF indican que podría tratarse de la albúmina sérica humana (HSA, datos no mostrados), que presenta una concentración plasmática de 42 g/L [128]. Existen trabajos en los cuales se estima que se unen 10^6 moléculas de HSA por GR, las cuales, además de cumplir un importante rol en la homeostasis del GR [129], serían suficientes para cubrir casi por completo la superficie externa del eritrocito [130,131].

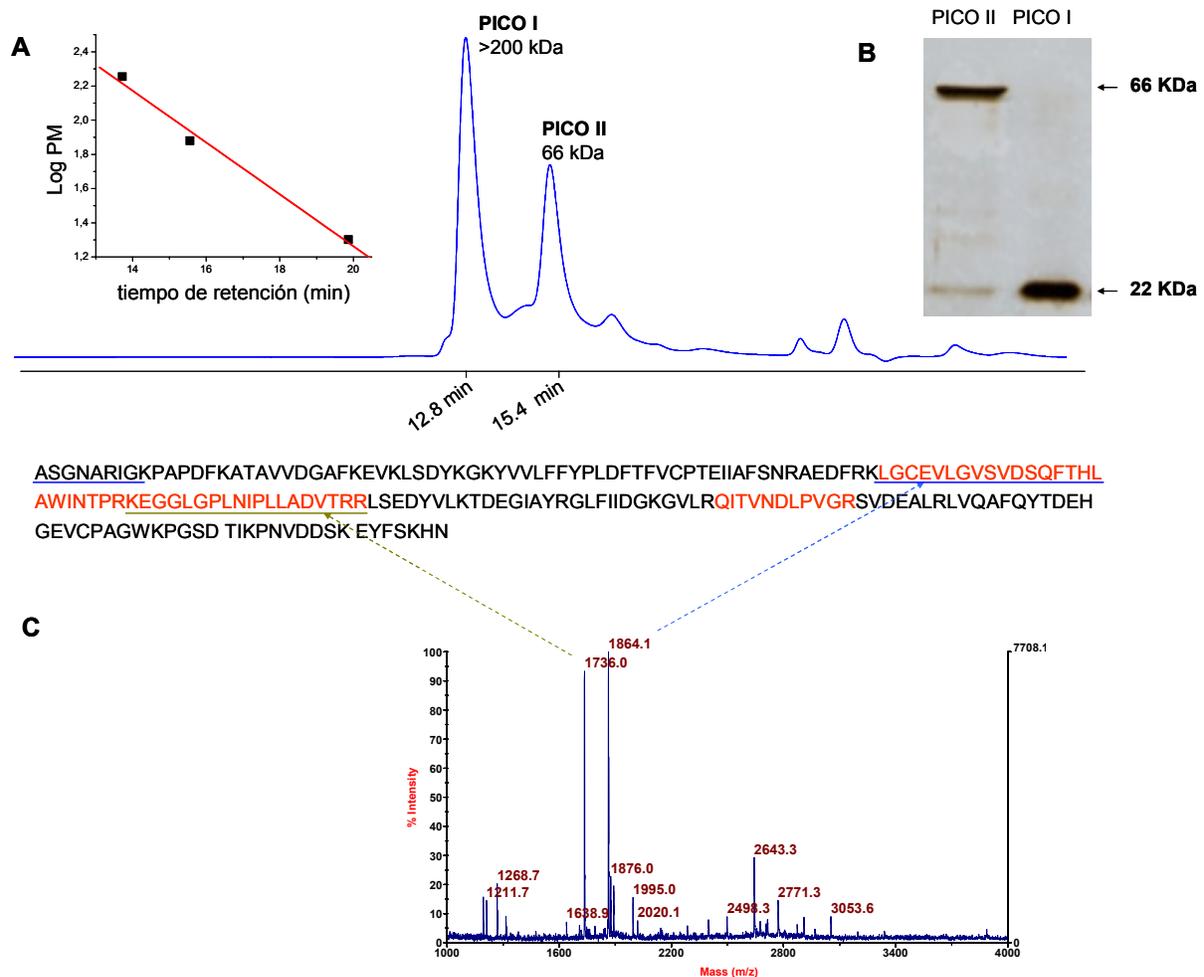


Figura 6. Identificación de Prx por cromatografía de exclusión molecular y espectrometría de masa. A. Cromatografía de exclusión molecular (SEC) por HPLC de la muestra eluida de la DEAE-Sephaorsa (carril 3, Figura 4). *Inserto:* Calibración de la TSK G2000SW, con glucosa oxidasa (180 kDa), BSA (66 kDa) y citocromo c (12 kDa). B. Electroforesis de los Picos I y II de la SEC de la parte A. C. Identificación por espectrometría de masa MALDI-TOF de la digestión triptica del Pico I. Se muestra la secuencia de la Prx (Prx1, P32119) y la identificación de los fragmentos de mayor intensidad.

4.2 CONCLUSIÓN OBJETIVO ESPECÍFICO 1

De esta primera etapa podemos concluir que en solo dos pasos cromatográficos es posible purificar una actividad peroxidasa dependiente de tioles, y que puede demostrarse que se trata de la Prx II de GR (código 1QMV en NCBI). La enzima se purifica en condiciones reductoras mediante el agregado de concentraciones mM de DTT a los amortiguadores, y se obtiene en solución como oligómero activo de peso molecular >200 kDa. El proceso de purificación logra separar la Prx de la HSA, la cual se adsorbe a los GR y parece copurificar en la primer etapa. El uso de una etapa de cromatografía de exclusión molecular como método para purificación fue realizado en escala analítica y su escalado a una escala preparativa, necesario para obtener mayores cantidades de muestra pura, ha dado resultados prometedores. Sin embargo, requiere

optimizar condiciones de flujo y composición de la fase móvil, así como estudiar en más detalle la dinámica de la oligomerización de la Prx en función del pH y fuerza iónica, ya que de una correcta interpretación de su estado oligomérico depende la validez de este método.

4.3 ACTIVIDAD PEROXIDASA DE LA PRX

Las Prx reducen peróxido de hidrógeno y/o peróxidos orgánicos a expensas de un tiol reductor, que en el caso de las 2-Cys Prx de mamíferos, es la proteína de 12 kDa Trx, la cual es subsecuentemente reducida por la flavoenzima TR en una manera dependiente de NADPH. El ciclo completo, esquematizado en la Figura 7, muestra que la estequiometría de esta reacción es de un mol de NADPH oxidado por mol de H_2O_2 reducido. En ausencia del sistema reductor (Trx, TR y NADPH) la Prx es capaz de reducir H_2O_2 a expensas de sus tioles reducidos y DTT (como se muestra en la Figura 5), pero su eficiencia es mucho menor y es más proclive a una rápida inactivación por sobreoxidación [121]

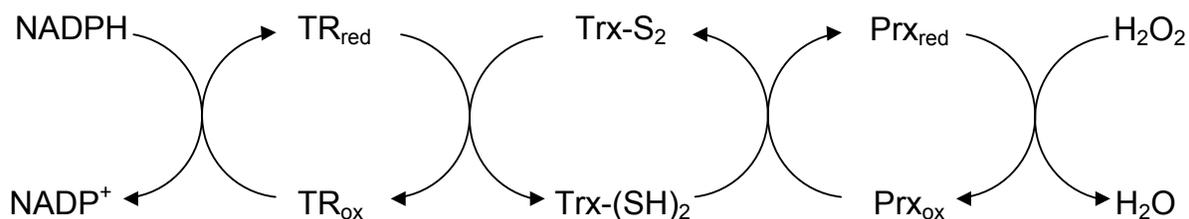


Figura 7. Esquema de la reducción de H_2O_2 dependiente de NADPH por el sistema Prx, Trx y TR

En presencia del sistema completo, la Prx consume catalíticamente H_2O_2 y es posible seguir la cinética de esta reacción a partir de la desaparición de NADPH a 340 nm. Para estos experimentos, es importante ajustar las concentraciones de las enzimas acopladas Trx y TR de manera que las reacciones en las que ellas participan no sean el paso limitante de la velocidad y que la Prx se encuentre trabajando en su máxima eficiencia catalítica [34,120,121]. En la Figura 8 se muestra un experimento representativo en donde se puede ver el consumo de NADPH correlativo al de H_2O_2 , en función del tiempo. En los insertos de la Figura 8 se presentan los resultados que muestran que en este diseño experimental la velocidad aumenta linealmente con la concentración de la enzima Prx usada y es independiente de la concentración de TR y Trx. En estas condiciones es posible determinar el K_M de la Prx para el H_2O_2 . Sin embargo, como podemos ver en la Figura 8, se observan valores de V_{max} aún a concentraciones bajas de H_2O_2 . Los resultados obtenidos a concentraciones de H_2O_2 menores a $5 \mu M$ presentan curvas bifásicas

que indican agotamiento del sustrato H_2O_2 (datos no mostrados), sugiriendo que la enzima aún se encuentra trabajando en condiciones de saturación, es decir, varias veces por encima de su K_M . Esto impone una limitante técnica para medir velocidades iniciales de la reacción, identificada previamente por otros autores [41], ya que concentraciones de H_2O_2 menores a $1 \mu M$ producen cambios de absorbancia a 340 nm en el límite de detección de la mayoría de los espectrofotómetros ($\sim 0.006 \text{ UA}$).

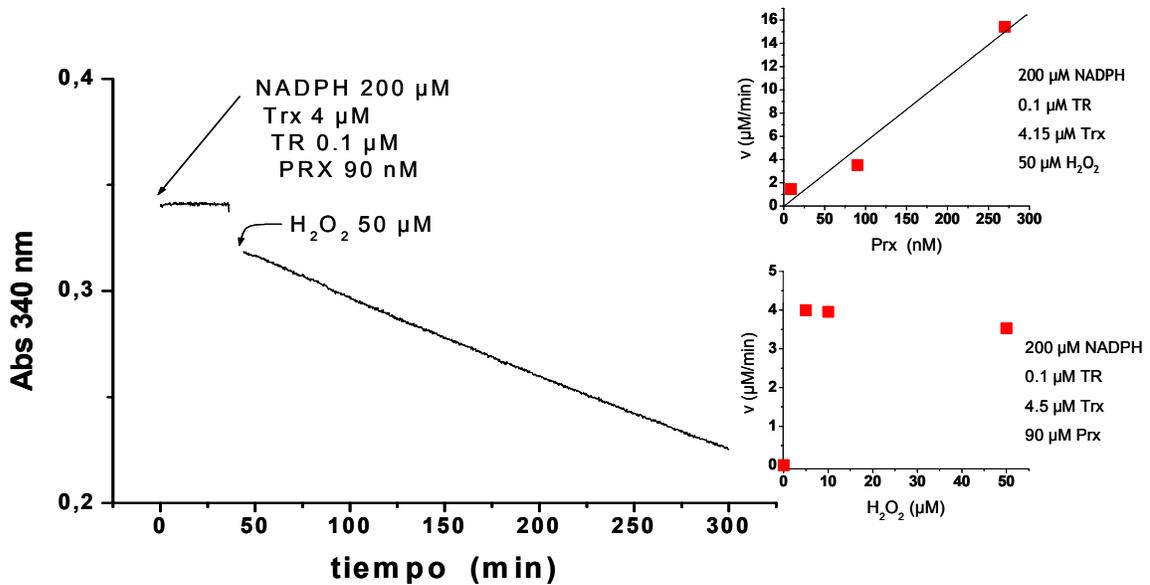


Figura 8. Reducción de H_2O_2 por la Prx en presencia del sistema Trx-TR. La actividad peroxidasa fue ensayada siguiendo la oxidación de NADPH en presencia de Trx y TR de *E.coli*. En las condiciones del ensayo, la velocidad fue proporcional a la concentración de enzima Prx (*derecha, arriba*). A partir de la medida de velocidad a concentraciones crecientes del sustrato H_2O_2 (*derecha, abajo*) se puede ver que el K_M de la Prx para el H_2O_2 es menor a $5 \mu M$.

Para confirmar la suposición de que nos encontrábamos frente a un K_M menor al que podíamos detectar acertadamente por este método, optamos por realizar simulaciones con el programa Gepasi [122]. El registro de absorbancia a 340 nm vs tiempo fue convertido, asumiendo una estequiometría 1:1, a un registro de consumo de H_2O_2 en función del tiempo. Definimos el modelo cinético de la reacción en dos líneas:



Donde la Ecuación 9 representa la reacción de la Prx con el sustrato peróxido ($Prx + H_2O_2 \rightarrow Prx-SOH$), y la Ecuación 10 su reducción por Trx en condiciones no limitantes ($Prx-SOH \rightarrow Prx$). La Figura 9 muestra los resultados experimentales de una corrida con

90 nM Prx, 4 μM Trx, 0.1 μM TR y 3.85 μM H_2O_2 . Tomando estos valores como condiciones iniciales, se definió el sistema cinético en el Gepasi, según se indicó, con $k_{-1} = 0$ (reacción irreversible) y un valor de k_2 (k_{cat}) de 0.691 s^{-1} , obtenido según $k_{\text{cat}} = V_{\text{max}} / [\text{Prx}]$, donde el valor de V_{max} se calcula de la pendiente inicial de los datos experimentales presentados en la Figura 9, por lo que $k_{\text{cat}} = 0.0622 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} / 90 \times 10^{-9} \text{ M} = 0.691 \text{ s}^{-1}$. Se realizaron simulaciones variando el valor de k_1 de manera de obtener K_M entre 0,01 y 1 μM . Como se puede ver en la Figura 9, el valor de K_M que mejor ajusta el modelo a los datos experimentales es el de 0,1 μM , lo que sustenta la hipótesis de que la Prx tiene un bajo K_M para el H_2O_2 .

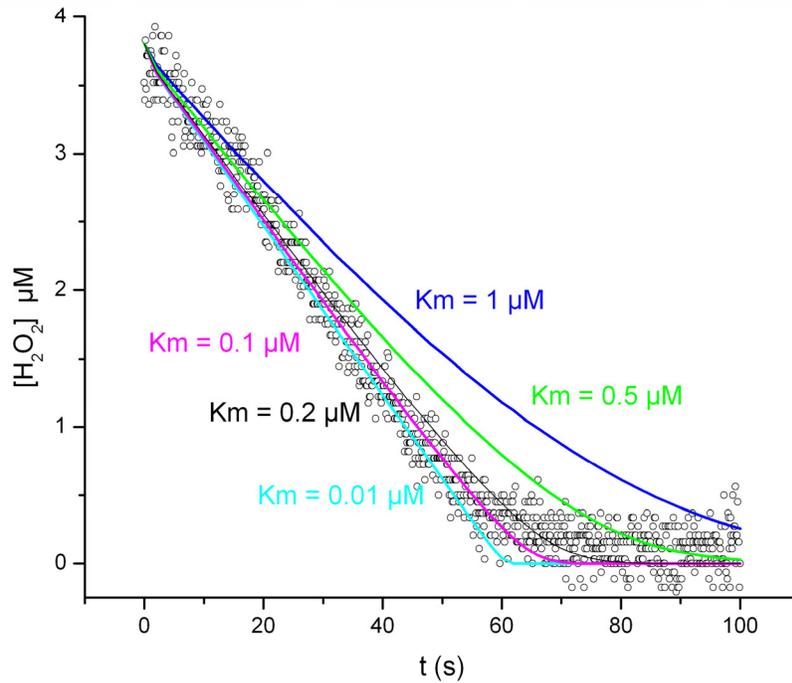


Figura 9. Reducción de H_2O_2 por la Prx y simulaciones por computadora. En la figura se muestra el registro del consumo de 3.58 μM H_2O_2 por la 90 nM Prx a expensas del sistema completo Trx, TR y NADPH (o). Como se indica en el texto, los trazos continuos muestran las simulaciones con K_M de 0.01, 0.1, 0.2, 0.5 y 1 μM , considerando $V_{\text{max}} = 0.0622 \mu\text{M s}^{-1}$, 90 nM PRX y $k_{\text{cat}} = 0.691 \text{ s}^{-1}$.

A raíz de estos resultados, recurrimos a otra estrategia para medir la actividad de la Prx, basada en el espectro de fluorescencia diferencial de la Trx oxidada y reducida. Esta observación, publicada por Holmgren hace más de tres décadas [123], nos permite diseñar un experimento en el cual el consumo de H_2O_2 por la Prx sea seguido a partir del cambio en la fluorescencia intrínseca de la Trx que resulta al reducir la Prx oxidada. La Figura 10A se puede ver la pérdida de intensidad de fluorescencia que se registra en el espectro de emisión de la Trx, excitada a 280 nm, como consecuencia de su oxidación. En la Figura 10B se muestra una corrida representativa, con 2.8 μM Trx, 20 nM Prx y 1.2 μM H_2O_2 , siguiendo el cambio en la emisión de

fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$) en el tiempo. Como se muestra en la Figura 10D, la velocidad de la reacción determinada en estas condiciones es proporcional a la concentración de Prx y la velocidad aumenta hiperbólicamente con la concentración de H_2O_2 (Figura 10C), de donde se puede determinar el $K_M^{\text{H}_2\text{O}_2}$ para la enzima.

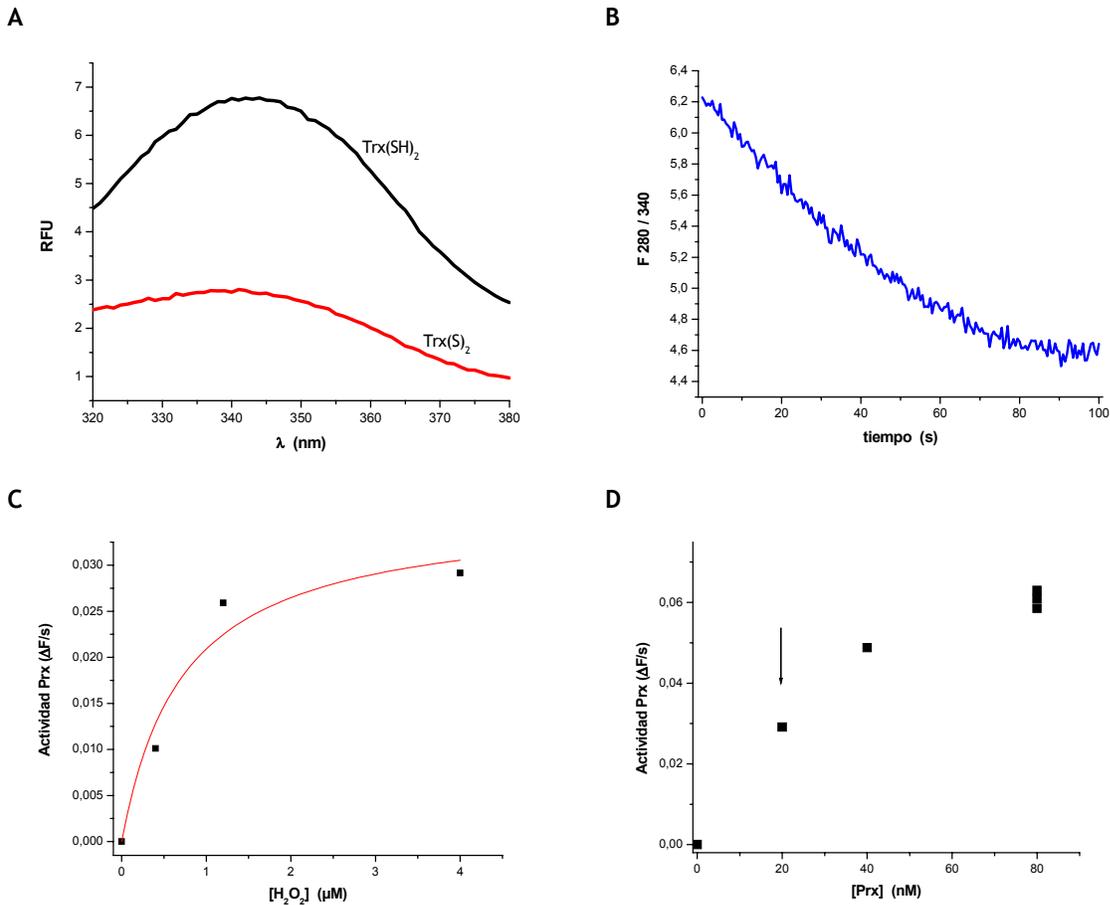


Figura 10. Determinación de parámetros cinéticos de Prx por fluorescencia. En A se muestra el espectro de emisión de $2.8 \mu\text{M}$ Trx(SH)₂ (–) o $2.8 \mu\text{M}$ Trx(S)₂ (–), excitada a 280 nm . En B se muestra la caída en la emisión de fluorescencia a 340 nm de $2.8 \mu\text{M}$ Trx(SH)₂, excitada a 280 nm , como consecuencia de la descomposición de $1.2 \mu\text{M}$ H_2O_2 por 20 nM Prx, en amortiguador a $\text{pH } 7.4$, 22°C . C, De la pendiente inicial de experimentos como el mostrado en B obtenemos la actividad Prx, expresada como $\Delta F/s$, para diferentes concentración de H_2O_2 . En rojo se muestra el ajuste de los datos a una hipérbola rectangular, de donde sacamos los valores de K_M y V_{max} , discutidos en el texto. En D se muestra que a la concentración de Prx escogida para realizar los experimentos mostrados en C (20 nM , indicada con una flecha), la actividad Prx medida aumenta linealmente al aumentar la concentración de enzima.

4.4 CONCLUSIÓN OBJETIVO ESPECÍFICO 2

La Prx purificada a partir de GR humano cataliza la reducción de H₂O₂ a expensas de NADPH con el sistema Trx - TR de *E.coli*. Si bien por los métodos utilizados aún no se pudo determinar los parámetros cinéticos con exactitud, los resultados preliminares obtenidos por la técnica de fluorescencia, resumidos en la Tabla 2, nos permiten calcular una eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) de $\sim 1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

| TABLA 2. | Parámetros cinéticos estimados de la 2-Cys Prx II de GR humano, a pH 7.4 y 22 °C |
|------------------------------|--|
| $K_M^{\text{H}_2\text{O}_2}$ | $0.73 \pm 0.37 \mu\text{M}$ |
| k_{cat} | $0.8 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ |
| V_{max} | $3.4 \pm 0.3 \times 10^{-8} \text{ Ms}^{-1}$ |

4.5 REACCIÓN DE LA PRX CON PEROXINITRITO

Tanto el peroxinitrito anión (ONOO⁻) como su ácido conjugado (ONOOH) son potentes oxidantes, que pueden conducir a oxidaciones por 1 o por 2 electrones de diferentes moléculas blanco. El peroxinitrito es relativamente estable a pH alcalino, pero se descompone rápidamente a NO₃⁻ a medida que se acidifica el pH, siguiendo un decaimiento exponencial con una constante de velocidad (k) de 0.26 s^{-1} a pH 7.4, 25°C o de 0.9 s^{-1} a pH 7.4, 37°C [68]. El mecanismo por el cual es peroxinitrito se isomeriza a NO₃⁻ ha sido motivo de debate desde comienzos de los estudios sobre la química de esta molécula, pero el mecanismo más aceptado propone una homólisis a nivel del enlace peroxilo, la cual conduce a la formación inicial de un par radicalar [•]OH y [•]NO₂ contenidos dentro de una caja de solvente [68], los cuales pueden recombinar en la caja para dar nitrato o difundir como radicales (Figura 2, vía III). A partir de reacciones de competencia, se ha estimado que a pH 7.4 y 37°C, un mínimo del 70% del ONOO⁻ se isomeriza a NO₃⁻. Dado que los radicales secundarios [•]OH y [•]NO₂ producidos por la homólisis de peroxinitrito -que pueden llegar a ser el 30% del peroxinitrito total- poseen su propia reactividad química oxidativa, las reacciones de oxidación dependientes de peroxinitrito pueden clasificarse en reacciones directas, dependientes del peroxinitrito (protonado o no) en sí mismo, y reacciones indirectas, dependientes de especies derivadas del mismo.

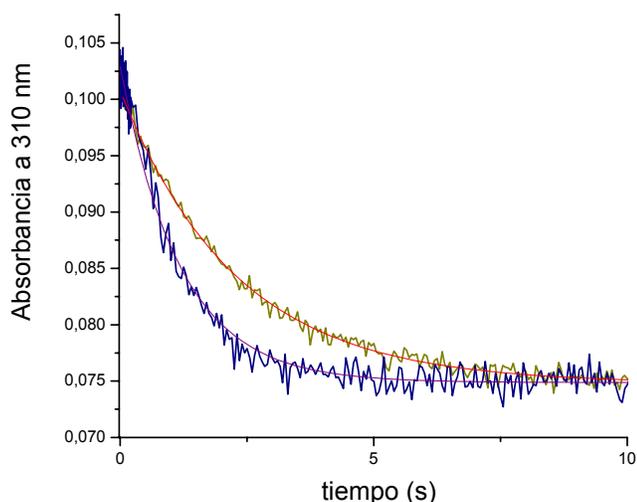
Desde el punto de vista cinético, las reacciones directas pueden diferenciarse de las indirectas, ya que mientras que los blancos de oxidación directa conducen a un incremento en la velocidad de descomposición de peroxinitrito ($k_{obs} = k + k_2 \times [\text{blanco}]$), donde k_2 es la constante de reacción de segundo orden entre el peroxinitrito y la molécula blanco), mientras que las reacciones indirectas (a expensas de radicales derivados de la homólisis del peroxinitrito) no alteran la constante observada de descomposición del mismo ($k_{obs} = k$), siguiendo una cinética de orden cero respecto al blanco [68].

En sistemas biológicos una de las reacciones directas más importantes del peroxinitrito es la reacción con CO_2 , dada la constante de velocidad de esta reacción ($k_2 = 4.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7.4 y 37°C) y la concentración milimolar alcanzada por el CO_2 en medios biológicos [132]. La reacción conduce a la formación inicial del aducto anión nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO_2^-), el cual posee una vida media extremadamente corta y una reactividad que se debe principalmente a su descomposición por homólisis para dar el par de radicales: anión carbonato $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}_2$ [133,134]. El otro blanco biológico prioritario del ONOO^- son los grupos tiol. La oxidación directa mediada por peroxinitrito de compuestos con grupo tiol tales como el aminoácido cisteína y el residuo de cisteína de la albúmina sérica bovina fue descrita por Radi y colaboradores en 1991 [65]. En dicho trabajo se establece que el peroxinitrito oxida directamente compuestos con grupos tiol en un proceso de oxidación por dos electrones, que conduce en primera instancia a la formación del derivado sulfénico de dichos tioles, el cual en presencia de un segundo grupo tiol accesible conduce a la formación del correspondiente disulfuro, siendo la estequiometría global de la reacción dos tioles oxidados por molécula de peroxinitrito.

Si bien los tioles de bajo peso molecular reaccionan con el peroxinitrito con velocidades del orden de $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [135] que son, en general, superiores a las que poseen con otros peróxidos, varias proteínas poseen grupos tioles que reaccionan con peroxinitrito con constantes de velocidad inusualmente altas, del orden de 10^5 - $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, a pH 7.4 [62]. A modo de ejemplo, podemos mencionar las enzimas gliceroaldehído 3-fosfato deshidrogenasa [136], la creatina quinasa [137], tirosina fosfatasas [138] y la Prx bacteriana AhpC [61]. Estas enzimas poseen en común un el tener un bajo pK del grupo tiol lo cual, según lo propuesto por Trujillo y colaboradores [135] podría explicar, al menos en parte, la alta reactividad de estos tioles con ONOO^- . La Prx de GR, por su parte, es de esperar que posea una reactividad con ONOO^- similar a la de la AhpC y de otras 2-Cys Prx [61,62,63,64,71].

Con la intención de determinar la constante de velocidad de la reacción directa entre el ONOO^- y la Prx realizamos, en una primera instancia, cinética de descomposición del ONOO^- en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de Prx reducida (Figura 11). Dada la corta vida media del ONOO^- a pH 7.4, la cinética se realizó por espectrofotometría de flujo detenido a 310 nm, donde la absorbancia de la Prx es varias veces menor que a 302 nm (λ_{max} de absorción del ONOO^-). La velocidad de descomposición (k_{obs}) del ONOO^- a pH 7.4 se puede calcular de la pendiente de los primeros milisegundos y, como podemos ver en la Figura 11 (trazo azul), el agregado de Prx determina un incremento en la velocidad de descomposición del ONOO^- . A partir de determinar k_{obs} para diferentes concentraciones de Prx podemos obtener el valor de k_2 , graficando k_{obs} vs $[\text{ONOO}^-]$. Sin embargo, en nuestro caso no fue posible dado que la reacción aparentaba ser demasiado rápida y, a pesar de estar trabajando en un equipo de cinética rápida perdíamos los tramos iniciales de reacción, necesarios para obtener el valor de k_{obs} .

Figura 11. Reacción directa de la Prx con peroxinitrito. La reacción directa de la Prx reducida con ONOO^- fue ensayada por espectrofotometría con accesorio de flujo detenido, según se indica en Materiales y Métodos. En la figura se muestra la descomposición de ONOO^- en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, 0.1 mM dpta a a pH 7.4 y 25°C en ausencia (-) o presencia (-) de 46 μM Prx reducida.



Esto nos impuso, nuevamente, una limitante técnica. Si bien no fue posible obtener un valor de k_2 a partir de los experimentos detallados anteriormente, estos resultados indicaban una reactividad alta entre la Prx y el ONOO^- alta, con una k_2 del orden de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Para sortear esta limitante, optamos por la determinación de k_2 por métodos de competencia con mangano porfirinas, cuya reactividad con ONOO^- se conoce [124,139,140]. La porfirina de manganeso $\text{Mn}^{\text{III}}\text{TM-4-PyP}$ es oxidada por ONOO^- a su forma $\text{O}=\text{Mn}^{\text{IV}}$ con $k_2 = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 25°C [124] y dicha oxidación se puede seguir espectrofotométricamente por la caída en la absorbancia a 462 nm correspondiente a la especie Mn^{III} . La presencia de un segundo blanco para el ONOO^- en la mezcla de reacción, en este caso la Prx reducida, determina que la reactividad del mismo se reparta entre estos blancos y lo hará en función de las constantes de reacción con cada uno. La oxidación de una concentración de $\text{Mn}^{\text{III}}\text{TM-4-PyP}$ por ONOO^- en ausencia de Prx es dependiente de la k_2 para esta reacción. En presencia de Prx reducida, un segundo blanco para el ONOO^- , el

total de la Mn^{III}TM-4-PyP oxidada por igual concentración de ONOO⁻ será menor que en ausencia de la Prx (Figura 12A). De esta manera, para cada caso podemos definir el porcentaje de oxidación (PO) de la porfirina como:

$$PO = \frac{\Delta Abs_{462} \text{ en presencia de Prx}}{\Delta Abs_{462} \text{ en ausencia de Prx}} \times 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

valor que será 100% en ausencia de Prx reducida y que decrece a medida que aumentamos la concentraciones de enzima. Por lo tanto, el porcentaje de inhibición de la oxidación (PI = 1 - PO), se incrementa al aumentar la concentración de Prx y puede ser ajustado a una función hiperbólica del tipo

$$PI = 1 - PO = \frac{ax}{b + x} \quad \text{Ecuación 7}$$

donde *a* corresponde al porcentaje inicial de oxidación de la porfirina por ONOO⁻ (PO = 100%, en ausencia de enzima que compita por el oxidante) y *b* corresponde a la concentración de Prx que inhibe en un 50% el porcentaje inicial de oxidación (PO = 50%) de esa concentración de porfirina por esa concentración de ONOO⁻ (Figura 12B). De esta manera, obtenemos un valor de [Prx] que representa una situación donde el 50% del oxidante oxida la Mn^{III}TM-4-PyP y el otro 50% a la Prx reducida. Es decir, ambos blancos compiten de manera que:

$$k_{Mn^{III}TM-4-PyP}^{ONOO^-} \times [Mn^{III}TM-4-PyP] = k_{Prx}^{ONOO^-} \times [Prx] \quad \text{Ecuación 8}$$

lo cual permite el cálculo de la $k_{Prx}^{ONOO^-}$ [63]. A partir de este procedimiento, que ya ha sido aplicado con éxito para otras 2-Cys Prx [62,63], obtenemos que (ver Figura 12B) el valor de k_2 es

$$k_{Prx}^{ONOO^-} = \frac{k_{Mn^{III}TM-4-PyP}^{ONOO^-} \times [Mn^{III}TM-4-PyP]}{[Prx]} \quad \text{Ecuación 11}$$

$$\frac{2 \times 10^6 M^{-1} s^{-1} \times 5 \times 10^{-6} M}{1.04 \times 10^{-6} M} = 9.6 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$$

El valor de k_2 obtenido ($9.6 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$) para la reacción entre la Prx y el ONOO⁻ se haya dentro del rango de los resultados obtenidos por otros autores (10^5 - $10^7 M^{-1} s^{-1}$) [61,62,63,64,71] (Tabla 3), pero es probable que esté sobredimensionado como consecuencia de que la estimación de la concentración de Prx que produce el 50% de protección se realizó en base a pocos puntos (Figura 12B).

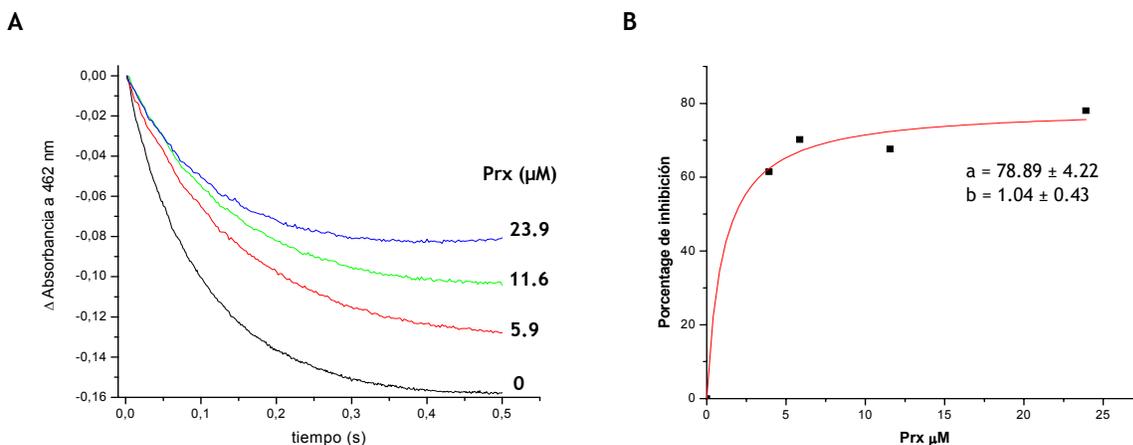


Figura 12. Cinética de la reacción con peroxinitrito por ensayos de competencia. En A se muestra la oxidación de 5 μ M Mn^{III}TM-4-PyP por 2 μ M ONOO⁻ en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de Prx (0-49.7 μ M). La constante de reacción de segundo orden (k_2) de $1.84 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 25 °C entre la Mn^{III}TM-4-PyP y el ONOO⁻ se obtuvo en el mismo experimento (datos no mostrados). En B se grafica el porcentaje de inhibición de la oxidación de Mn^{III}TM-4-PyP por ONOO⁻ (PI) en presencia de las diferentes concentraciones de Prx, según se explica en el texto, y los datos se ajustan a una función hiperbólica de donde se calcula la concentración de Prx que inhibe un 50% (b).

La reacción de la Prx por ONOO⁻ involucra la oxidación de sus tioles, con la consiguiente formación de disulfuros, como se puede observar en la electroforéisis desnaturizante presentada en la Figura 13. En ausencia del reductor de disulfuros β -mercaptoetanol (carriles 6-8) se puede observar que la oxidación de la Prx reducida por concentraciones crecientes de ONOO⁻ conlleva la desaparición de la banda que corresponde al monómero, y la subsiguiente formación de dímeros. Estos dímeros son reducible por β -mercaptoetanol, como se puede observar en los carriles 2-4 de la Figura 13. La oxidación y formación de dímeros se puede observar a partir de relaciones Prx: ONOO⁻ de 1:0.5, estequiometría coincidente con que cada molécula de ONOO⁻ oxida 2 tioles, como comentamos anteriormente. Esto se ha visto para tioles de bajo peso molecular cuando se encuentran en concentraciones altas, ya que el intermediario sulfénico formado, por lo general altamente reactivo, reacciona con otro tiol para formar un disulfuro y rendir dos moles de tiol oxidado por mol de oxidante [65]. Por su parte, la oxidación de tioles proteicos también determina la formación de un intermediario sulfénico [33], el cual puede tener varios destinos dependiendo del contexto en que se forme. En el caso de la HSA [141] o de las 1-Cys Prx cuya reactividad con ONOO⁻ ha sido estudiada [142], la ausencia de un segundo tiol en las cercanías del tiol oxidado determina que el sulfénico formado sea relativamente estable y se pueda detectar por técnicas espectrofotométricas. Por su parte, la presencia de otro tiol reducido en las cercanías del tiol oxidado a sulfénico, como se puede observar en las 2-Cys Prx, determina la condensación de estos a un disulfuro [37,38] [143]. Es interesante notar que la oxidación de la Prx con un exceso de 10 veces ONOO⁻ conlleva a la formación en cantidades equivalente de la especie dimérica unida por disulfuro y de una especie monomérica, que suponemos sobreoxidada (Figura 12C, carriles 9 y 10), como se ha identificado en otros casos [142].

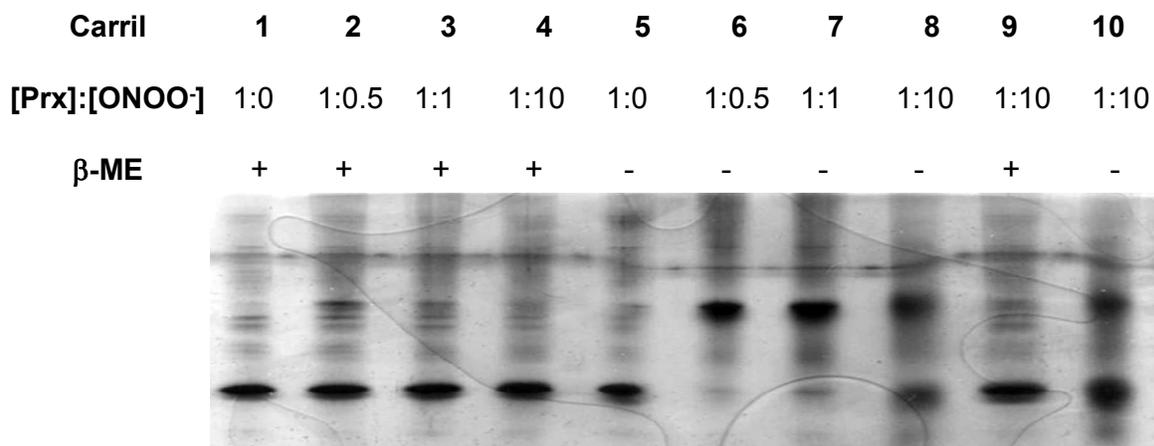


Figura 13. Dimerización de la Prx por oxidación por peroxinitrito y sobreoxidación. La Prx reducida fue oxidada con concentraciones crecientes de ONOO⁻ y sembrada en un SDS-PAGE 12%, con (+) o sin (-) β-mercaptoetanol. Tinción con nitrato de plata.

4.6 CONCLUSIÓN OBJETIVO ESPECÍFICO 3

Se pudo determinar una constante de reacción de ONOO⁻ con la Prx purificada de GR de $k_2 = 9.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 25 °C, valor comparable al obtenido para otras 2-Cys Prx típicas [61,62,64]. Los experimentos de velocidades iniciales parecen estar comprometidos por la alta reactividad de la enzima con el oxidante, motivo por el cual consideramos necesario explotar la técnica de competencia con porfirinas de manganeso que son fáciles de seguir espectrofotométricamente, de k_2 conocidos y en el orden de reacción de las Prx. La oxidación con un exceso molar de 10 veces ONOO⁻ frente a Prx determina la formación de especies que migran como monómeros en la electroforesis desnaturante. Podemos suponer que estas especies constituyen formas sobreoxidadas de la Prx (C_P-SO₂H o C_P-SO₃H), cuya C_P no puede condensarse con la C_R adyacente. La sobreoxidación por H₂O₂ de Prx se ha visto en las 2-Cys Prx [120,144] y es revertida enzimáticamente por sestrinas [55] o sulfiredoxinas [54], sin embargo no ha sido reportada anteriormente como consecuencia de la oxidación por ONOO⁻ y debe ser confirmada [145,146]. Es importante notar que la Prx II de GR fue cristalizada como decámero en su forma sobreoxidada [38] y presenta un cambio estructural en la región de C_P que podría justificar su imposibilidad para formar el disulfuro C_P-C_R [39].

| TABLA 3. Constante de segundo orden entre Prx y peroxinitrito | | | | | |
|---|-------------------|-----------------------------------|-------------------------------|--------------|------|
| Prx | Tipo | Organismo | k_2 ($M^{-1}s^{-1}$) | condiciones | Ref. |
| Ahp C | 2-Cys Prx típica | <i>Salmonella thyphimurium</i> | $1.51(\pm 0.04) \times 10^6$ | pH 7.0 | [61] |
| Ahp C | 2-Cys Prx típica | <i>Helicobacteria pylori</i> | $1.33 (\pm 0.08) \times 10^6$ | pH 7.0 | [61] |
| Ahp C | 2-Cys Prx típica | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | $1.21 (\pm 0.05) \times 10^6$ | pH 7.0 | [61] |
| MtTPx | 2-Cys Prx atípica | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 1.5×10^7 | pH 7.4, 37°C | [63] |
| TbcTXNPx | 2-Cys Prx típica | <i>Trypanosoma brucei</i> | $9.0 (\pm 1) \times 10^5$ | pH 7.4, 37°C | [62] |
| TbcTXNPx | 2-Cys Prx típica | <i>Trypanosoma cruzi</i> | $7.2 (\pm 0.6) \times 10^5$ | pH 7.4, 37°C | [62] |
| Prx V | 2-Cys Prx atípica | <i>Homo sapiens</i> | $7 (\pm 3) \times 10^7$ | pH 7.8 | [71] |
| TPx1 | 2-Cys Prx típica | <i>Plasmodium falciparum</i> | 1.0×10^6 | pH 7.4, 37°C | [64] |
| TPx1 | 2-Cys Prx típica | <i>Plasmodium falciparum</i> | 4.0×10^5 | pH 7.4, 25°C | [64] |

4.7 DISCUSIÓN GENERAL

El trabajo abarcó la purificación y caracterización cinética de la 2-Cys Prx de GR Prx II. La purificación de la enzima fue optimizada a tan solo dos pasos de cromatografía. Se obtuvieron valores preliminares para los parámetros cinéticos V_{max} y K_M , que nos permiten indicar que se trata de una enzima con un $K_M^{H_2O_2}$ del orden de $1 \mu M$ ($0.73 \pm 0.37 \mu M$) con una eficiencia catalítica de $\sim 10^5 M^{-1}s^{-1}$. Por su parte, los resultados preliminares de reactividad con $ONOO^-$ indican una k_2 de $\sim 10^6 M^{-1}s^{-1}$, lo que posiciona a esta enzima, junto con otras 2-Cys Prx, dentro del rango de proteínas que presentan reactividades más altas con $ONOO^-$.

Como comentamos brevemente en la introducción, la actividad peroxidasa de esta enzima parece jugar un rol central en las defensas antioxidantes del GR, y es necesario conocer sus parámetros cinéticos para poder integrarla como tal. Por su parte, el destino del $ONOO^-$ formado en el torrente sanguíneo está profundamente afectado por la circulación de eritrocitos, que forman el 40-45% del material circulante y constituyen un sumidero de $ONOO^-$, en especial por su alta concentración de Hb y la alta constante de reacción del $ONOO^-$ con ella ($1.7 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$ [66]). Como plantea el trabajo de Romero y colaboradores [66,67,76], si bien en el compartimento intravascular la difusión de peroxinitrito hacia el GR compite con otras rutas que lo consumen, mayoritariamente difunde hacia dentro del GR donde reacciona con HbO_2 para determinar su isomerización a NO_3^- , y formación secundaria de $O_2^{\cdot -}$ [66].

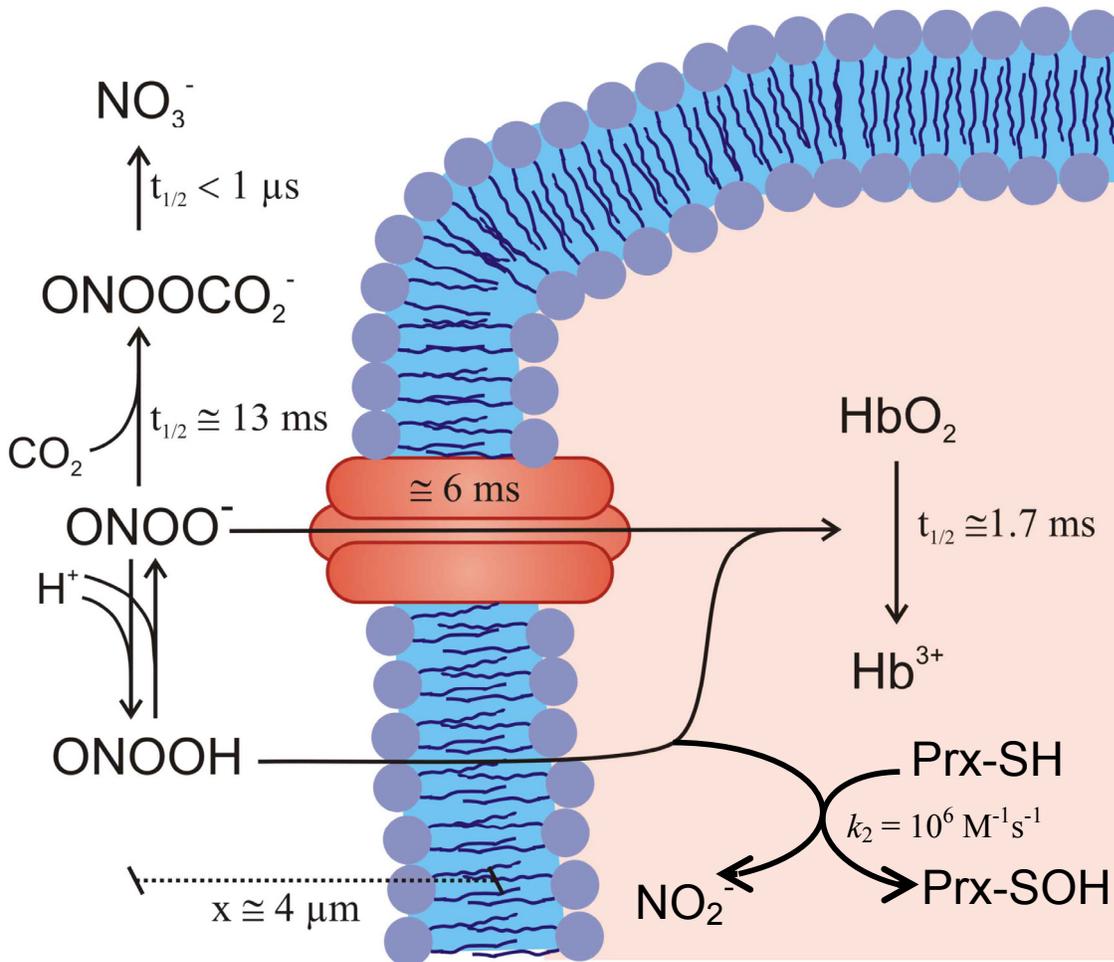


Figura 14. Esquema de la reactividad del peroxinitrito en eritrocito. Adaptado de [75]

En este marco, la reacción del ONOO^- dentro del GR deriva el potencial oxidativo del ONOO^- hacia la formación de un oxidante menos potente pero más difusible, como ser el H_2O_2 que se produce de la desproporción espontánea o catalizada de este $\text{O}_2^{\cdot-}$, lo que constituiría una fuente de H_2O_2 adicional a la autooxidación de HbO_2 [73], haciendo más necesaria aún la presencia de enzimas capaces de detoxificarlo. Es importante destacar que la detoxificación de éste peróxido de hidrógeno formado, que suponemos en rangos de concentración de nM alto a μM bajo, no recaerá en la catalasa dado que se trata de una enzima notablemente ineficiente a concentraciones de sustrato bajos [49]. Por otro lado, la presencia de una enzima como la Prx II en el citosol del GR, en una concentración de $240 \mu\text{M}$ [90] y, según nuestro trabajo, con una constante de reacción con el ONOO^- de $\sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, hace necesario replantear la reactividad de este oxidante dentro del GR ya que, como se esquematiza en la Figura 14, es posible que ambos blancos -Hb y Prx- compitan en condiciones similares por el ONOO^- . Si bien existe debate acerca del mecanismo por el cual la reacción del peroxinitrito con la Hb conlleva a la formación de MetHb y NO_3^- , así como del tipo y cantidad de productos minoritarios que se forman [67], es

sabido que la única proteína afectada es la Hb y que las modificaciones oxidativas que ella reciba son puntos finales en la reacción del ONOO^- . Por el contrario, y como quedó planteado en la introducción, el rol de la Prx II en la fisiología del GR parece ser más complejo que el de una simple peroxidasa. Por lo tanto, si bien es necesario seguir avanzando en la caracterización de las propiedades cinéticas de la Prx II así como de su reactividad con ONOO^- , serán necesarios avances reales en el área de la fisiología del GR para poder comprender la funcionalidad de esta enzima.

4.8 REFERENCIAS

- [1] B. Hofmann, H.J. Hecht and L. Flohe (2002). Peroxiredoxins. *Biol Chem*; 383, (3-4): 347-364.
- [2] B.a.G. Halliwell, J.M.C. (1999). *Free Radical in Biology and Medicine*. New York, Oxford University Press.
- [3] L. Flohe, W.A. Gunzler and H.H. Schock (1973). Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett*; 32, (1): 132-134.
- [4] L. Flohe, H. Budde and B. Hofmann (2003). Peroxiredoxins in antioxidant defense and redox regulation. *Biofactors*; 19, (1-2): 3-10.
- [5] Z.A. Wood, E. Schroder, J. Robin Harris and L.B. Poole (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*; 28, (1): 32-40.
- [6] S.W. Kang, H.Z. Chae, M.S. Seo, K. Kim, I.C. Baines and S.G. Rhee (1998). Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem*; 273, (11): 6297-6302.
- [7] D.Y. Jin, H.Z. Chae, S.G. Rhee and K.T. Jeang (1997). Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF- κ B activation. *J Biol Chem*; 272, (49): 30952-30961.
- [8] M.R. Kim, H.S. Chang, B.H. Kim, S. Kim, S.H. Baek, J.H. Kim, S.R. Lee and J.R. Kim (2003). Involvements of mitochondrial thioredoxin reductase (TrxR2) in cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*; 304, (1): 119-124.
- [9] S.-T. Wen and R.A. Van Etten (1997). The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity. *Genes and Development*; 11, 2456-2467.
- [10] T.S. Chang, W. Jeong, S.Y. Choi, S. Yu, S.W. Kang and S.G. Rhee (2002). Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation. *J Biol Chem*; 277, (28): 25370-25376.
- [11] L.H. Butterfield, A. Merino, S.H. Golub and H. Shau (1999). From cytoprotection to tumor suppression: the multifactorial role of peroxiredoxins. *Antioxid Redox Signal*; 1, (4): 385-402.
- [12] T. Rabilloud, R. Berthier, M. Vincon, D. Ferbus, G. Goubin and J.J. Lawrence (1995). Early events in erythroid differentiation: accumulation of the acidic peroxidoxin (PRP/TSA/NKEF-B). *Biochem J*; 312 (Pt 3), 699-705.
- [13] Y. Zhou, K.H. Kok, A.C. Chun, C.M. Wong, H.W. Wu, M.C. Lin, P.C. Fung, H. Kung and D.Y. Jin (2000). Mouse peroxiredoxin V is a thioredoxin peroxidase that inhibits p53-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*; 268, (3): 921-927.
- [14] K. Kim, I.H. Kim, K.Y. Lee, S.G. Rhee and E.R. Stadtman (1988). The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. *J Biol Chem*; 263, (10): 4704-4711.
- [15] K. Kim, S.G. Rhee and E.R. Stadtman (1985). Nonenzymatic Cleavage of Proteins by Reactive Oxygen Species Generated by Dithiothreitol and Iron. *J Biol Chem*; 260, (29): 15394-15397.
- [16] H. Shau and A. Kim (1994). Identification of natural killer enhancing factor as a major antioxidant in human red blood cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 199, (1): 83-88.
- [17] H.Z. Chae, K. Robison, L.B. Poole, G. Church, G. Storz and S.G. Rhee (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, (15): 7017-7021.

- [18] L.A. Tartaglia, G. Storz, M.H. Brodsky, A. Lai and B.N. Ames (1990). Alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. Sequence and homology to thioredoxin reductase and other flavoprotein disulfide oxidoreductases. *J Biol Chem*; 265, (18): 10535-10540.
- [19] F.S. Jacobson, R.W. Morgan, M.F. Christman and B.N. Ames (1989). An alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium* involved in the defense of DNA against oxidative damage. Purification and properties. *J Biol Chem*; 264, (3): 1488-1496.
- [20] S.G. Rhee, S.W. Kang, T.S. Chang, W. Jeong and K. Kim (2001). Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life*; 52, (1-2): 35-41.
- [21] H.Z. Chae and S.G. Rhee (1994). A thiol-specific antioxidant and sequence homology to various proteins of unknown function. *Biofactors*; 4, (3-4): 177-180.
- [22] C. Jacob, G.I. Giles, N.M. Giles and H. Sies (2003). Sulfur and Selenium: The Role of Oxidation State Protein Structure and Function. *Angew. Chem. Int. Ed.*; 42, 4742-4758.
- [23] H.Z. Chae, S.W. Kang and S.G. Rhee (1999). Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol*; 300, 219-226.
- [24] H.Z. Chae, H.J. Kim, S.W. Kang and S.G. Rhee (1999). Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res Clin Pract*; 45, (2-3): 101-112.
- [25] S.W. Kang, I.C. Baines and S.G. Rhee (1998). Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *J Biol Chem*; 273, (11): 6303-6311.
- [26] M.S. Seo, S.W. Kang, K. Kim, I.C. Baines, T.H. Lee and S.G. Rhee (2000). Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem*; 275, (27): 20346-20354.
- [27] K.J. Dietz (2003). Plant peroxiredoxins. *Annu Rev Plant Biol*; 54, 93-107.
- [28] W. Jeong, M.K. Cha and I.H. Kim (2000). Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of bacterioferritin comigratory protein (BCP) as a new member of the thiol-specific antioxidant protein (TSA)/Alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family. *J Biol Chem*; 275, (4): 2924-2930.
- [29] S.L. Comtois, M.D. Gidley and D.J. Kelly (2003). Role of the thioredoxin system and the thiol-peroxidases Tpx and Bcp in mediating resistance to oxidative and nitrosative stress in *Helicobacter pylori*. *Microbiology*; 149, (Pt 1): 121-129.
- [30] X. Trivelli, I. Krimm, C. Ebel, L. Verdoucq, V. Prouzet-Mauleon, Y. Chartier, P. Tsan, G. Lauquin, Y. Meyer and J.M. Lancelin (2003). Characterization of the yeast peroxiredoxin Ahp1 in its reduced active and overoxidized inactive forms using NMR. *Biochemistry*; 42, (48): 14139-14149.
- [31] M. Montemartini, H.M. Kalisz, H.J. Hecht, P. Steinert and L. Flohe (1999). Activation of active-site cysteine residues in the peroxiredoxin-type trypanoxin peroxidase of *Crithidia fasciculata*. *Eur J Biochem*; 264, (2): 516-524.
- [32] Z.A. Wood, L.B. Poole, R.R. Hantgan and P.A. Karplus (2002). Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry*; 41, (17): 5493-5504.
- [33] A. Claiborne, T.C. Mallett, J.I. Yeh, J. Luba and D. Parsonage (2001). Structural, redox, and mechanistic parameters for cysteine-sulfenic acid function in catalysis and regulation. *Adv Protein Chem*; 58, 215-276.
- [34] L.M. Baker, A. Raudonikiene, P.S. Hoffman and L.B. Poole (2001). Essential thioredoxin-dependent peroxiredoxin system from *Helicobacter pylori*: genetic and kinetic characterization. *J Bacteriol*; 183, (6): 1961-1973.

- [35] H. Castro, H. Budde, L. Flohe, B. Hofmann, H. Lunsdorf, J. Wissing and A.M. Tomas (2002). Specificity and kinetics of a mitochondrial peroxiredoxin of *Leishmania infantum*. *Free Radic Biol Med*; 33, (11): 1563-1574.
- [36] H. Budde, L. Flohe, H.J. Hecht, B. Hofmann, M. Stehr, J. Wissing and H. Lunsdorf (2003). Kinetics and redox-sensitive oligomerisation reveal negative subunit cooperativity in trypanothione peroxidase of *Trypanosoma brucei brucei*. *Biol Chem*; 384, (4): 619-633.
- [37] M.S. Alpey, C.S. Bond, E. Tetaud, A.H. Fairlamb and W.N. Hunter (2000). The structure of reduced trypanothione peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2Cys-peroxiredoxins. *J Mol Biol*; 300, (4): 903-916.
- [38] E. Schroder, J.A. Littlechild, A.A. Lebedev, N. Errington, A.A. Vagin and M.N. Isupov (2000). Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution. *Structure Fold Des*; 8, (6): 605-615.
- [39] Z.A. Wood, L.B. Poole and P.A. Karplus (2003). Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*; 300, (5619): 650-653.
- [40] S. Hirotsu, Y. Abe, K. Okada, N. Nagahara, H. Hori, T. Nishino and T. Hakoshima (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, (22): 12333-12338.
- [41] D. Parsonage, D.S. Youngblood, G.N. Sarma, Z.A. Wood, P.A. Karplus and L.B. Poole (2005). Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Biochemistry*; 44, (31): 10583-10592.
- [42] K. Kitano, Y. Niimura, Y. Nishiyama and K. Miki (1999). Stimulation of peroxidase activity by decamerization related to ionic strength: AhpC protein from *Amphibacillus xylanus*. *J Biochem (Tokyo)*; 126, (2): 313-319.
- [43] K. Kitano, A. Kita, T. Hakoshima, Y. Niimura and K. Miki (2005). Crystal structure of decameric peroxiredoxin (AhpC) from *Amphibacillus xylanus*. *Proteins*; 59, (3): 644-647.
- [44] H.H. Jang, K.O. Lee, Y.H. Chi, B.G. Jung, S.K. Park, J.H. Park, J.R. Lee, S.S. Lee, J.C. Moon, J.W. Yun, Y.O. Choi, W.Y. Kim, J.S. Kang, G.W. Cheong, D.J. Yun, S.G. Rhee, M.J. Cho and S.Y. Lee (2004). Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell*; 117, (5): 625-635.
- [45] H.H. Jang, S.Y. Kim, S.K. Park, H.S. Jeon, Y.M. Lee, J.H. Jung, S.Y. Lee, H.B. Chae, Y.J. Jung, K.O. Lee, C.O. Lim, W.S. Chung, J.D. Bahk, D.J. Yun and M.J. Cho (2006). Phosphorylation and concomitant structural changes in human 2-Cys peroxiredoxin isotype I differentially regulate its peroxidase and molecular chaperone functions. *FEBS Lett*; 580, (1): 351-355.
- [46] L.B. Poole (2005). Bacterial defenses against oxidants: mechanistic features of cysteine-based peroxidases and their flavoprotein reductases. *Arch Biochem Biophys*; 433, (1): 240-254.
- [47] S.G. Rhee, H.Z. Chae and K. Kim (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med*; 38, (12): 1543-1552.
- [48] S.G. Rhee, T.S. Chang, Y.S. Bae, S.R. Lee and S.W. Kang (2003). Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J Am Soc Nephrol*; 14, (8 Suppl 3): S211-215.
- [49] S.G. Rhee, K.S. Yang, S.W. Kang, H.A. Woo and T.S. Chang (2005). Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxid Redox Signal*; 7, (5-6): 619-626.
- [50] S.G. Rhee, Y.S. Bae, S.R. Lee and J. Kwon (2000). Hydrogen Peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Science SKTE*; 53, pe1,
- [51] G. Georgiou and L. Masip (2003). An overoxidation journey with a return ticket. *Science*; 300, (5619): 592-594.

- [52] A. Salmeen, J.N. Andersen, M.P. Myers, T.C. Meng, J.A. Hinks, N.K. Tonks and D. Barford (2003). Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature*; 423, (6941): 769-773.
- [53] R.L. van Montfort, M. Congreve, D. Tisi, R. Carr and H. Jhoti (2003). Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature*; 423, (6941): 773-777.
- [54] B. Biteau, J. Labarre and M.B. Toledano (2003). ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature*; 425, (6961): 980-984.
- [55] A.V. Budanov, A.A. Sablina, E. Feinstein, E.V. Koonin and P.M. Chumakov (2004). Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science*; 304, (5670): 596-600.
- [56] H.A. Woo, H.Z. Chae, S.C. Hwang, K.S. Yang, S.W. Kang, K. Kim and S.G. Rhee (2003). Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science*; 300, (5619): 653-656.
- [57] A.P. Demasi, G.A. Pereira and L.E. Netto (2001). Cytosolic thioredoxin peroxidase I is essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria. *FEBS Lett*; 509, (3): 430-434.
- [58] C.M. Wong, K.L. Siu and D.Y. Jin (2004). Peroxiredoxin-null yeast cells are hypersensitive to oxidative stress and are genomically unstable. *J Biol Chem*; 279, (22): 23207-23213.
- [59] C.A. Neumann, D.S. Krause, C.V. Carman, S. Das, D.P. Dubey, J.L. Abraham, R.T. Bronson, Y. Fujiwara, S.H. Orkin and R.A. Van Etten (2003). Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature*; 424, (6948): 561-565.
- [60] T.H. Lee, S.U. Kim, S.L. Yu, S.H. Kim, S. Park do, H.B. Moon, S.H. Dho, K.S. Kwon, H.J. Kwon, Y.H. Han, S. Jeong, S.W. Kang, H.S. Shin, K.K. Lee, S.G. Rhee and D.Y. Yu (2003). Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood*; 101, (12): 5033-5038.
- [61] R. Bryk, P. Griffin and C. Nathan (2000). Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature*; 407, (6801): 211-215.
- [62] M. Trujillo, H. Budde, M.D. Pineyro, M. Stehr, C. Robello, L. Flohe and R. Radi (2004). Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. *J Biol Chem*; 279, (33): 34175-34182.
- [63] T. Jaeger, H. Budde, L. Flohe, U. Menge, M. Singh, M. Trujillo and R. Radi (2004). Multiple thioredoxin-mediated routes to detoxify hydroperoxides in Mycobacterium tuberculosis. *Arch Biochem Biophys*; 423, (1): 182-191.
- [64] C. Nickel, M. Trujillo, S. Rahlfs, M. Deponte, R. Radi and K. Becker (2005). Plasmodium falciparum 2-Cys peroxiredoxin reacts with plasmoredoxin and peroxynitrite. *Biol Chem*; 386, (11): 1129-1136.
- [65] R. Radi, J.S. Beckman, K.M. Bush and B.A. Freeman (1991). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem*; 266, (7): 4244-4250.
- [66] N. Romero, R. Radi, E. Linares, O. Augusto, C.D. Detweiler, R.P. Mason and A. Denicola (2003). Reaction of human hemoglobin with peroxynitrite. Isomerization to nitrate and secondary formation of protein radicals. *J Biol Chem*; 278, (45): 44049-44057.
- [67] N. Romero and R. Radi (2005). Hemoglobin and red blood cells as tools for studying peroxynitrite biochemistry. *Methods Enzymol*; 396, 229-245.
- [68] R. Radi, A. Denicola, B. Alvarez, G. Ferrer-Sueta and H. Rubbo (2000). The Biological Chemistry of Peroxynitrite. Nitric Oxide, Biology and Pathobiology. L. Ignarro. San Diego, California, Academic Press. 57-82.
- [69] R. Radi (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 101, (12): 4003-4008.

- [70] L. Chen, Q.W. Xie and C. Nathan (1998). Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC) protects bacterial and human cells against reactive nitrogen intermediates. *Mol Cell*; 1, (6): 795-805.
- [71] M. Dubuisson, D. Vander Stricht, A. Clippe, F. Etienne, T. Nauser, R. Kissner, W.H. Koppenol, J.F. Rees and B. Knoops (2004). Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase. *FEBS Lett*; 571, (1-3): 161-165.
- [72] C. Guilivi, P. Hochstein and K.J.A. Davies (1994). Hydrogen peroxide production by red blood cells. *Free Radic Biol Med*; 16, 123-129.
- [73] K. Shikama (1998). The Molecular Mechanism of Autoxidation for Myoglobin and Hemoglobin: A Venerable Puzzle. *Chem Rev*; 98, 1357-1373.
- [74] J.M.C. Gutteridge (1986). Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *Febs J*; 201, (2): 291-295.
- [75] A. Denicola, J.M. Souza and R. Radi (1998). Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95, (7): 3566-3571.
- [76] N. Romero, A. Denicola, J.M. Souza and R. Radi (1999). Diffusion of peroxynitrite in the presence of carbon dioxide. *Arch Biochem Biophys*; 368, (1): 23-30.
- [77] T. Yamamoto, Y. Matsui, S. Natori and M. Obinata (1989). Cloning of a housekeeping-type gene (MER5) preferentially expressed in murine erythroleukemia cells. *Gene*; 80, (2): 337-343.
- [78] K. Tsuji, N.G. Copeland, N.A. Jenkins and M. Obinata (1995). Mammalian antioxidant protein complements alkylhydroperoxide reductase (ahpC) mutation in *Escherichia coli*. *Biochem J*; 307 (Pt 2), 377-381.
- [79] H. Shau, R.K. Gupta and S.H. Golub (1993). Identification of a natural killer enhancing factor (NKEF) from human erythroid cells. *Cell Immunol*; 147, (1): 1-11.
- [80] E. Schroder, A.C. Willis and C.P. Ponting (1998). Porcine natural-killer-enhancing factor-B: oligomerisation and identification as a calpain substrate in vitro. *Biochim Biophys Acta*; 1383, (2): 279-291.
- [81] J.R. Harris, E. Schroder, M.N. Isupov, D. Scheffler, P. Kristensen, J.A. Littlechild, A.A. Vagin and U. Meissner (2001). Comparison of the decameric structure of peroxiredoxin-II by transmission electron microscopy and X-ray crystallography. *Biochim Biophys Acta*; 1547, (2): 221-234.
- [82] K.M. Stuhlmeier, J.J. Kao, P. Wallbrandt, M. Lindberg, B. Hammarstrom, H. Broell and B. Paigen (2003). Antioxidant protein 2 prevents methemoglobin formation in erythrocyte hemolysates. *Eur J Biochem*; 270, (2): 334-341.
- [83] J.P. Declercq, C. Evrard, A. Clippe, D.V. Stricht, A. Bernard and B. Knoops (2001). Crystal structure of human peroxiredoxin 5, a novel type of mammalian peroxiredoxin at 1.5 Å resolution. *J Mol Biol*; 311, (4): 751-759.
- [84] H. Shau and S.H. Golub (1988). Modulation of natural killer-mediated lysis by red blood cells. *Cell Immunol*; 116, (1): 60-72.
- [85] H. Shau, D. Gray and M.S. Mitchell (1988). Studies on the relationship of human natural killer and lymphokine-activated killer cells with lysosomal staining and analysis of surface marker phenotypes. *Cell Immunol*; 115, (1): 13-23.
- [86] Y.S. Lim, M.K. Cha, C.H. Yun, H.K. Kim, K. Kim and I.H. Kim (1994). Purification and characterization of thiol-specific antioxidant protein from human red blood cell: a new type of antioxidant protein. *Biochem Biophys Res Commun*; 199, (1): 199-206.

- [87] M.K. Cha and I.H. Kim (1995). Thioredoxin-linked peroxidase from human red blood cell: evidence for the existence of thioredoxin and thioredoxin reductase in human red blood cell. *Biochem Biophys Res Commun*; 217, (3): 900-907.
- [88] H. Sauri, P.H. Ashjian, A.T. Kim and H. Shau (1996). Recombinant natural killer enhancing factor augments natural killer cytotoxicity. *J Leukoc Biol*; 59, (6): 925-931.
- [89] H. Shau, A.T. Kim, C.C. Hedrick, A.J. Lusic, C. Tompkins, R. Finney, D.W. Leung and D.E. Paglia (1997). Endogenous natural killer enhancing factor-B increases cellular resistance to oxidative stresses. *Free Radic Biol Med*; 22, (3): 497-507.
- [90] R.B. Moore, G.A. Plishker and S.K. Shriver (1990). Purification and measurement of calpromotin, the cytoplasmic protein which activates calcium-dependent potassium transport. *Biochem Biophys Res Commun*; 166, (1): 146-153.
- [91] R.B. Moore, M.V. Mankad, S.K. Shriver, V.N. Mankad and G.A. Plishker (1991). Reconstitution of Ca(2+)-dependent K⁺ transport in erythrocyte membrane vesicles requires a cytoplasmic protein. *J Biol Chem*; 266, (28): 18964-18968.
- [92] J.R. Harris (1969). Some negative contrast staining features of a protein from erythrocyte ghosts. *J Mol Biol*; 46, (2): 329-335.
- [93] J.R. Harris and I. Naeem (1978). The subunit composition of two high molecular weight extrinsic proteins from human erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta*; 537, (2): 495-500.
- [94] J.R. Harris and I. Naeem (1981). Further studies on the characterization of cylindrin and torin, two extrinsic proteins of the erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta*; 670, (2): 285-290.
- [95] G. Gardos (1958). The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*; 30, (3): 653-654.
- [96] A.D. Maher and P.W. Kuchel (2003). The Gardos channel: a review of the Ca²⁺-activated K⁺ channel in human erythrocytes. *Int J Biochem Cell Biol*; 35, (8): 1182-1197.
- [97] G.A. Plishker, D. Chevalier, L. Seinsoth and R.B. Moore (1992). Calcium-activated potassium transport and high molecular weight forms of calpromotin. *J Biol Chem*; 267, (30): 21839-21843.
- [98] E. Melloni and S. Pontremoli (1989). The calpains. *Trends Neurosci*; 12, (11): 438-444.
- [99] R.B. Moore and S.K. Shriver (1997). Protein 7.2b of human erythrocyte membranes binds to calpromotin. *Biochem Biophys Res Commun*; 232, (2): 294-297.
- [100] G.W. Stewart and E.J. Blackstock (1989). Potassium transport in rabbit erythrocytes. *Exp Biol*; 48, (3): 161-165.
- [101] P. Kristensen, D.E. Rasmussen and B.I. Kristensen (1999). Properties of thiol-specific anti-oxidant protein or calpromotin in solution. *Biochem Biophys Res Commun*; 262, (1): 127-131.
- [102] D.W. Allen and S. Cadman (1979). Calcium-induced erythrocyte membrane changes. The role of adsorption of cytosol proteins and proteases. *Biochim Biophys Acta*; 551, (1): 1-9.
- [103] D.W. Allen, S. Cadman, S.R. McCann and B. Finkel (1977). Increased membrane binding of erythrocyte catalase in hereditary spherocytosis and in metabolically stressed normal cells. *Blood*; 49, (1): 113-123.
- [104] E. Schroder, M.N. Isupov, A. Naran and J.A. Littlechild (1999). Crystallization and preliminary X-ray analysis of human thioredoxin peroxidase-B from red blood cells. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*; 55 (Pt 2), 536-538.
- [105] Y. Nemoto, T. Yamamoto, S. Takada, Y. Matsui and M. Obinata (1990). Antisense RNA of the latent period gene (MER5) inhibits the differentiation of murine erythroleukemia cells. *Gene*; 91, (2): 261-265.

- [106] M.K. Cha, C.H. Yun and I.H. Kim (2000). Interaction of human thiol-specific antioxidant protein 1 with erythrocyte plasma membrane. *Biochemistry*; 39, (23): 6944-6950.
- [107] S.K. Jain and S.B. Shohet (1981). Calcium potentiates the peroxidation of erythrocyte membrane lipids. *Biochim Biophys Acta*; 642, (1): 46-54.
- [108] I. Maridonneau, P. Braquet and R.P. Garay (1983). Na⁺ and K⁺ transport damage induced by oxygen free radicals in human red cell membranes. *J Biol Chem*; 258, (5): 3107-3113.
- [109] R.M. Johnson, G. Goyette, Jr., Y. Ravindranath and Y.S. Ho (2000). Red cells from glutathione peroxidase-1-deficient mice have nearly normal defenses against exogenous peroxides. *Blood*; 96, (5): 1985-1988.
- [110] Y.S. Ho, Y. Xiong, W. Ma, A. Spector and D.S. Ho (2004). Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J Biol Chem*; 279, (31): 32804-32812.
- [111] E. Schroder, T. Jonsson and L. Poole (2003). The role of erythrocyte peroxiredoxin in detoxifying peroxides and in stimulating potassium efflux via the Gardos channels. *Blood*; 101, (7): 2897; author reply 2898.
- [112] R.M. Johnson, G. Goyette, Jr., Y. Ravindranath and Y.S. Ho (2005). Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. *Free Radic Biol Med*; 39, (11): 1407-1417.
- [113] U.K. Laemmli (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227, (5259): 680-685.
- [114] A. Agorio, C. Chalar, S. Cardozo and G. Salinas (2003). Alternative mRNAs arising from trans-splicing code for mitochondrial and cytosolic variants of *Echinococcus granulosus* thioredoxin Glutathione reductase. *J Biol Chem*; 278, (15): 12920-12928.
- [115] G. Ellman and H. Lysko (1979). A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Anal Biochem*; 93, (1): 98-102.
- [116] C.K. Riener, G. Kada and H.J. Gruber (2002). Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Bioanal Chem*; 373, (4-5): 266-276.
- [117] M.M. Bradford (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; 72, 248-254.
- [118] A. Denicola, H. Rubbo, D. Rodriguez and R. Radi (1993). Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Arch Biochem Biophys*; 304, (1): 279-286.
- [119] S. Kawazu, K. Komaki, N. Tsuji, S. Kawai, N. Ikenoue, T. Hatabu, H. Ishikawa, Y. Matsumoto, K. Himeno and S. Kano (2001). Molecular characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*; 116, (1): 73-79.
- [120] L.M. Baker and L.B. Poole (2003). Catalytic mechanism of thiol peroxidase from *Escherichia coli*. Sulfenic acid formation and overoxidation of essential CYS61. *J Biol Chem*; 278, (11): 9203-9211.
- [121] J.A. Kim, S. Park, K. Kim, S.G. Rhee and S.W. Kang (2005). Activity assay of mammalian 2-cys peroxiredoxins using yeast thioredoxin reductase system. *Anal Biochem*; 338, (2): 216-223.
- [122] P. Mendes (1993). GEPASI: a software package for modelling the dynamics, steady states and control of biochemical and other systems. *Comput Appl Biosci*; 9, (5): 563-571.
- [123] A. Holmgren (1972). Tryptophan fluorescence study of conformational transitions of the oxidized and reduced form of thioredoxin. *J Biol Chem*; 247, (7): 1992-1998.
- [124] G. Ferrer-Sueta, D. Vitturi, I. Batinic-Haberle, I. Fridovich, S. Goldstein, G. Czapski and R. Radi (2003). Reactions of manganese porphyrins with peroxynitrite and carbonate radical anion. *J Biol Chem*; 278, (30): 27432-27438.

- [125] L. Pauling, H.A. Itano and et al. (1949). Sick cell anemia a molecular disease. *Science*; 110, (2865): 543-548.
- [126] S. Iwahara, H. Satoh, D.X. Song, J. Webb, A.L. Burlingame, Y. Nagae and U. Muller-Eberhard (1995). Purification, characterization, and cloning of a heme-binding protein (23 kDa) in rat liver cytosol. *Biochemistry*; 34, (41): 13398-13406.
- [127] D.G. Kakhniashvili, L.A. Bulla, Jr. and S.R. Goodman (2004). The human erythrocyte proteome: analysis by ion trap mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*; 3, (5): 501-509.
- [128] T.J. Peters (1996). All about albumin. *Biochemistry, Genetic and Medical Applications*. San Diego, California, Academic Press.
- [129] A.R. Williams (1973). The effect of bovine and human serum albumins on the mechanical properties on human erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta*; 307, (1): 58-64.
- [130] Y. Kikuchi and T. Koyama (1984). Effects of Na⁺ and K⁺ on protein adsorption on red blood cell surface. *Am J Physiol*; 247, (5 Pt 2): H748-753.
- [131] Y. Kikuchi and T. Koyama (1984). Red blood cell deformability and protein adsorption on red blood cell surface. *Am J Physiol*; 247, (5 Pt 2): H739-747.
- [132] A. Denicola, J.M. Souza, R. Radi and E. Lissi (1996). Nitric oxide diffusion in membranes determined by fluorescence quenching. *Arch Biochem Biophys*; 328, (1): 208-212.
- [133] M. Trujillo, L. Folkes, S. Bartesaghi, B. Kalyanaraman, P. Wardman and R. Radi (2005). Peroxynitrite-derived carbonate and nitrogen dioxide radicals readily react with lipoic and dihydrolipoic acid. *Free Radic Biol Med*; 39, (2): 279-288.
- [134] A. Denicola, B.A. Freeman, M. Trujillo and R. Radi (1996). Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch Biochem Biophys*; 333, (1): 49-58.
- [135] M. Trujillo and R. Radi (2002). Peroxynitrite reaction with the reduced and the oxidized forms of lipoic acid: new insights into the reaction of peroxynitrite with thiols. *Arch Biochem Biophys*; 397, (1): 91-98.
- [136] J.M. Souza and R. Radi (1998). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys*; 360, (2): 187-194.
- [137] E.A. Konorev, N. Hogg and B. Kalyanaraman (1998). Rapid and irreversible inhibition of creatine kinase by peroxynitrite. *FEBS Lett*; 427, (2): 171-174.
- [138] K. Takakura, J.S. Beckman, L.A. MacMillan-Crow and J.P. Crow (1999). Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys*; 369, (2): 197-207.
- [139] G. Ferrer-Sueta, I. Batinic-Haberle, I. Spasojevic, I. Fridovich and R. Radi (1999). Catalytic scavenging of peroxynitrite by isomeric Mn(III) N-methylpyridylporphyrins in the presence of reductants. *Chem Res Toxicol*; 12, (5): 442-449.
- [140] G. Ferrer-Sueta, C. Quijano, B. Alvarez and R. Radi (2002). Reactions of manganese porphyrins and manganese-superoxide dismutase with peroxynitrite. *Methods Enzymol*; 349, 23-37.
- [141] S. Carballal, R. Radi, M.C. Kirk, S. Barnes, B.A. Freeman and B. Alvarez (2003). Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Biochemistry*; 42, (33): 9906-9914.
- [142] I.V. Peshenko and H. Shichi (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, (3): 292-303.

- [143] M.D. Pineyro, J.C. Pizarro, F. Lema, O. Pritsch, A. Cayota, G.A. Bentley and C. Robello (2005). Crystal structure of the trypanothione peroxidase from the human parasite *Trypanosoma cruzi*. *J Struct Biol*; 150, (1): 11-22.
- [144] K.S. Yang, S.W. Kang, H.A. Woo, S.C. Hwang, H.Z. Chae, K. Kim and S.G. Rhee (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, (41): 38029-38036.
- [145] H.A. Woo, W. Jeong, T.S. Chang, K.J. Park, S.J. Park, J.S. Yang and S.G. Rhee (2005). Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins. *J Biol Chem*; 280, (5): 3125-3128.
- [146] T.S. Chang, W. Jeong, H.A. Woo, S.M. Lee, S. Park and S.G. Rhee (2004). Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine. *J Biol Chem*; 279, (49): 50994-51001.

Backstage (agradecimientos)

El trabajo experimental que, en parte, se presenta acá se fue desarrollando durante los últimos años como un proyecto incipiente, con idas y venidas, como toda cosa nueva. Por eso, tuvo una característica que, al final, hizo que fuera de lo más divertido: recibí ayuda de mucha gente, en muchos laboratorios distintos. En Ciencias, la barra es lo mejor del día, y son muchos, pero a Ana le debo unas cuantas...a ella todo mi agradecimiento, por jefa y por amiga. Al Gefe y Bea, grandes profesores, no solo en lo académico. A Matías, un amigo de la cotidiana y de fondo. Obviamente están Dario y Luciana, dos máquinas que ahora lucen en otro estante y que estuvieron muy presentes en los primeros años. Seba, Edward, Lucía, Maggie, Verónica, Verónica, Verónica, Victoria, etc...son gente para tener cerca. De arriba, Bioquímica, Cora y Beatriz, con su barra, siempre fueron amables y dispuestos. De enfrente, ni que decir, a Richiardi, Malón y el resto, hacen del día a día mucho más divertido. A Sabina y su gente, que siempre prestaron cuando tenían y cuando no también. En Medicina...también son muchos, pero especialmente a Madia y al Botti, muy importantes para mi. Obviamente, a mi amiga y compañera, Malenita.