



Tesis de Doctorado en Biología Subárea Bioquímica

Sistemas enzimáticos de detoxificación de oxidantes en patógenos intracelulares

Martín Hugo

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina y CEINBIO, Universidad de la República.

Tutor: Dr. Rafael Radi

Co-tutora: Dra. Madia Trujillo

Montevideo, 20 de Junio de 2014

Comisión de admisión y seguimiento (CAS):

- Dra. Ana Denicola
- Dra. Laura Franco Fraguas
- Dr. Rafael Radi.

Integración de tribunal:

- Dra. Laura Franco Fraguas, presidente
- Dr. Luis Netto, vocal
- Dra. Leonor Thomson, vocal

A Eduardo y Enna, mis padres

CONTENIDO

Página

| | Indice de tablas y figuras | 7 |
|------------|---|----|
| | Abreviaturas utilizadas | 9 |
| Capítulo 1 | Introducción | 11 |
| 1.1 | Mycobacterium tuberculosis y Trypanosoma cruzi: patógenos intracelulares. | 13 |
| 1.1.1 | Mycobacterium tuberculosis | 13 |
| 1.1.2 | Trypanosoma cruzi. | 13 |
| 1.2. | Formación de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno por macrófagos activados. | 15 |
| 1.3. | Sistemas antioxidantes enzimáticos. | 17 |
| 1.3.1 | Tiol peroxidasas. | 18 |
| 1.4. | Aspectos singulares de las defensas antioxidantes de | 21 |
| 1.4.1. | Micotiol. | 21 |
| 1.4.2. | Catalasa peroxidasa, la hemoperoxidasa de Mycobacterium | 22 |
| 1.4.4. | Peroxirredoxinas de Mycobacterium tuberculosis. | 23 |
| 1.5. | Aspectos singulares de las defensas antioxidantes de <i>Trypanosoma</i> 2 | |
| 1.5.1. | <i>cruzi.</i> Tripanotiona. | 29 |
| 1.5.2. | Peroxidasas de <i>Trypanosoma cruzi.</i> 3 | |
| | Objetivos | 35 |
| Capítulo 2 | Oxidación y sobreoxidación mediada por peróxidos del tiol 3 | |
| | peroxidático (C _P) en la AhpE de <i>Mycobacterium tuberculosis.</i> | |
| 2.1 | Resumen 3 | |
| 2.2 | Materiales y Métodos 4 | |
| 2.3 | Resultados 4 | |
| 2.4 | Discusión 5 | |
| Capítulo 3 | Identificación de sustratos reductores para la AhpE de <i>M.</i> 6 tuberculosis. | |
| 3.1 | Resumen | 67 |

| 3.2 | Materiales y Métodos | 69 |
|------------|---|-----|
| 3.3 | Resultados | 75 |
| 3.4 | Discusión | 87 |
| Capítulo 4 | Actividad citocromo c peroxidasa y localización subcelular de la ascorbato peroxidasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> . | 91 |
| 4.1 | Resumen | 93 |
| 4.2 | Materiales y Métodos | 95 |
| 4.3 | Resultados | 99 |
| 4.4 | Discusión | 107 |
| Capítulo 5 | Conclusiones Generales y Perspectivas | 113 |
| | Referencias Bibliográficas | 117 |
| | Publicaciones | 133 |

Indice de figuras y tablas

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 1.1 | Estadíos de Trypanosoma cruzi | 14 |
| 1.2 | Ultraestructura de T.cruzi | 15 |
| 1.3 | Fuentes de peróxidos en fagosomas de macrófagos activados | 16 |
| 1.4 | Estructura del micotiol | 22 |
| 1.5 | Localización celular y susutratos reductores conocidos para peroxidasas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 24 |
| 1.6 | Estructura de la <i>Mt</i> AhpE | 29 |
| 1.7 | Estructura de la tripanotiona | 30 |
| 1.8 | Sistemas enzimáticos de metabolización de peróxidos dependientes de la tripanotiona. | 32 |
| 1.9 | Alineamiento de secuencias para 8 miembros representativos de las hemoperoxidasas híbridas tipo A. | 34 |
| 2.1 | Fluorescencia intrínseca de la <i>Mt</i> AhpE en diferentes estados redox. | 47 |
| 2.2 | Dimerización covalente de la MtAhpE. | 49 |
| 2.3 | Cambios en la estructura cuaternaria de la <i>Mt</i> AhpE mediados por el estado de oxidación. | 48 |
| 2.4 | Modificaciones covalentes del residuo de cisteína en la <i>Mt</i> AhpE. | 50 |
| 2.5 | Cinética de oxidación de la <i>Mt</i> AhpE mediada por peroxinitrito estudiada por un método directo. | 51 |
| 2.6 | Cinética de oxidación de la <i>Mt</i> AhpE mediada por peroxinitrito estudiada por un método de competencia. | 52 |
| 2.7 | Cinética de oxidación de <i>Mt</i> AhpE mediada por H ₂ O ₂ . | 52 |
| 2.8 | Determinación del pK _a del tiol peroxidático de la <i>Mt</i> AhpE. | 53 |
| 2.9 | Cinética de oxidación de <i>Mt</i> AhpE mediada por H ₂ O ₂ estudiada por competencia con LP. | 53 |
| 2.10 | Cinética de sobreoxidación de la <i>Mt</i> AhpE mediada por H ₂ O ₂ .A. | 54 |
| 2.11 | Determinación del pK _a del ácido sulfénico (C _P -SOH) de la <i>Mt</i> AhpE. | 55 |
| 2.12 | Cinética de oxidación y sobroxidación de la <i>Mt</i> AhpE por 15-HpETE. | 56 |
| 2.13 | Cinética de oxidación y sobroxidación de la <i>Mt</i> AhpE por hidroperóxido de ácido a-linolenico. | 56 |
| 2.14 | Gráfico de Brønsted para la reactividad de varios peróxidos con la <i>Mt</i> AhpE reducida y oxidada. | 60 |
| 2.15 | Las representaciones de la MtAhpE reducida muestran un surco hidrofóbico. | 63 |
| 3.1 | Reducción catalítica de la <i>Mt</i> AhpE por TNB. | 75 |

| 3.2 | La <i>Mt</i> AhpE oxidada reacciona con el MSH para formar un disulfuro mixto. | 77 |
|--------|---|-----|
| 3.3 | Cinética de reacción de la <i>Mt</i> AhpE oxidada con MSH. | 78 |
| 3.4 | Reducción de <i>Mt</i> AhpE-SS-M por <i>Mt</i> Mrx1. | 78 |
| 3.5 | La <i>Mt</i> AhpE es reducida por la <i>Mt</i> Mrx1 salvaje mediante un mecanismo ditiólico. | 79 |
| 3.6 | Reducción di versus monotiólica de la <i>Mt</i> AhpE por <i>Mt</i> Mrx1. | 80 |
| 3.7 | La reacción del <i>Mt</i> AhpE-SS-M con la <i>Mt</i> Mrx1 CXXA no forma un disulfuro mixto intermolecular. | 81 |
| 3.8 | Cinética de reacción de la <i>Mt</i> AhpE-SOH con el tiol nucelofílico de la <i>Mt</i> Mrx1CXXA. | 82 |
| 3.9 | Cinética de oxidación del tiol de la <i>Mt</i> Mrx1 por H ₂ O ₂ . | 83 |
| 3.10 | La MtAhpE cataliza la reducción de H₂O₂ en presencia de MtMrx1. | 84 |
| 3.11 | Consumo de NADPH durante la reduccion de H_2O_2 mediada por MtAhpE. | 84 |
| 3.12 | Mecanismos propuestospara la reducción de MtAhpE dependiente de MSH/Mrx1. | 88 |
| 4.1 | La <i>Tc</i> APx forma un compuesto tipo-II luego de la oxidación con H_2O_2 . | 99 |
| 4.2 | Espectros de EPR de la <i>Tc</i> APx. | 100 |
| 4.3 | Actividad enzimática. | 101 |
| 4.4 | Cinética del estado estacionario de la actividad citocromo c peroxidasa de la <i>Tc</i> APx. | 102 |
| 4.5 | Cinética de oxidación de la $TcAPx$ por H ₂ O ₂ . | 103 |
| 4.6 | Inactivación de la <i>Tc</i> APx por H ₂ O ₂ . | 103 |
| 4.7 | La <i>Tc</i> APx se localiza en diferentes compartimentos subcelulares. | 104 |
| 4.8 | La <i>Tc</i> APx se localiza en la membrana plasmática y membrana mitocondrial externa de amastigotas intracelulares. | 105 |
| 4.9 | La <i>Tc</i> APx se localiza en la membrana plasmática. | 106 |
| 4.10 | Estructuras del sitio activo de tres hemoperoxidasas que | |
| 4.11 | conservan el Trp proximal: CCP, APX y APX-CCP. Modelo para la detoxificación de peróxidos por la TcAPx en cardiomiocitos. | 110 |
| Tablas | | |
| 2.1 | Cinética de oxidación y sobreoxidación de la AhpE de Mycobacterium tuberculosis por diferentes peróxidos. | 57 |
| 4.1 | Parámetros cinéticos para la <i>Tc</i> APx. | 109 |

Abreviaturas

| AhpE | alkyhydroperóxido reductasa E |
|-------------------------------|--|
| 'NO | radical óxido nítrico |
| 'NO ₂ | radical dióxido de nitrógeno |
| OH | radical hidroxilo |
| AG-OH | Alcohol de ácido graso |
| AG-OOH | Peróxido de ácido graso |
| BAECS | células de endotelio de aorta bovino |
| BHI | infusión de corazón y cerebro |
| β-ME | β-mercaptoetanol |
| cit <i>c</i> | citocromo <i>c</i> |
| COOH | peróxido de cumeno |
| C_P | cisteína peroxidática |
| DTNB | ácido 5,5'-Ditiobis-2-nitrobenzoico |
| DTPA | Ácido dietilen-triamino tetraacético |
| DTT | ditiotreitol |
| EDTA | Ácido etilen-diamino pentaacético |
| GPxs | glutatión peroxidasas |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |
| HEPES | Ácido hidroxietil piperazina etanosulfónico |
| HpETE | peróxido de ácido araquidónico |
| HRP | Peroxidasa de rábano picante |
| iptg | Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido |
| KatG | catalasa peroxidasa |
| LP | lignina peroxidasa |
| MR | Micotiol disulfuro reductasa |
| Mrx1 | Micorredoxina 1 |
| MSH | micotiol |
| MSSM | Micotiol disulfuro |
| NADPH | β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato. |
| NEM | N-etilmaleimida |
| ONOO ⁻ | Peroxinitrito anión |
| ONOOH | ácido peroxinitroso |
| PEG-maleimide | metoxipolietilenglicol-maleimida |
| PLA ₂ | fosfolipasa A ₂ |
| Prxs | peroxirredoxinas |
| SDS | Dodecil sulfato sódico |
| SDS-PAGE | electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS |
| SOD | superóxido dismutasa |
| T(SH) ₂ | tripanotiona |
| ТВ | tuberculosis |

| <i>t</i> -BuOOH | tert-butil hidroperóxido |
|-----------------|--------------------------|
| ТСА | Ácido tricloroacético |
| TNB- | tionitrobenzoato |
| TPx | tiorredoxina peroxidasa |
| Trx | tiorredoxina |
| WB | western blot |

Capítulo 1

Introducción

1.1. Mycobacterium tuberculosis y Trypanosoma cruzi: dos patógenos intracelulares.

1.1.1. Mycobacterium tuberculosis.

Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis) es el agente causante de la enfermedad tuberculosis. De acuerdo al último informe de la organización mundial de la salud en control de la tuberculosis (http://www.who.int/tb/publications/global report/en/), aproximadamente un tercio de la población mundial está infectada con M. tuberculosis y cerca de dos millones de personas mueren al año a causa de esta enfermedad. La aparición de cepas resistentes a las drogas utilizadas actualmente hace que el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas sea una prioridad. Sin embargo, los factores que determinan la patogénesis, la virulencia y persistencia de infecciones causada por M. tuberculosis no se conocen completamente (1, 2). M. tuberculosis pertenece al filo Actinobacteria y es uno de los patógenos humanos más exitosos. Ha desarrollado diversas estrategias para asegurar el crecimiento y supervivencia dentro del ambiente hostil de macrófagos activados, su célula huésped primaria (3, 4). Los mecanismos moleculares de la patogénesis están en activa investigación, ya que podrían constituir las bases para el desarrollo de nuevas drogas. Los mismos incluyen la inhibición de la maduración del fagosoma a fagolisosoma (5, 6), la inhibición de la acidificación de fagosomas albergando Mycobacterium (7), la reparación de ADN y reparación o degradación de proteínas (8, 9), así como la degradación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno citotóxicas que se forman como consecuencia de la fagocitosis y activación del macrófago (10, 11). Estos mecanismos, deben ser considerados complementarios en la supervivencia del patógeno. Los neutrófilos no son capaces de fagocitar mycobacterias en los sitios de infección inicial. Sin embargo, durante la formación de los granulomas, los mismos pueden fagocitar macrófagos infectados y matar la bacteria por un proceso que hasta lo que se sabe, depende de la actividad NADPH oxidasa (12). En el presente trabajo nos interesan los sistemas antioxidants de M. tuberculosis, y en particular las peroxidas dependientes de tioles.

1.1.2 *Trypanosoma cruzi. Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*) es un parasito intracelular que causa la enfermedad de Chagas, conocida también como la tripanosomiasis Americana, endémica en 21 países americanos, donde millones de personas son infectadas y miles mueren cada año a causa de esta enfermedad <u>http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html</u>. La infección del macrófago juega un rol importante en la fase aguda de la misma. La infección de *T.cruzi* al huésped vertebrado involucra la entrada de las formas metacíclicas (presentes en las heces u orina del insecto vector) por heridas producidas en la piel. De esta manera, la primer línea de defensa contra este patógeno es el sistema fagocítico mononuclear, en especial el macrófago. La interacción de *T. cruzi* con el macrófago lleva a la internalización del parásito dentro de la vacuola

fagocítica o fagosoma yluego de un período de residencia de 30-120 minutos, el tripomastigota evade la vacuola para multiplicarse en el citosol bajo la forma amastigota (*13*).



Figura 1.1. Estadíos de Trypanosoma cruzi. A. En el epimastigota el kinetoplasto está ubicado en posición anterior al núcleo. Son replicativos no infectivos y es el estadío presente en el intestino del insecto vector o bien durante la fase logarítmica del crecimiento en cultivos axénicos. B. En el estadío tripomastigota hay una migración del kinetoplastido a la zona posterior. No son replicativos, sí infectivos y se encuntran a nivel del recto del insecto vector o en la sangre del huésped vertebrado. Durante la fase estacionaria del cultivo axénico también se puede encontrar esta forma del parásito. C. Dentro de la célula, el parásito se encuentra en forma de amastigota. Es replicativo e infectivo frente a células de mamíferos (*14*). Adaptado de (*13*).

La forma y la posición del kinetoplástido (estructura de ADN fibrilar presente en la matriz mitocondrial, ver abajo) en el parásito permiten identificar fácilmente el estadío en que se encuentra (Figura 1.1). *T. cruzi* posee una serie de organelos característicos que no están presentes en eucariotas superiores: el glicosoma, el acidocalcisoma y una única mitocondria de gran tamaño que se extiende a lo largo de toda la estructura de la célula. Dentro de la matriz mitocondrial se encuentra el kinetoplástido, estructura compuesta por docenas de moléculas de ADN formando maxicírculos y miles de minicírculos asociados unos con otros, que tiene aspecto electrondenso en microscopía electrónica de trasmisión (Figura 1.2). En el estadio epimastigota y amastigota el kinetoplastido se dispone perpendicular al eje longitudinal de la célula como una estructura de aproximadamente 1 µm de largo (Figura 1.2).

Como en las células de mamíferos, la membrana plasmática del parásito se encuentra asociada a una malla formada por microtúbulos y microfilamentos. En este caso la interacción es tan fuerte que permanecen asociados incluso luego de la lisis de la célula. Esta particularidad en la estructura de *T. cruzi* junto con la presencia de una única gran mitocondria, hace imposible la purificación de mitocondrias intactas del parásito (*13*), Por lo que cualquier estudio funcional a nivel mitocondrial debe realizarse mediante la permeabilización selectiva de la membrana plasmática celular por el uso del de detergentes (*15*). Al igual que en mitocondrias de mamíferos (*16, 17*), se ha reportado la producción de oxidantes, y en especial de peróxido de hidrógeno

 (H_2O_2) , a nivel la cadena de transporte de electrones mitocondrial de *T. cruzi* durante el metabolismo celular normal (*18, 19*).



Figura 1.2. Ultraestructura de T.cruzi. Micrografía electrónica de un amastigota donde se observa la localización del kinetoplastido (K) dentro de la mitocondria del parásito (M), en la figura también se observan el flagelo corto (F) y el núcleo (N). *Adaptado de (13).*

Dentro de los fagosomas de macrófagos activados los parásitos son expuestos a especies reactivas del oxígeno citotóxicas (*11, 20, 21*). Los mecanismos antioxidantes que permiten al parasito detoxificar estas especies están siendo investigadas activamente, dado que por su diferencia con los sistemas de mamífero podrían ser una alternativa para el desarrollo de nuevas drogas o estrategias terapéuticas. Además aunque la mayoría de las investigaciones se han centrado en la formación de especies reactivas durante la infección aguda, el Chagas es una enfermedad principalmente crónica, y no existen drogas hasta la fecha disponibles para el tratamiento en esta etapa, donde el parásito infecta el músculo cardíaco y otras células no fagocíticas (*22-25*). Los roles de las especies reactivas del nitrógeno y el oxígeno en la muerte de *T. cruzi* y los mecanismos enzimáticos que permiten sobrevivir al parásito durante la infección crónica recién están comenzando a ser elucidados.

1.2. Formación de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno por macrófagos activados.

Luego de la fagocitosis, la NADPH oxidasa 2 (NOX2) se ensambla en un complejo enzimático activo que transfiere electrones desde el NADPH al oxígeno molecular formando el radical anion superóxido (O_2^{-}) dentro de los fagosomas (26, 27). La naturaleza cargada de este radical a pH fisiológico (p K_a del radical hidroperoxilo (H O_2^{-}) = 4.75), determina su reducida difusibilidad a través de membranas. Por otra parte, la inducción de la óxido nítrico sintasa (iNOS) mediada por INF γ inicia la formación de óxido nítrico ('NO), un radical pequeño, lipofílico que puede difundir hacia

dentro del fagosoma (*6, 28, 29*). El superóxido puede dismutar espontáneamente o enzimáticamente a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (30). La reacción de este último con centros conteniendo metales de transición (en particular Fe²⁺ o Cu⁺) forma radical hidroxilo ('OH), fuertemente oxidante y no selectivo. Además, la reacción controlada por diffusion entre el O₂⁻⁻ y el 'NO forman peroxinitrito⁻, una molécula oxidante y nitrante (*31, 32*). En ausencia de blancos específicos, el ácido peroxinitroso (pK₈ = 6.5-6.8 (33-35)) sufre homólisis a dioxido de nitrógeno ('NO₂) y 'OH con un rendimiento del 30% (*k* = 0.9 s⁻¹ a pH 7.4 y 37 °C) (33). Sin embargo, la relevancia de esta reacción *in vivo* probablemente sea limitada, ya que es esperable que el peroxinitrito se vea involucrado en reacciones directas. Por ejemplo, el peroxinitrito puede reaccionar con dioxido de carbono (CO₂) que se encuentra en concentraciones milimolares en sistemas biológicos (*k* = 4.6 x 10⁴ M⁻¹ s⁻¹ a pH 7.4 y 37 °C), formando hasta un 35% de radical carbonato (CO₃⁻⁻) y radical 'NO₂, las cuales también son especies oxidantes (36-38). El 'OH y el 'NO₂ pueden participar en reacciones de peroxidación lipídica, formando hidroperóxidos de ácidos grasos (39). Estos también pueden ser fomados enzimáticamente por reacciones catalizadas por la lipooxigenasa (40).



Figura 1.3. Fuentes de peróxidos en fagosomas de macrófagos activados. Detalle de las vías de fromación de peróxidos (H₂O₂, peroxinitrito e hidroperóxidos de ácidos grasos (FA-OOH), en negrita) entre

Los nombres recomendados por la IUPAC para el peroxinitrito anión (ONOO⁻) y el ácido peroxinitroso (ONOOH) son oxoperoxinitrato(1-) oxoperoxinitrato de hidrógeno, respectivamente. El término peroxinitrito se refiere a la suma de ambas especies.

otras especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno se detallan en el texto. Las líneas punteadas indican reacciones que involucran varios pasos. Mt: *Mycobacterium tuberculosis*. Tomado de (*41*).

Los hidroperóxidos de ácidos grasos pueden ser liberados de membranas por la acción de la fosfolipasa A_2 (PLA₂)(42). El ácido araquidónico libre es tóxico para *M. tuberculosis*, actuando sinérgicamente con especies reactivas del nitrógeno (43). Aunque los mecanismos de esta sinergia no se conocen, el hecho de que la toxicidad mediada por ácidos grasos libres en *Helicobacter pylori* aumenta en cepas deficientes de peroxidasas dependientes de tioles indica que los hidroperóxidos de ácidos grasos podrían participar en la toxicidad (44). En suma, dentro de los fagosomas de macrófagos activados, entre otras especies reactivas, se pueden formar varios peróxidos, como H₂O₂, peroxinitrito e hidroperóxidos de ácidos grasos (Figura 1.1). Estas especies han sido descritas como citotóxicas contra microorganismos incluyendo *Trypanosoma cruzi* y bacterias (44-49).

1.3. Sistemas antioxidantes enzimáticos.

Los mecanismos enzimáticos que permiten la detoxificación de especies reactivas del nitrógeno y oxígeno en general y reducción de peróxidos en particular, permitiendo a los microorganismos infectar y persistir dentro del fagosoma del macrófago activado, son sólo parcialmente conocidos y son objeto de estudio en esta tesis. Las superóxido dismutasas (superóxido oxidoreductasas, SOD, EC 1.15.1.1) catalizan la dismutación de dos moléculas de superóxido a una molécula de oxígeno y una de H₂O₂, vía la oxidación y reducción del metal del sitio activo:

$$O_2^{*} + O_2^{*} + 2 H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$
 (1.1)

La constante de reacción entre la SOD y el superóxido es generalmente 2 x 10⁹ M⁻¹s⁻¹ (*50*), y su concentración intracelular en el rango micromolar, de manera que en condiciones fisiológicas la velocidad de dismutación del superóxido catalizada por la SOD es varios órdenes de magnitud mayor que la velocidad de dismutación espontánea (2 x 10⁵ M⁻¹s⁻¹) (*50, 51*). Se han descrito varios tipos de SODs, basados en los requerimientos de diferentes metales en el sitio activo, agrupándose al menos 3 familias: las SODs que contienen manganeso o hierro que presentan homología estructural, las SODs con centros binucleados de cobre y zinc y las superóxido dismutasas de níquel.

Las hemoperoxidasas son enzimas que requieren de un grupo hemo en su sitio activo para la descomposición de H_2O_2 , mediante el siguiente mecanismo general:

| $Fe^{III}-R + H_2O_2 \rightarrow Fe^{IV=O}-R^{**} + H_2O$ | | (1.2) |
|---|-------------|-------|
| Estado basal | Compuesto I | |

 $\begin{array}{ll} \mathsf{Fe}^{\mathsf{IV=O}}\mathsf{-R}^{**} + \mathsf{S} \to \mathsf{Fe}^{\mathsf{IV=O}}\mathsf{-R} + \mathsf{S}^{*} & (1.3) \\ & & \mathsf{Compuesto} \ \mathsf{I} & \mathsf{Compuesto} \ \mathsf{II} & \\ & & \mathsf{Fe}^{\mathsf{IV=O}}\mathsf{-R} + \mathsf{S} \to \ \mathsf{Fe}^{\mathsf{III}}\mathsf{-R} + \mathsf{S}^{*} & (1.4) \\ & & & \mathsf{Compuesto} \ \mathsf{II} & \mathsf{Estado basal} \end{array}$

En el primer paso (ecuación 1.2) el peróxido oxida por dos electrones a la proteína. Un electrón es retirado del átomo de hierro, y otro de un grupo orgánico, *R*, formando el compuesto I. En la mayoría de las peroxidasas, el grupo orgánico es en general la profirina, formando un radical π catiónico. El mecanismo de reacción de las catalasas es similar con la excepción que el peróxido actúa tanto como oxidante y reductor. Las hemoperoxidasas de clase I tienen como miembros a las citocromo *c* peroxidasas (CcP), las ascorbato peroxidasas (APx), las ascorbato/citocromo *c* peroxidasas (APxCcPs) y las catalasa peroxidasas de bacterias (*52*).

1.3.1. Tiol peroxidasas. Las peroxidasas cuya actividad catalítica depende de residuos de cisteína críticos se llaman tiol peroxidasas. Estas enzimas catalizan la reducción de H_2O_2 , peróxidos orgánicos y/o ácido peroxinitroso (ONOOH) a agua, alcoholes orgánicos y nitrito, respectivamente utilizando un sustrato reductor, usualmente tiorredoxina (Trx) o una proteína con plegamiento de tipo Trx a través de un mecanismo de tipo ping-pong (*53-55*):

ROOH ROH $H_2O_2 + Trx(SH)_2 \xrightarrow{\text{Tiol Peroxidasa}} H_2O + H_2O + TrxS_2$ (1.5) ONOOH NO₂⁻ + H⁺

donde ROOH es un peróxido orgánico; ONOOH es el ácido peroxinitroso; NO_2^- es nitrito; ROH es un alcohol orgánico; $Trx(SH)_2$ es triorredoxina reducida; $TrxS_2$ es tiorredoxina oxidada.

El paso oxidante del ciclo catalítico involucra una reacción SN_2 que ocurre mediante un ataque nucleofílico del tiol deprotonado de la llamada cisteína peroxidática (C_P) en uno de los oxígenos del grupo peróxido. En el estado de transición, la carga negativa se distribuye entre ambos oxígenos y el átomo de azufre; la reacción finaliza mediante la ruptura del enlace peróxido, formando un alcóxido como grupo saliente, el cual se puede protonar de acuerdo a su pK_a. Por lo tanto, el tiolato de la C_P sufre una oxidación de dos electrones para formar ácido sulfénico (E-SOH):



El resto del ciclo catalítico depende del tipo de tiol peroxidasa. En muchos casos, consiste en la formación de un puente disulfuro por la reacción entre el intermediario sulfénico de la C_P y el tiol de otro residuo de cisteína, llamada cisteína resolutiva (C_R), el cual es luego reducido por tiorredoxina (Trx) (u otra proteína con función tiol/disulfuro oxidoreductasa) que es mantenida en su estado reducido por la tiorredoxina reductasa (TR) utilizando el poder reductor del NADPH (56). Para todas las peroxidasas dependientes de tiol estudiadas, las constantes de acidez de la C_P son bastante altas (pKa ~ (5 - 6.3, (21, 54, 57-60)). Por lo tanto, en condiciones fisiológicas se espera que la misma se encuentre principalmente bajo la forma deprotonada, la especie reactiva. Sin embargo las constantes de reacción del tiolato (constante independiente de pH) de la C_P en tiol peroxidasas son varios ordenes de magnitud superiores a las reacciones correspondientes con tiolatos de bajo peso molecular o proteínas en general, lo cual indica que existen factores proteicos involucrados en establecer la especificidad en reducción de peróxidos. Estos factores recién están comenzando a ser esclarecidos (54, 61-63). Otro aspecto intrigante del mecanismo catalítico de las tiol peroxidasas son los mecanismos moleculares que establecen la especificidad por sustrato: si bien en muchos casos las tiol peroxidasas pueden catalizar la reducción de un rango amplio de peróxidos, los sustratos preferenciales varían, y no reflejan la tendencias en reactividad esperadas de acuerdo al p K_a^{\dagger} del grupo saliente (54) que fue reportado para la reactividad de otros tiolatos con peróxidos (60, 64).

Las tiol peroxidasas se pueden clasificar en dos grupos[‡] de acuerdo a homología de secuencia: glutatión peroxidasas (Gpxs) y peroxirredoxinas (Prxs). Dado que en el genoma de *M. tuberculosis* no hay genes que codifiquen para GPxs, pero hay varios miembros de la familia de las Prxs, nos detendremos en ésta última familia.

Las Prxs (EC 1.11.1.15) son una familia de enzimas con plegamiento tiorredoxina con actividad peroxidasa dependiente de tiol (65). Son ubicuas, están en todos los reinos vivientes y en

[†] Valor de p K_a del alcóxido formado luego de la reducción del peróxido.

[‡] Existen otras tiol peroxidasas no relacionadas estructuralmente con las GPx y las Prxs. Por ejemplo en muchas bacterias, una reductasa de hidroperóxidos orgánicos dependiente de tiol (Ohr) esta asociada a la detoxificación de hidroperóxidos. Sin embargo el gen que codifica para las Ohr no exite en el genoma de *M. tuberculosis*

compartimentos celulares variados (66). Por su actividad peroxidasa, estas enzimas son parte de las defensas antioxidantes. Por otro lado, en vista del rol señalizador que tiene el H₂O₂ y otros peróxidos, las Prxs están siendo consideradas parte fundamental de la señalización redox y regulación de factores de transcripción (67-70). Las peroxirredoxinas se clasifican clásicamente en Prxs de una cisteína (1-Cys Prxs) o de dos cisteínas (2-Cys Prxs) de acuerdo al número de residuos de cisteína que participan en la catálisis (56). La primer parte del ciclo catalítico es común para todos los tipos de Prxs y consiste en la reducción del sustrato peróxido con la oxidación concomitante de la C_P a su derivado ácido sulfénico. En el caso de las 1-Cys Prxs, el ácido sulfénico es reducido por diferentes vías que varían según la 1-Cys Prx en particular y en muchos casos se desconocen. En el caso de las 2-Cys Prxs, el ácido sulfénico de la C_P reacciona con otro residuo de cisteína que también se requiere para la catálisis (C_R) que puede estar presente en otra, o la misma cadena polipeptídica (2-Cys Prxs típicas y atípicas, respectivamente) formando un enlace disulfuro que es reducido por tiorredoxina u otra porteína relacionada a la tiorredoxina. Recientemente, a través de una nueva base de datos Prxs (PREX, http://csb.wfu.edu/prex/index.php) se ha propuesto otro método de clasificación de las Prxs de acuerdo a secuencia (71, 72). De esta forma se han identificado diferentes familias que contienen uno o más miembros canónicos:

- Alquil hidroperóxido reductasa C (AhpC) peroxirredoxina 1 (Prx1). Está es la subfamilia más grande y más ampliamente distribuida, con miembros en archaea, bacteria, y todas las formas eucariotas. Funcionalmente se clasifican como 2-Cys Prxs típicas. Son proteínas multiméricas (8-12 subunidades).
- Proteína comigratoria de bacterioferritina (Bcp, de su sigla en ingés bacterioferritin comigratory protein) – peroxirredoxina Q (PrxQ) (por Bcp de Escherichia coli y PrxQ de plantas, respectivamente). Están presentes principalmente en bacterias, también en levaduras y plantas, pero no en mamíferos. Pueden funcionar como 1-Cys Prxs o 2-Cys Prxs atípicas. Se han descripto formas monoméricas y diméricas.
- Tiol peroxidasa (Tpx) (por TPx de *E. coli*). Sus miembros son todos bacterianos y funcionan casi exclusivamente como 2-Cys Prxs atípicas. Generalmente dimérica.
- Peroxirredoxina 5 (por Prx5 de Homo sapiens). Los miembros de esta familia se encuentran desde bacterias a mamíferos, incluyendo plantas, hongos y levaduras. Funcionalmente incluye 1-Cys Prxs o 2-Cys Prxs atípicas. Generalmente dimérica.
- Peroxirredoxina 6 (por Prx 6 de *H. sapiens*). Se encuentran en bacterias, plantas, levaduras y mamíferos. En general son 1-Cys Prxs. Generalmente son dimérican.
- Alquil hidroperóxido reductasa E (AhpE) (por AhpE de Mycobacterium tuberculosis).
 Se encuentran en bacterias aeróbicas gram-positivas del orden actinomicetos y algunas

archaea. Su estructura cristalogríafica fue reportada y forma dímeros en estado reducido (73). Su mecanismo catalítico se desconocía hasta el desarrollo de esta tesis.

Las peroxirredoxinas son, al menos en varios casos, peroxidasas muy eficientes (*60, 74, 75*). El sitio activo presenta un motivo PXXXTXXC, el cual está muy conservado entre diferentes subfamilias de Prxs, aunque la treonina es sustituía por serina en unas pocas secuencias de Prxs, y una selenocisteína (Sec) peroxidática se ha identificado en una Prx de *Eubacterium acidamidophilum* (*56, 66, 71, 76*). Las peroxirredoxinas también contienen una arginina altamente conservada. Estos residuos conservados, junto con varias interacciones de la cadena determinan un p K_a de la C_P bajo y contribuyen al mecanismo catalítico de las Prxs, donde se ha propuesto que la estabilización del estado de transición por la formación de múltiples puentes de hidrógeno juega un rol importante (*62*)(Zeida *et al*, comunicación personal), aunque el mecanismo preciso de la catálisis aún no está claro. La concentración de las Prxs en diferentes células y tejidos está regulada, y usualmente aumenta bajo condiciones de estrés oxidativo. Incluso, su actividad también está regulada por diferentes mecanismos como fosforilación (*77, 78*) acetilación (*79*), nitración (*80*) e inactivación por sobreoxidación de la C_P. mediante una oxidación por dos electrones del derivado sulfénico a ácido sulfínico (C_P-SO₂H)(*81*).

En las 2-Cys Prxs típicas la susceptibilidad a la sobreoxidación depende de dos motivos estructurales (GGLG e YF) presentes en una extensión C-terminal principalmente en formas eucariotas (*81*) pero también en algunos organismos como cianobacterias (*82*). Estos motivos enlentecen la velocidad de formación del puente disulfuro con C_R y por lo tanto las 2-Cys Prxs que presentan este motivo se sobreoxidan con más facilidad (*55*). Esta modificación post-traduccional se consideró irreversible inicialmente, pero luego fue descrita la reducción por sistemas enzimáticos en diferentes 2-Cys Prxs (*83, 84*) y se la ha vinculado con procesos de señalización (*84*). Además, la forma sobreoxidada de algunas Prxs gana función chaperona (*85, 86*), y podrían tener un rol propio en procesos de señalización (*84*).

1.4. Aspectos singulares de las defensas antioxidantes de Mycobacterium tuberculosis.

1.4.1. Micotiol. Las defensas antioxidantes de *Mycobacterium tuberculosis* son inusuales en varios aspectos. Como muchas otras actinobacterias, carecen de glutatión, y contienen concentraciones milimolares de micotiol o 1-D-myo-inositil-2-deoxi-2-(N-acetil-L-cisteinil)amino-D-glucopiranosido (MSH, Figura 1.4) como principal tiol de bajo peso molecular (*87*). El MSH es mantenido en su forma reducida por la micotiol-disulfuro reductasa (MTR) que utiliza NADPH como fuente de electrones (*88*). Participa en vías de detoxificación de drogas mediante la formación de aductos con agentes alquilantes y antibióticos, los cuales son luego clivados por la

amidasa de conjugados de MSH para generar ácido mercaptúrico (que es excretado) y glucosamina inositol (utilizado para regenerar MSH) (89).



Figura 1.4. Estructura del micotiol (MSH). Tomado de (90).

El MSH también puede funcionar con una fuente de precursores metabólicos y en la generación de energía (91). Las cepas M. smegmatis deficientes en MSH son más sensibles a toxicidad mediada por 'NO y H₂O₂ que las cepas salvajes (92, 93). Sin embargo, actualmente no existe evidencia sobre el micotiol funcionando como sustrato reductor de alguna peroxidasa. Las micobacterias, entre otros organismos, también sintetizan ergotioneína, un derivado de tiourea de la histidina que contiene un átomo de azufre en el anillo imidazol. Su síntesis aumenta en mutantes de *M. smegmatis* para la síntesis de MSH sugiriendo un mecanismo compensatorio (94). Con respecto a otros mecanismos para la detoxificación de especies reactivas del nitrógeno y el oxígeno, M. tuberculosis expresa una superóxido dismutasa dependiente de hierro, SODA (Rv3846), la cual es liberada al medio extracellular y es considerada importante para la patogenicidad (95); también expresa una SODC dependiente de cobre (Rv0432) que no es esencial para el crecimiento dentro de macrófagos y parece cumplir un rol menor en la patogenicidad (96). M. tuberculosis contiene varias enzimas relacionadas a la tiorredoxina que son mantenidas en su estado reducido por la tiorredoxina reductasa a expensas de NADPH (97). A pesar de carecer de glutatión, el genoma de M. tuberculosis codifica diferentes proteínas tipo glutarredoxina cuyo rol funcional se encuentra en investigación (98, 99). Una de las micorredoxinas caracterizadas recientemente, tienen una función análoga a las glutarredoxinas en otros organismos, pero en lugar de utilizar glutatión, funcionan con MSH. La micotiolación y demicotiolación de proteínas dependiente de micorredoxina cumple un rol en la defensa contra el estrés de arsenato, hipoclorito y diamida (100-102). También expresa una peroxidasa dependiente de grupo hemo, la catalasa peroxidasa (KatG) y varias peroxidasas dependientes de tiol de la familia de las peroxirredoxinas (Prxs)(ver abajo). M. tuberculosis carece de un OxyR funcional, que en E. coli controla la transcripción de un regulón de alrededor de 20 genes antioxidantes (103). La regulación de respuestas al estrés oxidativo en M. tuberculosis depende (al menos parcialmente) de un sensor redox dependiente de zinc-tiolato, el factor sigma H/antisigma H (104).

1.4.2. Catalasa peroxidasa, la hemoperoxidasa de Mycobacterium tuberculosis

M. tuberculosis expresa constitutivamente la catalasa peroxidasa (EC 1.11.1.6) (MtKatG, Rv1908)(105). Esta enzima ha llamado particularmente la atención a raíz de su rol en la activación de la droga isoniazida (INH), antibiotico de primera línea en el tratamiento de la tuberculosis, dado que las mutaciones con pérdida de función en la enzima son el principal mecanismo de resistencia a INH (106). Las cepas negativas para MtKatG generadas in vitro no son patogénicas. Sin embargo, las cepas negativas para MtKatG aisladas de muestras clínicas sobreexpresan la peroxirredoxina alquil hidroperóxido reductasa C (AhpC), lo cual indica la necesidad de otra peroxidasa para garantizar la proteccón de la bacteria frente a especies oxidantes (107). Más recientemente se ha propuesto un mecanismo de resistencia a la INH basado en la regulación a la baja de KatG a través de mutaciones en la region intergénica *furA[§]-katG* que generó resistencia a la prodroga (108). Esta enzima ha sido identificada en el citosol, membrana y filtrados de cultivo de M. tuberculosis (109-111). Presenta una actividad peroxidasa amplia, así como una actividad catalasa importante ($k_{cat}/K_{M} = 2 \times 10^{6} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (112), catalizando la dismutación de H₂O₂ en dioxígeno y agua. También reduce peroxinitrito ($k = 1.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25 °C (113)). El mecanismo catalítico de la reducción de H₂O₂ por KatG involucra inicialmente la oxidación de la enzima por dos electrones a compuesto I ((Fe IV=O)). La KatG presenta una modificación posttraduccional en forma de aducto de tres aminoácidos (Met255-Tyr229-Trp107) con un rol específico en la actividad catalasa, ya que mutaciones en cualquiera de estos residuos elimina la actividad catalasa pero no peroxidasa (114, 115). Se ha propuesto que la actividad catalasa en KatG está vinculada a la formación de un radical en el aducto Met-Tyr-Trp, mientras que durante la actividad peroxidasa se forma un radical tirosilo (116). En el caso de la reducción de peroxinitrito, se ha propuesto la oxidación del estado basal de la KatG a compuesto II (Fe IV=O) y [•]NO₂ (113).

Además de la *Mt*KatG, el genoma de *M. tuberculosis* codifica para una lignina peroxidasa (Rv1900c) putativa y otras peroxidasas no dependiente de hemo ni tioles, aún sin caracterización (*98, 99*)(<u>http://www.webtb.org/</u>).

1.4.4. Peroxirredoxinas de *Mycobacterium tuberculosis*.

El genoma de *Mycobacterium tuberculosis* codifica varias tiol peroxidasas de la familia Prx: AhpC, TPx, AhpE, y dos Bcps putativas (*98*), las cuales han sido detectadas en las fracciones citosólica, de membrana y medio de cultivo (Figura 1.5). A continuación describiremos las principales características funcionales de las Prxs de *M. tuberculosis* así como la evidencia exitente en la literatura acerca de su rol en la detoxificación de peróxidos en modelos celulares o animales de

§

FurA es un regulador negativo de la expresión de KatG en Mycobacterium smegmatis (103).

tuberculosis. Las cinco Prxs y la KatG tienen distribuciones celulares diferentes, aunque solapantes. La *Mt*KatG (naranja) se ha encontrado en el citosol, membrana y espacio extracelular. La *Mt*AhpC (azul) es una enzima citosólica que se ha encontrado asociada a la membrana de la bacteria. La *Mt*TPx (verde), además del citosol y fracción de membrana, se ha encontrado en el medio de cultivo. La *Mt*AhpE (violeta), y las Prxs BcpB y Bcp (amarillo) se han detectado en fracciones de membrana, y la segunda también en el citosol. Los sistemas reductores para la *Mt*AhpC y *Mt*Tpx (gris) se muestran sin considerar su localización celular. Los sustratos reductores para la *Mt*AhpE y *Mt*Bcps no se conocen.



Figura 1.5. Localización celular y susutratos reductores conocidos para peroxidasas de *Mycobacterium tuberculosis.* Tomado de (41).

La alquil hidroperoxido reductasa C (*Mt*AhpC, Rv2428) es una peroxidasa dependiente de tiol, miembro de la subfamilia AhpC-Prx1. Funcionalmente, la AhpC se clasifica como una 2-Cys Prx típica, aunque experimentos de mutagénesis sitio-dirigiada indican que no son dos sino tres las cisteínas involucradas en la catálisis: la C_P (Cys 61), la C_R putativa (Cys 174) y una tercer cisteína (Cys 176) cuyo rol en la catálisis no está claro pero podría ofrecer una ruta alternativa para la formación del puente disulfuro (*117*). Mientras las Cys 61 juega un rol escencial en la catálisis, la enzima permanece parcialmente activa en ausencia de la Cys 174 o 176, posiblemente adoptando un mecanismo de tipo 1-Cys Prx (*118, 119*). Se ha propuesto que esta redundancia en pasos catalíticos podría ayudar a mantener la eficiencia del sistema antioxidante (*119*). La *Mt*AhpC se ha detectado tanto en el citosol (*120*) como asociada a la membrana (*109*) de la bacteria. La AhpC

parte del sistema alquil hidroperóxido reductasa (Ahp) bacteriano (121). En forma entererobacterias, este sistema comunmente está integrado por dos componentes: la AhpC y una reductasa de disulfuros dependiente de flavina (AhpF) que reduce a la AhpC a expensas de NADH. La expresión de ambas enzimas aumenta bajo regulación de oxyR en condiciones de estrés oxidativo (122). Sin embargo, todas las micobacterias carecen de AhpF, por lo que se han propuesto dos sistemas reductores para la AhpC de M. tuberculosis. El primero, la alquil hidroperóxido reductasa D (AhpD), que contiene un motivo CXXC y puede reducir a la MtAhpC. El gen ahpD se encuentra inmediatamente corriente abajo del gen ahpC, en la posición ocupada por el gen ahpF en el genoma de S. typhimurium, y ambas proteínas están controladas por el mismo promotor (123). La AhpD oxidada es regenerada por la dihidrolipoamida aciltransferasa (DIaT); la dihidrolipoamida deshidrogenasa (Lpd) media la reducción de la DIaT a expensas de NADH (124). El gen dlaT (Rv2215) codifica para el componente E2 del complejo piruvato deshidrogenasa, y el gen lpdC (Rv0462), la única Lpd funcional en M. tuberculosis (125), probablemente codifique para el componente E3 del complejo mencionado (126). En segundo lugar, la tiorredoxina C (TrxC), pero no la B (TrxB) o A (TrxA), también es capaz de actuar como un sustrato reductor de la AhpC (97), de manera que el ciclo catalítico es completado por tiorredoxina reductasa (MtTR) y NADPH. La eficiencia catalítica de la AhpC utilizando TrxC como sustrato reductor fue cerca de 100 veces más lenta que la medida usando AhpD como reductor (2.5 x 10⁴ versus 2.7 x 10⁶ M⁻¹s⁻¹, respectivamente)(97). Sin embargo, el sustrato reductor preferencial no sólo es determinado por las eficiencias catalíticas sino también por las concentraciones en estado estacionario de los sustratos reductores en estado reducido. En este sentido, la MtTrxC ha sido detectado como muy abundante en electroforesis de proteoma de la bacteria, mientras que la MtAhpD ha sido detectada con mucho menos intensidad (127, 128), lo cual indica una concentración menor de MtAhpD frente a MtTrxC en la bacteria. Además, la MtTR también es abundante en las micobacterias (127, 128), y entonces se espera que mantenga a la TrxC en su estado reducido mientras el NADPH no sea limitante (97). Estos datos sugieren que a pesar de la eficiencia catalítica de reducción de la AhpC menor por la MtTrxC comparada con la MtAhpD, ambas vía enzimáticas podrían estar contribuyendo a la detoxificación de peróxidos in vivo. Respecto a la especificidad por sustratos oxidantes, la AhpC es una peroxidasa de amplio espectro que cataliza la reducción de H₂O₂, hidroperóxidos orgánicos y peroxinitrito. La eficiencia catalítica de reducción de tert-butil hidroperóxido (t-BuOOH, un peróxido artificial usado comunmente cómo mimético de hidroperóxidos orgánicos naturales^{**}) por la *Mt*AhpC está en el orden de 10⁴ M⁻¹ s⁻¹ (97). La enzima también pudo reducir otro hidroperóxido orgánico artificial, el hidroperóxido de cumeno a una velocidad similar. También redujo H₂O₂ e hidroperóxido de ácido linoleico, pero no hidroperóxido de fosfatidilcolina. Esta enzima, junto con otras AhpC bacterianas, fue la primera para la cual fue

^{**} Sin embargo, estudios de nuestro y otros laboratorios indican que la reactividad de peroxidasas con *t*-BuOOH y peróxidos de ácidos grasos pueden ser muy difrentes *(129)*.

demostrada una actividad peroxinitrito reductasa ($k = 1.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 6.85 y TA (57)). El H₂O₂ fue un sustrato preferencial para la MtAhpC, aunque las medidas precisas de actividad fueron difíciles de determinar dada la actividad basal del sistema TR/Trx (97). En el caso de otra AhpC (de Salmonella typhimurium), la eficiencia catalítica para la reducción de H₂O₂ fue reportada como 3.7 x 10⁷ M⁻¹ s⁻¹ (75). Por lo tanto, la selectividad por sustratos de las AhpC bacterianas parecen seguir la misma tendencia que otros miembros de la subfamilia AhpC-Prx1, donde la reducción de peroxinitrito es un poco más lenta que la de H_2O_2 a un pH cercano al fisiológico, y muestran constantes de velocidad independientes de pH similares. (74). No hay datos acerca del pK_a de la C_P y del potencial redox de la AhpC de *M. tuberculosis*. El primer dato reportado para el pK_a de la C_P de las AhpC de S. *tiphymurium* fue < 5 (57) y más recientemente se reportó un valor de 5.8 (58), indicando que la C_P estaría principalmente deprotonada a pH fisiológico. El potencial de reducción para esta enzima es -178 ± 0.4 mV, un poco menor que el reportado para la Prx3 de mamífero Prx 3 (E°' = -290 mV) (130) y 2-Cys Prxs de plantas y PrxQ (E°' = -288 to -325 mV) (131). Aún no se dispone de datos para el potencial redox de la MtAhpD. Por otro lado, el potencial redox de las Trx de M. tuberculosis no ha sido determinado, pero sí para otras Trx bacterianas que demostraron ser bajos (-270 mV) para la Trc de E. coli (132). Siendo el potencial redox estándar para la reducción de H₂O₂ a agua, y para la reducción del ONOOH a nitrito 1.77 y 1.6 V, respectivamente (133, 134), el flujo de electrones desde Trxs hacia estos peróxidos a través de la AhpC está termodinámicamente favorecido. Además de la actividad peroxidasa, se han demostrado otras funciones para algunas AhpCs bacterianas: la AhpC de Helicobacter pylori puede formar agregados de alto peso molecular con actividad chaperona en condiciones de estrés oxidativo (135). En la AhpC de algunos microorganismos gram-negativos también se ha descrito una actividad deglutationilante que depende de la C_R en lugar de la C_P (136).

Estudios de cormatografía de exclusión molecular indicaron que la forma salvaje de la *Mt*AhpC en estado reducido está presente como una mezcla heterogénea de oligómeros bajo condiciones no reductoras, mientras que en condiciones reductoras la enzima es un oligómero homogéneo formado por 10 a 12 subunidades. Un mutante de sustitución de la cisteína 176 por serina de la *Mt*AhpC es un dímero en su forma oxidada, pero forma un oligómero de 10 a 12 subunidades luego de la reducción (*117*). La relación entre la oligomerización de la *Mt*AhpC y la actividad no ha sido explorada. En el caso de la AhpC de *Salmonella typhimurium*, la cual es decamérica en estado reducido, el análisis de formas mutantes en la interfase de decamerización indicaron que la oligomerización es importante pero no es escencial para la actividad (*137*).

El rol de la *Mt*AhpC en la detoxificación de peróxidos *in vivo* fue sugerida por primera vez por el hecho de que las cepas patogénicas aisladas de *M.tuberculosis* resistentes a la INH, carentes de KatG, sobreexpresan a la *Mt*AhpC, lo cual podría representar un mecanismo compensatorio para la eliminación de peróxidos citotóxicos (*107*). La sobreexpresión de *Mt*AhpC en estas cepas se

asocia a mutaciones en el promotor del gen (138). De esta manera, la MtAhpC fue propuesta como un blanco de drogas potencial, pero datos utilizando cepas de M. tuberculosis carentes de MtAhpC no son concluyentes. La expresión de AhpC en cepas virulentas de M. tuberculosis crecidas *in vitro* fue reprimida y aumentada en condiciones de crecimiento estático, probablemente reflejando una adaptación de la bacteria durante el ciclo de infección (139). La expresión de la AhpC se induce por hipoxia (140). Cepas de S. typhimurim carentes de ahpC resultaron hipersusceptibles a especies reactivas del nitrógeno y la complementación con AhpC logró revertir el defecto. Esta enzima también protegió células humanas de la toxicidad causada por especies reactivas del nitrógeno (141). Mientras la inactivación de la MtAhpC no tuvo efectos en el crecimiento bacteriano durante la infección aguda de ratones y en la sensibilidad a H₂O₂ in vitro, causó un aumento en la sensibilidad a la toxicidad mediada por peróxidos orgánicos y peroxinitrito (139, 142). La inactivación de la MtAhpC causó una disminución en la supervivencia de M. tuberculosis en macrófagos no estimulados pero no en macrófagos estimulados con interferon- γ (142). Cepas carentes de la DlaT presentaron un crecimiento retardado, fueron muy susceptibles a la muerte por nitrito acidificado in vitro, mostraron menor supervivencia intracelular durante la infección de macrófagos y fueron menos virulentas en un modelo de infección murino (143). En conjunto, estos datos indican la importancia de tanto la MtAhpC como la MtDlaT, su reductor a través de la *Mt*AhpD, para *M. tuberculosis* a la hora de enfrentar el insulto oxidativo en sus células huesped primarias y establecer una infección exitosa.

La segunda Prx de *M. tuberculosis* en ser identificada pertenece a la subfamilia TPx (*Mt*TPx, Rv1932) (97), ampliamente distribuida en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. En el caso de la TPx de *E. coli*, la enzima se localiza en el espacio periplásmico. En *M. tuberculosis*, la TPx se caracterizó inicialmente como un antígeno extracelular que induce una fuerte respuesta proliferativa en animales (144). La *Mt*TPx se encontró en ocasiones repetidas en filtrados de cultivo; también ha encontrado asociada a membranas y fracciones citosólicas (110, 120, 145, 146).

Las TPxs son 2-Cys Prxs atípicas. En general tienen tres residuos de cisteína donde la Cys60 es la C_P, la C93 es la C_R y la Cys80^{††} es irrelevante en términos de catálisis. Sin embargo, una forma mutante de la *Mt*TPx en la Cys 93 se mantuvo activa durante un período limitado de tiempo, antes de ser inactivada por sobreoxidación de la C_P a ácido sulfínico, y por lo tanto el rol de la Cys93 podría ser formar un disulfuro intramolecular con el ácido sulfénico para evitar la sobreoxidación de la C_P bajo condiciones de disponibilidad de sustrato reductor restringidas (*147*). La *Mt*TPx reacciona rápidamente con peroxinitrito (*k* = 1.5 x 10⁷ M⁻¹s⁻¹ a pH 7.4 y 25 °C)^{‡‡}. La reducción de *t*-

tt Las posiciones de cada cisteína corresponden a la secuencia de la TPx de *M. tuberculosis*.

^{‡‡} El valor de p K_a de la C_P en la *Mt*TPx u otras TPx bacterianas no ha sido reportado. Asumiendo un p K_a <6.3 como para todas las otras Prx estudiadas, más del 90 % de la C_P estaría como tiolato y 20% del

BuOOH fue más lenta ($k \sim 1 \ge 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25 °C). La reducción de H₂O₂ fue mayor que la de *t*-BuOOH, aunque el valor exacto fue difícil de estimar. La enzima fue poco activa utilizando peróxido de ácido linolenico y no pudo reducir hidroperóxidos de fosfatidilcolina. Respecto al paso reductor del ciclo catalítico, tanto la *Mt*TrxB como la *Mt*TrxC redujeron a la *Mt*TPx con eficiencias catalíticas similares (4.6 y 5.8 x 10⁴ M⁻¹ s⁻¹, respectivamente). De acuerdo a los datos proteómicos que indican que la *Mt*Trx C sería mucho más abundante que la *Mt*TrxB, la primera jugaría un rol principal como sustrato reductor para la *Mt*TPx. El MSH en presencia de MTR y NADPH no fue capaz de reducir a la *Mt*TPx (*97*).

La estructura cristalográfica de la *Mt*Tpx (*148*) salvaje y de la forma mutante C60S de la *Mt*Px (*149*), así como de otras TPxs bacterianas indicaron que la Cys60 forma parte de una tríada catalítica con la Thr57 y la Arg130. Esta enzima es dimérica tanto en la estructura cristalográfica como en solución (*148, 149*). En la mutante C60S de la *Mt*TPx, cocristalizó una molécula de acetato, interaccionando con la Ser60, Arg130 y Thr57 como mimético del sustrato (*149*). De manera similar, la enzima salvaje también mostró interacción con aniones cerca del sitio activo. En Prxs es frecuente la cocristalización con aniones; se ha propuesto la presencia de un sitio de unión a aniones en la cercanía de tioles reactivos en proteínas, que podrían participar en la estabilización del estado de transición, y por lo tanto en la aceleración de la reducción de peróxidos en general (*61, 62*).

Las cepas de *M. tuberculosis* carentes de una *Mt*TPx funcional tienen menos actividad peroxidasa que su contraparte salvaje, indicando que la enzima contribuye de manera importante en la actividad peroxidasa total de la bacteria. Además, cepas mutantes en *Mt*TPx resultaron más sensibles a la toxicidad mediado por H_2O_2 y •NO, efecto que fue revertido cuando la cepa fue complementada con el gen tpx. Las cepas sin TPx fueron incapaces de dividirse y sobrevivir dentro de macrófagos, especialmente luego de la activación con interferón- γ . El crecimiento fue recuperado significativamente en macrófagos derivados de ratones knockout para la iNOS. Esto es consistente con la capacidad para reducir peroxinitrito de la enzima medida *in vitro*. Estas cepas tampoco fueron capaces de iniciar una infección aguda y mantener una infección persistente, y fueron menos virulentas que la cepa salvaje (*150*). En la cepa de *M. bovis* BCG, la TPx es inducida en respuesta a la exposición a diamida, un agente que causa oxidación de tioles (*151*).

El genoma de *M. tuberculosis* también codifica para Prxs putativas de tipo Bcp (*98*). Hay evidencia para la expresión de Bcp (Rv2125) a nivel de proteína, tanto en la fracción de membrana (*109*)

peroxinitrito como ONOOH a pH 7.4. Por lo tanto, la constante independiente de pH para la oxidación de la C_P por peroxinitrito sería 5 veces mayor que el valor determinado a pH 7.4: 7.5 x 10⁷ M⁻¹s⁻¹. Sería aún mayor si el p K_a de la C_P de la *Mt*TPx fuera > 6.3.

como en el citosol de la cepa H37Rv (*111*). Se ha observado que la proteína es un blanco para la modificación por una proteína pequeña llamada Pup, un modificación post-traduccional que dirige las proteína a la degradación por el proteasoma en *M. tuberculosis* (*152, 153*). Esta modificiación (pupilación), junto con la función del proteasoma es esencial para la virulencia de la bacteria, por razones que aún no se conocen (*9, 154*). En el caso de la BcpB (Rv1608c), se ha identificado asociada a la membrana de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (*109*). Mientras que la Bcp es considerada no esencial de acuerdo a análisis realizados en la cepa H37Rv, en el caso de la BcpB que está siendo caracterizada funcionalmente en nuestro laboratorio por A. Reyes, es esencial para el crecimiento de la bacteria en medio rico en colesterol.

El genoma de *M. tuberculosis* también codifica para una 1-Cys Prx, la alquil hidroperóxido reductasa E (*Mt*AhpE, Rv2238c), que está altamente conservada en muchas micobacterias (*98, 99, 155*). La *Mt*AhpE pertenece a la nueva subfamilia AhpE, que comprende también Prxs tipo AhpE presente en otras bacterias y algunas archeas (*72, 155*). Esta proteína se ha identificado en la fracción de membrana de *M. tuberculosis* H37Rv usando un abordaje proteómico (*109*). La expresión de la *Mt*AhpE aumenta durante la fase durmiente de la enfermedad (*156*), lo cual indica que la expresión está regulada. Aunque la *Mt*AhpE tiene una secuencia más parecida a las 2-Cys Prxs típicas de mamíferos que las 1-Cys Prxs (*72, 155*), sólamente tiene un residuo de cisteína y por lo tanto deberia funcionar como una 1-Cys Prx.



Figura 1.6. Estructura de la *Mt***AhpE.** Estructura de la AhpE reducida donde se muestra una subunidad del homodímero. Se detallan los residuos de triptofano (azul) y la cisteína peroxidática. Visulización realizada en el programa pymol. PDB 1XXU (76).

De hecho, la forma oxidada de la C_P es un ácido sulfénico, observado en estudios cristalográficos (73). Resta una caracterización funcional para esta Prx. No se conocen los sustratos oxidantes preferenciales ni un sustrato reductor para esta enzima u otro miembro de la subfamilia AhpE.

1.5. Aspectos singulares de las defensas antioxidantes de Trypanosoma cruzi.

1.5.1. Tripanotiona.

Los tripanosomatídeos poseen como principal tiol de bajo peso molecular a la tripanotiona [N^{1} -,

 N^{β} -bis(glutationil)espermidina, T(SH)₂], di-tiol formado por dos moléculas de glutatión (GSH) conjugadas a una molécula de poliamina, la espermidina (*157*) (Figura 1.7).



Figura 1.7. Estructura de la tripanotiona (T(SH)₂). Tomado de (158).

La forma disulfuro de la tripanotiona es reducida por la flavoenzima tripanotiona reductasa (TR) a expensas de NADPH, constituyendo el sistema de la tripanotiona que sustituye al sistema del GSH/GSH reductasa presente en células de mamíferos. La $T(SH)_2$ tiene una reactividad mayor que el GSH como reductor a pesar de presentar un potencial redox similar (-230 y -250 mV, respectivamente). Las diferencias en reactividad fueron atribuídas a la naturaleza de di-tiol de la $T(SH)_2$ en donde las reacciones de reducción de disulfuros se ven favorecidas (*159*) y al valor de pKa del tiol, siendo menor en la $T(SH)_2$ (~ 7.4) respecto a el GSH (~ 8.7-9.2). Este pKa cercano al pH intracelular del parásito hacen que cerca de la mitad de la $T(SH)_2$ se encuentre deprotonada, contribuyendo a su reactividad (*159*).

En *T. cruzi* y *T. brucei* la tripanotiona se sintetiza en dos pasos consecutivos catalizados por la misma enzima tripanotiona sintasa (TryS) que usa ATP. La primer reacción consiste en la conjugación del GSH a la espermidina (Spd, una poliamina) para dar el intermediario monoglutationil espermidina que luego se conjuga a otra molécula de GSH para dar la tripanotiona. El sistema de la tripanotiona se encuentra involucrado en diferentes procesos celulares siendo uno de los más importantes el de mantener el balance redox celular. En tripanosomatídeos, la detoxificación de peróxidos se encuentra mediada por un sistema complejo de peroxidasas (ver abajo) dependientes en última instancia del poder reductor del NADPH a través de la T(SH)₂(*160*). Además de su rol en las defensas antioxidantes del parásito, la T(SH)₂ participa en otros procesos celulares como la reducción no enzimática de dehidroascorbato, glutatión oxidado (GSSG) y ovotiol, la síntesis de deoxiribonucleótidos cediendo equivalentes de reducción a la ribonucleótido reductasa (a través de la triparredoxina (TXN)), regulando la

proliferación celular, la detoxificación de metales y xenobióticos y la detoxificación de aldehídos reactivos (*161*).

La importancia del sistema de la tripanotiona ha sido demostrada mediante el uso de técnicas de biología molecular en donde utilizando diferentes estrategias se observó: a) la inhibición de la expresión de la TryS, enzima responsable de la síntesis de tripanotiona, produce un aumento en la sensibilidad a oxidantes y una dramática disminución de la viabilidad parasitaria (162), b) la disminución en los niveles de TR (> 90%) produce la inhibición de la proliferación celular, aumento de la sensibilidad a oxidantes y pérdida de virulencia en infecciones experimentales en ratones (163), c) en Leishmania donovani la disminución de actividad TR produce un aumento de la sensibilidad a la toxicidad derivada de macrófagos (164), d) la inhibición de la biosíntesis de TXN produce la inhibición de la proliferación celular en T. brucei (165) y e) la inhibición de la expresión de las peroxidasas dependientes de TXN producen en T. brucei un aumento de la sensibilidad a oxidantes llevando al parásito a la muerte celular. Más aún, durante la diferenciación del estadío no infectivo epimastigota al estadío infectivo tripomastigota metacíclico, proceso denominado metaciclogénesis se reportó la sobreexpresión de diferentes componentes del sistema incluyendo la TryS, y diferentes peroxidasas dependientes de TXN (ascorbato peroxidasa, TcAPX y peroxirredoxina mitocondrial, TcMPX)(166). Estos cambios producidos durante la metaciclogénesis sugieren el rol central del sistema en procesos fundamentales como la diferenciación celular y la pre-adaptación para la invasión al huésped vertebrado. Tanto la TR como la TryS, dos enzimas únicas de tripanosomatídeos, han sido validadas como blancos quimioterapéuticos para el diseño de drogas antichagásicas (158, 162). De esta manera, el sistema de la tripanotiona junto con la proteína TXN y los sistemas de peroxidasas asociadas al mismo componen una red de enzimas y sustratos cuyas funciones biológicas involucran, la regulación redox de diferentes procesos celulares incluyendo señalización celular, diferenciación, proliferación y virulencia. Estas funciones escenciales junto con la particularidad del sistema (ausente en células de mamíferos) lo hace un blanco promisorio para la búsqueda de nuevas drogas para el control de éstas parasitosis.

1.5.2. Peroxidasas de Trypanosoma cruzi.

En *T. cruzi* hasta la fecha se han caracterizado cinco peroxidasas que difieren no solo en su localización subcelular sino también en su especificidad por diferentes sustratos (Fig. 1.8). Dos de éstas peroxidasas presentan homología de secuencia con las fosfolípido-hidroperóxido glutatión peroxidasas de mamíferos y son denominadas TcGPXI y TcGPXII (*167, 168*). La enzima TcGPXI se encuentra a nivel del glicosoma y citosol celular donde reduce ácidos grasos e hidroperóxidos orgánicos de cadena corta utilizando el poder reductor proveniente del GSH y/o de la TXN(*167*). La TcGPXII se localiza a nivel del retículo endoplásmico y utiliza GSH como dador de

equivalentes de reducción; su actividad se ve restringida a la detoxificación de hidroperóxidos de ácidos grasos y fosfolípidos (*168*). Ninguna de las dos glutatión peroxidasas de *T. cruzi* (TcGPXI y TcGPXII) utilizan al peróxido de hidrogeno (H_2O_2) como sustrato, sin embargo, la sobreexpresión de ambas enzimas en epimastigotas de *T. cruzi* confiere resistencia contra la toxicidad mediada por éste oxidante. Estos resultados, indican que ambas enzimas tienen la capacidad de minimizar los efectos tóxicos producidos por las oxidaciones secundarias generadas por el H_2O_2 como lo es por ejemplo la inhibición de la lipo-peroxidación de membranas (*167, 168*).

Dos peroxirredoxinas, una de localización citosólica (*Tc*CPX) y otra de localización mitocondrial (*Tc*MPX), dependen de la TXN como dador de equivalentes de reducción y presentan actividad frente a H_2O_2 y *t*-butil hidroperóxido (*169*). De acuerdo la clasificación de Prxs de acuerdo a la secuencia aminoacídica (<u>http://csb.wfu.edu/prex/index.php</u>) ambas *Tc*CPx y *Tc*MPx pertenecen a la subfamila AhpC/Prx1, que se clasifican mecanísticamente como Prxs de dos cisteínas típicas. La *Tc*MPX se localiza dentro de la mitocondria parasitaria colocalizando con el kinetoplastido lo que sugiere que la enzima podría tener un rol en la protección del ADN mitocondrial frente a la toxicidad mediada por H_2O_2 (*169*). La sobreexpresión de la *Tc*CPX y la *Tc*MPX confiere a los epimastigotas protección frente a la toxicidad mediada por H_2O_2 y *t*-butil hidroperóxido (*169*).



Figura 1.8. Sistemas enzimáticos de metabolización de peróxidos dependientes de la tripanotiona. La tripanotiona (T(SH)₂) y la tripanotiona reductasa (TR) ceden los equivalentes de reducción provenientes del NADPH a los diferentes sistemas de detoxificación de peróxidos mediante la triparedoxina (TXN), glutatión (GSH) o el ascorbato (ASC). CPX (peroxirredoxina citosólica); GPXI (glutatión peroxidasa I); GPXII (glutatión peroxidasa II); MPX (peroxirredoxina mitocondrial); APX (ascorbato hemoperoxidasa). *Adpatado de Wilkinson et al., 2003 (165).*

T. cruzi presenta cuatro formas de superóxido dismutasas (SODs). Las diferentes isoformas de las SODs se encuentran localizadas a nivel del citosol, mitocondria y glicosoma del parásito y presentan Fe en su sitio activo, característica de las SODs de bacterias y plantas pero ausentes en células de mamífero (*170*). Cepas de *Leishmania chagasi* knockouts para FeSODB (*Lc*SODB) producen una reducción de la viabilidad parasitaria en macrófagos (*171*) mientras que la utilización de técnicas de ARN de interferencia para la FeSODB de *T. brucei* (*172*) produce una dramática inhibición de la proliferación parasitaria. En epimastigotas de *T. cruzi*, la sobreexpresión de la isoforma mitocondrial (FeSODA) protege a las células de la muerte celular programada inducida por suero humano fresco, proceso que dispara el aumento en la producción de radical $O_2^{\bullet-}$ a nivel de la mitocondria del parásito (*173*).

Finalmente, T.cruzi expresa una hemoperoxidasa, la ascorbato peroxidasa (TcAPx). Estudios realizados previamente indicaron que la enzima presenta actividad peroxidasa dependiente de ascorbato (K_M ascorbate = 192 mM; k_{cat}/K_M H₂O₂ ~ 10⁶ M⁻¹s⁻¹) y la localizaron en el retículo endoplásmico. Los epimastigotas que sobreexpresan esta enzima son más resistentes a la toxicidad por H₂O₂ (174). La expresión de la TcAPx aumenta luego de la exposición del parásito a H₂O₂ y se ha visto incrementada en cepas aisladas resistentes a benznidazol (175). No se observó una correlación entre el contenido de TcAPx en parásitos y la parasitemia en modelos animales de infección (176). La presencia en el retículo endoplásmico de TcAPX y TcGPXII, dos peroxidasas con diferente especificidad por sustrato, sugiere que las mismas actúan de forma complementaria para detoxificar los diferentes peróxidos generados en éste organelo (168, 174). El cofactor hemo fue esencial para la actividad peroxidasa y se propuso una vía que involucra la reducción directa del ascorbato por T(SH)₂ (174). En este sentido, cabe mencionar que hasta la fecha no se ha identificado una actividad de-hidro ascorbato reductasa en T. cruzi (177). Sin embargo, posteriormente el mismo grupo reportó la síntesis de novo de ascorbato por T. cruzi, que compensa su incapacidad de incorporarlo del medio (178). La TcAPx pertenece a la clase I de hemoperoxidasas, presentes en los seis reinos vivientes e incluyen a las catalasa peroxidasas (katG), ascorbato peroxidasas (APxs), citocromo c peroxidasas (CcPs) y dos tipos de peroxidasas "híbridas". Un estudio filogenético coloca a la TcAPx como una hemoperoxidasa híbrida (Fig. 1.8), por lo que debería ser capaz de funcionar tanto como una ascorbato peroxidasa, como una citocromo c peroxidasa, con dos sitios de unión a sustrato diferentes (52). Coincidentemente, se ha determinado la actividad ascorbato/citocromo c peroxidasa de su homologa en Leishmania major, con alto grado de homologia (62 % de identidad y un 87 % de similitud)(179). Esta se encuentra en la membrana mitocondrial interna, orientada hacia el espacio intermembrana de la mitocondria. En Leishmania su expresión aumenta frente a la exposición de los parásitos a H_2O_2 , y la sobreezpresión de la enzima confiere resistencia al daño causado por el mismo, como la

oxidación de glutatión, proteínas y cardiolipina (*180*). El genoma de *T. cruzi* contiene dos copias (duplicadas) del mismo gen que codifica para esta enzima (*Tc*rAPx-Ccp01 y *Tc*rAPx-Ccp02).

| PparaCcP1 DNYMGPTWVRLAWHSSCSYSAKDNSCSTGGTURED CreAPx-CcP DGSYGPVUVRLAWHASCTYAKKDGSGGSNGATMREA LmAPx-CcP ELGPSLTRLAWHEAGSYDCFKKDGSPN-SASMRFJ TcrAPx-CcP DMSKGPLFVRLAWHEAGSWDCFKKDGSPN-SASMRFJ LbraAFx-CcP DLGPSLVRLAWHEAGSWDCFKKDGSPN-SASMRFJ LbraAFx-CcP DLGPSLVRLAWHEAGSYDCFKKDGSPN-SASMRFJ TpsAFx-CcP NCGPLURLWHAGGYDCS | -PSINHGGNAGI-HLAVKALE-KVKKNHPBITYADIYIAGVTMIEEMG-GEE: 164 -PECEWGANAGI-AVARKLLE-PVKAAHPWISYADIWTUAGVVAIEEMG-GET: 212 KECLYAGNKGL-DIPRKALE-TLKKKYPCISYADIWTUAAYVAIEYMG-GET: 139 HPECSYAGNKGL-DKGRNALE-SLKKKYPCISYADIWTUAAYVAIEYMG-GET: 164 KECQYEGNNGL-EVPRRALE-PFKKKYPCISYADIWTUAAYVAIEYMG-GES: 164 GGGGTFGANAGLPDVALGLLK-EISDKYGVISHADIWTUAAVVAIEYMG-GEV: 104 GGBAEHGSNNGL-DIARGLLQ-PIVDKYSWISHADIWTUAAVVAIEYMG-GEV: 104 GGBAEHGSNNGL-DIARGLLQ-PIVDKYSWISHADIWTUAAVVAIEVMG-GEV: 131 DGBSQHGANAGL-GIARDLLQ-PFKEKYPQVSYADIWATAAAVVAIQECG-GEV: 117 |
|---|--|
| CreAPx-CcP : VPDGRLEDAKQGAKHIREVFG-RMGFDDKDIVAISG- LmAPx-CcP : GPDGRLEDGSKTQSHVREVFR-RLGFNDQETVALIG- TcrAPx-CcP : GPDGRLEDGSKTQDHVRDVFS-RLGFNDDETVALIG- LbraAPx-Cc : GPDGRLEDGGKTQDHVREVFT-RLGFNDQETVALIG- TpsAPx-CcP : SQVGRLEDADKGCPHLRKIEHPK-GFTDKDIVALSG- EgrAPx-CcP :RGRLEDATQTTNHIRDVFY-RVGMTDEEIVALSG- PparAPx-CcP :EGRLEDGKDASHVRSVFN-RWGFDDAEIVALSG- | AHTLGRCHGDR |
| CreAPx-CcP : EDTKSQSLMMPPSDLALL LmAPx-CcP : MDRATTKLMMPPSDVCLL TcrAPx-CcP : MDRATTKLMMPPSDVSIL LbraAPx-Cc : MDRATTKLMMPPSDMSLI TpsAPx-CcP : KHGETGTIMLIS-LALL EgrAPx-CcP : ACDEHPGLMMPTSLALL | SDRSFKKYVTQYAKDEEAFFKDFAVAFSKLLELG : 364 LDPSYRKYVELYAKDNDRFNKDFANAFKKLTELG : 291 LDDKYRSIAKKYADDNDYECNAFSKAYQKLLEVG : 316 LDPKYRKYVELYANDNDRFNKDFSAFKKLTELG : 293 EQP-FREWVELYAKDEEAFFKDYTAAWVKLQENG : 257 MDPSFRKHVERPAADQDAFFRVYAGAYQKLTEGG : 283 TDPALKIHTERPANDKEAFFTAFASAFSRLQENG : 270 |

Figura 1.9. Alineamiento de secuencias para 8 miembros representativos de las hemoperoxidasas híbridas tipo A. Esquema de colores: azul - residuos de aminoácidos conservados sin variaciones, verde - posiciones altamente similares, amarillo - posiciones similares. Las abreviaciones de las especies corresponden a sus nombres en PeroxiBase (*155*). El cuadro rojo detalla el residuo de triptofano identificado como escencial para la actividad citocromo c peroxidasa en la *Lm*APx (*181*). Adaptado de (*52*).

Se desconoce si esta enzima es capaz de descomponer peroxinitrito *in vitro*. Sin embargo el hecho de que los parásitos sobreexpresantes de *Tc*APx fueron más resistentes a peróxido de hidrógeno pero no a peroxinitrito, argumentan en contra de un rol de la *Tc*APx en la descomposición de peroxinitrito *in vivo* (*182*). El hecho de que este tipo de hemoperoxidasas no se encuentra en las células de huésped mamífero, hacen a la *Tc*APx un interesante blanco de nuevas drogas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas (*174*).

De esta manera, los tripanosomatídeos y en particular *T. cruzi* presentan las enzimas necesarias (SODs y peroxidasas) que le permiten la detoxificación de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e hidroperóxidos orgánicos localizados en diferentes compartimentos celulares. En este sentido, la sensibilidad a oxidantes no dependería de la falta de enzimas capaces de metabolizarlos sino más bien de los niveles de expresión de éstas enzimas en los diferentes estadíos parasitarios.

Objetivo general.

En este trabajo, estudiaremos parte de los sistemas enzimáticos de detoxificación de oxidantes en dos patógenos intracelulares: *Mycobacterium tuberculosis* y *Tripanosoma cruzi*, con el fin de contribuír al conocimiento de la compleja interacción entre los mismos con el macrófago, la primer línea de defensa frente a la invasión por patógenos.

En este sentido nos hemos propuesto los siguientes objetivos específicos:

1 - Caracterizar la oxidación y sobreoxidación mediada por peróxidos del tiol peroxidático (C_P) en la AhpE de *Mycobacterium tuberculosis* (Capítulo 2)

2 - Identificación de un sustrato reductor biológicamente relevante para la AhpE de *Mycobacterium tuberculosis.* (Capítulo 3)

3 - Caracterizar la función citocromo *c* peroxidasa y localización subcelular de la APx de *Trypanosoma cruzi*. (Capítulo 4).
CAPITULO 2

Oxidación y sobreoxidación mediada por peróxidos del tiol peroxidático (C_P) en la AhpE de *Mycobacterium tuberculosis*

2.1 Resumen

La virulencia y la resistencia a drogas de Mycobacterium tuberculosis está (al menos parcialmente) relacionada con sus sistemas antioxidantes. La detoxificación de peróxidos en esta bacteria la llevan a cabo una hemoperoxidasa y diferentes peroxirredoxinas de dos cisteínas. El genoma de *M. tuberculosis* también codifica para una peroxirredoxina de una cisteína putativa, la alquil hidroperóxido reductasa E (MtAhpE). Su expresión fue demostrada previamente a nivel transcripcional, y su estructura cristalográfica fue resuelta en los estados reducido y oxidado. En este capítulo demostramos la actividad peroxidasa de la enzima recombinante, y profundizamos el conocimiento sobre el mecanismo y cinética de reducción de diferentes peróxidos, así como la de la inactivación enzimática por sobreoxidación. Como consecuencia de la oxidación de su tiol peroxidático (C_P) la conformación de la proteína cambió, lo que se vio reflejado en cambios en sus propiedades de fluorescencia intrínseca y estructura cuaternaria. Los perfiles de pH para la reacción de oxidación y sobre oxidación permitieron determinar los valores de pKA para el tiol y derivado sulfénico de la C_P, y establecer al tiolato y sulfenato como las especies reactivas frente al sustrato peróxido. La oxidaxión del tiol y sobreoxidación del sulfénico de C_P siguieron la tendencia en la cual los peróxidos con menor pK_A del grupo saliente reaccionan más rápido, de acuerdo con el mecanismo de oxidación mencionado. Sin embargo, los hidroperóxidos de ácidos grasos (AG-OOH) reaccionaron con la enzima órdenes de magnitud más rápido que lo esperado, probablemente vinculado a la presencia de un surco hidrofóbico que favorece el posicionamiento correcto del sustrato. Hemos establecido al peroxinitrito y peróxidos derivados de ácidos grasos como sustratos oxidantes preferenciales para la enzima ($k_{ONOOH} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$, $k_{AG-OOH} \sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$, vs $k_{H2O2} \sim 10^4 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$).

2.2 Materiales y métodos

Expresión y purificación de la MtAhpE. El gen que codifica la MtAhpE (TB Database: Rv2238c) y una cola de residuos de histidina C-terminal en el vector pDEST17 fue cedido gentilmente por Pedro Alzari del Instituto Pasteur de París. La proteína fue expresada en Escherichia coli BL21(DE3). Las bacterias conteniendo el plásmido fueron crecidas en medio LB en presencia de ampicilina (100 mg/L) a 37 °C a partir de crioinóculos almacenados en 50 % de glicerol a -80 °C. Una vez alcanzada una turbidez cercana a 0.6, la expresión de la enzima fue inducida por la adición de 1 mg/mL de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido) durante 4 horas. Las bacterias fueron centrifugadas a 4000 rpm, el sobrenadante descartado, y resuspendidas en amortiguador Tris 20 mM, 0.5 M NaCl pH 7.6 (solución A) en una cantidad de 40 mL por cada litro de cultivo. Las bacterias fueron sonicadas y centrifugadas a 10000 rpm. El sobrenadante fue filtrado (0,8 µm) v pasado por una columna de níquel (HisTrap, 5 mL) previamente equilibrada en solución A + imidazol 5 mM. La columna fue limpiada de las proteínas no unidas o unidas inespecíficamente con 90, 90, 20 y 10 mL de solución A + imidazol 5, 20, 50 y 100 mM, respectivamente. La proteína fue eluída con solución A + imidazol 500 mM, tomando alícuotas de ~ 0.5 mL. Las alícuotas conteniendo alta concentración de proteína (absorbancia saturada a 280 nm) fueron colectadas y dializadas contra amortiguador fosfato 50 mM, 75 mM NaCl, 0.1 mM dtpa, pH 7.4 (3 x 4L). Todos los pasos de purificación, desde la centrifugación de las bacterias, hasta la diálisis fueron realizados a 4 °C, ya sea en baño de hielo o en cámara fría. La proteína dializada típicamente contiene 90 % de tioles reducidos. Se almacena bajo atmósfera de argón a - 80 °C§§. La pureza de la proteína fue controlada por electroforesis en gel de acrilamida desnaturalizante. La forma mutante en la C_P (C45S) de la MtAhpE fue generada por mutagénesis sitio dirigida con el kit QuikChange site-directed mutagenesis (Stratagene) según descrito por el fabricante utilizando los siguientes cebadores:

C45Sfw, 5' CAC GGG CAT CTC ACA GGG CGA GC 3' C45Srev, 5' GCT CGC CCT GTG AGA TGC CCG TG 3'

Su expresión y purificación se realizó como para la enzima salvaje.

Cuantificación de peróxido, proteínas y tioles. Las concentración de la solucion stock de H_2O_2 se midió a 240 nm (ϵ_{240} = 43.6 M⁻¹cm⁻¹) (*183*). El peroxinitrito se midió a pH alcalino a 302 nm (ϵ_{302} = 1670 M⁻¹cm⁻¹)(*184*). La concentración de peróxidos por el método de FOX se determinó incubando 100 mL de muestra problema con 900 mL de reactivo de FOX (100 mM xilenol orange, 250 mM

^{§§} Dada la rápida reacción de la *Mt*AhpE oxidada con TNB (ver capítulo 3), que podría resultar en una subestimación de la cantidad de tiol, la cuantificación de tioles precisa fue realizada con la enzima recién purificada o previamente reducida.

Fe²⁺, H₂SO₄ 25 mM, y BHT 4 mM en 90 % (v/v) metanol, y luego incubadas durante 30 minutos a tempratura ambiente antes de ser medidas a 560 nm. Para el ácido 15(S)hidroperoxieicosatetraenoico (15-HpETE) el coeficiente de extición fue de 78,500 M⁻¹cm⁻¹, el cual fue ligeramente mayor al valor reportado previamente para otros peróxidos de ácidos grasos (hidroperóxido de ácido linolénico (*185*)). Las concentraciones fueron confirmadas midiendo dienos conjugados a 234 nm (ϵ_{234} = 28,000 M⁻¹cm⁻¹) (*186*).

La concentración de *Mt*AhpE fue determinada espectrofotométricamente a 280 nm, usando un coeficiente de absorción molar de 23950 $M^{-1}cm^{-1}$ calculado de acuerdo a (*187*), y fue consistente con las determinaciones de proteínas por el ensayo de Biuret. La concentración de tioles en las proteínas fueron medidas por el ensayo de Ellman (ϵ_{412} = 14150 $M^{-1}cm^{-1}$): 15 µL de muestra de proteína a diferentes diluciones, o amortiguador (blanco) se mezlcaron con 135 µL de ácido 5,5'-Ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) 1 mM preparado en amortiguador fosfato 100 mM, 0.1 mM dtpa, pH 7.4 (amortiguador B) y la absorbancia se midió a 412 nm utilizando una cubeta de 100 µL. La concentración de peroxidasa de rábano (HRP) y lignina peroxidasa (LP) fueron determinadas por su absorción en la banda de Soret, (ϵ_{403} = 1.02 x 10⁵ M⁻¹ cm⁻¹ (*188*) y ϵ_{409} = 1.68 x 10⁵ M⁻¹ cm⁻¹ (*189*), respectivamente).

Reducción y alquilación de tioles. La enzima fue reducida inmediatamente antes de su uso mediante la incubación con DTT 1 mM durante 30 minutos en hielo. El exceso de reductor fue removido por gel filtración usando una columna Hitrap desalting (Amersham Bioscience) acoplada a detección UV visible, o en el caso de pequeños volúmenos (< 200 µL) pasando la enzima dos veces por una columna de cromatografía Micro-biospin 6 (BioRad). Una vez colectadas, las muestras fueron purgadas en argón para evitar la autoxidación. Para la alquilación de tioles, la enzima previamente reducida fue incubada con N-etilmaleimida (NEM) (5 o 10 mM) por 30 minutos en hielo, y el exceso de NEM fue removido al igual que el DTT.

Preparación de peróxido de ácido α-linolénico. Se incubó ácido a-linolénico (0.32 mM) con lipooxigenasa (LOX) tipo V de de soja (9.5 nM) en amortiguador borato 100 mM con deoxicolato 0.2 %, a pH 9 y 25 °C por 10 minutos. La reacción fue detenida mediante la adición de una mezcla de hexano/isopropanol/ácido acético (30/20/2, v/v/v) y los lípidos fueron extraídos como fue reportado anteriormente (Maskrey y O'Donnel, JBC 2007). Se evaporaron los solventes y los lípidos se resuspendieron en metanol y se almacenaron a – 80 °C hasta que fueron usados. La concentración de hidroperóxidos antes y después del tratamiento con LOX se midieron usando el método de FOX, y confirmadas midiendo dienos conjugados a 234 nm ($ε_{234}$ =28,000 M⁻¹cm⁻¹ (*186*)) con resultados similares.

Cambios en la fluorescencia de la AhpE. Los espectros de emisión de la enzima (1.5 μ M, λ_{exc} = 280 o 295 nm) fueron tomados usando un fluorímetro Aminco Bowman Series 2.

Cromatografía de exclusión molecular. 250 µL de *Mt*AhpE (0.1 mg de proteína) bajo diferenes estados redox se resolvieron en una columna Superdex 75 10/300 column, preequilibrada en amortiguador fosfato (20 mM, 150 mM NaCl, pH 7.4 a un flujo de 0.5 mL/min), con detección UV a 215 y 280 nm. Laa columna fue calibrada con un estándar de peso molecular (6.5–75 kDa, Sigma–Aldrich).

Análisis electroforético de la MtAhpE. Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE, del inglés sodium dodecyl sulfate- poliacrylamide gel electroforesis) de la enzima reducida y oxidada (0.2 µg de proteína por carril) usando geles al 15 % de acrilamida que fueron teñidos con nitrato de plata.

Análisis por espectrometría de masa de ionización por electrospray (ESI-MS). La enzima recién purificada fue incubada con las concentraciones indicadas de NEM (durante 30 minutos), DTT, o H_2O_2 (durante 2 minutos), o con H_2O_2 (durante 1 minuto) seguido de la adición de DTT. Las muestras fueron pasadas dos veces por columnas Micro-biospin 6 equilibradas en agua, diluídas en una mezcla acetonitrilo: H_2O 1:1, 0.1% ácido acético, pH 4.5 a una concentración final de 1 μ M y cargadas en un espectrómetro de masa QTRAP 2000 (Applied Biosystems/MDS Sciex). Los espectros de masa ESI de ión positivo fueron colectados usando un rango de *m/z* de 700-1700, con un voltaje de spray de iones (IS) de 5000 V, potencial desagrupante (declustering potential, DP) 60 V, y potencial de entrada 10 V. La adquisición de datos fue seteada en 3 minutos, y la masa real de la *Mt*AhpE fue calculada por deconvolución automática usando el programa Analyst 1.4.

Cinética de oxidación de la MtAhpE estudiada por un método de competencia. Las constantes de segundo orden para la reacción entre la *Mt*AhpE y el H_2O_2 o peroxinitrito fueron determinadas por un ensayo de competencia como fue descrito previamente (*59, 60, 74, 190*). Brevemente, para un par de reacciones compitiendo por un reactivo en común:

$$A_1 + B \to P_1 \qquad \qquad k_1 \tag{2.1}$$

$$A_2 + B \to P_2 \qquad \qquad (2.2)$$

Bajo condiciones donde $[A_1] y [A_2] > [B]$, pero sin llegar a excesos de $[A_1] y [A_2] > 10 x [B]$, la relación de reactividades estará dada por (*191*):

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{\ln\left\{\frac{[A_1]_0}{[A_1]_0 - [P_1]_\infty}\right\}}{\ln\left\{\frac{[A_2]_0}{[A_2]_0 - [P_2]_\infty}\right\}}$$
(2.3)

Para determinar la constante de reacción de la *Mt*AhpE con peroxinitrito y H₂O₂ se usaron HRP y LP, respectivamente. En el caso de H₂O₂, dada la velocidad de reacción relativamente lenta (~ 10⁴ M⁻¹s⁻¹, ver abajo) de la enzima frente a este peróxido, la misma fue incapaz de competir con la HRP que reacciona con una contante de ~ 10⁷ M⁻¹s⁻¹, de manera que fue necesario cambiar a una peroxidasa con menor constante de velocidad, en este caso la LP (~ 10⁵ M⁻¹s⁻¹). Por lo tanto, en nuestro trabajo A₁ = HRP o LP, mientras que A₂ = *Mt*AhpE-SH, B = peroxinitrito o H₂O₂, P₁ = compuesto I de la HRP o LP, P₂ = *Mt*AhpE-SOH y k₁ es la constante de velocidad para la reacción entre la HRP y el peroxinitrito o entre la LP y el H₂O₂. En ambos casos, las reacciones fueron seguidas en un espectrofotómetro de flujo detenido Applied Photophysics SX-17MV.

En el caso de la oxidación de HRP mediada por peroxinitrito, la reacción se siguió a 398 nm (corresponde al punto isosbéstico entre el compuesto I y II de la HRP), la concentración de compuesto I de la HRP se determinó usando un ε_{402} 4.2 x 10⁴ M⁻¹cm⁻¹ (*192*). La constante de velocidad para la oxidación de HRP a compuesto I mediada por peroxinitrito (k_1) fue de 3 x 10⁶ M⁻¹s⁻¹ bajo las condiciones experimentales empleadas aquí (no mostrado) valor que está de acuerdo con los datos publicados (*193*). La constante de velocidad para la oxidación de *Mt*AhpE mediada por peroxinitrito (k_2) fue calculada a partir de la ecuación 6, y la desviación estándar a partir de los datos obtenidas usando diferentes concentraciones de *Mt*AhpE.

En el caso de la oxidación de LP mediada por H_2O_2 , la reacción fue seguida a 401 nm (punto isosbéstico entre los compuestos I y II de la LP) y la concentración de LP se determinó espectrofotométricamente asumiendo una reacción equimolar con el H_2O_2 . La constante de reacción para la oxidación a compuesto I de la LP mediada por H_2O_2 (k_1) fue de 6.5 x 10⁵ M⁻¹s⁻¹ a pH 7.4 y 25°C (no mostrado), de acuerdo con datos reportados previamente (*189*). La constante de velocidad para la oxidación de la *Mt*AhpE mediada por H_2O_2 (k_2) se calculó de igual forma que para la reacción con peroxinitrito.

Las simulaciones fueron realizadas usando el programa GEPASI 3 (194, 195).

Cinética de oxidacion y sobreoxidación de la MtAhpE estudiada utilizando un abordaje fluorimétrico. Las constantes de velocidad de oxidación de la MtAhpE por diferentes peróxidos fueron determinadas tomando ventaja de la disminución de la fluorescencia intrínseca de la proteína (λ_{exc} = 280 nm) que ocurre durante su oxidación. La *Mt*AhpE reducida, bloqueada con NEM o mutante en la C_P (*Mt*AhpEC45S), fueron mezcladas rápidamente con peroxinitrito o H₂O₂ en exceso en un espectrofotómetro de flujo detenido (Applied Photophysics SX-17MV) con un tiempo de mezclado <2 ms. En el caso del peroxinitrito, a pesar de ser una especie inestable, decae con una constante de primer orden de 0.27 s^{-1} a pH 7.4 y 25 °C (*196*), mucho más lenta que la reacción con la *Mt*AhpE, de manera que las condiciones de pseudo-primer orden se mantienen durante el curso de la reacción (<0.1 s). Las constantes observadas del decaimiento de la fluorescencia (k_{obs}) fueron determinadas ajustando los datos experimentales a una función exponencial simple. Las constantes de velocidad de segundo orden para la reacción entre la enzima reducida y los diferentes peróxidos fueron obtenidas de la pendiente del gráfico k_{obs} versus concentración de oxidante.

Para determinar la constante de sobreoxidación mediada por peróxidos de la *Mt*AhpE oxidada, (Eq. 2), tomamos ventaja del aumento de la fluorescencia intrínseca de la proteína que ocurre cuando es tratada con un gran exceso de oxidante. En el caso del H₂O₂, *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BuOOH) y peróxido de cumeno (COOH) la enzima reducida o bloqueada con NEM (1 μ M) se mezcló con los peróxidos (100 – 450 μ M) en un fluorímetro Aminco Bowman Series 2, y se registró el curso temporal del cambio de intensidad de fluorescencia (λ_{exc} = 295 nm, λ_{em} = 338 nm). Para los peróxidos que reaccionaron a mayor velocidad, la reacción se siguió en el espectrofotómetro de flujo detenido como en el caso del estudio de la oxidación. En todos los casos fueron usados altos excesos del peróxido frente a la enzima. Los datos fueron procesados y analizados para determinar las constantes de sobreoxidación como se describió para la oxidación.

Determinación del pK_A del tiol y su derivado sulfénico en la C_P de la MtAhpE. Los valores de pK_A fueron determinados midiendo las constantes de velocidad de oxidación y sobreoxidación de la enzima por H₂O₂ a diferentes pHs. Las soluciones amortiguadoras que se usaron para los distintos rangos de pH fueron: amortiguador fosfato 100 mM con 0.1 mM dtpa (pHs 5.8-7.8) amortiguador acetato de sodio 100 mM con 0.1 mM dtpa (pHs < 5.8), con NaCl adicionada para mantener la fuerza iónica. Para analizar el efecto del pH en la sobreoxidación, la enzima reducida fue oxidada previamente a su derivado sulfénico mediante el tratamiento con H₂O₂ equimolar por 2 minutos a pH 7.4 y 25°C, y luego expuesta a exceso de H₂O₂ al pH de interés. Las constantes de velocidad de oxidación y sobreoxidación (k_{app}) se graficaron en función del pH y fueron ajustadas a la siguiente función:

$$k_{\rm pH7.4} = k_{\rm pH-i} X \frac{K_{\rm A_{MtAhpE-S(O)H}}}{K_{\rm A_{MtAhpE-S(O)H}} + [\rm H^+]} X \frac{[\rm H^+]}{K_{\rm A_{ROOH}} + [\rm H^+]}$$
(2.4)

Donde $k_{pH7.4}$ es la constante aparente a pH 7.4, k_{pH-i} es la constante de velocidad real o independiente de pH, $K_{A_{MtAhpE-S(O)H}}$ y $K_{A_{ROOH}}$ son las constantes de disociación ácida del tiol (en la

reacción de oxidación) o el ácido sulfénico (en reacciones de sobreoxidación) de la *Mt*AhpE y del peróxido de interés, respectivamente.

Las constantes de velocidad reales o independientes de pH (k_{pH-i}) para otros peróxidos fueron obtenidas a partir de las constantes aparentes a pH 7.4, y utilizando la Eq. 2.4 y los valores de pK_A del tiol/sulfénico de C_P obtenidos en la sección anterior.

Representación de superficie del cristal de la MtAhpE en estado reducido. La superficie molecular de la MtAhpE (número de acceso en la pdb 1XXU (73)) fue representado usando el programa Visual Molecular Dynamics (VMD)(197).

2.3 Resultados

La oxidación y sobreoxidación de la MtAhpE están acompañadas de cambios estructurales significativos. Cuando la MtAhpE (1.5 μ M) se expuso a H₂O₂ (0.85 μ M), se observó una disminución importante en la fluorescencia intrínseca de la proteína (Fig.2.1A). Este cambio fue revertido al agregar DTT (1 mM) como reductor, recobrándose una intensidad aún mayor a los niveles iniciales (Fig. 2.1A). Esto se debe a que la enzima estaba parcialmente oxidada, ya que había sido almacenada algunos días. Por otro lado, cuando la enzima (1 μ M) fue tratada con un alto exceso de H₂O₂ (300 μ M), hubo una disminución rápida de la fluorescencia correspondiente a la oxidación, seguida de un aumento lento de la intensidad de fluorescencia (Fig. 2.1B).



Figura 2.1. Fluorescencia intrínseca de la *Mt*AhpE en diferentes estados redox. A. Espectros de emisión de fluorescencia (λ_{ex} = 295 nm) de la *Mt*AhpE (1.5 µM, 0.83 µM tiol medido por DTNB) (línea sólida), mas H₂O₂ 0.85 µM (línea punteada) y mas DTT 1 mM (línea rayada). B. *Mt*AhpE (1.0 µM)(línea sólida) o luego del agregado de H₂O₂ 300 µM por 1 minuto (línea rayada) o 10 minutos (línea punteada).

Dimerización covalente. Al ser analizada por SDS-PAGE, la enzima migró como un monómero y solamente una pequeña fracción de la enzima oxidada migró como un dímero covalente, reducible por DTT y β -ME (Figura 2.2). La oxidación de la proteína con H₂O₂ (5 minutos), en concentraciones subequimolares (*Mt*AhpE:H₂O₂ = 1:0.5) para formar la mitad de ácido sulfénico, equimolares, y en exceso (*Mt*AhpE:H₂O₂ = 1:10) causaron un aumento muy pequeño en la forma dimérica, indicativo que la enzima no dimeriza covalentemente luego de la oxidación a estos tiempos, como sí ocurre con las Prxs de dos cisteínas típicas. La oxidación de la proteína dimerización observada en las otras condiciones, posiblemente a causa de la sobreoxidación de la C_P a ácido sulfínico.



Figura 2.2. Dimerización covalente de la *Mt*AhpE. SDS-PAGE de la enzima (0.2 μ g/carril), tratada con H₂O₂ (5 minutos) en las relaciones *Mt*AhpE: H₂O₂ indicadas. Las muestras fueron preparadas en presencia y ausencia de reductor β -ME. En el carril 2, la enzima fue reducida con DTT previo a la preparación de la muestra. La proteína fue visualizada por tinción con nitrato de plata.

Cambios en la estructura cuaternaria. La enzima reducida (60 μ M, ~ 1.2 mg/mL) eluyó como un pico único con un volumen de elución correspondiente a un dímero (Fig. 2.3 A, azul). La oxidación de la enzima con una cantidad equimolar de H₂O₂ resultó en una formación lenta de una especie de mayor peso molecular, mientras que la adición de H₂O₂ en exceso para promover la sobreoxidación resultó nuevamente en la forma dimérica (Fig. 2.3 A). La especie de alto peso molecular formada luego de la incubación con H₂O₂ equimolar fue revertida por la adición de DTT



Figura 2.3. Cambios en la estructura cuaternaria de la *Mt*AhpE mediados por el estado de oxidación. A. Perfiles de elución de la *Mt*AhpE en una columna Superdex 75 10/300 *Mt*AhpE (0.1 mg) previamente equilibrada con amortiguador fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4, sin tratamiento previo (azul), luego de la incubación con H_2O_2 equimolar (1 min, verde oscuro; 60 min, verde claro) y luego de la adición de H_2O_2 en un exceso de 20 veces (10 minutos, rojo). **B.** Línea azul, lo mismo que en (A), luego del tratamiento con H_2O_2 equimolar por 60 minutos y posterior agregado de DTT 1 mM (rojo) o NAC 2 mM (verde claro).

La adición de N-acetilcisteina 1 mM (NAC, un tiol de bajo peso molecular que se puede formar a partir de la degradación enzimática del micotiol en (*198*) resultó en una desestabilización del dímero, formando una especie de menor peso molecular (Fig. 2.3 B). Esto podría deberse a la formación de un disulfuro mixto a través de la reacción entre el derivado sulfénico (C_P-SOH) de la

*Mt*AhpE oxidada y el grupo tiol de la NAC, como posteriormente fue confirmado por espectrometría de masa (ver sección siguiente).

Análisis por espectrometría de masa de las modificaciones de la cisteína en la MtAhpE. La enzima recién purificada (> 90 % reducida) sin ningún tratamiento presentó una masa molecular de 19319 Da (Fig. 2.4 A). Cuando la MtAhpE (50 µM) se incubó con NEM en exceso (5 mM durante 30 min en amortiguador fosfato 100 mM a 25 °C y pH 7.4), el cambio en masa molecular fue consistente con la alquilación completa de la C_P, indicando que la constante para la reacción es mayor que 0.5 $M^{-1}s^{-1}$ a pH 7.4 y 25°C (Fig. 2.4 B). Luego de la oxidación de la *Mt*AhpE (50 µM) con H₂O₂ equimolar no fuimos capaces de detectar la forma de la enzima presentando el ácido sulfénico libre. Esto pudo deberse a la precipitación de la proteína durante la manipulación (especialmente la dilución final en la mezcla acetonitrilo:H₂O 1:1, 0.1% ácido acético, pH 4.5), y concordante con la formación de especies de mayor peso molecular luego de la oxidación observado por cromatografía de exclusión molecular. Consecuentemente, en la búsqueda de un atrapador potencial para el sulfénico en la *Mt*AhpE, la enzima se expuso a H₂O₂ equimolar y dos minutos más tarde, fue incubada con DTT, NAC o GSH en exceso. En el primer caso, se observó un pico de 19319 Da (Fig. 2.4 C), correspondiente a la enzima reducida. La incubación con NAC o GSH causó cambios de masa de + 162 y + 306, respectivamente (Fig. 2.4 D y E), indicando la formación de disulfuros mixtos. La formación del disulfuro mixto pudo ser la razón para la desestabilización del dímero de MtAhpE que se observó por cromatografía de exclusión molecular (Fig. 2.4). Finalmente, luego de exponer a la enzima (50 µM) a un exceso de H₂O₂ (250 µM) por 2 min, se observó un incremento en la masa de 32 Da, consistente con la adición de dos átomos de oxígeno a la proteína (Fig. 2.4 F).



Figura 2.4. Modificaciones covalentes del residuo de cisteína en la *Mt*AhpE. Análisis por espectrometría de masa de ionización por electrospray de la *Mt*AhpE (50 μ M) recién purificada (A), incubada con NEM 5 mM durante 30 minutos (B), oxidada con H₂O₂ equimolar por 1 min y luego tratada con DTT 1 mM (C), NAC 2 mM (D) o GSH 2mM (E), y tratada con exceso de (250 μ M) (F). Las muestras se desalaron y diluyeron a una concentración final de 1 μ M para el análisis.

No logramos atrapar el derivado sulfénico con dimedona, posiblemente dada la baja reacctividad de la dimedona con el ácido sulfénico, que para la albúmina humana fue de 0.027 M⁻¹s⁻¹ (pH 7.4, 37 °C (*199*)).

Oxidación por peroxinitrito. Abordaje por un método directo. El agregado de concentraciones en exceso de peroxinitrito causaron un aumento dosis dependiente en las constantes de decaimiento de la fluorescencia intrínseca de la *Mt*AhpE (Fig. 2.5 A línea a y 2.5 B). Los cambios no se observaron cuando se usó la enzima mutada en la C_P (C45S) (Fig. 2.5 A línea b), bloqueada con NEM (no mostrado) o mezclando la enzima salvaje con los productos de descomposición del

peroxinitrito(adición reversa)(Fig. 2.5 A línea c). A partir de la pendiente del gráfico mostrado en la figura 2.5 B, se calculó una constante de velocidad de segundo orden de $(1.9 \pm 0.2) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25 °C.



Figura 2.5. Cinética de oxidación de la *Mt*AhpE mediada por peroxinitrito estudiada por un método directo. A. La *Mt*AhpE previamente reducida (a) o C45S (b) (0.25 μ M) fue mezclada rápidamente (< 2 ms) con peroxinitrito (1.15 y 3.3 μ M, respectivamente) en amortiguador fosfato de sodio 100 mM con dtpa 0.1 mM, pH 7.4 y 25°C, y se determinó el curso temporal de la disminución de intensidad de fluorescencia total. (c) Lo mismo que en (a) pero usando peroxinitrito previamente decompuesto en el amortiguador (3.3 μ M). El trazo rojo respresenta el ajuste de los datos experimentales (a) a un decaimiento exponencial simple. **B.** Efecto del aumento de la concentración de peroxinitrito en las constantes observadas (k_{obs}) del cambio de fluorescencia.

Abordaje por un método de competencia. La reacción entre la *Mt*AhpE reducida y el peroxinitrito también fue estudiada por competencia con HRP. Como fue esperado, concentraciones crecientes de *Mt*AhpE inhibieron la formación de compuesto I de la HRP mediada por peroxinitrito (Fig. 2.6 A y B). De estos datos, y de acuerdo a la ecuación 6, se calculó la constante de reducción de peroxinitrito por la *Mt*AhpE como (1.7 ± 0.6) x 10^7 M⁻¹s⁻¹ a pH 7.4 y 25 °C, concordante con la deteminada por el abordaje fluorimétrico. Los rendimientos de compuesto I totales a las diferentes concentraciones de *Mt*AhpE fueron consistentes con los esperados de acuerdo a la simulación realizada asumiendo un sistema de competición simple (Fig. 2.6 B, trazo rojo).



Figura 2.6. Cinética de oxidación de la *Mt*AhpE mediada por peroxinitrito estudiada por un método de competencia. A. La HRP (5 µM) se mezcló rápidamente (<2 ms) con peroxinitrito (1.0 µM) en presencia de concentraciones crecientes de *Mt*AhpE reducida, y se midió el curso temporal del la oxidación de HRP. B. Efecto de la concentración de *Mt*AhpE en los rendimientos de compuesto I de la HRP (cuadrados). La línea continua representa la simulación computacional (GEPASI) de los rendimientos de compuesto I de acuerdo a un sistema de competencia simple usando la constante de reacción determinada ($k_2 = 1.7 \pm 0.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Oxidación por H_2O_2 y determinación del pK_A de la C_P. Determinación por un abordaje directo. El agregado de concentraciones en exceso de H_2O_2 causaron un aumento dosis dependiente en las constantes de decaimiento de la fluorescencia intrínseca de la *Mt*AhpE (Fig. 2.7 A y B). A partir de la pendiente del gráfico mostrado en la figura 2.7 B, se calculó una constante de velocidad de segundo orden de (8.2 ± 1.5) x 10⁴ M⁻¹s⁻¹ a pH 7.4 y 25 °C.



Figura 2.7. Cinética de oxidación de *Mt***AhpE mediada por H**₂**O**₂**. A.** La *Mt***AhpE** reducida (1.0 µM) se mezcló rápidamente con H₂**O**₂ (20 µM) en amortiguador fosfato 100 mM con dtpa 0.1 mM, pH 7.4 y 25°C, y se registró el curso temporal del decaimiento de fluorescencia intrínseca total (λ_{ex} = 280 nm). El trazo rojo representa el mejor ajuste de los datos experimentales a una función exponencial simple. **B.** Efecto del aumento de la concentración de H₂O₂ en las constantes observadas (k_{obs}) de cambio de fluorescencia, a partir del cual se obtuvo la constante de velocidad aparente a pH 7.4.

Las constantes de segundo orden aparentes fueron mayores a pHs alcalinos (Fig. 2.8), indicando que el tiolato de la C_P es la especie reactiva, de acuerdo a los mecanismos de reacción propuestos previamente (*66, 200*). La *Mt*AhpE fue inestable y precipitó a pHs muy bajos, lo cual limitó el rango de pH estudiado (pHs > 4.5). Las amplitudes del cambio de fluorescencia fueron menores a pHs ácidos, pero los valores de k_{obs} se mantuvieron linealmente dependientes de la concentración de oxidante. El pK_A del tiol peroxidático (pK_{SH}), se estimó como 5.2.



Figura 2.8. Determinación del pK_a del tiol peroxidático de la *Mt*AhpE. Igual que en la figura 7 pero realizado en amortiguador acetato de sodio o fosfato de sodio a diferentes pHs. Las constantes de velocidad de segundo orden aparentes (•) entre la enzima y el H_2O_2 se graficaron en función del pH y los datos fueron ajustados a la ecuación 2.4 (línea roja).

Determinación por un abordaje de competencia. Con el fin de confirmar el valor de constante para la oxidación de la *Mt*AhpE dependiente de H_2O_2 determinado arriba, la reacción también se estudió por un abordaje de competencia (*190, 201*). La *Mt*AhpE hasta una concentración de 15 µM no inhibió la formación de compuesto I por la reacción entre HRP 1 µM y H_2O_2 0.75 µM (no mostrado). Esto es esperado tomando en consideración la constante determinada arriba, y a que se necesitarían grandes cantidades de *Mt*AhpE (>100 veces respecto a la concentración de HRP) para inhibir la formación de compuesto I de la misma. Por lo tanto, seleccionamos otra peroxidasa, la lignina peroxidasa (LP) (E.C. 1.11.1.14) que reacciona con H_2O_2 para formar compuesto I con



una constante de velocidad menor que la HRP.

Figura 2.9. Cinética de oxidación de *Mt*AhpE mediada por H_2O_2 estudiada por competencia con LP. Cursos temporales de oxidación de la LP (5 µM) por H_2O_2 (1.0 µM) en presencia de concentraciones crecientres de *Mt*AhpE (sentido indicado por la flecha: 0, 3.3, 6.6 y 19.8 µM). La adición de concentraciones crecientes de *Mt*AhpE generaron una inhibición dosis dependiente de la formación de compuesto I de la LP (Fig. 2.9). La constante de reacción de segundo orden para la reducción de H_2O_2 por la *Mt*AhpE fue de (7 ± 3) x 10⁴ M⁻¹s⁻¹ a pH 7.4 y 25°C, en acuerdo con la determinada mediante el abordaje fluorimetrico.

Sobreoxidación de la MtAhpE mediada por H_2O_2 y determinación del pK_A del derivado sulfénico de la C_P . La cinética de sobreoxidación de la MtAhpE mediada por H_2O_2 se estudió tomando ventaja de el aumento en la fluorescencia intrínseca de la proteína que ocurre luego de la exposición a concentraciones de oxidante en exceso, como se mostró en la figura 2.1 B y 2.4 F. La adición de concentraciones crecientes de H_2O_2 (100-500 µM) causó un aumento dosis dependiente de las constantes observadas de cambio de fluorescencia intínseca de la *Mt*AhpE (1 µM), y se determinó una constante de 41 ± 1 M⁻¹s⁻¹ a pH 7.4 y 25°C (Fig. 2.10). La enzima que había sido incubada previamente con NEM (5 mM durante 30 minutos) no mostró cambios significativos en la intensidad de fluorescencia. Estos datos tomados en conjunto con el aumento en peso molecular de + 32 Da mostrado en la figura 2.4 F, confirmaron que el cambio de fluorescencia mencionado corresponde a la sobreoxidación de la cisteína peroxidática (única cisteína de esta proteína).



Figura 2.10. Cinética de sobreoxidación de la *Mt*AhpE mediada por H₂O₂.A. La *Mt*AhpE (1.0 μ M) reducida (a) o alquilada (b) se mezcló con H₂O₂ (230 μ M) en amortiguador fosfato 100 mM con 0.1 mM dtpa, a pH 7.4 y 25°C, y se registró el aumento de la fluorescencia dependiente del tiempo (λ_{ex} = 295 nm, λ_{em} = 338 nm). El trazo rojo representa el ajuste de los datos experimentales a una función exponencial simple. Inserto: Efecto de la concentración de H₂O₂ en las constantes observadas (k_{obs}) del cambio de fluorescencia. De la pendiente del gráfico se calculó una constante de reacción de 40 M⁻¹s⁻¹ a pH 7.4 y 25 °C.

Las constantes de velocidad de sobreoxidación aparentes fueron mayores a pHs alcalinos (Fig. 2.11), indicando un mecanismo de reacción donde el sulfenato reacciona con el H₂O₂. La constante de velocidad independiente de pH fue 46 M⁻¹s⁻¹, y se determinó un valor de pK_A para el derivado sulfénico del tiol peroxidático en la *Mt*AhpE de 6.6 ± 0.1, muy similar al que fue reportado previamente para el intermediario ácido sulfénico de la AhpC de *Salmonella typhimurium* AhpC, una Prx de dos cisteínas típica (*202*), pero inferior al reportado recientemente para la Prx2 (k = 1.2 x 10⁴ M⁻¹s⁻¹ (*203*)).



Figura 2.11. Determinación del pK_a del ácido sulfénico (C_P-SOH) de la *Mt*AhpE. Igual que en la figura 10 pero realizado en amortiguador fosfato de sodio a los pHs indicados. Las constantes de velocidad de segundo orden aparentes (\blacksquare) entre la enzima oxidada a sulfénico y el H₂O₂ se graficaron en función del pH y los datos fueron ajustados a la ecuación 2.4 (línea roja).

Oxidación y sobreoxidación por peróxidos derivados de ácidos grasos. Cuando se mezcló MtAhpE (2 μM) reducida con 15-HpETE en exceso, se observó una única fase de aumento de la intensidad de fluorescencia, posiblemente correpondiente a la sobreoxidación, de manera que la fase correspondiente a la sobreoxidación no se estaba observando bajo esas condiciones y sugiriendo una reacción muy rápida (registro no mostrado). Solamente cuando se mezcló la enzima con bajas concentraciones de 15-HpETE (< 3 μM) se pudo observar la disminución de la fluorescencia correspondiente a la sobreoxidaciónen nuestro equipo de flujo detenido (tiempo de mezclado menor a 2 milisegundos, Fig. 2.12 A). El ácido araquidónico no causó ningún cambio en la intensidad de fluorescencia de la *Mt*AhpE durante la misma escala temporal. Para trabajar en condiciones de pseudo-primer orden fue necesario disminuír la concentración de enzima a 0,2 μM. Las constantes de oxidación y sobreoxidación dependientes de 15-HpETE fueron (1.8 ± 0.3) x 10⁸ y (3.9 ± 0.5) x 10⁵ M⁻¹s⁻¹, respectivamente, a pH 7.4 y 25°C (Fig. 2.12 B). Dado que el grupo funcional hidroperóxido del 15-HpETE está totalmente protonado a pHs < 9, las constantes independientes de pH se calcularon de acuerdo a la Eq. 3 como 1.8 x 10⁸ y 4.5 x 10⁵ M⁻¹s⁻¹ para la oxidación y sobreoxidación de la *Mt*AhpE, respectivamente (Tabla 2.1).



Figura 2.12. Cinética de oxidación y sobroxidación de la *Mt*AhpE por 15-HpETE. A. La *Mt*AhpE reducida (2 μ M) se expuso a ácido araquidónico (2 μ M; línea a) o 15-HpETE (2 μ M; línea b) en amortiguador fosfato 100 mM con DTPA 0.1 mM, a pH 7.4 y 25 °C, se registró el cambio total de fluorescencia intrínseca de la proteína (λ ex = 295 nm). B. La *Mt*AhpE (0.2 μ M) reducida se expuso a 15-HpETE en exceso en el mismo amortiguador que en (A), y la primer fase de disminución de la intensidad de fluorescencia (correpsondiente a la oxidación, círculos), así como el aumento más lento de la fluorescencia (correspondiente a la sobreoxidación, cuadrados), ajustaron a curvas exponenciales. Las constantes observadas de oxidación y sobreoxidación se graficaron en función de la concentración de 15-HpETE para determinar las constantes de ambos procesos.

Para determinar si la reacción rápida de oxidación y sobreoxidación de la *Mt*AhpE mediada por 15-HpETE es específica o también se da para hidroperóxidos de ácidos grasos de cadena larga, estudiamos el efecto del peróxido derivado del ácido α -linolenico que se forma luego de la oxidación del ácido α -linolénico mediada por lipooxigenasa.



Figura 2.13. Cinética de oxidación y sobroxidación de **MtAhpE** la por hidroperóxido de ácido α-linolenico. (A) La MtAhpE 0.2 µM reducida (línea contínua) o previamente bloqueada con NEM (línea punteada) se expuso a hidroperóxido de ácido α-linolenico (~ 0.8 μM) en amortiguador fosfato 100 mM con DTPA 0.1 mM, a pH 7.4 y 25 °C, y se registró el cambio total de fluorescencia intrínseca de la proteína (λ_{ex} = 295 nm). Inserto: las constantes observadas de oxidación (círculos) y sobreoxidación (cuadrados) se graficaron en función de la concentración de peróxido de a-linolenico para determinar las constantes de ambos procesos.

La adición de ácido α -linolenico tratado con lipooxigenasa (conteniendo entre 0.8 y 1.2 μ M hidroperóxido de acuerdo a ensayo de FOX) a la enzima reducida (0.2 μ M) causó

una disminución rápida seguida de un aumento rápido de la fluorescencia intrínseca de la proteína (Fig. 2.13, línea contínua). Las constantes observadas para el cambio de fluorescencia fueron graficadas en función de la concentración de hidroperóxidos (Fig. 2.13, inserto), y las constantes de segundo orden para la oxidación (círculos) y sobreoxidación (cuadrados) de la enzima se calcularon como $(2.7 \pm 1) \times 10^8$ y 3.7×10^5 M⁻¹s⁻¹ a pH 7.4 y 25°C, respectivamente. No se observó ningún cambio de fluorescencia cuando el hidroperóxido fue agregado a la enzima bloqueada previamente con NEM (Fig. 2.13, línea punteada).

| Hidroperoxido | рК _{коон} | рК _{GS} | k _{ox} рН 7.4 (M ⁻¹ s ⁻¹) | k _{ox} pH ind. (M⁻¹s⁻¹) | k _{sox} рН 7.4 (M ⁻¹ s ⁻¹) | k _{sox} pH ind. (M⁻¹s⁻¹) |
|-------------------------------|--------------------|------------------|--|-------------------------------------|---|--------------------------------------|
| H ₂ O ₂ | 11.7 | 15.7 | 8.2 x 10 ⁴ | 8.2 x 10 ⁴ | 40 | 46 |
| ONOOH | 6.8 | 3.15 | 1.9 x 10 ⁷ | 9.5 x 10 ⁷ | ND | ND |
| <i>t</i> -BuOOH | 12.8 | 18 | 8.0 x 10 ³ | 8.0 x 10 ³ | 13 | 15 |
| СООН | 12.6 | 14.5 | 4.0 x 10 ⁴ | 4.0 x 10 ⁴ | 65 | 76 |
| HCO4 | >9 | 10.3 | 1.1 x 10 ⁷ | 1.1x 10 ⁷ | 2.1x 10 ³ | 2.5 x 10 ³ |
| 3-CPBA | 7.57 | 3.82 | 2.4 x 10 ⁷ | 3.9 x 10 ⁷ | 2.0 x 10 ⁵ | 3.8 x 10 ⁵ |
| 15-HpETE | >10 ^a | >10 ^a | 1.8 x 10 ⁸ | 1.8 x 10 ⁸ | 3.9 x 10⁵ | 4.1 x 10 ⁵ |

Tabla 2.1. Cinética de oxidación y sobreoxidación de la AhpE de *Mycobacterium tuberculosis* por diferentes peróxidos.

pK_{ROOH} indica el valor de pK_A del grupo funcional peróxido (ROOH). pK_{GS} indica el valor de pK_A del grupo saliente, producto formado luego de la reducción del peróxido (ROH).

^a Aunque los valores de pK_a para el grupo hidroperóxido en el 15-HpETE o el alcohol correspondiente (15-HETE) no han sido determinados, deberían ser similares a otros peróxidos y alcoholes de alquilo, y por lo tanto pueden ser asumidos como > 10.

ND es no determinado.

En negrita se destacan las constantes de oxidación y sobreoxidación para los peróxidos identificados como sustratos preferenciales de relevancia biológica.

2.5. Discusión

La oxidación de la MtAhpE recombinante ocurrió con una disminución importante de la intensidad de fluorescencia, que fue revertida por reducción con DTT (Figura 2.1 A), así como la adición de exceso de oxidante (Figura 2.1 B). Estos cambios ocurrieron cuando la enzima fue excitada a 295 nm (Figura 2.1 A y B), indicando que por lo menos uno de los tres residuos de triptofano (W 80, 95 y 144 (73)) presentes en la secuencia aminoacídica está involucrado en el proceso. Los cambios en la intensidad de fluorescencia evidenciaron cambios estructurales en la proteína bajo diferentes estados redox, lo cual causó un quenching de la fluorescencia por aminoácidos vecinos (204) aún no identificados. La MtAhpE reducida fue un monómero bajo condiciones desnaturalizantes y la forma oxidada a sulfénico formó lentamente dímeros covalentes reducibles por DTT y bmercaptoetanol, según se evidenció por electroforesis en gel de poliacrilamida. La naturaleza de ese enlace covalente necesita ser identificada dado que no se puede asumir que se trata de un enlace disulfuro, que se formaría a partir de un tiol reducido y un ácido sulfénico. En este caso la enzima tratada con concentraciones equimolares de peróxido no contiene ningún tiol reducido y por lo tanto la naturaleza de este enlace debería ser otra, presumiblemente un enlace tiosulfinato que podría formarse por la condensación de dos ácidos sulfénicos (205, 206). Sin embargo, los rendimientos de formación y relevancia biológica de este enlace estarán determinados por la competencia entre el proceso de condensación y la reacción del ácido sulfénico con los tioles proteicos y de bajo peso molecular presentes en la bacteria. En solución y condiciones no desnaturalizantes, la enzima reducida fue un dímero, lo cual está de acuerdo con la estructura cristalográfica reportada. Por otro lado, la enzima oligomerizó luego del tratamiento con H₂O₂ equimolar (Figura 2.3 A), también en concordancia con la estructura reportada para le enzima en estado sulfénico (73). La oligomerización fue revertida por el agregado de DTT. Estos cambios de estructura cuaternaria fueron lentos y por lo tanto no son los responsables de los cambios de fluorescencia observados (en el rango de milisegundos de acuerdo a los datos cinéticos: ver, por ejemplo, figura 2.7 A). Los cambios en la estructura cuaternaria no se observaron cuando la enzima fue sobreoxidada con exceso de H₂O₂, sugiriendo que la estructura de la enzima sobreoxidada es similar a la reducida, lo cual ha sido observado para peroxirredoxinas de dos cisteínas (55). La oxidación del tiol con concentraciones equimolares de peróxido formó ácido sulfénico, el cual fue atrapado con GSH y NAC formando disulfuros mixtos. (Figuras 2.4 D y F) y fue reducido por DTT (Figura 2.4 C). Esto concuerda con los datos cristalográficos que mostraron que el residuo de cisteína fue oxidado a ácido sulfénico en la forma oxidada de la enzima (73) y con nuestros resultados que mostraron que sólo una pequeña fracción de la enzima presenta dímeros covalentes luego de la oxidación (Figura 2.2).

El hecho de que las constantes de velocidad de disminución de la intensidad de la fluorescencia intrínseca de la proteína presentaron una dependencia lineal con la concentración de oxidantes

indicó que la oxidación fue limitante en el proceso global que conlleva a cambios en la intesidad de la fluorescencia (Figuras 2.5 B, 2.7 B y 2.12 B para la oxidación por peroxinitrito, H_2O_2 y 15-HpETE, respectivamente), y por lo tanto esta propiedad de la enzima puede ser utilizada para la determinación de los parámetros cinéticos. Esto fue confirmado utilizando otra aproximación basada en cinética de competencia con peroxidasa de rábano (HRP) y lignina peroxidasa (LP) que permitió determinar valores similares para la oxidación por peroxinitrito y H_2O_2 , respectivamente (Figuras 2.6 y 2.9).



Figura 2.14. Gráfico de Brønsted para la reactividad de varios peróxidos con la MtAhpE reducida y oxidada. Las constantes de velocidad independientes de pH para diferentes reacciones de oxidación (círculos) y sobreoxidación (cuadrados)de la MtAhpE se calcularon a partir de las constantes determinadas experimentalmente a pH 7.4 usando la Eq. 3. Se graficaron los logaritmos de las constantes independientes de pH en función de los valores de pKa para los ácidos conjugados de los alcóxidos fromados luego de la reducción del peróxido (pKa la forma protonada

del grupo saliente). Los peróxidos que se usaron fueron: peroxinitrito (grupo saliente anion nitrito, NO₂⁻), 3-CPBA (grupo saliente 3-clorobenzoato, 3-CIB⁻), HCO₄⁻ (grupo saliente anion carbonato, $CO_3^{2^-}$), hidroperóxido de cumeno (grupo saliente alcóxido de cumeno, CumenoO⁻), H₂O₂ (grupo saliente anion hidroxilo, OH⁻), t-BuOOH (grupo saliente tert-butilalcóxido, t-BuO⁻), AG-OOH (grupo saliente AG-OH) Las constantes de velocidad y los valores de pK_A se muestran en la Tabla 1.

Los tiolatos son especies nucleófilas durante la reducción de peróxidos y por lo tanto el pK_A del tiol puede afectar la reactividad. En el caso de la *Mt*AhpE este fue de 5.2 (Figura 2.8), siendo la primer determinación para la C_P de una peroxirredoxina de una cisteína. Un pK_A bajo indica que el tiol estaría casi totalmente deprotonado a los pHs que se espera que la enzima encuentre *in vivo*. Este valor es similar a otros reportados (<5-6.3 (*207*)), lo que es razonable tomando en cuenta una geometría del sitio activo similar (*62*).

El exceso de H_2O_2 causó una disminución rápida seguida de un aumento lento de la fluorescencia intrínseca de la *Mt*AhpE que no sucedió cuando la enzima fue alquilada previamente (Figura 2.1 B y 2.10). La constante observada para la segunda fase fue linealmente dependiente de la concentración de H_2O_2 , una vez más indicando que la reacción bimolecular fue el paso limitante

del proceso (Figura 2.10, inserto). Bajo estas condiciones se observó un incremento de 32 Da en el peso molecular de la enzima respecto a su forma reducida. (Figura 2.4 F). En conjunto estos datos indican que la sobreoxidación dependiente de H2O2 es hacia la forma sulfínico de la CP con una constante de velocidad de 40 ± 3 M⁻¹s⁻¹ a pH 7.4 y 25 °C. Este valor es muy similar al que se determinó para la inactivación de la Prx1 (57 M⁻¹s⁻¹ (55, 208)) y mucho más rápido que la velocidad reportada para la oxidación de ácido sulfénico mediada por H₂O₂ en la albúmina sérica humana o la NADH peroxidasa de estreptococo (k = $0.4 \pm 0.2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $0.14 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente (199, 209, 210)). Además, las constantes de velocidad para la oxidación del sulfénico mediada por H₂O₂ fueron más rápidas a pHs alcalinos, de acuerdo con un mecanismo donde el sulfenato es la especie reactiva, sugiriendo un ataque nucleofílico en el oxígeno peroxídico (o forma tautomérica). El perfil de pH para esta reacción nos permitió calcular el pK_A del ácido sulfénico de la enzima oxidada como 6.6 ± 0.1 (Figura 2.11), muy similar al pK_A reportado (= 6.1) para el intermediario sulfénico que se forma durante la oxidacion de la C_P de la AhpC bacteriana, una 2-Cys Prx (202). Dado que el pH intrabacterial de M.tuberculosis dentro de macrófagos tanto no activados como activados con IFN-y fue reportado como 6.8-7.5 (211), más del 95 % del tiol y 50 % del sulfénico estarían deprotonados y por lo tanto en su forma reactiva frenta a peróxidos en el estado reducido y oxidado, respectivamente.

La reducción de peróxidos por tioles se da a través de un ataque nucleofílico del tiolato a uno de los átomos de oxígeno del peróxido. Se alcanza un estado de transición donde la carga negativa del grupo nucleófilo se ditribuye entre los dos átomos de oxígeno y el sulfuro (212). Para completar la reacción, el enlace peróxido debe romperse para liberar el grupo saliente. En el caso del glutatión y el tiol libre de la albúmina, las velocidades de reacción para la oxidación del tiol son más rápidas para peróxidos cuyo grupo saliente tiene un menor pK_A (en efecto el pK_A del grupo formado luego de la reducción del peróxido)(64). A partir de las constantes de velocidad determinadas en este trabajo, y otras publicadas determinadas por Marcelo Reyes en su tesina de grado (129), se construyó un plot de Brønsted (k₂ independiente de pH vs pK_A del grupo saliente) para la reacción de la MtAhpE con diferentes peróxidos (Tabla 2.1 y Figura 2.14). En el caso de la MtAhpE, la oxidación de tioles también fue más rápida con peróxidos con grupo saliente de menor pK_A (Figura 2.14). Esto explica la velocidad de reacción tres órdenes de magnitud más lenta de la enzima con H₂O₂ comparado con el peroxinitrito (ver tabla 2.1). De la pendiente del gráfico mostrado en la figura 2.14, se obtuvo la constante nucleofílica del grupo saliente ($\beta_{Lq} = -0.27$), similar a la reportada para la oxidación de GSH mediada por peróxidos (64), indicando que las características nucleofílicas son importantes en la determinación de las constantes de reacción en la *Mt*AhpE. Es interesante notar que a pesar de tener un comportamiento similar respecto al pK_A del grupo saliente, las constantes de velocidad para la oxidación la C_P de la enzima mediada por peróxidos son entre 10³-10⁴ veces más rápidas que aquellas para la oxidación de tioles de bajo

peso molecular, como ya fue descrito para otras Prxs^{***}. Los factores proteicos responsables de aumentos en las velocidades de oxidación de la cisteína tan notables todavía son objeto de especulación, aunque probablemente la estabilización del estado de transición estaría involucrada (62). Estudios curso el laboratorio mediante abordaje conjunto en en un computacional/experimental colaborando con el grupo del Dr. Darío Estrín (UBA, Argentina) confirman esta hipótesis (Ari Zeida y colaboradores 2014, enviado a Chemical communications). En el caso del 15-HpETE, las constantes de velocidad de oxidación y sobreoxidación (Figura 2.12 y tabla 2.1) fueron mucho más rápidas que lo esperado de acuerdo a la relación de Brønsted mostrada en la figura 2.14. Aunque el pK_A del HETE u otros alcoholes derivados de ácidos grasos (AG-OH), el alcohol formado luego de la reducción (129) no ha sido reportado, debería ser similar o estar en el rango de otros alcoholes alifáticos como el t-BuOOH o el peróxido de cumeno (>10). Las reacciones determinadas en la figura 2.12 (1.8×10^8 y 3.9×10^5 M⁻¹s⁻¹ para la oxidación y sobreoxidación de la MtAhpE, respectivamente, fueron sorprendentemente rápidas. Por lo tanto, la *Mt*AhpE reaccionó con 15-HpETE (Figura 2.12) e hidroperóxidos derivados de ácido α -linolénico de forma similar a la glutatión peroxidasa de selenio presente en mamíferos, que es la enzima con actividad reductasa de peróxidos de ácidos grasos con mayor reactividad identificada hasta ahora (213). La constante de oxidación fue incluso más rápida que la oxidación de la Prx2 humana por H₂O₂ (74). En el caso de la sobreoxidación de la MtAhpE a ácido sulfínico, se han reportado reacciones de velocidad similar para la sobreoxidación de la Ohr mediada por peróxidos de ácido a-liniolénico (2 x $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (214)).

La desviación de las correlaciones esperadas con el pKA del grupo saliente son frecuentes en reducciones de peróxidos mediadas por Prxs. En el caso de la Prx 5 humana, la oxidación fue mucho más rápida con peroxinitrito que con H_2O_2 , consistente con que el primero tiene un pKA de grupo saliente menor (*60*). Sin embargo, cuando se estudió la reacción con t-BuOOH y peróxido de cumeno, éstas se desviaron ampliamente de la tendencia de reactividad. La estructura cristalográfica de la Prx 5 reducida presenta un ion bezoato asociado al sitio activo (*215*), con un lado del bolsillo del sitio activo conteniendo varios residuos hidrofóbicos, cuyas cadenas laterales están localizadas en la cercanía del anillo aromático del benzoato. Interacciones de esta tipo podrían estar contribuyendo a la reactividad alta de esta enzima con peróxidos alifáticos hidrofóbicos. En el caso de las Prxs de dos cisteínas típicas que han sido estudiadas hasta ahora, éstas reaccionan igual o más rápido con peróxido que con peroxinitrito. Los mecanismos moleculares para esta selectividad por sustrato aún no se conocen (*57, 59, 74, 75, 216*), y casi no existen datos cinéticos para la oxidación y sobreoxidación mediada por hidroperóxidos de ácidos grasos. Respecto a la MtAhpE que es una enzima dimérica no covalente en su estado reducido

^{***} En el caso de algunas Prxs, las velocidades de reacción incluso pueden ser >>10⁴ más rápidas comparadas con la oxidación de cisteína libre, como es el caso de la oxidación de la Prx2 de glóbulos rojos mediada por H₂O₂, ($k_{pHind} = 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (71) versus 18 $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ para la oxidación de cisteína (210).

(Figura 2.2, 2.3 y (73)), la estructura reportada revela un surco hidrofófico que podrían funcionar como un sitio de anclaje o posicionamiento correcto del sustrato peróxido lipídico (Figura 2.15 A). Este surco está formado por aminoácidos de las dos subunidades de la enzima: lle 113, Leu 39, Pro 38 y Ala 111 de una subunidad y Phe 94, Trp 95 y Pro 73 de la otra (Figura 2.15 B). La interacción hidrofóbica con este tipo de sustratos podría ser la base para la desviación de la tendencia mencionada. En este sentido no se espera una fuerte interacción con el sustrato, sino que podría estar funcionando un mecanismo similar al descrito para para succinil-CoA:3-cetoácido coenzima A transferasa, donde interacciones débiles del sitio activo con la cadena alifática de la coenzima A se traducen en una significativa estabilización del estado de transición, que explica la catálisis (*217, 218*).

La *Mt*AhpE pertenece a un grupo novedoso de Prxs, incluyendo AhpEs y enzimas tipo-AhpE de bacterias y archaeas. Nuestros datos son los primeros datos funcionales existentes para esta subfamilia Prxs, y proponemos un rol en la reducción de peroxinitrito y peróxidos lipídicos. En este sentido, es interesante remarcar que la AhpE fue identificada en la fracción de membrana de *M.tuberculosis* utilizando un abordaje proteómico (*109*). El ácido araquidónico libre es tóxico para *M.tuberculosis* y su toxicidad fue asociada sinérgicamente a la producción de especies reactivas del nitrógeno (*43*). El mecanismo para este sinergismo no está claro en este caso, pero el hecho de que la toxicidad dependiente de ácidos grasos aumenta en cepas de *Helicobacter pylori*



deficientes en peroxidasas indica que los peróxidos de ácidos grasos están involucrados en el proceso que lleva a la muerte de la célula (219).

Figura 2.15. Las representaciones de la MtAhpE reducida muestran un surco hidrofóbico. (A) La superficie de la MtAhpE (acceso en PDB No. 1XXU (73)) dimérica está coloreada de acuerdo al tipo de residuo (azul, básico; rojo, ácido; verde, polar; blanco nopolar). La cistína 45 (CP) se muestra en amarillo. El óvalo negro detalla el surco hidrofóbico cercano a la CP. (B) Estructura en cintas donde se detalla la CP de la subunidad A (Cys 45; 1) y los residuos no polares que forman el surco mostrado en (A): lle 113 (2), Pro 38 (3), Leu 39 (4), y Ala 111 (5) de la subunidad A (cinta plateada); Trp 95 (6), Phe 94 (7), y Pro 73 (8) de subunidad B (cintas verdes) de la enzima la homodimérica. En estos residuos, los átomos están coloreados de acuerdo a la identidad: rojo, oxígeno; azul, nitrógeno; amarillo, azufre.

CAPITULO 3

Identificación de sustratos reductores para la AhpE de *M. tuberculosis*

3.1. Resumen

En el capítulo anterior caracterizamos a la MtAhpE y establecimos al peroxinitrito y peróxidos de ácidos grasos como los sustratos oxidantes preferenciales de la enzima. En este capítulo nos detenemos en la búsqueda de sustratos reductores para la AhpE, tanto artificiales, como biológicamente relevantes, que permitan completar el ciclo catalítico. La enzima fue capaz de funcionar catalíticamente en presencia de H_2O_2 y tionitrobenzoato (TNB⁻). Identificamos a la micorredoxina 1 de *M. tuberculosis* (*Mt*Mrx1) actuando en conjunto con micotiol (MSH) y micotiol disulfuro reductasa (MR) como un sistema reductor biológicamente relevante para la MtAhpE. La *Mt*Mrx1 es una oxidorreductasa dependiente de micotiol de tipo glutarredoxina que fue capaz de reducir a la MtAhpE a través de la formación de un disulfuro intermolecular con la cisteína Nterminal de la MtMrx1 y el derivado ácido sulfénico de la C_P de la MtAhpE. Este disulfuro fue reducido por la cisteína C-terminal en la MtMrx1. En este sentido, la MtAhpE catalizó la reducción de H₂O₂ en presencia de la *Mt*Mrx1 salvaje pero no de la forma mutante en la cisteína C-terminal, confirmando un mecanismo ditiólico. La MtAhpE oxidada fue capaz de formar un disulfuro mixto con MSH, que luego fue reducido por la MtMrx1 mediante un mecanismo monotiólico. Demostramos la oxidación de NADPH dependiente de H2O2 catalizada por la MtAhpE en presencia de MR, Mrx1 y MSH. La formación del disulfuro con MSH probablemente compite con la reducción directa por MtMrx1 en un medio acuoso, donde el MSH se encuentra en concentraciones milimolares. Sin embargo, la MtAhpE se encontró asociada a la fracción de membrana, y dado que el micotiol es altamente hidrofílico, la reducción directa por la MtMrx1 podría estar favorecida. Los resultados de este capítulo permiten racionalizar el rol asignado al MSH en la reducción de peróxidos y más recientemente a la Mrx1 en sistemas celulares, demostrando la primer asociación molecular entre una peroxidasa dependiente de tioles y el sistema MSH/Mrx1 en micobacterias.

3.2. Materiales y métodos

Cinética de reacción de la MtAhpE con TNB y DTNB. Las reacciones se estudiaron en colaboración con Lucía Turell y Beatriz Alvarez (Laboratorio de Enzimología, Facultad de Ciencias, UdelaR) usando un espectrofotómetro Varian Cary 50 con un accesorio de flujo detenido (Applied Photophysics RX 2000). El tionitrobenzoato (TNB) se ha usado para cuantificar la formación de ácido sulfénico en Prxs de una cisteína (*220*) y en la albúmina de suero humano luego de la oxidación (*199*). La cinética de reducción de la *Mt*AhpE por TNB se estudió mezclando concentraciones crecientes de *Mt*AhpE reducida (0.5 - 2.5 μ M) y TNB (70 μ M) en una jeringa y H₂O₂ (20 μ M) en la otra, a pH 7.4 y 25°C, y registrando la absorbancia del TNB a 412 nm. La velocidad de oxidación de *Mt*AhpE por DTNB se determinó midiendo la velocidad inicial de la formación de TNB a partir de la reacción entre la *Mt*AhpE (6 μ M) y DTNB (100-500 μ M) a pH 7.4 y 25°C.

Purificación del micotiol (MSH). El MSH se purificó a partir de M. smegmatis en el contexto de una pasantía (EMBO Short-term Fellowships) en el laboratorio del Dr. Joris Messens (Structural biology Brussels, VUB, Bélgica) de acuerdo al protocolo publicado (221) con modificaciones menores: se realizó un precultivo pequeño de Mycobacterium smegmatis (10 - 20 mL) a partir de crioínoculos en 50 % de glicerol en medio de cultivo Middelbrook 7H9 + 0.05 % Tween80. Se dejó crecer a 37°C hasta alcanzar un cultivo denso (2 a 3 días). Con este cultivo se inoculó un precultivo grande (120 mL) en medio Middlebrook 7H9 + 0.05% Tween80 + 1% glucosa y se dejó crecer hasta alcanzar un cultivo denso (varios días). Con este precultivo se inoculó un cultivo principal (20 mL de precultivo/L de cultivo principal) en medio Middelbrook 7H9 + 0.05 % Tween80 + 1 % glucosa. Se dejó crecer a 37°C durante 7 días aproximadamente (agitación a 80 rpm) hasta alcanzar una $OD_{600} > 8$. A esta densidad el cultivo rinde cerca de 10g células/L. Se resuspendieron las células (20 mL/10 g de células) en 50 % de acetonitrilo + 25 mM ácido metanosulfónico + 5 mM EDTA. Se sonicó para homogeneizar la suspensión y las células se lisaron untilizando un cell cracker a 40000 psi. Se centrifugó el lisado celular. En el caso de aparecer un color amarronado, se filtró el sobrenadante con un diámetro de poro de 0.45 µm. El acetronitrilo se evaporó utilizando un rotavapor. De ser necesario se centrifugaron o filtraron los precipitados. Se llevó el lisado a 50 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA (utilizando stocks 1M y 100 mM, respectivamente). Se agregó DTT 1 mM y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se cargó el lisado en una columna de tiopropil sefarosa previamente equilibrada en Tris 50 mM pH 8.0, 0.5 mM EDTA a un flujo de 0.15 mL/min, registrando la absorbancia a 343 y 215 nm. Se realizó un primer lavado de la columna con Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM. Se realizó un segundo lavado con carbonato de amonio hidrogenado 50 mM a pH 8.0 (se ajusta el pH del amortiguador con NH₄OH). Se eluyó con carbonato de amonio hidrogenado 50 mM a pH 8.0, 50 mM DTT. Se recogieron las fracciones con absorbancia a 343 nm. Se realizó una extracción orgánica de la tiopiridina proveniente de la columna y el DTT usando iguales volúmenes de etil acetato en un embudo separado, hasta que el color amarillo en el etil acetato es imperceptible. Se evaporó utilizando un liofilizador. Se resuspendió en un pqueño volumen (1 mL) de agua + ácido fórmico al 0.1 % y se cargó en una columna júpiter C18 (phenomenex Jupiter C18 300A 250 x 10 mm), equilibrada en agua + 0.1 % ácido fórmico (solución A). La columna se lavó previo al equilibrado con solución B (50 % metano + 0.1 % ácido fórmico). Se registró la absorbancia a 215 nm. El micotiol oxidado eluyó a 50 % de solución B, mientras que el reducido a 0 % de B. Se liofilizó y fue enviado para analizar su pureza mediante análisis por NMR en la plataforma de NMR (Nico van Nuland) del mismo instituto .

Expresión y purificación de proteínas. La micotiol disulfuro reducatasa (MR) fue cedida por el Dr. Joris Messens (Structural Biology Brussels). La MR de *Corynebactrium glutamicum* fue más activa y estable que la de *M.tuberculosis* por lo que se usó la primera para los ensayos descritos abajo. La *Mt*Mrx1 salvaje (*Mt*Mrx1wt) y la forma mutante en cisteína (*Mt*Mrx1CXXA) se expresaron en *Escherichia coli* BL21 Star y se purificaron mediante el mismo método que para la *Mt*AhpE (ver materiales y métodos del capítulo 2) sustituyendo la etapa de diálisis por una gel filtración usando una columna Hitrap desalting. En el caso de la *Mt*Mrx1CXXA, luego de la purificación por cromatografía de unión a metales, se realizó un segundo paso de purificación mediante exclusión molecular usando una Superdex 75 10/300 previamente equilibrada en amortiguador fosfato 100 mM, DTPA 0.1 mM, pH 7.4. Tanto la *Mt*Mrx1wt como la *Mt*Mrx1CXXA se almacenaron a -20 °C con DTT 5 mM. El DTT fue removido inmediatamente antes del uso de las proteínas usando una columna Hitrap desalting.

Cuantificación de proteínas. Las concentraciónes de *Mt*AhpE, *Mt*Mrx1wt y *Mt*Mrx1CXXA se determinaron espectrofotométricamente a 280 nm, usando coeficientes de absorción molar de 23,950, 9,974 y 9,942 M⁻¹cm⁻¹, respectivamente, calculados a partir de la composición aminoacídica (<u>http://web.expasy.org/protparam/</u>). La concentración de HRP se determinó como en el capítulo 2 (*188*). La concentración de MR se determinó por la absorbancia del cofactor FAD a 463 nm (ε = 11,300 M⁻¹s⁻¹ (*222*)).

Alquilación de tioles proteicos con PEG-maleimida y análisis electroforético. Diferentes mezclas de reacción (100 µL) conteniendo *Mt*AhpE reducida y/u oxidada en presencia o ausencia de MSH, *Mt*Mrx1wt o *Mt*Mrx1CXXA a las concentraciones indicadas se precipitaron mediante el agregado de 10 µL de ácido tricloroacético (10 % (w/v)) e incubado en hielo durante 30 min. Los precipitados de proteínas se sedimentaron usando una minífuga, se lavaron con 100 µL de acetona helada, se secaron a 37 °C y fueron resuspendidos en 15 µL de PEG-maleimida 3 mM (preparado en Tris 50 mM, EDTA 10 mM, SDS 0.1 %, a pH 7.5) y se incubó a 45 °C por 45

minutos. Las muestras se cargaron inmediatamente en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 15 % sin reductor. Las proteínas se visualizaron por tinción con Coomassie Brilliant Blue.

Identificación de los productos de reacción por espectrometría de masa. El análisis por espectrometría de masa descrito a continuación fue realizado por el Dr. Didier Vertommen (Universidad Católica de Lovaina, Belgica) durante la pasantía mencionada arriba. Las muestras de proteínas se diluyeron a una concentración aproximada de 5 µM en acetonitrilo al 50%, ácido acético al 0.1% y las medidas de proteína intacta se realizaron mediante infusión directa en un espectrómetro de masa de trampa de iones (ionización por microelectrospray, LTQ XL, ThermoFisher Scientific, San José, CA). El espectrómetro de masa fue operado manualmente en modo positivo con el voltaje de fuente seteado en 3.8 kV y el tubo de transferencia de iones a 220°C. Los iones parentales se sometieron a disociación en fuente (SID) usando la mínima energía. Los espectros de masa se deconvolucionaron usando el programa ProMass Deconvolution de ThermoFisher Scientific. Para la identificación del disulfuro MtAhpE-MtMrx1CXXA, se cortó la banda del gel conteniendo el disulfuro y las proteínas se digirieron en el mismo gel con tripsina grado secuenciación (0.5 µg) toda la noche a 30°C. La reacción se detuvo agregando ácido trifluoroacético 0.1%. El espectrómetro de masa se operó en el modo dependiente de datos y cambiado automáticamente entre MS, Zoom Scan para determinación del estado de carga y MS/MS para el ion más abundante. Cada escaneo de MS se siguió por un máximo de cinco MS/MSs usando una energía de colisión de 35%. La exclusión dinámica se habilitó para analizar los péptidos co-eluyentes. Para la identificación de péptidos se generó una lista de picos usando la aplicación selectora de espectros en el programa Proteome Discoverer 1.3. Las listas de picos resultantes se analizaron usando Sequest contra una base de datos casera conteniendo las secuencias de la MtMrx1 y la MtAhpE (Uniprot Q8VJ51 y Q73YJ5). Se usaron los siguientes parámetros: la tripsina se seleccionó con clivajes luego de lisinas y argininas solamente; el número interno de cortes se seteó en 1; las tolerancias de masa para los iones precursores y fragmentos fueron 1.1 y 1.0 Da, respectivamente; y las modificaciones dinámicas consideradas fueron +15.99 Da para la metionina oxidada y +71.0 Da para la adición de acrilamida a la cisteína. Las coincidencias de péptidos se filtraron usando estado de carga versus el puntaje de correlación cruzada (Xcorr). El péptido derivado del disulfuro entre la MtMrx1 y la *Mt*AhpE se identificó usando el programa DBond y fue validado manualmente.

Determinación de la constante de velocidad para la formación de el disulfuro AhpE-micotiol (AhpE-SS-M). La cinética de reacción de la *Mt*AhpE con micotiol se determinó por un abordaje de competencia, siguiendo la sobreoxidación por H_2O_2 de la enzima oxidada (a ácido sulfénico) a ácido sulfínico en presencia y ausencia de MSH, el cual no compite con la reacción de oxidación inicial de la C_P dado que la constante de reacción con esta última es mucho mayor que la

oxidación de tioles de bajo peso molecular. La sobreoxidación de la enzima se midió como en la figura 10 del capítulo 2.

AhpE-SO⁻ + H₂O₂
$$\rightarrow$$
 AhpE-SO₂⁻ + H₂O k₁ (3.1)

 $AhpE-SO^{-} + MSH \rightarrow AhpE-SS-M + H_2O \qquad k_2$ (3.2)

La enzima reducida (2 μ M) se mezcló con H₂O₂ (150 μ M) en ausencia o presencia de MSH (11-33 μ M) causando una disminución rápida de la fluorescencia intrínseca de la proteína correspondiente a la oxidación (k = 8.2 x 10⁴ M⁻¹ s⁻¹, la vida media de la reacción bajo estas condiciones es ~ 0.06 segundos), seguido de un aumento de la fluorescencia correspondiente a la sobreoxidación (k = 40 M⁻¹ s⁻¹, vida media de la reacción 115 s), como se mostró en el capítulo 2. Las constantes observadas de aumento de la fluorescencia (k_{obs}) se determinaron ajustando los datos experimentales a exponenciales simples. En presencia de micotiol,

$$k_{obs} = k_1 \times [H_2O_2] + k_2 [MSH]$$
 (3.3)

donde k_1 es la constente de velocidad de sobreoxidación y k_2 es la constante de velocidad de segundo orden para la reacción entre la *Mt*AhpE oxidada a sulfénico y MSH. La k_2 a pH 7.4 y 25 °C se obtuvo de la pendiente del gráfico k_{obs} vs concentración de MSH, y el corte en el eje de ordenadas corresponde a $k_1 x [H_2O_2]$.

Reducción de la MtAhpE-SS-M por MtMrx1wt. La MtAhpE (20 µM) fue tratada con micotiol disulfuro (MSSM, 20 µM) u oxidada con H₂O₂ equimolar. Inmediatamente luego de la oxidación, se agregó MSH para alcanzar una concentración final de 20 µM y se incubó durante 30 minutos para formar la *Mt*AhpE-SS-M. El tiempo de incubación se seleccionó para permitir que se forme \ge 90 % de disulfuro mixto según lo calculado con el programa Gepasy 3 (*223*) y la constante de velocidad calculada abajo. Luego se agregó *Mt*Mrx1 a una de las mezclas de reacción conteniendo *Mt*AhpE-SS-M (concentraciones finales Mrx1 20 µM y *Mt*AhpE-SS-M 10 µM). Luego de 15 minutos, las muestras se precipitaron con TCA y se analizaron por alquilación con PEG-maleimida y electroforesis como descrito arriba.

Reducción de la MtAhpE-SOH por MtMrx1wt. La MtAhpE oxidada se preparó por incubación de MtAhpE (17 μ M) con una cantidad equimolar de H₂O₂ por 1 minuto. Inmediatamente luego de la oxidación, se agregó *Mt*Mrx1 reducida para alcanzar una concentración final de 16 μ M *Mt*Mrx1 y 10 μ M *Mt*AhpE. Se tomaron alícuotas (90 μ L) a diferentes tiempos de incubación (0.2, 0.5 y 4 min) y se agregaron directamente a tubos con 10 μ L de TCA 100% para detener la reacción y precipitar las proteínas. Las muestras antes de la adición de H₂O₂ (*Mt*AhpE reducida) y luego de la oxidación pero antes de la adición de *Mt*Mrx1 (*Mt*AhpE oxidada) se usaron como controles
positivos y negativos, respectivamente. Las muestras se analizaron por alquilación con PEGmaleimida y electroforesis como descrito arriba.

Reacción de la MtAhpE oxidada con el tiol nucleofílico de la MtMrx1. La *Mt*AhpE (10 μ M) en presencia o ausencia de *Mt*Mrx1wt o *Mt*Mrx1CXXA (30 μ M) se oxidó con H₂O₂ (10 μ M). Luego de 15 min, se agregó TCA y se analizaron las muestras por SDS-PAGE.

Reacción de MtAhpE-SS-M con MtMrx1wt o MtMrx1CXXA. La *Mt*AhpE (16 μ M) en ausencia o presencia de MSH (30 μ M) fue tratada con H₂O₂ (16 μ M), para formar *Mt*AhpE-SOH y *Mt*AhpE-SS-M, respectivamente. Luego de 30 minutos, se agregó *Mt*Mrx1 wt o *Mt*Mrx1CXXA (*Mt*Mrx1wt o CXXA 20 μ M y *Mt*AhpE-SOH o *Mt*AhpE-SS-M 10 μ M final). Luego de 30 minutos, se agregó NEM 10 mM y se incubó durante 15 minutos. Las muestras fueron analizadas por electroforesis.

Cinética de reacción de la MtAhpE oxidada con el tiol nucleofílico en la MtMrx1CXXA. Para determinar la constante de reacción entre la MtAhpE-SOH y la MtMrx1 CXXA, se prepararon mezclas de reacción conteniendo MtAhpE 1 µM y concentraciones crecientes de MtMrx1CXXA (10, 25 y 40 μ M) y se trataron con H₂O₂ 1 μ M. Dada la reactividad alta de la C_P de la *Mt*AhpE (8 x 10⁴ M⁻¹s⁻¹ (224)) comparada con la con la reactividad baja de los tioles en la *Mt*Mrx1 (6.6 M⁻¹s⁻¹, ver abajo), el H_2O_2 es reducido por la primera. Se tomaron alícuotas de 90 µL a diferentes tiempos y se pipetearon dentro de tubos Eppendorf con 10 µL de TCA 100 % para detener la reacción y precipitar las proteínas. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y los geles teñidos con Coomassie se escanearon en un Oddysey[®] LI-COR a 700 nm. La intensidad de la banda correspondiente al disulfuro MtAhpE-MtMrx1CXXA (identificado por espectrometría de masa, ver abajo) se normalizó contra la intensidad de la banda correpondiente a la MtMrx1CXXA, que estando en un exceso ≥10 respecto a la MtAhpE (y por lo tanto condiciones de pseudo-primer orden) no debería haber un consumo apreciable durante el ensayo. La intesidad del disulfuro relativa a la MtMrx1 total se graficó en función del tiempo, y los gráficos fueron ajustados a una función exponencial simple. La constante de segundo orden para la formación del disulfuro entre ambas proteínas se obtuvo de la pendiente del gráfico de las constantes observadas en función de la concentración de MtMrx1CXXA.

Cinética de oxidación de la MtMrx1 por H_2O_2 . La intensidad de fluorescencia de la *Mt*Mrx1 (λ_{exc} = 295 nm, λ_{em} = 335 nm) disminuyó luego de la oxidación por H₂O₂, lo cual fue totalmente reversible por DTT. Tomamos ventaja de este cambio espectral para medir la cinética de oxidación de la proteína por H₂O₂. Ls *Mt*Mrx1 reducida (10 µM) se mezcló con un exceso de H₂O₂ (0.25 – 1.0 mM) en un fluorímetro Aminco Bowman Series 2, y se registró el cambio de fluorescencia intrínseco dependiente del tiempo. Las constantes observadas para la disminución de fluorescencia (k_{obs}) se determinaron ajustando los datos experimentales a exponenciales simples. La constante de

reacción de segundo orden entre la *Mt*Mrx1 y el H_2O_2 a pH 7.4 y 25 °C se obtuvo a partir del gráfico k_{obs} versus concentración de H_2O_2 .

Consumo de H_2O_2 por la MtAhpE en presencia de MtMrx1. Se infundió H_2O_2 lentamente en soluciones de MtAhpE 2 µM con o sin MtMrx1 salvaje o CXXA reducida (50 µM) utilizando un sistema de jeringas eléctrico (Kd Scientific) con un flujo contínuo bajo agitación constante (flujo = 1 µM/min durante 15 minutos). Se tomaron alícotas de 20 µL a diferentes tiempos y se pipetearon dentro de pocillos en placa (Fisherbrand[®] flat bottom well plate, transparentes) conteniendo 180 µL de una solución de HRP 1 µM y Amplex[®]red 20 µM. La oxidación del Amplex[®]red dependiente de H_2O_2 se midió usando un lector de fluorescencia en placa Fluostar BMG Lab (λ_{ex} = 515 nm, λ_{em} = 590 nm). La concentración de H_2O_2 para cada muestra se determinó de acuerdo a una curva de calibración apropiada.

Actividad peroxidasa dependiente de NADPH en presencia de MtMrx1 y MtAhpE. La oxidación de NADPH durante la reducción de H_2O_2 mediada por *Mt*AhpE se determinó usando un ensayo acoplado. Mezclas de reacción conteniendo NADPH 100 µM, *Mt*AhpE reducida 20 µM, *Mt*Mrx1 salvaje o CXXA reducida 5 µM, se incubaron en amortiguador HEPES 50 mM, EDTA 0.5 mM, a pH 7.8 y 25 °C, seguido de la adicción secuencial de *Cg*MR 0.13 µM, MSSM 30 µM y H_2O_2 20 µM. La reducción de NADPH se siguió a 340 nm ($\epsilon_{340} = 6,220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (225)) usando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2450 termostatizado. Como controles negativos se prepararon muezclas de reacción sin *Mt*AhpE o *Mt*Mrx1.

3.3. Resultados

Consumo catalítico de H_2O_2 con tionitrobenzoato como reductor. Cuando se mezcló *Mt*AhpE reducida (2.5 µM) y TNB (70 µM) con H_2O_2 (20 µM), se observó una disminución en la concentración de TNB (Figura 3.1 A). Bajo estas condiciones experimentales y considerando la constnate de reacción detemrinada en el capítulo 2, la oxidación de la *Mt*AhpE mediada por H_2O_2 ocurre casi inmediatamente ($t_{1/2}$ = 0. 42 s). Además, la oxidación de TNB por H_2O_2 es despreciable (k = 0.45 M⁻¹s⁻¹ at pH 7.4 and 25°C, Lucía Turell y Betriz Alvarez, datos no publicados). Por lo tanto, cualquier descenso en la concentración de TNB se debería a la reacción con la enzima.





Figura 3.1. *Reducción catalítica de la MtAhpE por TNB.* **A.** La *Mt*AhpE reducida (2.5 μ M) y el TNB (70 μ M) en una jeringa se mezclaron con H₂O₂ (20 μ M) en la segunda jeringa usando un accesorio de flujo detenido. La disminución en la concentración de TNB se siguió a 412 nm (trazo negro). El trazo gris muestra el mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación 3.4. **B.** Se usaron concentraciones crecientes de *Mt*AhpE (0.5 - 2.5 μ M) y se graficaron las amplitudes (A en la ecuación 3.4) de la primer fase en función de la concentración de *Mt*AhpE. **C.** Las pendientes de la segunda (S en la ecuación 3.4) se graficaron en función de A.

Los cursos temporales de la reacción fueron bifásicos, con una disminución rápida que duró cerca de 15 s seguido por una oxidación de TNB más lenta. Los datos ajustaron a una función exponencial más una recta:

Donde A representa la amplitud, k_{obs} es la constante observada para la primer fase y S es la pendiente de la segunda fase. El decaimiento bifásico del TNB representa una cinética preestacionaria típica, donde el consumo rápido inicial de TNB por el sulfénico (estallido) se continúa con el ciclo catalítico completo de la enzima que limita la velocidad. Por lo tanto, además de reaccionar con el ácido sulfénico de la enzima para formar un disulfuro mixto, el TNB reacciona con éste último para liberar la enzima reducida que puede iniciar un nuevo ciclo catalítico de reducción de H₂O₂:

| $MtAhpE-SH + H_2O_2 \rightarrow MtAhpE-SOH + OH^-$ | (muy rápida) | (3.5) |
|---|--------------|-------|
| $MtAhpE-SOH + TNB \rightarrow MtAhpE-STNB + OH^{-}$ | (rápida) | (3.6) |
| $MtAhpE-STNB + TNB \rightarrow MtAhpE-SH + DTNB$ | (lenta) | (3.7) |

La amplitud de la fase exponencial fue proporcional a la concentración de enzima como es esperado para una cinética de estallido (Figura 3.1, B) y representó la cantidad de ácido sulfénico que pudo ser detectado a través de la formación de un disulfuro mixto en estas condiciones, 77 % de la *Mt*AhpE. La constante de reacción del TNB con el sulfénico (Eq. 3.6), se calculó dividiendo la constante observada k_{obs} por [TNB] como 1.5 ± 0.3 x 10³ M⁻¹s⁻¹. La constante de velocidad para la reacción entre el disulfuro mixto *Mt*AhpE-TNB con TNB para dar la enzima reducida y DTNB (Eq. 3.7) se estimó a partir del gráfico –(S) *versus* A (en efecto la concentración de *Mt*AhpE-STNB), dividiendo la pendiente entre la concentración de TNB, para dar un valor de 266 M⁻¹s⁻¹ (Fig. 3.1B).

Reacción de la AhpE-SOH con MSH. Cuando se incubó *Mt*AhpE reducida con PEG-maleimida en exceso y luego se analizó por SDS-PAGE, se observó un aumento en el peso molecular de la enzima de 5 kDa, de acuerdo con el agregado de una molégula de PEG por proteína y la presencia de un tiol por monómero de *Mt*AhpE. Este aumento no fue observado cuando la enzima fue previamente oxidada a ácido sulfénico por la adición de H₂O₂ equimolar, como es esperado ya que el PEG-maleimida es un reactivo específico para tioles reducidos (Fig 3.2 A). Cuando la enzima oxidada se incubó con MSH reducido, no se observó alquilación de tioles, indicando que el MSH no es capaz de reducir a la AhpE-SOH (Fig. 3.2 A). Sin embargo, sí se observó una protección de la enzima frente a la dimerización dependiente de la oxidación. Considerando que la AhpE-SOH reacciona con otros tioles de bajo peso molecular formando disulfuros mixtos (Capítulo 2, figura 2.4), hipotetizamos que la protección se debió a la formación de un disulfuro mixto con MSH de acuerdo a:

 $AhpE-SOH + MSH \rightarrow AhpE-SS-M + H_2O$ (3.8)

Estudios de espectrometría de masa permitieron demostrar la S-tiolación de la *Mt*AhpE en la cisteína 45 (Fig. 3.2 B): la masa del péptido conteniendo la cisteína Cys45 fue 484 Da mayor, consistente con la unión covalente del MSH. Luego de la fragmentación del ion precursor con una m/z de 1026.5 (z=3), se observó un pérdida neta de 180Da, correspondiente al inositol y consistente con resultados reportados previamente (*15*). El espectro LC-MS/MS también permitió localizar exactamente el disulfuro mixto entre el MSH y el residuo de cisteína.



Figura 3.2. *La MtAhpE oxidada reacciona con el MSH para formar un disulfuro mixto.* **A.** Alquilación de la *Mt*AhpE con PEG-maleimida. La *Mt*AhpE reducida u oxidada (20 μ M) se incubó con o sin MSH (200 μ M). La proteína se precipitó con TCA, se trató con PEG-maleimida (5 mM) y se evaluó en por cromatografía en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 15 %, teñido con coomassie brillant blue. **B.** Identificación de la S-micotiolación en la cisteína 45 de la *Mt*AhpE. La muestra se obtuvo agregando MSH (60 μ M) a la *Mt*AhpE oxidada (20 μ M). El espectro LC-MS/MS muestra los datos obtenidos a partir de un ion parental 3+ con una m/z = 1026.5. El espectro muestra un ion hijo predominante a una m/z = 966.4 correspondiente con la pérdida neutra de un inositol (180 Da) luego de la fragmentación del enlace C-O. Las series *y*- y *b*- de iones permitieron la localización exacta del disulfuro mixto entre el micotiol y el residuo de cisteína.

Cinética de reacción de la MtAhpE-SOH con MSH. La incubación de la *Mt*AhpE reducida con H_2O_2 en exceso causó la sobreoxidación de la enzima que fue acompañada por cambios en la fluorescencia de triptofano como fue mostrado ampliamente en el capítulo 2. Cuando la sobreoxidación se realizó en presencia de MSH en exceso, se observó una disminución de la amplitud y un aumento en la constante observada para la sobreoxidación de la *Mt*AhpE (Fig. 3.3 A). La k_{obs} del proceso fue linealmente dependiente de la concentración de MSH (Fig. 3.3 B). La pendiente de este gráfico permitió determinar una constante de velocidad de segundo orden (k₂) de 237 ± 30 M⁻¹s⁻¹ para la reacción entre la *Mt*AhpE-SOH con MSH a pH 7.4 y 25 °C. El offset del

gráfico corresponde a $k_1 \times [H_2O_2]$ y concuerda perfectamente con la constante de sobreoxidación por H_2O_2 determinada en el capítulo anterior (ver tabla 1).



Figura 3.3. *Cinética de reacción de la MtAhpE oxidada con MSH.* **A.** Disminución (oxidación) y aumento (sobreoxidación) de la fluorescencia intrínseca ($\lambda_{ex} = 295$ nm, $\lambda_{em} = 340$ nm) de la *Mt*AhpE (2 µM) en ausencia (A) o presencia (B) de MSH (18 µM) luego del agregado de H₂O₂ (150 µM) en amortiguador fosfato 100 mM con DTPA 0.1 mM. **B.** Efecto de la concentración de MSH en las constantes observadas de cambio de fluorescencia de la *Mt*AhpE causada por la sobreoxidación.

Reducción del disulfuro MtAhpE-SS-M por MtMrx1. Cuando se incubó *Mt*AhpE reducida (20 μM) con micotiol disulfuro (MSSM, 20 μM), no se vio inhibición de la alquilación por PEG-maleimida, indicando que al menos bajo esas condiciones la enzima reducida no es oxidada por el disulfuro del micotiol (Fig. 3.4). Cuando se agregó *Mt*Mrx1 al disulfuro *Mt*AhpE-SS-M preformado y, y luego se trató con PEG-maleimida, la proteína fue alquilada (Fig. 3.4), indicando que la *Mt*Mrx1 reduce el *Mt*AhpE-SS-M.



Figura 3.4. *Reducción de MtAhpE-SS-M por MtMrx1*. La *Mt*AhpE (20 μ M) reducida (carriles 1 y 2) u oxidada (carriles 3 y 4) se incubó con MSSM (carril 2) o MSH (carriles 3 y 4)(20 μ M) durante 30 minutos, seguido de la incubación sin (carril 3) or con (carril 4) *Mt*Mrx1 (20 μ M) durante 15 minutos. Las muestras se trataron con PEG-maleimida (5 mM) y se evaluaron por cromatografía en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 15 %, teñido con Coomassie brillant blue.

Reducción de MtAhpE por MtMrx1. Dado que la *Mt*Mrx1 fue capaz de reducir el disulfuro entre la *Mt*AhpE y el MSH, exploramos la capacidad de la misma en reducir la *Mt*AhpE oxidada a sulfénico. Cuando se incubó la *Mt*AhpE (10 μ M) oxidada a sulfénico con *Mt*Mrx1 (16 μ M) durante 0.2 - 4 minutos y luego se trató con PEG-maleimida, la enzima fue alquilada (Fig. 3.5), indicando que la *Mt*AhpE es reducida directamente por la *Mt*Mrx1 de acuerdo a la reacción:

AhpE-SOH + Mrx1-(SH)₂ \rightarrow AhpE-SH + Mrx1-S₂ + H₂O (3.9)

La reducción de la *Mt*AhpE dependiente de *Mt*Mrx1 se completó en un ~ 50% luego de 0.2 - 0.5 minutos, sugiriendo una reacción relativamente rápida. Es interesante notar que el agregado de *Mt*Mrx1 también inhibió parcialmente la dimerización de la *Mt*AhpE que ocurre luego de la oxidación (Fig. 3.5).



Figura 3.5. La MtAhpE es reducida por la MtMrx1 salvaje mediante un mecanismo ditiólico. La MtAhpE (10 µM) reducida (carril 1) u oxidada (carriles 2-6) incubada en ausencia (carriles 1-3) o en presencia de MtMrx1 reducida (16 µM) durante los tiempos indicados (carriles 4-6) y tratada con PEG-maleimida 5 mM se evaluó por cromatografía en gel de poliacrilamida desnaturalizandte al 15 %, teñido con coomassie brillant blue.

Reducción di versus monotiólica de la MtAhpE por MtMrx1. En la Mrx1 de C. glutamicum, solamente el residuo de cisteína N-terminal en el motivo CXXC del sitio activo fue esencial para la reducción del aducto micotiol-arsenato (*102, 226*). Sin embargo, la *Mt*Mrx con el residuo de cisteína C-terminal mutado a alanina (*Mt*Mrx1 CXXA) no fue capaz de reducir a la *Mt*AhpE. Formó un disulfuro mixto (*Mt*AhpE-*Mt*Mrx1 CXXA) reducible por β -ME (Fig. 3.6 A), indicando que ambos residuos de cisteína son esenciales para la reducción de la *Mt*AhpE en estas condiciones, de acuerdo al siguiente mecanismo:

AhpE-SOH + Mrx1-(SH)₂
$$\rightarrow$$
 AhpE-SS-Mrx1-SH + H₂O (3.10)

AhpE-SS-Mrx1-SH
$$\rightarrow$$
 AhpE-SH + Mrx1-S₂

Estudios de espectrometría de masa confirmaron la formación de este disulfuro. Al digerir las proteínas presentes en la banda correspondiente al supuesto disulfuro *Mt*AhpE-*Mt*Mrx1 CXXA mostrado en la Fig. 3.6 A se identificó un ion parental cuádruplemente cargado de [M+4H]⁴⁺ =1183.7 Da con características de fragmentación de una unión por disulfuro entre la Cys 17 de la *Mt*Mrx1 y la Cys 45 de la *Mt*AhpE, según determinado por el programa DBond (29) (Fig. 3.6 B)



Figura 3.6. *Reducción di versus monotiólica de la MtAhpE por MtMrx1.* **A.** La *Mt*AhpE reducida y oxidada sola (10 μ M), u oxidada e incubada con *Mt*Mrx1 salvaje o CXXA (30 μ M) durante 15 minutos fue evaluada por cromatografía en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 15 %, teñido con coomassie brillant blue en ausencia (carriles 1 a 4, respectivamente) o presencia (carriles 4 a 6, respectivamente) de β -ME. Una nueva banda compatible con la formación de un disulfuro mixto entre la *Mt*AhpE y la *Mt*Mrx1CXXA se indica *Mt*AhpE-SS-*Mt*Mrx1. **B.** Análisis por espectrometría de masa de el complejo *Mt*AhpE-SS-*Mt*Mrx1 mostrado en el panel A. El ion parental cuádruplemente cargado de [M+4H]⁴⁺ =1183.7 Da muestra la características de fragmentación de una unión por disulfuro entre la Cys 17 de la *Mt*Mrx1 y la Cys 45 de la *Mt*AhpE, según determinado por el programa DBond (29). *P**, una rama del dipéptido; *p**, la otra rama del dipéptido *p**. La pérdida de 34 unidades de masa atómica representan la formación de dehidroalanina a partir de la fragmentación del enlace C-S.

Como fue indicado anteriormente la *Mt*Mrx1 salvaje pudo reducir directamente a la *Mt*AhpE-SOH (Figs. 3.5 y 3.6). Sin embargo, cuando la *Mt*Mrx1CXXA fue agregada al *Mt*AhpE-SS-M previamente formado, no se formó el disulfuro AhpE-SS-Mrx1 (Fig. 3.7), indicando que la *Mt*Mrx1CXXA reaccionó con el átomo de azufre del MSH, liberando a la *Mt*AhpE reducida de acuerdo al siguiente mecanismo:

 $AhpE-SS-M + Mrx1-SH \rightarrow AhpE-SH + Mrx1-SS-M$ (3.12)

Lo que corresponde a un mecanismo de reducción monotiólico.

(3.11)



Figura 3.7. La reacción del MtAhpE-SS-M con la MtMrx1 CXXA no forma un disulfuro mixto intermolecular. La MtAhpE (10 μ M) reducida (carril 1) y oxidada (carriles 2-7) sola (carriles 2, 4 y 6), o incubada con MSH (20 μ M) durante 30 minutos (carriles 3, 5 y 7), se incubaron en ausencia (carriles 2 y 3) o presencia de MtMrx1 (20 μ M) salvaje (carriles 4 y 5) o MtMrx1 CXXA

(carriles 6 y 7) durante 15 minutos. La reacción se detuvo mediante el agregado de NEM 5 mM y las muestras fueron evaluadas por cromatografía en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 15 %, teñido con coomassie brillant blue sin reductor. Una nueva banda compatible con la formación de un disulfuro mixto entre la *Mt*AhpE y la *Mt*Mrx1CXXA se indica *Mt*AhpE-SS-*Mt*Mrx1.

*Cinética de reacción de la MtAhpE-SOH con la Mt*Mrx1CXXA. Cuando se oxidó la *Mt*AhpE a su derivado sulfénico en presencia de exceso de *Mt*Mrx1CXXA, se observó un aumento dependiente del tiempo del disulfuro entre la *Mt*AhpE y la *Mt*Mrx1CXXA (Fig. 3.8 A). Los cursos temporales del aumento del disulfuro fueron exponenciales (Fig. 3.8 B), y las constantes obervadas fueron dependientes de la concentración de *Mt*Mrx1CXXA (Fig. 3.8 C). De la pendiente del gráfico mostrado en la figura 3.8 C, se calculó una constante de velocidad de segundo orden de para la reacción entre la MtAhpE-SOH y la MtMrx1CXXA de $(1.6 \pm 0.3) \times 10^3$ M⁻¹ s⁻¹ a pH 7.4 y 25 °C.





Figura 3.8. Cinética de reacción de la MtAhpE-SOH con el tiol nucelofílico de la MtMrx1CXXA. A. La MtAhpE oxidada (1 μ M) se incubó con MtMrx1CXXA (25 μ M); se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se detuvo la reacción mediante el agregado de TCA al 10 %. Las muestras fueron evaluadas por cromatografía en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 15 %, teñido con coomassie brillant blue, sin reductor. **B.** Aumento dependiente del tiempo de la intensidad de banda relativa del disulfuro mixto mostrado en el panel A como MtAhpE-SS-MtMrx1. La MtMrx1CXXA se usó a concentraciones mayores a 10 veces de exceso y por lo tanto se mantiene contante, por lo que fue usada como control de carga de proteína. La línea contínua muestra

el mejor ajuste a una exponencial simple. **C.** Efecto de la concentración creciente de *Mt*Mrx1CXXA en la contante de velocidad observada para la formación del disulfuro mixto.

Cinética de oxidación del tiol de la MtMrx1 por H_2O_2 . Cuando se oxidó a la *Mt*Mrx1 (10 µM) con H_2O_2 1 mM, se observó una disminución dependiente del tiempo en la fluorescencia intrínseca de la proteína, que fue revertido por DTT (Fig. 3.9 A). Los cursos temporales para el cambio de fluorescencia fueron exponenciales y las constantes observadas fueron linealmente dependientes de la concentración de H_2O_2 (Fig. 3.9 B). A partir de la pendiente del gráfico, se determinó una constante de reacción para la oxidación de la *Mt*Mrx1 por H_2O_2 de (6.6 ± 0.6) $M^{-1}s^{-1}$ a pH 7.4 y 25°C.



Figura 3.9. *Cinética de oxidación del tiol de la MtMrx1 por H*₂*O*₂**. A.** Disminución dependiente del tiempo de la fluorescencia intrínseca total (λ_{ex} = 295 nm, λ_{em} = 335 nm) de la *Mt*Mrx1 (10 µM) luego de la oxidación por H₂O₂ en amortiguador fosfato 100 mM con DTPA 0.1 mM , a pH 7.4 y 25 °C. La primer flecha indica el agregado de H₂O₂ en exceso (1.5 mM) y la segunda el agregado de DTT (1.5 mM). **B.** Efecto de la concentración de H₂O₂ en las constantes observadas de cambio de fluorescencia de la *Mt*Mrx1.

Reducción de H_2O_2 *catalizada por la MtAhpE en presencia de MtMrx1*. Exploramos si la *Mt*AhpE era capaz de funcionar como una micorredoxina peroxidasa. Cuando se infundió H_2O_2 (1 µMmin⁻¹) a la *Mt*Mrx1 (50 µM) reducida, se observó un aumento de la concentración de H_2O_2 dependiente del tiempo (Fig. 3.10). Luego de 15 minutes, se acumuló H_2O_2 cerca de 14 µM, indicando que se consumió < 10% del H_2O_2 infundido. Esto es consisitente con la reactividad baja de la *Mt*Mrx1 frente al H_2O_2 (6.6 ± 0.6 M⁻¹ s⁻¹ a pH 7.4, fig. 3.9). La *Mt*AhpE reducida (2 µM) sola no puedo consumir catalíticamente el H_2O_2 . Sin embargo, cuando se infundió el mismo flujo de H_2O_2 a una mezcla de *Mt*Mrx1 y *Mt*AhpE, se observó un aumento de la concentración de peróxido mucho más lento: Luego de 15 minutos se acumuló 2.8 µM de H_2O_2 , correspondiente al consumo del 81 % del H_2O_2 infundido. Como era esperado, mientras la *Mt*AhpE consumió catalíticamente el H_2O_2 en presencia de la forma salvaje de la *Mt*Mrx1, la actividad peroxidasa se perdió cuando se usó la variante CXXA, confirmando que ambos residuos de cisteína en la *Mt*Mrx1 son esenciales para la reducción directa de la *Mt*AhpE (Fig. 3.10).



Figura 3.10. La MtAhpE cataliza la reducción de H₂O₂ en presencia de **MtMrx1.** Se infundio H_2O_2 (J = 1 μ Mmin⁻¹) mezclas de reaccion conteniendo а MtMrx1 salvaje reducida 50 μM (triangulos), *Mt*Mrx1 CXXA reducida 50 μM + MtAhpE 2 μM (circulos) o MtMrx1 salvaje reducida 50 µM + MtAhpE 2 µM (cuadrados). Se tomaron alicuotas a diferentes tiempos y se midio el H2O2 remanente usando el ensayo de oxidacion del Amplex[®]red. Los datos son el promedio de n = $3 \pm D.S$.

La MtAhpE cataliza la oxidación de NADPH dependiente de H_2O_2 . El agregado de MSSM (30 µM) a una mezcla de reacción conteniendo NADPH (120 µM), *Mt*AhpE reducida (20 µM), *Mt*Mrx1 salvaje reducida (5 µM) y *Cg*MR (0.13 µM) causó una disminución rápida de la concentración de NADPH, acoplada a la reducción de MSSM, luego de la cual la absorbancia se mantuvo constante (Fig. 3.11 A).



Figura 3.11. *Consumo de NADPH durante la reduccion de* H_2O_2 *mediada por MtAhpE.* **A.** Consumo de NADPH (100 µM) dependiente del tiempo en un ensayo acoplado conteniendo *Mt*AhpE 20 µM, *Mt*Mrx1salvaje 5 µM, *Cg*MR 0.13 µM, MSSM 30 µM y H_2O_2 20 µM en HEPES 50 mM, EDTA 0.5 mM, pH 7.8 a 25 °C. Las flechas indican el agregado de los ultimos tres componentes a la mezcla. **B.** Consumo de NADPH luego del agregado de H_2O_2 (flecha) en mezclas como en A (Mrx1 salvaje); con *Mt*Mrx1 CXXA en lugar de salvaje (Mrx1 CXXA); en ausencia de *Mt*Mrx1 (sin Mrx1) o en ausencia de *Mt*AhpE (sin AhpE). Se muestran trazos representativos que fueron repetidos en dias independientes con los mismos resultados.

La posterior adición de H_2O_2 (20 μ M) causó una aceleración del consumo de NADPH (1.6 ± 0.1 μ M/min) indicando que el sistema acoplado sustenta una actividad peroxidasa dependiente de

NADPH (Fig. 3.11 A y B). Esta aceleración no se observó en ausencia de *Mt*Mrx1 o *Mt*AhpE. Cuando se utilizó la *Mt*Mrx1 CXXA en lugar de la forma salvaje, también se observó actividad, aunque a una velocidad menor (aproximadamente un 65% respecto a la actividad en presencia de la forma salvaje)(Fig. 3.11 B).

3.4. Discusión

En este capítulo, hemos demostrado que la enzima es capaz de funcionar catalíticamente usando el tiol artificial tionitrobenzoato (TNB) como sustrato reductor (Fig. 3.1). En la búsqueda de un sustrato reductor relevante biológicamente, hemos estudiado la interacción y reacción de la enzima con el principal tiol de bajo peso molecular de *M. tuberculosis*, el MSH, y con una proteína de tipo glutarredoxina que forma parte de la via del micotiol, la Mrx1. El MSH no es capaz de reducir el derivado sulfenico de la MtAhpE, pero forma un disulfuro mixto con la enzima, el cual fue confirmado por espectrometría de masa (Fig. 3.2), con una constante de reacción de 237 M⁻¹s⁻¹ a pH 7.4 y 25°C (Fig. 3.3). La micorredoxina 1 fue capaz de reducir este disulfuro mixto formado entre la enzima y el micotiol (Fig. 3.4). El segundo motivo tiol en la MtMrx1 no fue necesario para la reducción del MtAhpE-SS-M, como indica la ausencia del aducto MtAhpE-S-S-MtMrx1 luego de la incubación con la MtMrx1CXXA (Fig. 3.7). Además, el consumo catalítico de NADPH por un ensayo acoplado compuesto por NADPH/CgMR/MSH/MtMrx1/ MtAhpE/H2O2 también fue funcional cuando se sustituyó la MtMrx1 salvaje por la mutante CXXA (Fig. 3.11 B). Estos datos son consistentes con los datos reportados para la reducción de arsenato por CqArsC1 y CqArsC2 dependiente de CgMrx1. En estas enzimas, el mecanismo de reacción propuesto involucra la formación inicial de un complejo arseno (V)-sulfuro, seguido de un ataque nucleofílico por el MSH resultando en un complejo arseno micotiol (As^(V)-MSH). La Mrx1 reacciona con éste último, liberando el As^(III) y formando un disulfuro mixto con el MSH el cual es resuelto por una segunda molécula de MSH liberando la Mrx1 y micotiol disulfuro (MSSM). Para la reducción del MtAhpE-SS-M por la MtMrx1, proponemos un mecanismo monotiólico análogo (102, 226), ilustrado en la figura 3.12.

También mostramos que la *Mt*Mrx1 es capaz de reducir a la *Mt*AhpE oxidada al derivado ácido sulfénico, mediante ensayos de alquilación de tioles (Fig. 3.5). Sin embargo, la forma mutante de la *Mt*Mrx1 donde la cisteína C-terminal fue sustituída por alanina (*Mt*Mrx1CXXA) forma un disulfuro mixto con la *Mt*AhpE oxidada, como se evidenció por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante e identificación de péptidos por espectrometría de masa (Fig. 3.6). Por lo tanto, el ácido sulfénico en la C_P de la *Mt*AhpE reacciona con el residuo de cisteína N-terminal en la *Mt*Mrx1 el cual es posteriormente reducido por el segundo motivo tiol presente en la *Mt*Mrx1, regenerando a la *Mt*AhpE reducida. En este sentido, la *Mt*AhpE (Fig. 3.10). Es importante notar que la *Mt*Mrx1 reducida causó un consumo marginal de H₂O₂ en ausencia de *Mt*AhpE, de acuerdo con reportes previos que indicaron que la *Mt*Mrx1 carece de actividad peroxidasa (*227*), y consistente con la constante de reacción con H₂O₂ determinada aquí (6.6 ± 0.6 M⁻¹ s⁻¹ a pH 7.4 y 25 °C, Fig 3.9). Este valor concuerda con el valor de pK_A bastante bajo (6.8) reportado para el tiol

de la cisteína nucleofílica (227), y constantes independientes de pH de oxidación de tioles de bajo peso molecular por H₂O₂ en el rango de 18-26 $M^{-1}s^{-1}a$ 37 °C(228).



Figura 3.12. Mecanismos propuestospara la reducción de **MtAhpE** dependiente de MSH/Mrx1. La MtAhpE es oxidada por el para formar peroxido el ácido derivado sulfénico (reacción 1). ΕI ácido sulfénico es luego reducido directamente por la MtMrx1 (reacciones 2 y 3), o a través de la formación de un disdulfuro intermedirio con micotiol (reacción 4). seguida de la reducción por la MtMrx1 (reacción 5). La Mrx1-S₂ saliente y la especie

Mrx1-SS-M son luego reducidas por MSH para formar el micotiol disulfuro (MSSM) y la *Mt*Mrx1 como fue reportado (*221, 227*). El MSSM formado es reducido por una flavoenzima dependiente de NADPH, la micotiol disulfuro reductasa (MR), como fue reportado (*222, 227*). Ambos pasos reductivos compiten con la inactivación oxidativa (sobreoxidación) a ácido sulfínico (reacción 6). El paso de abajo (reacciones 4-5) predominarían en el citosol mientras que el de arriba (reacciones 2-3) podrían estar favorecidas en compartimentos asociados a membrana dada la naturaleza altamente hidrofílica del MSH.

La mutante CXXA se usó para estimar la constante de velocidad de segundo orden entre el sulfénico de la *Mt*AhpE y la cisteína nucleofílica en la *Mt*Mrx1 como (1.6 \pm 0.3) x 10³ M⁻¹s⁻¹ a pH 7.4 (Fig. 3.8). Este valor es similar al determinado para la reacción entre el sulfénico de la MtAhpE y el tiolato aromático tionitrobenzoato ((1.5 \pm 0.3) x 10³ M⁻¹ s⁻¹ a pH 7.4, Fig. 3.1). Esta constante de velocidad es la del primer paso de la reacción de reducción de la MtAhpE (Eq. 3.10) y recae en una mutante con propiedades potencialmente alteradas. La constante obtenida usando esta mutante probablemente es una cota mínima en el paso limitante de la velocidad del proceso global, ya que los experimentos usando la MtMrx1 (16 µM) en la figura 3.5 muestra una importante fracción de la *Mt*AhpE (10 μ M) reducida (\geq 50%) en tan sólo 0.2-0.5 minutos (Fig. 3.5), lo cual es consistente con una constante de velocidad global de reducción entre ~103-104 M-1s-1 de acuerdo a simulaciones realizadas usando el programa Gepasy 3. En comparación con la reducción de otras MtPrxs por tiorredoxinas, la reducción de la MtAhpE por MtMrx-1 parece estar cerca de la reportada para la reducción de otras Prxs (MtTPx o MtAhpC) que ocurren con una constante de velocidad en el rango de 10⁴ M⁻¹s⁻¹ (97, 147). La constante de reducción de la *Mt*AhpE por *Mt*Mrx1 es ~ 10 veces más rápida que la formación del disulfuro mixto con el micotiol (Fig. 3.5). Sin embargo, la concentración de MSH está en el rango milimolar en la fracción citosólica de M.

tuberculosis (87) y por lo tanto, para compatir efectivamente con el micotiol para reaccionar con la *Mt*AhpE, la concentración de *Mt*Mrx1 (que aún no se ha determinado) debería ser \geq 50 µM. Como fue mencionado, estudios de proteómica encontraron a la MtAhpE en la fracción asociada a membrana. La reducción directa por *Mt*Mrx1 podría estar favorecida en estos compartimentos hidrofóbicos donde una molécula tan polar como el MSH tendría difícil acceso. En cualquier caso, tanto la reducción directa por la MtMrx1 y la formación del disulfuro mixto con MSH son suficientemente rápidas para competir con la sobreoxidación de la enzima mediada por H₂O₂ (contante de velocidad de 40 M⁻¹s⁻¹)(Figs. 3.3, 3.5 y 3.8). Si la inactivación oxidativa de la *Mt*AhpE puede competir con la reducción de la enzima por MSH/MtMrx1 in vivo no sólo dependerá de las constantes de reacción, sino también de las concentraciones en estado estacionario de sustratos reductores y oxidantes. La reducción de la MtAhpE por el sistema MSH/Mrx-1 condujo a la oxidación de MSH que fue reducido por la CgMR evidenciado por el consumo de NADPH observado usando un ensavo acoplado, mostrado en la figura 3.11. No se registró actividad peroxidasa dependiente de NADPH en ausencia de la MtAhpE. Tampoco en ausencia de la MtMrx1, indicando que el disulfuro mixto MtAhpE-SS-M no pudo ser reducido por MR/NADPH. Además la MtAhpE tuvo una actividad del 65% usando la MtMrx1CXXA en lugar de la MtMrx1 salvaje, indicando que en presencia de MSH la reducción de la enzima ocurre mediante un mecanismo monotiólico. Estos resultados concuerdan con la ausencia de un aducto AhpE-Mrx1CXXA en presencia de MSH (Fig. 3.7). Esta es la primer identificación de un sustrato reductor relevante biológicamente para esta peroxirredoxina de una cisteína de *M. tuberculosis* o cualquier otro miembro de la familia AhpE de Prxs. También es el primer reporte para la reducción de un disulfuro mixto entre una proteína y micotiol por la Mrx1 de micobacterias. Los datos obtenidos en este capítulo representan el primer vínculo entre el sistema de peroxidasas y la vía del MSH/micorredoxina en micobacterias. Proponemos un mecanismo de sensado y/o detoxificación de peróxidos (Fig. 3.12) donde la MtAhpE es oxidada por el peróxido para formar ácido sulfénico (Fig. 3.12, reacción 1). El ácido sulfénico luego es reducido directamente por la MtMrx1 (Fig. 3.12, reacciones 2 y 3), por un mecanismo ditiólico que involucra un intermediario MtAhpE-SS-MtMrx1. Alternativamente, un disulfuro entre la enzima y el MSH es luego reducido por MtMrx1 (Fig. 3.12, reacciones 4 y 5). En cualquier caso, los disulfuros MtMrx1-S₂ y MtMrx1-SS-M salientes son reducidos por MSH (221, 227) que es luego reciclado por la actividad micotiol disulfuro reductasa (MR) a expensas de NADPH (222). Ambas vías reductivas compiten con la sobreoxidación de la enzima a ácido sulfínico (Fig. 3.12, reacción 6). En este sentido, las glutarredoxinas de diferentes tipos celulares se han asociado a sistemas de reducción de Prxs homólogos, proponiéndose mecanismos mono- y ditiólicos (229-233).

Un trabajo reciente donde se realiza un abordaje proteómico de tioles y espectrometría de masa para identificar proteínas micotioladas en *C. glutamicum* durante estrés por incubación con NaOCI

mostró que la TPx fue una de las proteínas modificadas en sus tioles. La S-micotiolación afectó la actividad de la CgTPx que fue recuperada por incubación con CgMrx1 (234). La reducción dependiente de MSH/Mrx1 no ha sido descrita para otras Prxs de micobacterias (TPx ó AhpC) caracterizadas, donde el sistema NADPH/tiorredoxina reductasa es usado directamente para reducir diferentes isoformas de tiorredoxina, el sustrato reductor para la mayoría de las Prxs de micobacterias (97, 235). Las tiorredoxinas, triparredoxinas, así como diferentes glutarredoxinas y NrdH-redoxinas reducen muchos otros sustratos proteicos diferentes a las tiol peroxidasas, como por ejemplo a la ribonucleótido reductasa (236-238). De manera similar, proponemos que la reducción por la MtMrx1 de tioles proteicos oxidados (tanto en forma de ácido sulfénico como disulfuro mixto con el MSH) no sería un proceso específico para la MtAhpE. Estudios estructurales y funcionales futuros en el aducto MtAhpE-Mrx1 podrán ser útiles para establecer las bases de la interacción entre ambas proteínas, que podrían anticipar motivos estructurales requeridos para que opere un mecanismo de reducción ditiólico por la Mrx1. De manera similar, datos estructurales acerca del aducto MtAhpE-SSM podrían ser la base para la identificación de proteínas susceptibles a micotiolación, que al igual que la glutationilación en otras células, pordía afectar significativamente la función de la proteína.

La reducción de la *Mt*AhpE dependiente de *Mt*Mrx1 provee una explicación para la susceptibilidad al estrés oxidativo aumentada en micobacterias que carecen una Mrx1 funcional o contienen cantidades disminuídas de MSH (*93, 221, 222, 239*). Además, las Prxs y otras peroxidasas dependientes de tiol se han propuesto como mediadores fundamentales en el sensado y señalización por peróxidos (*240-242*). Estos resultados, junto con los obtenidos en el capítulo anterior que establecen al peroxinitrito y peróxidos derivados de ácidos grasos como sustratos preferenciales para la *Mt*AhpE, sugieren un posible ruta para el sensado de peróxidos en micobacterias (*94*). La importancia de esta vía metabólica *in vivo* y sus posibles consecuencias en la infectividad y patogénesis serán el tema de trabajos futuros.

Capítulo 4

Actividad citocromo c peroxidasa y localización subcelular de la ascorbato peroxidasa de *Trypanosoma cruzi*

4.1 Resumen

La ascorbato peroxidasa de Trypanosoma cruzi (TcAPx) es una hemoperoxidasa que cataliza la reducción de H₂O₂ usando ascorbato como sustrato reductor. La sobreexpresión de esta enzima en parásitos genera mayor resistencia a la adición exógena de H₂O₂. En este capítulo expresamos, purificamos y estudiamos funcionalmente la TcAPx. La constante de velocidad de oxidación de la enzima mediada por H_2O_2 fue (2.9 ± 0.5) x 10⁷ M⁻¹s⁻¹ a pH 7.4 y 25°C. Los espectros de absorción de la enzima indican que la misma no forma un compuesto I típico, sino un compuesto tipo II luego de la reacción con H₂O₂. Según datos reportados, en este tipo de hemoperoxidasas de clase I, esto es indicativo de la formación de un radical centrado en un residuo de triptofano advacente al sitio activo (posición 233 en la TcAPx), caracterísitco de las citocromo *c* peroxidasas y peroxidasas híbridas. En este sentido, demostramos que la *Tc*APx es capaz de catalizar la oxidación de citocromo c^{2+} por H₂O₂. Además, los estudios de cinética de estado estacionario mostraron una mayor eficiencia catalítica usando citocromo c^{2+} comparado con ascorbato como sustrato reductor: $(k_{cat}/K_{M} (ascorbato) = 1.7 \times 10^{4} \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}; k_{cat}/K_{M} (citc c^{2+}) = 2.1$ x 10⁵ M⁻¹s⁻¹) y un K_M para el citocromo c^{2+} (23,5 μ M) un orden de mangitud menor que el reportado para el ascorbato (> 100 µM). Aunque fue reportado que la TcAPX se localiza en el retículo endoplásmico, ensayos de lisis de parásitos controlada por digitonina y detección de proteínas por WBlot resultaron en una coelución de la TcAPx tanto con la peroxirredoxina citosólica (CPx) como con la superóxido dismutasa mitocondrial (sod A) y también se detectó en la fracción enriquecida en membrana, sugiriendo que la enzima también está presente en otros compartimentos subcelulares. Estos resultados se complementaron con estudios de microscopía confocal y electrónica de transmisión en epimastigotas y amastigotas intracelulares que indicaron que la enzima también se localiza en la mitocondria y membrana plasmática. Por lo tanto, Trypanosoma cruzi expresa una hemoperoxidasa híbrida (TcAPx-CcP) con actividad tanto ascorbato como citocromo c peroxidasa con una posible nueva función en la detoxificación de peróxidos, en particular en estadíos intracelulares de la infección.

4.2 Materiales y métodos

Expresión y purificación de proteínas. El plásmido para la expresión heteróloga de la TcAPx (pTcHis-APX (174)) fue cedido por el Dr. Shane Wilkinson (Queen Mary University, Londres). Las bacterias E. coli BL21 DE3 conteniendo el plásmido fueron crecidas a 37 °C en medio NZCYM (Sigma) con ampicilina (50 μ g/mL) y ácido δ -aminolevulínico (0.5 mM). La expresión de la *Tc*APx se indujo cuando el cultivo alcanzó una absobancia a 600 nm de 0.6 utilizando isopropil-B-Dtiogalactopiranósido (IPTG, 0.5 mM) durante 4 horas a 37 °C. La purificación se realizó a 4 °C en una columna de afinidad HiTrap (AmershamBiosciences) cargada con Ni²⁺ y equilibrada con amortiguador A (Tris 50 mM, pH 7.6, y NaCl 500 mM) conteniendo 5 mM imidazol. La columna se lavó con amortiguador A, conteniendo concentraciones escalonadas de imidazol (5, 10, 20 y 100 mM) y la TcAPx se eluyó a 500 mM imidazol. Todos los pasos de purificación se realizaron en presencia de ascorbato 100 µM. El imidazol se removió de la proteína mediante gel filtración en amortiguador fosfato (100 mM, pH 7.4) usando una columna HiTrap (Amersham Biosciences). La pureza de la TcAPx se evaluó por SDS-PAGE, y se usó el pico de Soret a 409 nm para detemrinar el contenido de hemo usando un coeficiente de absorción molar de 101 mM⁻¹cm⁻¹ (179). La mutación sitio-dirigida de la TcAPx (W233F) se realizó utilizando el kit site-directed mutagenesis kit[®] de acuerdo a las indicaciones del fabricante, usando los siguientes cebadores:

Forward 5'- GGGCTACGTGGGTCCGTTCACGCACGACAAG-3'

Reverse 5'- CTTGTCGTGCGTGAACGGACCCACGTAGCCC-3'

La mutante *Tc*APxW233F se purificó como fue descrito para la forma salvaje. Ambas proteínas se almacenaron a 4 °C en presencia de ascorbato 100 µM.

Ensayos de actividad en estado estacionario. Los ensayos de actividad de la *Tc*APx salvaje y W233F se realizaron usando ascorbato y ferricitocromo *c* (citocromo *c*²⁺) como sustratos reductores como se reportó para la APx de *Leishmania major* (*179*). Todos los ensayos se realizaron en un espectrofotómetro Cary UV–visible a temperatura ambiente en amortiguador fosfato 100 mM a pH 7.4. Para el análisis comparativo entre la enzima salvaje y la mutante W233F se ensayaron ambas actividades. Para la primera, se registró la oxidación de ascorbato a 290 nm ($\varepsilon_{290} = 2,800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) usando *Tc*APx salvaje 0.1 y 0.2 µM , *Tc*APxW233F 0.2 y 2 µM en presencia de H₂O₂ 40 µM y ascorbato 200 µM. Para la segunda, el citocromo *c* se redujo previamente mediante la adición de exceso de ditionito de sodio y se removió por gel filtración usando una columna HiTrap desalting. La concentración de citocromo *c*²⁺ se midió a 550 nm ($\varepsilon_{550} =$ of 21,000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Para el ensayo de actividad, se siguió la oxidación de citocromo *c*²⁺ a la misma longitud de onda, usando *Tc*APx salvaje 0.05 y 0.1 µM, *Tc*APxW233F 0.1 y 0.5 µM en presencia de 40 µM H₂O₂ y 50 µM citocromo *c*²⁺. Para los ensayos de inactivación, se mezcló *Tc*APx (2 µM) con H₂O₂

(8 μ M); se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se midió la actividad como se indicó anteriormente usando *Tc*APx 0.1 μ M, cit c^{2+} 50 μ M y H₂O₂ 20 μ M.

Para el análisis de cinética bisustrática en la actividad citocromo c peroxidasa, el ensayo se realizó a concentraciones crecientes de H₂O₂ (0 – 50 μ M) a cuatro concentraciones diferentes de citocromo c^{2+} (4, 10, 25, 60 μ M). Para evitar subestimaciones en la determinación de la velocidad inicial (V₀), se mezclaron rápidamente la enzima (50 nm) en una jeringa, y el citocromo *c* junto con el H₂O₂ en la otra jeringa en el espectrofotómetro de flujo detenido mencionado arriba. A partir del gráfico secundario (1/V₀ versus 1/[cit c^{2+}]) se calcularon las velocidades máximas aparentes (V_{MAX}) a cada concentración de citocromo c^{2+} . A partir de los interceptos en los ejes x e y del gráfico 1/V_{MAX} versus 1/[cit c^{2+}] se determinaron los valores de V_{MAX} y K_M (cit c^{2+}) reales, respectivamente.

Experimentos de cinética rápida. Se registraron espectros rápidos (300 – 650 nm) cada 2.5 ms de *Tc*APx (2 μ M) y H₂O₂ (2 μ M) en la otra jeringa en amortiguador fosfato 100 mM a pH 7.4 y 25 °C usando un espectrofotómetro de flujo detenido Applied Photophysics SX-20 (tiempo de mezclado \leq 1.2 ms) equipado con un arreglo de diodos de escaneo rápido. Para la determinación de la constante de velocidad de oxidación de la *Tc*APx por H₂O₂ se mezclaron la enzima (2 μ M) con H₂O₂ (0 – 12 μ M) en amortiguador fosfato 100 mM a pH 7.4 y 25 °C y se registró el cambio de absorbancia a 390 nm correspondiente a la oxidación. Los registros fueron ajustados a exponenciales dobles, y las constantes observadas de ambas fases graficaron en función de la concentración de H₂O₂. A partir de la pendiente del gráfico se determinó la constante bimolecular de reacción entre la enzima y el H₂O₂.

Estudios de EPR. Se registraron espectro de EPR de la *Tc*APx a temperatura ambiente (~25 °C) en un espectrómetro de EPR Bruker EMX. La *Tc*APx (50 μ M) se oxidó con concentración equimolar de H₂O₂. Inmediatamente luego del agregado de oxidante, la muestra se trasfirió a una celda plana de 200- μ L, y se acumularon 5 espectros de 5 minutos de registro. Las condiciones instrumentales fueron las siguientes: poder de microondas, 20 miliwats; amplitud de modulación, 1.0 G; constante de tiempo, 164 ms; ganancia, 5 x 10⁵.

Parásitos. Los epimastigotas de *T. cruzi* (CL-Brener, salvaje) se cultivaron a 28°C en medio BHI (brain heart infusion). Los parásitos sobreexpresantes de la *Tc*APX fusionada al motivo c-Myc fueron cedidos por el Dr. Shane Wilkinson (Londres) y cultivados como previamente (*169, 174*) en medio BHI conteniendo 250 μgml⁻¹ de geneticina (G418, Sigma). Estos permiten identificar la proteína mediante técnicas inmunoquímicas mediante el uso de un anticuerpo ant-cmyc monoclonal.

Metaciclogénesis in vitro de T. cruzi. Los epimastigotas se colectaron mediante centrifugación a 800 g durante 10 min a 25 °C y se lavaron tres veces in 10 mL de TAU (triatomine artificial urine)

(190 mMNaCl, 17 mMKCl, 2 mMMgCl2, 2mM CaCl2, 8 mM amortiguador fosfato de sodio (pH 6.0) y 0.035% bicarbonato de sodio) y resuspendidos a una concentración de (3–5) x 10⁸ células/mL⁻¹. Luego de la incubación a 28 °C durante 2 h, los parásitos se transfirieron y diluyeron en medio TAU3AAG (TAU tres aminoácidos mas glucosa)(TAU (pH 6.0) suplementado con 10 mM L-prolina, 50 mM L-glutamato de sodio, 2 mM L-aspartato de sodio y 10 mM glucosa) a una concentración de (3–5) x 10⁶ células ml⁻¹, seguido de la incubación por 96 h a 28 °C como fue descrito previamente (*243*). Los tripomastigotas metacíclicos se purificaron mediante incubación en suero humano normal (sin activación por calor) y las formas resistentes a complemento (CR) se usaron para los experimentos de infección celular (*176*).

Lisis de epimastigotas controlada por digitonina. Se lavaron epimastigotas CL-Brener-pTEX-APX-9E10 (1 x 10⁸ células/mL) tres veces (1 mL) en PBS pH 7.4 (del inglés phosphate-buffered saline, Dulbecco). El sedimento de parásitos se resuspendió en 1 mL de PBS conteniendo 0.1 mg/mL de digitonina y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los parásitos se centrifugaron a 800 g, el sobrenadante se tomó y guardó en hielo. El sedimento se lavó tres veces (1 mL) con PBS. La incubación con digitonina y lavado se realizó 10 veces para acumular un total de 1 mg de digitonina. Las muestras incluyendo sobrenadantes, parásitos enteros (fracción T, control positivo) y la fracción enriquecida en membranas (sedimento remanente luego de finalizado el tratamiento con digitonina, fracción P) se resuspendieron en amortiguador de muestra Laemmli (con β mercaptoetanol 5% (v/v)), sonicadas e incubadas a 100 °C durante 5 minutos.

Análisis de proteínas por SDS-PAGE y western blot. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 15%, se transfirireron a a membranas de nitrocelulosa (1 h, 1 mA/cm² de membrana) y se bloquearon en PBS con 5 % (w/v) de leche en polvo descremada durante 1 h. Luego las membranas se probaron con anticuerpo monoclonal anti-c-myc (1/500, Santa Cruz) I, y policionales anti-*Tc*APx (1/2000), anti-superóxido dismutasa mitocondrial (*Tc*SodA, (*244*)) y anti-peroxirredoxina citosólica (*Tc*CPx) (1/2000) (desarrollados en conejo por la Dra. Lucía Piacenza en nuestro laboratorio (*176*)) en PBS con detergente Tween 20 (0.1%, v/v) por 1 h. Las proteínas se revelaron usando anticuerpos secundarios anti-ratón marcados con una sonda de emisión en el infrarrojo a 680 nm (IRE-680, rojo) para el anticuerpo anti-cmyc (detectando la proteína sobreexpresada), y anti-conejo (IRE-800, verde) para los anticuerpos de nuestro laboratorio. Luego del lavado de las membranas reveladas, las proteínas inmunorreactivas se visualizaron en un sistema de detección de fluorescencia en el infrarrojo (Odyssey, LI-COR Biosciences).

Cultivo e infección de células. Se cultivaron células endoteliales de aorta bovina (BAECs) en medio M199 suplementado con 2 mM glutamina, 10 mM HEPES, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 10% suero fetal bovino a 37 °C, en atmósfera humedecida a 5%

CO₂ como fue descrito previamente (245). Las células se sembraron en frascos de cultivo (25 cm²) o portaobjetos con separadores (8 pocillos) Lab-Tek y se infectaron con tripomastigotas metacíclicos CL-Brener o pTEX-TcAPX-9E10 (relación parásito: BAECs = 5:1) durante 2 horas a 37°C. Los parásitos no internalizados se removieron mediante lavado con PBS, y las células se incubaron durante 24 horas en medio M199 a 37°C. Para la fijación de células, se agregó un volumen de paraformaldehído (4% v/v en amortiguador 100 mM, pH 7.4) igual al de medio de cultivo para llegar a una concentración final de 2 % paraformaldehído para evitar un shock osmótico. Las células se fijaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, la solución de removió y se agregó paraformaldehído al 4 % (v/v) y se incubó toda la noche a 4 °C. Luego de la fijación, las células se lavaron con PBS conteniendo 100 mM glicina y se permeabilizaron incubándolas durante 5 minutos con PBS conteniendo 0.1% (v/v) Triton X-100. Los núcleos celulares kinetoplástido del parásito se marcaron con DAPI (5 mg ml⁻¹). La APx se identificó usando anticuerpo anti-APx (1/50) o anti c-Myc (1/100). Para la microscopía confocal, se usó un anticuerpo secundario anti-conejo marcado con FITC, y las muestras fueron analizadas usando un microscopio confocal de fluorescencia (Unidad de biología celular del Instituto Pasteur Montevideo).

Microscopía inmuno-electrónica. El análisis por microscopía electrónica de trasmisión fue realizado por el Dr. Harry Heijnen (Centro de Microscopía Celular, Universidad de Utrecht, Holanda) para el marcaje con anticuerpos anti-APx y anti-MPx y por la Dra. Tecia de Carvalho (Instituto de Biofísica Calos Chagas Filho, UFRJ, Brasil) para el marcaje con el anticuerpo anticMyc. Las células fijadas previamente se lavaron en PBS-lisina para inactivar aldehídos libres, se embebieron en gelatina, se infiltraron el sacarosa 2.3 M, seguido de congelado rápido en nitrógeno líquido. Se realizaron criosecciones de 50 nm de ancho a -120 °C usando un ultramicrótomo Ultracut-S 8 (Leica Microsystems). Las secciones se colectaron en cuadrículas de carbono usando una mezcla de metilcelulosa 1.8 % y sacarosa 2.3 M, y se incubaron con los anticuerpos primarios y proteína-A gold de 10 nm. Luego del marcaje, las secciones se fijaron con 1 % glutaraldehído, tiñeron negativamente con acetato de uranilo y embebieron en metil celulosa-acetato de uranilo. Las secciones se obervaron en un microscopio electrónico JEOL 1200CX (Jeol Ltd.).

4.3 Resultados

Espectroscopía de la TcAPx. Cuando la *Tc*APx (2 μ M) se trató con una concentración equimolar de H₂O₂, la enzima no formó un compuesto I típico, sino un compuesto tipo-II, con un movimiento de la banda de Soret de 409 a 414 nm. (Fig. 4.1 A), como fue observado previamente (*174*). Esto ha sido atribuído a la formación de un radical centrado en un triptofano adyacente al sitio activo en las citocromo-c peroxidasas y en el homólogo de la *Tc*APx en *Leishmania major* (*Lm*APx)(*181*). El agregado de 5 veces de exceso de H₂O₂ no causó cambios en el espectro de la enzima comparado con el oxidado con H₂O₂ equimolar (Fig. 4.1 A).



Figura 4.1. La *TcAPx* forma un compuesto tipo-II luego de la oxidación con H_2O_2 . A. Espectro de absorción de la *TcAPx* (2 µM) antes (negro) o luego del agregado de H_2O_2 2 (azul) y 20 (rojo) µM en amortiguador fosfato 100 mM, a pH 7.4 y 25 °C. B. La *TcAPx* (2 µM) en una jeringa y H_2O_2 (20 µM) en la otra jeringa se mezclaron en un espectrofotómetro de flujo detenido Applied Photophysics SX-20 (tiempo de mezclado ≤1.2 ms) en el mismo amortiguador que en A y se registraron espectros de absorción cada 2.5 ms (rojo, negro, azul y celeste: 2,5, 5, 7,5 y 10 ms, respectivamente).

Con el fin de estudiar si el compuesto I se estaba formando pero no era detectado en estos tiempos y condiciones de reacción realizamos espectros rápidos usando un espectrofotómetro de flujo detenido con arreglo de diodos. Durante los primeros milisegundos, mientras ocurre la reacción con el H_2O_2 ($t_{1/2} \sim 2$ ms, ver determinación de constante abajo), no se observó la formación de compuesto I (Fig 4.1 B), sugiriendo una transferencia rápida de radical centrado en la profirina a un residuo amino acídico, posiblemente un residuo de triptofano, como fue descrito para la *Lm*APx (*246*):

APx-Fe^{III}...²³³Trp + H₂O₂
$$\rightarrow$$
 APx-Fe^{IV=O}-P⁺⁺...²³³Trp + H₂OComp I (BM, rápido)4.1APx-Fe^{IV=O}- P⁺⁺...²³³Trp \rightarrow APx-Fe^{IV=O}-P...²³³Trp⁺⁺Comp tipo II (IM, muy rápido)4.2APx-Fe^{IV=O}-P...²³³Trp⁺⁺ + 2R_{RED} \rightarrow APx-Fe^{III}...²³³Trp + 2R_{OX}4.3

Donde el ²³³Trp es el triptofano adyacente al sitio activo, R_{RED} y R_{OX} son el sustrato reductor reducido y oxidado saliente, respectivamente. BM e IM son reacciones bimolecular e intramolecular, respectivamente. Mediante estudios de EPR pudimos detectar una señal inmovilizada que aumentó significativamente luego de la oxidación de la enzima (50 µM) con H₂O₂ equimolar (Fig. 4.2). No fue posible atrapar este radical proteico con DMPO (5,5-dimetil-pirrolina N-óxido) o MNP (2-metil-2-nitrosopropano).



Figura 4.2. Espectros de EPR de la TcAPx. Los espectros fueron registrados antes (negro) y después (rojo) de la incubación de la enzima (50 μ M) con H₂O₂ (50 μ M) a temperatura ambiente en amortiguador fosfato 100 mM, pH 7.4 con 0.1 mM dtpa.

Actividad citocromo c peroxidasa. Tanto la

formación del compuesto tipo II y el análisis filogenético reportado (*52*) son sugerentes de que la *Tc*APx debería usar citocromo *c* reducido (cit*c*²⁺), además de ascorbato, como sustrato reductor. Cuando se agregó *Tc*APx (50 y 100 nM) a mezclas de reacción conteniendo cit*c*²⁺ (50 μ M) y H₂O₂ (20 μ M), se observó un aumento en la velocidad de oxidación de cit*c*²⁺ medida a 550 nm (Fig. 4.3). Esta velocidad fue dependiente de la concentración de enzima. En la *Lm*APx y citocromo c peroxidasa de *Saccaromices cerevisiae* se han identificado los residuos de triptofano en posición 208 y 191, respectivamente, como esenciales para la actividad con cit*c*²⁺ pero no para la actividad dependiente de ascorbato (*181*).

El homólogo a este Trp invariable conservado (*52*) en la *Tc*APx se encuentra en posición 233. Realizamos mutación sitio dirigida para sustituír este residuo de triptofano por fenilalanina (*Tc*APxW233F) para evaluar su rol en la actividad con citocromo *c*. Se eligió fenilalanina en lugar de tirosina que en el caso de la *Lm*APx, la segunda afectó la reacción con peróxido (*181*). La actividad citocromo c peroxidasa de la *Tc*APxW233F fue despreciable (Fig. 4.3), indicando que ese residuo de triptofano es esencial para la actividad citocromo *c* peroxidasa. La actividad dependiente de ascorbato se vio afectada, aunque no tan dramáticamente como la anterior (Fig. 4.3 B)(la actividad de la *Tc*APxW233F fue ~10 veces menor comparada a su contraparte salvaje). El agregado de enzima a altas concentraciones (2 μ M) necesarias para ver actividad con ascorbato en la enzima mutada, produce un incremento de la absorbancia a 290 nm.



Figura 4.3. *Actividad enzimática.* **A.** Actividad citocromo c peroxidasa. Se siguió la oxidación de citcromo c^{2^+} (50 µM) en presencia de H_2O_2 (10 µM) antes y después de la adición de 50 y 100 nM APx salvaje, o 100 y 500 nM APxW233F (triangulos abiertos, diamantes abiertos, círculos cerrados y cuadrados cerrados, respectivamente) en amortiguador fosfato 100 mM a pH 7.4 y 25 °C. **B.** Actividad ascorbato peroxidasa. Se siguió la oxidación de ascorbato (200 µM) a 290 nm en presencia de H_2O_2 (40 µM) antes y después de el agregado de 100 y 200 nM APx salvaje, o 200 nM y 2 µM APxW233F (triangulos abiertos, diamantes abiertos, círculos cerrados y cuadrados cerrados, respectivamente) en el mismo amortiguador que en A.

Análisis cinético de la actividad citocromo c peroxidasa. Para estudiar el mecanismo y determinar los parámetros cinéticos de la actividad citocromo c peroxidasa de la *Tc*APx, realizamos ensayos de actividad enzimática usando concentraciones crecientes (0 – 50 μ M) de H₂O₂ a cuatro concentraciones fijas de citocromo c²⁺ (4, 10, 25, 60 μ M). La actividad enzimática mostró una dependencia hiperbólica con la concentración de H₂O₂, en forma consistente con una cinética Michaeliana (Fig. 4.4 A).

Cinética de oxidación de la TcAPx por H_2O_2 . Cuando la *Tc*APx (2 uM) se mezcló rápidamente con H_2O_2 (8 μ M) usando un espectrofotómetro de flujo detenido (tiempo de mezclado < 1.2 ms), se observó una disminución en el tiempo de la absorbancia a 390 nm (Fig. 4.5 A). Los cursos temporales ajustaron a caídas exponenciales dobles, y las constantes observadas de ambos preocesos se graficaron en función de la concentración de H_2O_2 .





Figura 4.4. Cinética del estado estacionario de la actividad citocromo c peroxidasa de la TcAPx. A. El mismo ensayo de actividad mostrado en la figura 4.3 se realizó en presencia de TcAPx 50 nm, concentraciones crecientes de H2O2 (0- 50 µM), a cuatro concentraciones diferentes de cit c^{2+} (4, 10, 25, 60 µM; cuadrados, círculos, triangulos hacia arriba y abajo, respectivamente). Las líneas contínuas mejor ajuste de representan el los datos experimentales a una hipérbola rectangular. B, C. Gráficos secundarios de los datos en A.

El gráfico secundario 1/Vo vs 1/[H₂O₂] para las cuatro concentraciones de cit c^{2+} generó una serie de pendientes paralelas, indicando un mecanismo bisustrático ping-pong (Fig. 4.4 B) (247). A partir del intercepto en el eje *y* del gráfico mostrado en la Fig. 4.4 B, se obtuvieron los valores de velocidad máxima aparentes a cada concentración de citc c²⁺. A partir de los interceptos de los ejes *x* e *y* del gráfico mostrado en la figura 4.4 C se determinaron los valores reales de 1/K_M (cit c^{2+}) y 1/V_{MAX}, respectivamente. Los parámetros cinéticos determinados fueron: K_M (cit c^{2+}) = 23,5 µM; k_{cat} = 5,0 s⁻¹; k_{cat}/ K_M (cit c^{2+}) = 2.1 x 10⁵ M⁻¹s⁻¹.



Figura 4.5. *Cinética de oxidación de la TcAPx por H*₂*O*₂*.* **A.** La *Tc*APx (2 μ M) se mezcló con H₂O₂ (8 μ M) en amortiguador fosfato 100 mM a pH 7.4 y 25 °C y se registró el cambio de absorbancia a 390 nm. **B.** Efecto de la concentración de H₂O₂ en la constante observada de decaimiento bifásico en la absorbancia a 390 nm mostrado en A (círculos y cuadrados para la primer y segunda reacción, respectivamente). Las líneas contínuas representan el mejor ajuste lineal a los datos experimentale.

A partir de la pendiente de los gráficos mostrados en la Fig. 4.5 B, se determinaron las contantes de velocidad para la oxidación por H_2O_2 como $(2,9 \pm 0,5) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \text{ y} (5,4 \pm 0,2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para los procesos rápido y lento, respectivamente. El proceso lento podría corresponder a la reacción de una segunda molécula de H_2O_2 para dar una forma inactiva de la proteína. En este sentido, cuando la enzima (2 uM) se incubó con H_2O_2 (8 μ M), se observó una inactivación dependiente del tiempo de la enzima (Figura 4.6), concordante con datos previos de inactivación de la *Tc*APx por H_2O_2 (*174*).



Localización subelular de la TcAPx. La permeabilización de epimastigotas de *T. cruzi* (CL-BrenerpTEX-APX-9E10 (174)) controlada por digitonina (un detergente que resulta en una permeabilización gradual de las membranas celulares (*248, 249*)) y análisis de proteínas por western blot nos permitieron identificar las proteínas que fueron liberadas de diferentes compartimentos celulares (Fig. 4.7 A)(*248*). Como era esperado, la peroxirredoxina citosólica (*Tc*CPx) se detectó a bajas concentraciones de digitonina, mientras que la superóxido dismutasa A mitocondrial (*Tc*SodA) a mayores concentraciones de digitonina. Sin embargo, la *Tc*APx mostró diferentes eventos de elución, sugiriendo que la misma se encuentra en varios compartimentos subcelulares. Además, la enzima se detectó en la fracción enriquecida en membranas.



Figura 4.7. La TcAPx se localiza en diferentes compartimentos subcelulares. A. Los epimastigotas de T.cruzi se permeabilizaron con digitonina (0-1 mg) y las prorteínas liberadas de los diferentes compartimentos se analizaron por western blot usando anticuerpos para detectar la TcAPx (α -APX), TcAPx sobreexpresada fusionada al motivo c-myc (α-cMYC), superóxido dismutasa de hierro A mitocondrial (α-SodA) y la peroxirredoxina citosólica (α-CPx). Т V Р corresponden a las fracciones total y enriquecida en membrana (pellet), respectivamente. B. Microscopía inmunofluorescente confocal de Т. epimastigotas de cruzi mostrando la APx (arriba, izquiera en verde, FITC) y ADN teñido con DAPI (arriba derecha: n, núcleo; k, kinetoplástido). Abajo a la izquierda se muestra la superposición de imágenes ambas (merge). mienstras que merge' corresponde a la superposición de APx y DAPI para un solo plano focal.

De manera complementaria realizamos microscopía confocal inmunofluorescente de epimastigotas de *Tcruzi*-CL-Brenner que evidenciaron una disribución amplia, no homogénea de la enzima en el parásito, incluyendo el flagelo y la proximidad del kinetoplástido, (Fig 4.7 B). Para explorar en mayor detalle y confirmar lo observado por estas técnicas, realizamos microscopía electrónica de trasmisión por inmuno-gold en células endolteliales infectadas con *T. cruzi* (CL-Brenner). Usando el anticuerpo policional contra la *Tc*APx desarrollado por nuestro grupo (*176*).



Figura 4.8. La TcAPx se localiza en la membrana plasmática y membrana mitocondrial externa de amastigotas intracelulares. A. Vista a bajo aumento de celulas de cultivo infectadas, con abundante marcaje en la superficie celular en los amastigotas intracelulares. En el inserto se muestra el detalle de la membrana plamatica del amastigota. Β. Micrografia electronica aumento de gran mostrando la localizacion de la TcAPx en la membrana mitocondrial (puntas de flecha). C-D. Localizacion de la TcMPX dentro de la mitocondria Am, amistigota; n, nucleo de la celula infectada; k, kinetoplasto; m, mitocondria. Barras, A, 500nm; B, 250nm; C-D, 500nm; E, 200nm.

La *Tc*APx se identificó principalmente localizada en la cara externa de la membrana plasmática del parásito y en la mitocondria (Fig. 4.8 A y B, respectivamente). La localización en la mitocondria

también fue a nivel de membrana (externa), a diferencia de lo que se observa para la peroxirredoxina mitocondrial (*Tc*MPx) que se encuentra en el interior del organelo (Fig 4.8 C-E), de acuerdo a reportes previos (Wilkinson and Kelly, JBC 2010). Por otro lado, cuando se analizaron tripomastigotas sobreexrpresantes de *Tc*APx (CL-Brener-pTEX-APX-9E10) usando el anticuerpo monoclonal a-cmyc, se observaron resultados similares, con una clara localización de la enzima a nivel de membrana plasmática (Fig. 4.9).



Figura 4.9. La TcAPx se localiza en la membrana plasmática. Vista a bajo aumento de tripomastigotas de Tcruzi sobreexpresantes de la TcAPx (CL-BrenerpTEX-APX-9E10) con marcaje en la superficie celular en los amastigotas intracelulares (marcaje de la proteína sobreexpresada fusionada al motivo c-myc con anticuerpo monoclonal α -cmyc).

4.4. Discusión

En este capítulo hemos demostrado y caracterizado la actividad peroxidasa dependiente de citcromo c^{2+} de la ascorbato peroxidasa de *Trypanosoma cruzi* (*Tc*APx). Esta enzima es, por lo tanto una hemoperoxidasa híbrida (TcAPx-CcP) Estos estudios complementan los escasos datos presentes en la literatura acerca de esta enzima en el parásito: la expresión de la TcAPx-CcP fue reportada por el grupo de Shane Wilkinson, donde fue caracterizada su función ascorbato peroxidasa y se determinaron los parámetros cinéticos correspondientes (174). Posteriormente, el mismo gurpo describió la capacidad de T. cruzi para la síntesis de novo de ascorbato, lo cual toma relevancia dada la incapacidad del parásito de incorporarlo del ambiente (178). Los parásitos sobreexpresantes de TcAPx-CcP fueron más resistentes a la adición exógena de H_2O_2 . Cepas aisladas resistenes a benznidazol (uno de los fármacos de primera línea para el tratamiento de la enfermedad de chagas) presentaron niveles hasta tres veces mayores de TcAPx-CcP en comparación a sus contrapartes susceptibles a la droga. Sin embargo, no se ha observado una correlación directa entre los niveles de TcAPx-CcP y la parasitemia en modelos animales de infección por T. cruzi (176). Un estudio filogenético de hemoperoxidasas de clase I (una familia que posee como miembros a las catalasa peroxidasas, citocromo c peroxidasas, ascorbato peroxidasas y hemoperoxidasas híbridas), ha colocado a la TcAPx-CcP dentro de las peroxidasas híbridas (52) y por lo tanto serían capaces de utilizar ambos ascorbato y citocromo c como sustratos reductores. En este sentido, al realizar espectros de absorción de la TcAPx-CcP observamos que la enzima no forma un compuesto I típico, sino un compuesto tipo II luego de la oxidación por H₂O₂, característico de la formación de un radical catiónico centrado en triptofano (Trp^{*+}), y necesario para la oxidación de citocromo c²⁺. Esto ha sido ampliamente estudidado para las citocromo c peroxidasas de levadura y para la ascorbato peroxidasa de Leishmania major (LmAPx)(181, 246), un homólogo con quien comparte un 62 % de identidad y un 87 % de similitud (179). No fue posible detectar el compuesto I (con el radical centrado en la porfirina (ver reacción 4.1) realizando espectros rápidos en un espectrofotómetro de flujo detenido, por lo que se puede suponer que la transferencia del electron desde la profirina al triptofano (intramolecular) es un muy rapida en comparacion con la raccion con el H2O2. Mediante espectroscopía de resonancia paramagnética (EPR) detectamos un radical proteico luego de la oxidación de la enzima (50 µM) con H₂O₂ equimolar. Si bien no logramos atrapar el mismo con DMPO o MNP, la aparición de la señal es sugerente de la formación del radical mencionado, que ha sido detectado y caracterizado en la LmAPx. Tanto las citocromo c peroxidasas como las ascorbato peroxidasas conservan este residuo de triptofano cercano al grupo hemo (52), como se muestra en la figura 4.10. Sin embargo, las ascorbato peroxidasas poseen un sitio de unión a potasio (K⁺) que desestabiliza el radical Trp⁺⁺. En contraposición, las citocromo c peroxidasas carecen de este sitio de unión a potasio, habilitando la formación del Trp⁺⁺ estable (fig. 4.10). En el caso de la LmAPx, resultó

intrigante detectar este radical, tomando en cuenta que la estructura cristalográfica reveló la presencia de un sitio de unión a potasio. Se ha propuesto que un residuo de cisteína (C197 en la *Lm*APx) que se encuentra en contacto con el triptofano 208 y estando deprotonada (al menos parcialmente) sería un factor estabilizador para el Trp⁺⁺. De hecho, al sustituír esta cisteína se perdió significativamente la señal de EPR, casi con el mismo dramatismo que al sustituír el propio triptofano (*246*).



Figura 4.10. Estructuras del sitio activo de tres hemoperoxidasas que conservan el Trp proximal: CcP, APx y APx-CcP. El bolsillo del Trp, por debajo del grupo prostético, es particular para cada enzima. La APx-CcP posee el ión potasio (esfera celeste) que está ausente en las CcPs, y presenta un residuo de cisteína extra. Adaptado de (246).

La TcAPx-CcP posee un residuo de cisteína análogo (C222), así como un segundo en posición 119 (http://peroxibase.toulouse.inra.fr). El rol de estas cisteínas en la funcionalidad de la TcAPx-CcP serán objetivo de futuras investigaciones. En concordancia con lo mencionado, la TcAPx-*CcP* fue capaz de catalizar la oxidación de citocromo c^{2+} por H₂O₂ (Fig 4.2 A). La actividad se perdió casi completamente al sustituír el triptofano 233 for fenilalanina (TcAPx-CcPW233F, figura 4.3 A), confirmando la importancia de éste residuo en la catálisis, y sugiriendo la formación del radical Trp⁺⁺. La actividad ascorbato peroxidasa también se vio afectada pero no con tanto dramatismo como la anterior (Fig 4.3 B). Al realizar estudios de cinética de estado estacionario confirmamos un mecanismo de cinética bisustrática de tipo ping-pong (Figura 4.4). En la Tabla 4.1 se muestran los datos cinéticos deteminados en este trabajo para la TcAPx-CcP a modo de comparación con los ya reportados para la actividad con ascorbato como sustrato reductor. El K_M para el cit c2+ fue de 23,5 µM, similar al reportado para la LmAPx (17 µM (181)) y menor que el reportado para el ascorbato (192 μ M (174)). La eficiencia catalítica para el cit c²⁺ fue 2 x 10⁵ M⁻¹s⁻¹, menor al reportado para la *Lm*APx (6.5 x 10⁶ M⁻¹s⁻¹) y superior al repotado para la reducción por ascorbato (5.7 x 10⁴ M⁻¹s⁻¹). Es interesante notar que la reducción por ascorbato para la APx de arveja es muy superior a la reportada para la *TcAPx-CcP* (8 x 10⁷ M⁻¹s⁻¹ (250)), lo que indica un
pérdida en la capacidad de usar ascorbato como fuente de electrones y una ganancia en el uso de cit c²⁺, presumiblemente a través de la incorporación del tiol que estabiliza el Trp⁺⁺, ausente en las APxs de plantas.

Mediante estudios de cinética preestacionaria (Fig. 4.5) fue posible determinar la constante de reaccion de la enzima con H_2O_2 (k = 2.9 x 10⁷ M⁻¹s⁻¹), muy similar a la determinada para la *Lm*APx (k = 6.7 x 10⁷ M⁻¹s⁻¹ (*181*)) y un orden de mangitud mayor que la eficiencia catalitica reportada para la actividad con ascorbato y H_2O_2 ($k_{cat}/K_M = 3.5 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$). Se registró y midió una segunda reacción de oxidación, más lenta (~ 105 M⁻¹s⁻¹) que podría corresponder a un proceso de inactivación oxidativa de la enzima mediante la reacción con una segunda molécula de H_2O_2 . De hecho, la inactivación de la *TcAPx-CcP* dependiente de H_2O_2 ya fue reportada (*174*), y bajo las condiciones experimentales en que se determinaron los parámetros cinéticos (Fig. 4.5), se observó una inactivación similar de la enzima dependiente del tiempo (Fig. 4.6). Este proceso ha sido atribuído a una degradación del grupo hemo dependiente de H_2O_2 e irreversible por la adición de ascorbato o guaiacol (*251*). Otros blancos para el H_2O_2 en la enzima podrían ser los residuos de cisteína deprotonados, entre éstos la cisteína adyacente al triptofano 233 (Cys 222), si bien la reacción usualmente es lenta (k < 100 M⁻¹s⁻¹ (*252*)).

| K _M (H ₂ O ₂) | 3.1 µM | (174). |
|--|---|--------------|
| k_{cat}/K_{M} (H ₂ O ₂) | 3.5 x 10 ⁶ M ⁻¹ s ⁻¹ | (174). |
| k ₂ (H ₂ O ₂) | 2.9 x 10 ⁷ M ⁻¹ s ⁻¹ | Este trabajo |
| K_M (ascorbato) | 192 µM | (174). |
| K_{M} (cit c^{2+}) | 23.5 µM | Este trabajo |
| k_{cat}/K_{M} (ascorbato) | 5.7 x 10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹ | (174).* |
| k_{cat}/K_{M} (cit c ²⁺) | 2.1 x 10 ⁵ M⁻¹s⁻¹ | Este trabajo |

Tabla 4.1. Parámetros cinéticos para la TcAPx-CcP.

*Calculado a partir de los datos publicados

La localización subcelular de la TcAPx-CcP fue estudiada previamente, fue asignada en el retículo endoplásmico de epimastigotas de parásitos sobreexpresantes de APx fusionada al motivo c-myc,

que permite su marcaje específico con anticuerpos monoclonales α -cmyc (174). Realizando una lisis de los mismo parásitos contolada por digitonina, se observó que la enzima eluye de diferentes compartimentos subcelulares, coeluyendo tanto con la peroxirredoxina citosólica (TcCPx), como con la superóxido dismutasa de hierro mitocondrial A (TcSodA). La enzima también se detectó en la fracción enriquecida en membrana (Fig 4.7 A). Esto sugiere que la misma no se localiza solamente en el retículo endoplásmico. Al realizar microscopía confocal de epimastigotas CL-Brenner se observó un patrón de distribución amplio y no homogéneo, incluyendo localización de la enzima en cercanía al kinetoplástido (Figura 4.7 B). La LmAPx ha sido identificada principalmente en la mitocondria del parásito (180), principalmente en el espacio intermembrana. Esta localización es dirigida por la presencia de un motivo N-terminal (180) que también se ha identificado como un determinante en la susceptibilidad a inactivación por H₂O₂ (179). La remoción de este motivo N-terminal resultó en una distribución difusa en los parásitos y perdida de especificidad por la membrana interna a nivel de mitocondria. Un motivo similar ha sido identificado en la TcAPx-CcP (52). Con el fin de estudiar con mayor detalle la localización subcelular de la enzima, realizamos microscopía electrónica de trasmisión con detección de la APx con el anticuerpo desarrollado en nuestro laboratorio y marcaje secundario con oro coloidal en células endoteliales infectadas con T. cruzi CL-Brener. Las células fueron fijadas luego de 48 horas de infección, de manera que los amastigotas se encuentren en un estadío intracelular citosólico. La TcAPx-CcP fue principalmente localizada a nivel de la cara externa de la membrana plasmática (Fig. 4.8 A), y en la mitocondria del parásito (Fig. 4.8 B). A diferencia de lo observado para la LmAPx, y la peroxirredoxina mitocondrial (TcMPx, Fig. 4.8 C-E), la localización mitocondrial fue a nivel de la membrana externa, y no dentro del organelo. En este contexto, se abren nuevas posibilidades en cuanto al rol de la enzima en la detoxificación de peróxidos.



Figura 4.11. Mecanismo propuesto para la detoxificación de peróxidos por la TcAPx en cardiomiocitos. La infección causa la producción de H2O2 a nivel de la mitocondria como consecuencia de una perturbación del potencial de membrana con la concomitante disfunción mitocondrial. La APx presente en la membrana del parásito puede consumir el peróxido utilizando el ascorbato presente en el citosol del cardiomiocito (A). La despolarización de la membrana mitocondrial puede causar la liberación de citcromo c, el cual podría servir sustrato de la *Tc*APxCcP como para descomponer el H_2O_2 generado (B).

En modelos de infección de cardiomiocitos por *T. cruzi*, se ha visto que los mismos

producen H₂O₂ mediante un mecanismo independiente de la NADPH oxidasa o xantina oxidasa

(formación de superóxido con la concomitante dismutación a H_2O_2 (Figura 4.10). La formación de especies reactivas del oxígeno ha sido atribuída a la mitocondria, que sufre una perturbación del potencial con la concomitante disfunción mitocondrial (*253*). La TcAPxCcP podría funcionar catalíticamente usando tanto el ascorbato sintetizado de novo como el presente en el citoplasma de la célula huésped (Figura 4.10 A). La alteración en el potencial de membrana mitocondrial puede causar la liberación de citocromo *c* desde las mitocondrias de la célula huésped al citosol, iniciando un programa apoptótico de la misma (*254*). En este contexto, especulamos que el citoromo *c* liberado podría servir como sustrato de la *Tc*APxCcP (localizada en la cara externa de la membrana plasmática del amastigota intracelular) para descomponer el H₂O₂ generado por las mitocondrias de la célula de mamífero (Figura 4.10 B). El rol de la enzima en la descomposición de peróxidos en este contexto necesitan ser explorados, pero podría constituír un primer escudo frente este oxidante antes de difundir al interior del parásito donde, además de la *TcAPx-CcP*, puede ser reducido por otros blancos preferenciales como las triparredoxina y/o glutatión peroxidasas (*216, 255*).

Capítulo 5

Conclusiones generales y Perspectivas

Los resultados de esta tesis contibuyen al conocimiento de la bioquímica y biología redox de *M. tuberculosis* y *T. cruzi* en el contexto de los mecanismos de resistencia a la respuesta inmune innata de la célula huésped por parte del patógeno. Se han caracterizado funcionalmente una peroxiredoxina de *M. tuberculosis* y una hemoperoxidasa de *T. cruzi*.

El desarrollo de esta tesis permitió el acercamiento a diversas estrategias experimentales, como la expresión y purificación de proteína recombiantes, la espectroscopía de fluorescencia, abordajes cinéticos tanto en el estado preestacionario como estacionario, espectroscopía de resonancia paramagnética, espectrometría de masa, SDS-PAGE y Western blot, purificación de micotiol, mutagénesis sitio dirigida, cultivo de parásitos e infección de células y microscopía. Por otra parte, durante el desarrollo de esta tesis fue posible realizar varios trabajos en colaboración con integrantes de este y otros grupos a nivel nacional a internacional, lo que significó enfrentar diferentes desafíos e interrogantes en el área y por lo tanto fueron muy enriquecedoras. Demostramos que la AhpE de M. tuberculosis funciona como una peroxirredoxina de una cisteína, cuyos sustratos oxidantes preferenciales son el peroxinitrito y los peróxidos derivados de ácidos grasos. Utilizamos esta enzima como modelo para profundizar en los mecanismos de oxidación y sobreoxidación de tioles. Esta enzima fue además el primer miembro de la nueva subfamilia AhpE de Prxs en ser caracterizada. Hemos identificar una vía para la reducción de la enzima, demostrando la actividad catalítica utilizando micotiol y micorredoxina-1. Estos datos no sólo significan la identificación de un sustrato reductor biológicamente relevante para la enzima, sino también el primer vínculo racional entre la vía del micotiol y la detoxificación de peróxidos en micobacterias.

A partir de los datos generados en esta tesis han sugido varias preguntas, que estamos explorando actualmente. Pretendemos entender las bases moleculares para los cambios de intesidad de fluorescencia de triptofano observados en la enzima durante la oxidación y sobreoxidación del tiol peroxidático, que también han sido utilizados para la caracterización de otras peroxirredoxinas. En este sentido hemos generado mutantes que contienen sólamente un residuo de triptofano, de los tres totales presentes en la enzima salvaje en colaboración con los Dres. Luis Netto y Gisele Monteiro (Universidad de San Pablo, Brasil). Pretendemos identificar cuál es el responsable de los cambios mencionados, y cuál es el mecanismo de inactivación de la fluorescencia luego de la oxidación. En colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Darío Estrín (UBA, Argentina) y en el marco de la tesis de doctorado del Lic. Ari Zeida estamos explorando las bases estructurales para la gran reactividad de la MtAhpE frente a peróxidos de ácidos grasos, mediante un abordaje experimental y computacional. Finalmente, en cuanto a la reducción por micotiol y micorredoxina, creemos que es necesario generar nuevos datos estructurales que permitan entender en profundidad la interacción de la enzima con sus sustratos reductores, así como la interacción de la micorredoxinas con potenciales blancos proteicos. La asignación de las estructuras de los complejos MtAhpE-MSH y MtAhpe-MtMrx1 serán un punto de partida.

Hemos demostrado y caracterizado la función citocromo *c* peroxidasa de la ascorbato peroxidasa de *Trypanosoma cruzi* por lo que en futuros trabajos nos referiremos a la

misma como *Tc*APx-Ccp. En el marco de estos resultados, reexploramos la localización subcelular de la misma, identificándola asociada a la cara externa de la membrana mitocondrial externa y a la membrana plasmática de amastigotas intracelulares. Esto sugiere una función en la detoxificación de peróxidos especialemente en el estadío intracelular de la infección. En este sentido estamos comenzando a estudiar la importancia de la enzima en el éxito del parásito en infectar diferentes tipos de células huésped, fagocíticas (macrófagos) como no fagocíticas (células endoteliales y cardiomiocitos).

En suma, este trabajo de tesis permitió la identificación y caracterización de sistemas antioxidantes enzimáticos en dos patógenos intracelulares. Estos resultados contribuyen a una mayor comprensión de cómo en el curso de la interacción patógenocélula de mamífero, procesos de óxido-reducción modulan la infectividad y virulencia.

Referencias bibliográficas

- 1. Nathan, C. (2009) Taming tuberculosis: a challenge for science and society, *Cell Host Microbe 5*, 220-224.
- 2. Lawn, S. D., and Zumla, A. I. (2011) Tuberculosis, *Lancet* 378, 57-72.
- 3. Ehrt, S., and Schnappinger, D. (2009) Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses, *Cell Microbiol 11*, 1170-1178.
- 4. Meena, L. S., and Rajni. (2010) Survival mechanisms of pathogenic Mycobacterium tuberculosis H37Rv, *FEBS J* 277, 2416-2427.
- 5. Armstrong, J. A., and Hart, P. D. (1971) Response of cultured macrophages to Mycobacterium tuberculosis, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes, *J Exp Med 134*, 713-740.
- 6. MacMicking, J. D., Taylor, G. A., and McKinney, J. D. (2003) Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47, *Science 302*, 654-659.
- Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P. H., Chakraborty, P., Haddix, P. L., Collins, H. L., Fok, A. K., Allen, R. D., Gluck, S. L., Heuser, J., and Russell, D. G. (1994) Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase, *Science* 263, 678-681.
- 8. Boshoff, H. I., Reed, M. B., Barry, C. E., 3rd, and Mizrahi, V. (2003) DnaE2 polymerase contributes to in vivo survival and the emergence of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis, *Cell 113*, 183-193.
- 9. Gandotra, S., Schnappinger, D., Monteleone, M., Hillen, W., and Ehrt, S. (2007) In vivo gene silencing identifies the Mycobacterium tuberculosis proteasome as essential for the bacteria to persist in mice, *Nat Med 13*, 1515-1520.
- 10. Bedard, K., and Krause, K. H. (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology, *Physiol Rev 87*, 245-313.
- 11. Nathan, C., and Shiloh, M. U. (2000) Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens, *Proc Natl Acad Sci U S A 97*, 8841-8848.
- 12. Yang, C. T., Cambier, C. J., Davis, J. M., Hall, C. J., Crosier, P. S., and Ramakrishnan, L. (2012) Neutrophils exert protection in the early tuberculous granuloma by oxidative killing of mycobacteria phagocytosed from infected macrophages, *Cell Host Microbe* 12, 301-312.
- 13. De Souza, W. (2002) Basic cell biology of Trypanosoma cruzi, *Curr Pharm Des 8*, 269-285.
- 14. Ley, V., Andrews, N. W., Robbins, E. S., and Nussenzweig, V. (1988) Amastigotes of Trypanosoma cruzi sustain an infective cycle in mammalian cells, *J Exp Med 168*, 649-659.
- 15. Vercesi, A. E., Bernardes, C. F., Hoffmann, M. E., Gadelha, F. R., and Docampo, R. (1991) Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of Trypanosoma cruzi in situ, *J Biol Chem 266*, 14431-14434.
- 16. Boveris, A., Cadenas, E., and Stoppani, A. O. (1976) Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide, *Biochem J 156*, 435-444.
- 17. Turrens, J. F., Alexandre, A., and Lehninger, A. L. (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria, *Arch Biochem Biophys* 237, 408-414.
- 18. Denicola-Seoane, A., Rubbo, H., Prodanov, E., and Turrens, J. F. (1992) Succinate-dependent metabolism in Trypanosoma cruzi epimastigotes, *Mol Biochem Parasitol 54*, 43-50.
- Boveris, A., Sies, H., Martino, E. E., Docampo, R., Turrens, J. F., and Stoppani, A. O. (1980) Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in Trypanosoma cruzi, *Biochem J 188*, 643-648.

- 20. Ischiropoulos, H., Zhu, L., and Beckman, J. S. (1992) Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide, *Arch Biochem Biophys* 298, 446-451.
- 21. Loumaye, E., Ferrer-Sueta, G., Alvarez, B., Rees, J. F., Clippe, A., Knoops, B., Radi, R., and Trujillo, M. (2011) Kinetic studies of peroxiredoxin 6 from Arenicola marina: rapid oxidation by hydrogen peroxide and peroxynitrite but lack of reduction by hydrogen sulfide, *Arch Biochem Biophys 514*, 1-7.
- de Castro, S. L., Batista, D. G., Batista, M. M., Batista, W., Daliry, A., de Souza, E. M., Menna-Barreto, R. F., Oliveira, G. M., Salomao, K., Silva, C. F., Silva, P. B., and Soeiro Mde, N. (2011) Experimental Chemotherapy for Chagas Disease: A Morphological, Biochemical, and Proteomic Overview of Potential Trypanosoma cruzi Targets of Amidines Derivatives and Naphthoquinones, *Mol Biol Int 2011*, 306928.
- 23. Guedes, P. M., Silva, G. K., Gutierrez, F. R., and Silva, J. S. (2011) Current status of Chagas disease chemotherapy, *Expert Rev Anti Infect Ther 9*, 609-620.
- 24. Zhang, L., and Tarleton, R. L. (1999) Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease, *J Infect Dis 180*, 480-486.
- Nagajyothi, F., Machado, F. S., Burleigh, B. A., Jelicks, L. A., Scherer, P. E., Mukherjee, S., Lisanti, M. P., Weiss, L. M., Garg, N. J., and Tanowitz, H. B. (2012) Mechanisms of Trypanosoma cruzi Persistence in Chagas Disease, *Cell Microbiol*.
- 26. Babior, B. M. (1984) Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction, *Blood 64*, 959-966.
- 27. Groemping, Y., and Rittinger, K. (2005) Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective, *Biochem J 386*, 401-416.
- 28. Xie, K., Huang, S., Dong, Z., and Fidler, I. (1993) Cytokine-induced apoptosis in transformed murine fibroblasts involves synthesis of endogenous nitric-oxide, *Int J Oncol 3*, 1043-1048.
- 29. Martin, E., Nathan, C., and Xie, Q. W. (1994) Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase, *J Exp Med 180*, 977-984.
- De Groote, M. A., Ochsner, U. A., Shiloh, M. U., Nathan, C., McCord, J. M., Dinauer, M. C., Libby, S. J., Vazquez-Torres, A., Xu, Y., and Fang, F. C. (1997) Periplasmic superoxide dismutase protects Salmonella from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13997-14001.
- 31. Alvarez, M. N., Peluffo, G., Piacenza, L., and Radi, R. (2011) Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized Trypanosoma cruzi: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity, *J Biol Chem* 286, 6627-6640.
- 32. Ferrer-Sueta, G., and Radi, R. (2009) Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals, *ACS Chem Biol 4*, 161-177.
- 33. Goldstein, S., and Czapski, G. (1995) The reaction of NO. with O2.- and HO2.: a pulse radiolysis study, *Free Radic Biol Med 19*, 505-510.
- 34. Kissner, R., Nauser, T., Bugnon, P., Lye, P. G., and Koppenol, W. H. (1997) Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis, *Chem Res Toxicol 10*, 1285-1292.
- 35. Pryor, W. A., and Squadrito, G. L. (1995) The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide, *Am J Physiol 268*, L699-722.
- Bonini, M. G., Radi, R., Ferrer-Sueta, G., Ferreira, A. M., and Augusto, O. (1999) Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide, *J Biol Chem* 274, 10802-10806.

- 37. Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996) Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations, *Arch Biochem Biophys* 333, 49-58.
- 38. Lymar, S. V., and Hurst, J. K. (1995) Role of compartmentation in promoting toxicity of leukocyte-generated strong oxidants, *Chem Res Toxicol 8*, 833-840.
- 39. Prutz, W. A., Monig, H., Butler, J., and Land, E. J. (1985) Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: oxidation of tyrosine units in peptides and proteins, *Arch Biochem Biophys* 243, 125-134.
- 40. Sevanian, A., Muakkassah-Kelly, S. F., and Montestruque, S. (1983) The influence of phospholipase A2 and glutathione peroxidase on the elimination of membrane lipid peroxides, *Arch Biochem Biophys* 223, 441-452.
- 41. Hugo, M., Radi, R., and Trujillo, M., (Ed.) (2012) *Thiol dependent peroxidases in Mycobacterium tuberculosis*, InTech.
- 42. Bonney, R. J., Opas, E. E., and Humes, J. L. (1985) Lipoxygenase pathways of macrophages, *Fed Proc 44*, 2933-2936.
- 43. Akaki, T., Tomioka, H., Shimizu, T., Dekio, S., and Sato, K. (2000) Comparative roles of free fatty acids with reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates in expression of the anti-microbial activity of macrophages against Mycobacterium tuberculosis, *Clin Exp Immunol 121*, 302-310.
- 44. Wang, G., Hong, Y., Johnson, M. K., and Maier, R. J. (2006) Lipid peroxidation as a source of oxidative damage in Helicobacter pylori: protective roles of peroxiredoxins, *Biochim Biophys Acta 1760*, 1596-1603.
- 45. Clifford, D. P., and Repine, J. E. (1982) Hydrogen peroxide mediated killing of bacteria, *Mol Cell Biochem* 49, 143-149.
- 46. Denicola, A., Rubbo, H., Rodriguez, D., and Radi, R. (1993) Peroxynitritemediated cytotoxicity to Trypanosoma cruzi, *Arch Biochem Biophys 304*, 279-286.
- 47. Evans, M. V., Turton, H. E., Grant, C. M., and Dawes, I. W. (1998) Toxicity of linoleic acid hydroperoxide to Saccharomyces cerevisiae: involvement of a respiration-related process for maximal sensitivity and adaptive response, *J Bacteriol 180*, 483-490.
- 48. Hurst, J. K., and Lymar, S. V. (1997) Toxicity of peroxynitrite and related reactive nitrogen species toward Escherichia coli, *Chem Res Toxicol 10*, 802-810.
- 49. Thomson, L., Gadelha, F. R., Peluffo, G., Vercesi, A. E., and Radi, R. (1999) Peroxynitrite affects Ca2+ transport in Trypanosoma cruzi, *Mol Biochem Parasitol 98*, 81-91.
- 50. Fridovich, I. (1989) Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas, *J Biol Chem 264*, 7761-7764.
- 51. Geller, B. L., and Winge, D. R. (1982) Rat liver Cu,Zn-superoxide dismutase. Subcellular location in lysosomes, *J Biol Chem* 257, 8945-8952.
- 52. Zamocky, M., Furtmuller, P. G., and Obinger, C. (2010) Evolution of structure and function of Class I peroxidases, *Arch Biochem Biophys 500*, 45-57.
- 53. Flohe, L., Jaeger, T., Pilawa, S., and Sztajer, H. (2003) Thiol-dependent peroxidases care little about homology-based assignments of function, *Redox Rep 8*, 256-264.
- 54. Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., Thomson, L., Flohe, L., and Radi, R. (2007) Kinetics of peroxiredoxins and their role in the decomposition of peroxynitrite, *Subcell Biochem* 44, 83-113.
- 55. Wood, Z. A., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2003) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling, *Science 300*, 650-653.
- 56. Poole, L. B. (2007) The catalytic mechanism of peroxiredoxins, *Subcell Biochem 44*, 61-81.

- 57. Bryk, R., Griffin, P., and Nathan, C. (2000) Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins, *Nature 407*, 211-215.
- 58. Nelson, K. J., Parsonage, D., Hall, A., Karplus, P. A., and Poole, L. B. (2008) Cysteine pK(a) values for the bacterial peroxiredoxin AhpC, *Biochemistry* 47, 12860-12868.
- 59. Ogusucu, R., Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L. E., and Augusto, O. (2007) Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics, *Free Radic Biol Med*, pp 326-334.
- 60. Trujillo, M., Clippe, A., Manta, B., Ferrer-Sueta, G., Smeets, A., Declercq, J. P., Knoops, B., and Radi, R. (2007) Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation, *Arch Biochem Biophys 467*, 95-106.
- 61. Ferrer-Sueta, G., Manta, B., Botti, H., Radi, R., Trujillo, M., and Denicola, A. (2011) Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction, *Chem Res Toxicol 24*, 434-450.
- 62. Hall, A., Parsonage, D., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2010) Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on transition-state stabilization, *J Mol Biol 402*, 194-209.
- 63. Flohe, L., Toppo, S., Cozza, G., and Ursini, F. (2011) A comparison of thiol peroxidase mechanisms, *Antioxid Redox Signal 15*, 763-780.
- 64. Trindade, D. F., Cerchiaro, G., and Augusto, O. (2006) A role for peroxymonocarbonate in the stimulation of biothiol peroxidation by the bicarbonate/carbon dioxide pair, *Chem Res Toxicol 19*, 1475-1482.
- 65. Chae, H. Z., Chung, S. J., and Rhee, S. G. (1994) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast, *J Biol Chem* 269, 27670-27678.
- 66. Hofmann, B., Hecht, H. J., and Flohe, L. (2002) Peroxiredoxins, *Biol Chem* 383, 347-364.
- 67. Brigelius-Flohe, R., and Flohe, L. (2011) Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors, *Antioxid Redox Signal 15*, 2335-2381.
- 68. Hall, A., Karplus, P. A., and Poole, L. B. (2009) Typical 2-Cys peroxiredoxins-structures, mechanisms and functions, *FEBS J 276*, 2469-2477.
- 69. Rhee, S. G., Chae, H. Z., and Kim, K. (2005) Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling, *Free Radic Biol Med 38*, 1543-1552.
- 70. Rhee, S. G., and Woo, H. A. (2011) Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H(2)O(2), and protein chaperones, *Antioxid Redox Signal 15*, 781-794.
- Nelson, K. J., Knutson, S. T., Soito, L., Klomsiri, C., Poole, L. B., and Fetrow, J. S. (2011) Analysis of the peroxiredoxin family: using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis, *Proteins* 79, 947-964.
- 72. Soito, L., Williamson, C., Knutson, S. T., Fetrow, J. S., Poole, L. B., and Nelson, K. J. (2011) PREX: PeroxiRedoxin classification indEX, a database of subfamily assignments across the diverse peroxiredoxin family, *Nucleic Acids Res 39*, D332-337.
- 73. Li, S., Peterson, N. A., Kim, M. Y., Kim, C. Y., Hung, L. W., Yu, M., Lekin, T., Segelke, B. W., Lott, J. S., and Baker, E. N. (2005) Crystal Structure of AhpE from Mycobacterium tuberculosis, a 1-Cys peroxiredoxin, *J Mol Biol 346*, 1035-1046.
- 74. Manta, B., Hugo, M., Ortiz, C., Ferrer-Sueta, G., Trujillo, M., and Denicola, A. (2009) The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2, *Arch Biochem Biophys* 484, 146-154.

- 75. Parsonage, D., Karplus, P. A., and Poole, L. B. (2008) Substrate specificity and redox potential of AhpC, a bacterial peroxiredoxin, *Proc Natl Acad Sci U S A 105*, 8209-8214.
- Sohling, B., Parther, T., Rucknagel, K. P., Wagner, M. A., and Andreesen, J. R. (2001) A selenocysteine-containing peroxiredoxin from the strictly anaerobic organism Eubacterium acidaminophilum, *Biol Chem* 382, 979-986.
- 77. Chang, T. S., Jeong, W., Choi, S. Y., Yu, S., Kang, S. W., and Rhee, S. G. (2002) Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation, *J Biol Chem* 277, 25370-25376.
- 78. Woo, H. A., Yim, S. H., Shin, D. H., Kang, D., Yu, D. Y., and Rhee, S. G. (2010) Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H(2)O(2) accumulation for cell signaling, *Cell 140*, 517-528.
- Parmigiani, R. B., Xu, W. S., Venta-Perez, G., Erdjument-Bromage, H., Yaneva, M., Tempst, P., and Marks, P. A. (2008) HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation, *Proc Natl Acad Sci U S A 105*, 9633-9638.
- Randall, L. M., Manta, B., Hugo, M., Gil, M., Batthyany, C., Trujillo, M., Poole, L. B., and Denicola, A. (2014) Nitration transforms a sensitive peroxiredoxin 2 into a more active and robust peroxidase, *J Biol Chem 289*, 15536-15543.
- 81. Yang, K. S., Kang, S. W., Woo, H. A., Hwang, S. C., Chae, H. Z., Kim, K., and Rhee, S. G. (2002) Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid, *J Biol Chem* 277, 38029-38036.
- Pascual, M. B., Mata-Cabana, A., Florencio, F. J., Lindahl, M., and Cejudo, F. J. (2010) Overoxidation of 2-Cys peroxiredoxin in prokaryotes: cyanobacterial 2-Cys peroxiredoxins sensitive to oxidative stress, *J Biol Chem 285*, 34485-34492.
- 83. Chang, T. S., Jeong, W., Woo, H. A., Lee, S. M., Park, S., and Rhee, S. G. (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, 50994-51001.
- 84. Iglesias-Baena, I., Barranco-Medina, S., Lazaro-Payo, A., Lopez-Jaramillo, F. J., Sevilla, F., and Lazaro, J. J. (2010) Characterization of plant sulfiredoxin and role of sulphinic form of 2-Cys peroxiredoxin, *J Exp Bot 61*, 1509-1521.
- Lim, J. C., Choi, H. I., Park, Y. S., Nam, H. W., Woo, H. A., Kwon, K. S., Kim, Y. S., Rhee, S. G., Kim, K., and Chae, H. Z. (2008) Irreversible oxidation of the active-site cysteine of peroxiredoxin to cysteine sulfonic acid for enhanced molecular chaperone activity, *J Biol Chem* 283, 28873-28880.
- Moon, J. C., Hah, Y. S., Kim, W. Y., Jung, B. G., Jang, H. H., Lee, J. R., Kim, S. Y., Lee, Y. M., Jeon, M. G., Kim, C. W., Cho, M. J., and Lee, S. Y. (2005) Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H2O2induced cell death, *J Biol Chem 280*, 28775-28784.
- 87. Newton, G. L., and Fahey, R. C. (2002) Mycothiol biochemistry, *Arch Microbiol 178*, 388-394.
- 88. Patel, M. P., and Blanchard, J. S. (2001) Mycobacterium tuberculosis mycothione reductase: pH dependence of the kinetic parameters and kinetic isotope effects, *Biochemistry 40*, 5119-5126.
- 89. Newton, G. L., Av-Gay, Y., and Fahey, R. C. (2000) A novel mycothioldependent detoxification pathway in mycobacteria involving mycothiol Sconjugate amidase, *Biochemistry 39*, 10739-10746.
- 90. Unson, M. D., Newton, G. L., Davis, C., and Fahey, R. C. (1998) An immunoassay for the detection and quantitative determination of mycothiol, *J Immunol Methods 214*, 29-39.

- 91. Bzymek, K. P., Newton, G. L., Ta, P., and Fahey, R. C. (2007) Mycothiol import by Mycobacterium smegmatis and function as a resource for metabolic precursors and energy production, *J Bacteriol 189*, 6796-6805.
- 92. Miller, C. C., Rawat, M., Johnson, T., and Av-Gay, Y. (2007) Innate protection of Mycobacterium smegmatis against the antimicrobial activity of nitric oxide is provided by mycothiol, *Antimicrob Agents Chemother 51*, 3364-3366.
- 93. Rawat, M., Newton, G. L., Ko, M., Martinez, G. J., Fahey, R. C., and Av-Gay, Y. (2002) Mycothiol-deficient Mycobacterium smegmatis mutants are hypersensitive to alkylating agents, free radicals, and antibiotics, *Antimicrob Agents Chemother 46*, 3348-3355.
- 94. Ta, P., Buchmeier, N., Newton, G. L., Rawat, M., and Fahey, R. C. (2011) Organic hydroperoxide resistance protein and ergothioneine compensate for loss of mycothiol in Mycobacterium smegmatis mutants, *J Bacteriol 193*, 1981-1990.
- 95. Edwards, K. M., Cynamon, M. H., Voladri, R. K., Hager, C. C., DeStefano, M. S., Tham, K. T., Lakey, D. L., Bochan, M. R., and Kernodle, D. S. (2001) Ironcofactored superoxide dismutase inhibits host responses to Mycobacterium tuberculosis, *Am J Respir Crit Care Med 164*, 2213-2219.
- 96. Dussurget, O., Stewart, G., Neyrolles, O., Pescher, P., Young, D., and Marchal, G. (2001) Role of Mycobacterium tuberculosis copper-zinc superoxide dismutase, *Infect Immun 69*, 529-533.
- Jaeger, T., Budde, H., Flohe, L., Menge, U., Singh, M., Trujillo, M., and Radi, R. (2004) Multiple thioredoxin-mediated routes to detoxify hydroperoxides in Mycobacterium tuberculosis, *Arch Biochem Biophys* 423, 182-191.
- 98. Cole, S. T., and Barrell, B. G. (1998) Analysis of the genome of Mycobacterium tuberculosis H37Rv, *Novartis Found Symp 217*, 160-172; discussion 172-167.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S., and Barrell, B. G. (1998) Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence, *Nature 393*, 537-544.
- Chi, B. K., Busche, T., Van Laer, K., Basell, K., Becher, D., Clermont, L., Seibold, G. M., Persicke, M., Kalinowski, J., Messens, J., and Antelmann, H. (2014) Protein S-mycothiolation functions as redox-switch and thiol protection mechanism in Corynebacterium glutamicum under hypochlorite stress, *Antioxid Redox Signal 20*, 589-605.
- 101. Van Laer, K., Buts, L., Foloppe, N., Vertommen, D., Van Belle, K., Wahni, K., Roos, G., Nilsson, L., Mateos, L. M., Rawat, M., van Nuland, N. A., and Messens, J. (2012) Mycoredoxin-1 is one of the missing links in the oxidative stress defence mechanism of Mycobacteria, *Mol Microbiol 86*, 787-804.
- 102. Villadangos, A. F., Van Belle, K., Wahni, K., Dufe, V. T., Freitas, S., Nur, H., De Galan, S., Gil, J. A., Collet, J. F., Mateos, L. M., and Messens, J. (2011) Corynebacterium glutamicum survives arsenic stress with arsenate reductases coupled to two distinct redox mechanisms, *Mol Microbiol 82*, 998-1014.
- 103. Zahrt, T. C., Song, J., Siple, J., and Deretic, V. (2001) Mycobacterial FurA is a negative regulator of catalase-peroxidase gene katG, *Mol Microbiol 39*, 1174-1185.
- 104. Raman, S., Song, T., Puyang, X., Bardarov, S., Jacobs, W. R., Jr., and Husson, R. N. (2001) The alternative sigma factor SigH regulates major components of

oxidative and heat stress responses in Mycobacterium tuberculosis, *J Bacteriol 183*, 6119-6125.

- 105. Diaz, G. A., and Wayne, L. G. (1974) Isolation and characterization of catalase produced by Mycobacterium tuberculosis, *Am Rev Respir Dis 110*, 312-319.
- 106. Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D., and Cole, S. (1992) The catalaseperoxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis, *Nature 358*, 591-593.
- Sherman, D. R., Mdluli, K., Hickey, M. J., Arain, T. M., Morris, S. L., Barry, C. E., 3rd, and Stover, C. K. (1996) Compensatory ahpC gene expression in isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis, *Science 272*, 1641-1643.
- 108. Ando, H., Kitao, T., Miyoshi-Akiyama, T., Kato, S., Mori, T., and Kirikae, T. (2011) Downregulation of katG expression is associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis, *Mol Microbiol* 79, 1615-1628.
- Gu, S., Chen, J., Dobos, K. M., Bradbury, E. M., Belisle, J. T., and Chen, X. (2003) Comprehensive proteomic profiling of the membrane constituents of a Mycobacterium tuberculosis strain, *Mol Cell Proteomics* 2, 1284-1296.
- Malen, H., Berven, F. S., Fladmark, K. E., and Wiker, H. G. (2007) Comprehensive analysis of exported proteins from Mycobacterium tuberculosis H37Rv, *Proteomics* 7, 1702-1718.
- 111. Mawuenyega, K. G., Forst, C. V., Dobos, K. M., Belisle, J. T., Chen, J., Bradbury, E. M., Bradbury, A. R., and Chen, X. (2005) Mycobacterium tuberculosis functional network analysis by global subcellular protein profiling, *Mol Biol Cell 16*, 396-404.
- 112. Johnsson, K., Froland, W. A., and Schultz, P. G. (1997) Overexpression, purification, and characterization of the catalase-peroxidase KatG from Mycobacterium tuberculosis, *J Biol Chem* 272, 2834-2840.
- 113. Wengenack, N. L., Jensen, M. P., Rusnak, F., and Stern, M. K. (1999) Mycobacterium tuberculosis KatG is a peroxynitritase, *Biochem Biophys Res Commun* 256, 485-487.
- 114. Ghiladi, R. A., Medzihradszky, K. F., and Ortiz de Montellano, P. R. (2005) Role of the Met-Tyr-Trp cross-link in Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase (KatG) as revealed by KatG(M255I), *Biochemistry* 44, 15093-15105.
- 115. Jakopitsch, C., Ivancich, A., Schmuckenschlager, F., Wanasinghe, A., Poltl, G., Furtmuller, P. G., Ruker, F., and Obinger, C. (2004) Influence of the unusual covalent adduct on the kinetics and formation of radical intermediates in synechocystis catalase peroxidase: a stopped-flow and EPR characterization of the MET275, TYR249, and ARG439 variants, *J Biol Chem* 279, 46082-46095.
- 116. Zhao, X., Suarez, J., Khajo, A., Yu, S., Metlitsky, L., and Magliozzo, R. S. (2010) A radical on the Met-Tyr-Trp modification required for catalase activity in catalase-peroxidase is established by isotopic labeling and site-directed mutagenesis, *J Am Chem Soc 132*, 8268-8269.
- 117. Guimaraes, B. G., Souchon, H., Honore, N., Saint-Joanis, B., Brosch, R., Shepard, W., Cole, S. T., and Alzari, P. M. (2005) Structure and mechanism of the alkyl hydroperoxidase AhpC, a key element of the Mycobacterium tuberculosis defense system against oxidative stress, *J Biol Chem 280*, 25735-25742.
- 118. Chauhan, R., and Mande, S. C. (2002) Site-directed mutagenesis reveals a novel catalytic mechanism of Mycobacterium tuberculosis alkylhydroperoxidase C, *Biochem J* 367, 255-261.
- 119. Koshkin, A., Knudsen, G. M., and Ortiz De Montellano, P. R. (2004) Intermolecular interactions in the AhpC/AhpD antioxidant defense system of Mycobacterium tuberculosis, *Arch Biochem Biophys* 427, 41-47.

- 120. Covert, B. A., Spencer, J. S., Orme, I. M., and Belisle, J. T. (2001) The application of proteomics in defining the T cell antigens of Mycobacterium tuberculosis, *Proteomics 1*, 574-586.
- 121. Storz, G., Christman, M. F., Sies, H., and Ames, B. N. (1987) Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in Salmonella typhimurium, *Proc Natl Acad Sci U S A 84*, 8917-8921.
- 122. Tartaglia, L. A., Storz, G., and Ames, B. N. (1989) Identification and molecular analysis of oxyR-regulated promoters important for the bacterial adaptation to oxidative stress, *J Mol Biol 210*, 709-719.
- Hillas, P. J., del Alba, F. S., Oyarzabal, J., Wilks, A., and Ortiz De Montellano, P. R. (2000) The AhpC and AhpD antioxidant defense system of Mycobacterium tuberculosis, *J Biol Chem* 275, 18801-18809.
- 124. Bryk, R., Lima, C. D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Nathan, C. (2002) Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein, *Science 295*, 1073-1077.
- 125. Argyrou, A., and Blanchard, J. S. (2001) Mycobacterium tuberculosis lipoamide dehydrogenase is encoded by Rv0462 and not by the lpdA or lpdB genes, *Biochemistry 40*, 11353-11363.
- 126. Tian, J., Bryk, R., Shi, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Nathan, C. (2005) Mycobacterium tuberculosis appears to lack alpha-ketoglutarate dehydrogenase and encodes pyruvate dehydrogenase in widely separated genes, *Mol Microbiol 57*, 859-868.
- 127. Jungblut, P. R., Schaible, U. E., Mollenkopf, H. J., Zimny-Arndt, U., Raupach, B., Mattow, J., Halada, P., Lamer, S., Hagens, K., and Kaufmann, S. H. (1999) Comparative proteome analysis of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens, *Mol Microbiol* 33, 1103-1117.
- 128. Mollenkopf, H. J., Jungblut, P. R., Raupach, B., Mattow, J., Lamer, S., Zimny-Arndt, U., Schaible, U. E., and Kaufmann, S. H. (1999) A dynamic twodimensional polyacrylamide gel electrophoresis database: the mycobacterial proteome via Internet, *Electrophoresis 20*, 2172-2180.
- Reyes, A. M., Hugo, M., Trostchansky, A., Capece, L., Radi, R., and Trujillo, M. (2011) Oxidizing substrate specificity of Mycobacterium tuberculosis alkyl hydroperoxide reductase E: kinetics and mechanisms of oxidation and overoxidation, *Free Radic Biol Med 51*, 464-473.
- Cox, A. G., Peskin, A. V., Paton, L. N., Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2009) Redox potential and peroxide reactivity of human peroxiredoxin 3, *Biochemistry 48*, 6495-6501.
- 131. Dietz, K. J., Jacob, S., Oelze, M. L., Laxa, M., Tognetti, V., de Miranda, S. M., Baier, M., and Finkemeier, I. (2006) The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism, *J Exp Bot 57*, 1697-1709.
- 132. Krause, G., Lundstrom, J., Barea, J. L., Pueyo de la Cuesta, C., and Holmgren, A. (1991) Mimicking the active site of protein disulfide-isomerase by substitution of proline 34 in Escherichia coli thioredoxin, *J Biol Chem 266*, 9494-9500.
- 133. Koppenol, W. H., and Kissner, R. (1998) Can O=NOOH undergo homolysis?, *Chem Res Toxicol 11*, 87-90.
- 134. Latimer, W. M. (1952) Oxidation Potentials, 2 ed.
- 135. Huang, C. H., Chuang, M. H., Wu, Y. H., Chuang, W. C., Jhuang, P. J., and Chiou, S. H. (2010) Characterization of site-specific mutants of alkylhydroperoxide reductase with dual functionality from Helicobacter pylori, *J Biochem* 147, 661-669.
- 136. Yamamoto, Y., Ritz, D., Planson, A. G., Jonsson, T. J., Faulkner, M. J., Boyd, D., Beckwith, J., and Poole, L. B. (2008) Mutant AhpC peroxiredoxins suppress

thiol-disulfide redox deficiencies and acquire deglutathionylating activity, *Mol Cell* 29, 36-45.

- 137. Parsonage, D., Youngblood, D. S., Sarma, G. N., Wood, Z. A., Karplus, P. A., and Poole, L. B. (2005) Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin, *Biochemistry* 44, 10583-10592.
- 138. Wilson, T. M., and Collins, D. M. (1996) ahpC, a gene involved in isoniazid resistance of the Mycobacterium tuberculosis complex, *Mol Microbiol 19*, 1025-1034.
- Springer, B., Master, S., Sander, P., Zahrt, T., McFalone, M., Song, J., Papavinasasundaram, K. G., Colston, M. J., Boettger, E., and Deretic, V. (2001) Silencing of oxidative stress response in Mycobacterium tuberculosis: expression patterns of ahpC in virulent and avirulent strains and effect of ahpC inactivation, *Infect Immun 69*, 5967-5973.
- 140. Sherman, D. R., Voskuil, M., Schnappinger, D., Liao, R., Harrell, M. I., and Schoolnik, G. K. (2001) Regulation of the Mycobacterium tuberculosis hypoxic response gene encoding alpha -crystallin, *Proc Natl Acad Sci U S A 98*, 7534-7539.
- 141. Chen, L., Xie, Q. W., and Nathan, C. (1998) Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC) protects bacterial and human cells against reactive nitrogen intermediates, *Mol Cell* 1, 795-805.
- 142. Master, S. S., Springer, B., Sander, P., Boettger, E. C., Deretic, V., and Timmins, G. S. (2002) Oxidative stress response genes in Mycobacterium tuberculosis: role of ahpC in resistance to peroxynitrite and stage-specific survival in macrophages, *Microbiology* 148, 3139-3144.
- 143. Shi, S., and Ehrt, S. (2006) Dihydrolipoamide acyltransferase is critical for Mycobacterium tuberculosis pathogenesis, *Infect Immun 74*, 56-63.
- 144. Weldingh, K., Rosenkrands, I., Jacobsen, S., Rasmussen, P. B., Elhay, M. J., and Andersen, P. (1998) Two-dimensional electrophoresis for analysis of Mycobacterium tuberculosis culture filtrate and purification and characterization of six novel proteins, *Infect Immun 66*, 3492-3500.
- 145. Malen, H., Pathak, S., Softeland, T., de Souza, G. A., and Wiker, H. G. (2010) Definition of novel cell envelope associated proteins in Triton X-114 extracts of Mycobacterium tuberculosis H37Rv, *BMC Microbiol 10*, 132.
- 146. Rosenkrands, I., King, A., Weldingh, K., Moniatte, M., Moertz, E., and Andersen, P. (2000) Towards the proteome of Mycobacterium tuberculosis, *Electrophoresis 21*, 3740-3756.
- 147. Trujillo, M., Mauri, P., Benazzi, L., Comini, M., De Palma, A., Flohe, L., Radi, R., Stehr, M., Singh, M., Ursini, F., and Jaeger, T. (2006) The mycobacterial thioredoxin peroxidase can act as a one-cysteine peroxiredoxin, *J Biol Chem 281*, 20555-20566.
- 148. Rho, B. S., Hung, L. W., Holton, J. M., Vigil, D., Kim, S. I., Park, M. S., Terwilliger, T. C., and Pedelacq, J. D. (2006) Functional and structural characterization of a thiol peroxidase from Mycobacterium tuberculosis, *J Mol Biol 361*, 850-863.
- 149. Stehr, M., Hecht, H. J., Jager, T., Flohe, L., and Singh, M. (2006) Structure of the inactive variant C60S of Mycobacterium tuberculosis thiol peroxidase, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62, 563-567.
- 150. Hu, Y., and Coates, A. R. (2009) Acute and persistent Mycobacterium tuberculosis infections depend on the thiol peroxidase TpX, *PLoS ONE 4*, e5150.
- 151. Dosanjh, N. S., Rawat, M., Chung, J. H., and Av-Gay, Y. (2005) Thiol specific oxidative stress response in Mycobacteria, *FEMS Microbiol Lett* 249, 87-94.

- Festa, R. A., McAllister, F., Pearce, M. J., Mintseris, J., Burns, K. E., Gygi, S. P., and Darwin, K. H. (2010) Prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) proteome of Mycobacterium tuberculosis [corrected], *PLoS One 5*, e8589.
- 153. Pearce, M. J., Arora, P., Festa, R. A., Butler-Wu, S. M., Gokhale, R. S., and Darwin, K. H. (2006) Identification of substrates of the Mycobacterium tuberculosis proteasome, *EMBO J 25*, 5423-5432.
- 154. Darwin, K. H., Ehrt, S., Gutierrez-Ramos, J. C., Weich, N., and Nathan, C. F. (2003) The proteasome of Mycobacterium tuberculosis is required for resistance to nitric oxide, *Science 302*, 1963-1966.
- 155. Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixera, F., Margis-Pinheiro, M., Ioannidis, V., Penel, C., Falquet, L., and Dunand, C. (2007) PeroxiBase: the peroxidase database, *Phytochemistry* 68, 1605-1611.
- 156. Murphy, D. J., and Brown, J. R. (2007) Identification of gene targets against dormant phase Mycobacterium tuberculosis infections, *BMC Infect Dis* 7, 84.
- 157. Fairlamb, A. H., and Cerami, A. (1985) Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids, *Mol Biochem Parasitol 14*, 187-198.
- 158. Krauth-Siegel, R. L., Bauer, H., and Schirmer, R. H. (2005) Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia, *Angew Chem Int Ed Engl 44*, 690-715.
- 159. Gilbert, H. F. (1990) Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 63*, 69-172.
- 160. Maugeri, D. A., and Cazzulo, J. J. (2004) The pentose phosphate pathway in Trypanosoma cruzi, *FEMS Microbiol Lett* 234, 117-123.
- 161. Manta, B., Comini, M., Medeiros, A., Hugo, M., Trujillo, M., and Radi, R. (2013) Trypanothione: a unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids, *Biochim Biophys Acta 1830*, 3199-3216.
- Comini, M. A., Guerrero, S. A., Haile, S., Menge, U., Lunsdorf, H., and Flohe, L. (2004) Validation of Trypanosoma brucei trypanothione synthetase as drug target, *Free Radic Biol Med* 36, 1289-1302.
- 163. Krieger, S., Schwarz, W., Ariyanayagam, M. R., Fairlamb, A. H., Krauth-Siegel, R. L., and Clayton, C. (2000) Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress, *Mol Microbiol 35*, 542-552.
- 164. Tovar, J., Cunningham, M. L., Smith, A. C., Croft, S. L., and Fairlamb, A. H. (1998) Down-regulation of Leishmania donovani trypanothione reductase by heterologous expression of a trans-dominant mutant homologue: effect on parasite intracellular survival, *Proc Natl Acad Sci U S A 95*, 5311-5316.
- 165. Wilkinson, S. R., Horn, D., Prathalingam, S. R., and Kelly, J. M. (2003) RNA interference identifies two hydroperoxide metabolizing enzymes that are essential to the bloodstream form of the african trypanosome, *J Biol Chem* 278, 31640-31646.
- 166. Atwood, J. A., 3rd, Weatherly, D. B., Minning, T. A., Bundy, B., Cavola, C., Opperdoes, F. R., Orlando, R., and Tarleton, R. L. (2005) The Trypanosoma cruzi proteome, *Science 309*, 473-476.
- 167. Wilkinson, S. R., Meyer, D. J., Taylor, M. C., Bromley, E. V., Miles, M. A., and Kelly, J. M. (2002) The Trypanosoma cruzi enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin, *J Biol Chem* 277, 17062-17071.
- 168. Wilkinson, S. R., Taylor, M. C., Touitha, S., Mauricio, I. L., Meyer, D. J., and Kelly, J. M. (2002) TcGPXII, a glutathione-dependent Trypanosoma cruzi peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid

hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum, *Biochem J 364*, 787-794.

- 169. Wilkinson, S. R., Temperton, N. J., Mondragon, A., and Kelly, J. M. (2000) Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in Trypanosoma cruzi, *J Biol Chem* 275, 8220-8225.
- 170. Dufernez, F., Yernaux, C., Gerbod, D., Noel, C., Chauvenet, M., Wintjens, R., Edgcomb, V. P., Capron, M., Opperdoes, F. R., and Viscogliosi, E. (2006) The presence of four iron-containing superoxide dismutase isozymes in trypanosomatidae: characterization, subcellular localization, and phylogenetic origin in Trypanosoma brucei, *Free Radic Biol Med 40*, 210-225.
- 171. Plewes, K. A., Barr, S. D., and Gedamu, L. (2003) Iron superoxide dismutases targeted to the glycosomes of Leishmania chagasi are important for survival, *Infect Immun 71*, 5910-5920.
- 172. Wilkinson, S. R., Prathalingam, S. R., Taylor, M. C., Ahmed, A., Horn, D., and Kelly, J. M. (2006) Functional characterisation of the iron superoxide dismutase gene repertoire in Trypanosoma brucei, *Free Radic Biol Med 40*, 198-209.
- 173. Piacenza, L., Irigoin, F., Alvarez, M. N., Peluffo, G., Taylor, M. C., Kelly, J. M., Wilkinson, S. R., and Radi, R. (2007) Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in Trypanosoma cruzi: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression, *Biochem J 403*, 323-334.
- 174. Wilkinson, S. R., Obado, S. O., Mauricio, I. L., and Kelly, J. M. (2002) Trypanosoma cruzi expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum, *Proc Natl Acad Sci U* S A 99, 13453-13458.
- 175. Nogueira, F. B., Rodrigues, J. F., Correa, M. M., Ruiz, J. C., Romanha, A. J., and Murta, S. M. (2012) The level of ascorbate peroxidase is enhanced in benznidazole-resistant populations of Trypanosoma cruzi and its expression is modulated by stress generated by hydrogen peroxide, *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107, 494-502.
- 176. Piacenza, L., Zago, M. P., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Basombrio, M. A., and Radi, R. (2009) Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of Trypanosoma cruzi virulence, *Int J Parasitol 39*, 1455-1464.
- 177. Krauth-Siegel, R. L., and Ludemann, H. (1996) Reduction of dehydroascorbate by trypanothione, *Mol Biochem Parasitol 80*, 203-208.
- 178. Logan, F. J., Taylor, M. C., Wilkinson, S. R., Kaur, H., and Kelly, J. M. (2007) The terminal step in vitamin C biosynthesis in Trypanosoma cruzi is mediated by a FMN-dependent galactonolactone oxidase, *Biochem J 407*, 419-426.
- 179. Adak, S., and Datta, A. K. (2005) Leishmania major encodes an unusual peroxidase that is a close homologue of plant ascorbate peroxidase: a novel role of the transmembrane domain, *Biochem J 390*, 465-474.
- 180. Dolai, S., Yadav, R. K., Pal, S., and Adak, S. (2008) Leishmania major ascorbate peroxidase overexpression protects cells against reactive oxygen species-mediated cardiolipin oxidation, *Free Radic Biol Med 45*, 1520-1529.
- 181. Yadav, R. K., Dolai, S., Pal, S., and Adak, S. (2008) Role of tryptophan-208 residue in cytochrome c oxidation by ascorbate peroxidase from Leishmania major-kinetic studies on Trp208Phe mutant and wild type enzyme, *Biochim Biophys Acta 1784*, 863-871.
- 182. Piacenza, L., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Kelly, J. M., Wilkinson, S. R., and Radi, R. (2008) Peroxiredoxins play a major role in protecting Trypanosoma cruzi against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite, *Biochem J 410*, 359-368.

- 183. Claiborne, A., Miller, H., Parsonage, D., and Ross, R. P. (1993) Protein-sulfenic acid stabilization and function in enzyme catalysis and gene regulation, *FASEB J* 7, 1483-1490.
- 184. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide, *J Biol Chem 266*, 4244-4250.
- 185. Jiang, Z. Y., Hunt, J. V., and Wolff, S. P. (1992) Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein, *Anal Biochem 202*, 384-389.
- 186. Pryor, W. A., and Castle, L. (1984) Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides, *Methods Enzymol 105*, 293-299.
- 187. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Sci 4*, 2411-2423.
- 188. Schonbaum, G. R., and Lo, S. (1972) Interaction of peroxidases with aromatic peracids and alkyl peroxides. Product analysis, *J Biol Chem* 247, 3353-3360.
- 189. Tien, M., Kirk, T. K., Bull, C., and Fee, J. A. (1986) Steady-state and transientstate kinetic studies on the oxidation of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol catalyzed by the ligninase of Phanerocheate chrysosporium Burds, *J Biol Chem 261*, 1687-1693.
- 190. Peskin, A. V., Low, F. M., Paton, L. N., Maghzal, G. J., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. C. (2007) The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H(2)O(2) is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents, *J Biol Chem 282*, 11885-11892.
- 191. Espenson, J. H. (1995) Chemical kinetics and reaction mechanisms, In *Series in advanced chemistry*, pp 46-69, McGraw-Hill.
- 192. Hayashi, Y., and Yamazaki, I. (1979) The oxidation-reduction potentials of compound I/compound II and compound II/ferric couples of horseradish peroxidases A2 and C, *J Biol Chem 254*, 9101-9106.
- 193. Floris, R., Piersma, S. R., Yang, G., Jones, P., and Wever, R. (1993) Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase, *Eur J Biochem* 215, 767-775.
- 194. Mendes, P. (1993) GEPASI: a software package for modelling the dynamics, steady states and control of biochemical and other systems, *Comput. Appl. Biosci.* 9, 563-571.
- 195. Mendes, P. (1997) Biochemistry by numbers: simulation of biochemical pathways with Gepasi 3., *Trends Biochem. Sci.* 22, 361-363.
- 196. Koppenol, W. H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H., and Beckman, J. S. (1992) Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide, *Chem Res Toxicol 5*, 834-842.
- 197. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics, *J Mol Graph 14*, 33-38, 27-38.
- 198. Steffek, M., Newton, G. L., Av-Gay, Y., and Fahey, R. C. (2003) Characterization of Mycobacterium tuberculosis mycothiol S-conjugate amidase, *Biochemistry* 42, 12067-12076.
- 199. Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Ferrer-Sueta, G., Souza, J. M., Duran, R., Freeman, B. A., Radi, R., and Alvarez, B. (2008) Reactivity of sulfenic acid in human serum albumin, *Biochemistry 47*, 358-367.
- 200. Wood, Z. A., Schroder, E., Harris, R. J., and Poole, L. B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins, *Trends Biochem Sci 28*, 32-40.
- 201. Ogusucu, R., Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L. E., and Augusto, O. (2007) Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics, *Free Radic Biol Med 42*, 326-334.

- 202. Poole, L. B., and Ellis, H. R. (2002) Identification of cysteine sulfenic acid in AhpC of alkyl hydroperoxide reductase, *Methods Enzymol 348*, 122-136.
- Peskin, A. V., Dickerhof, N., Poynton, R. A., Paton, L. N., Pace, P. E., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. C. (2013) Hyperoxidation of peroxiredoxins 2 and 3: rate constants for the reactions of the sulfenic acid of the peroxidatic cysteine, *J Biol Chem 288*, 14170-14177.
- 204. Lakowicz, J. R. (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd ed.*, New York.
- 205. Gupta, V., and Carroll, K. S. (2014) Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime, *Biochim Biophys Acta 1840*, 847-875.
- 206. Jeong, J., Jung, Y., Na, S., Lee, E., Kim, M. S., Choi, S., Shin, D. H., Paek, E., Lee, H. Y., and Lee, K. J. (2011) Novel oxidative modifications in redox-active cysteine residues, *Mol Cell Proteomics 10*, M110 000513.
- 207. Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., and Radi, R. (2008) Peroxynitrite detoxification and its biologic implications, *Antioxid Redox Signal 10*, 1607-1620.
- 208. Stone, J. R. (2004) An assessment of proposed mechanisms for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems, *Arch Biochem Biophys 422*, 119-124.
- 209. Poole, L. B., and Claiborne, A. (1989) The non-flavin redox center of the streptococcal NADH peroxidase. II. Evidence for a stabilized cysteine-sulfenic acid, *J Biol Chem 264*, 12330-12338.
- 210. Poole, L. B., and Claiborne, A. (1989) The non-flavin redox center of the streptococcal NADH peroxidase. I. Thiol reactivity and redox behavior in the presence of urea, *J Biol Chem 264*, 12322-12329.
- Vandal, O. H., Pierini, L. M., Schnappinger, D., Nathan, C. F., and Ehrt, S. (2008) A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal Mycobacterium tuberculosis, *Nat Med 14*, 849-854.
- Zeida, A., Babbush, R., Lebrero, M. C., Trujillo, M., Radi, R., and Estrin, D. A. (2012) Molecular basis of the mechanism of thiol oxidation by hydrogen peroxide in aqueous solution: challenging the SN2 paradigm, *Chem Res Toxicol 25*, 741-746.
- 213. Ursini, F., Maiorino, M., and Gregolin, C. (1985) The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *Biochim Biophys Acta 839*, 62-70.
- 214. Soonsanga, S., Lee, J. W., and Helmann, J. D. (2008) Oxidant-dependent switching between reversible and sacrificial oxidation pathways for Bacillus subtilis OhrR, *Mol Microbiol 68*, 978-986.
- Declercq, J. P., Evrard, C., Clippe, A., Stricht, D. V., Bernard, A., and Knoops, B. (2001) Crystal structure of human peroxiredoxin 5, a novel type of mammalian peroxiredoxin at 1.5 A resolution, *J Mol Biol 311*, 751-759.
- 216. Pineyro, M. D., Arcari, T., Robello, C., Radi, R., and Trujillo, M. (2011) Tryparedoxin peroxidases from Trypanosoma cruzi: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite, *Arch Biochem Biophys* 507, 287-295.
- 217. Amyes, T. L., and Richard, J. P. (2013) Specificity in transition state binding: the Pauling model revisited, *Biochemistry* 52, 2021-2035.
- 218. Moore, S. A., and Jencks, W. P. (1982) Formation of active site thiol esters of CoA transferase and the dependence of catalysis on specific binding interactions, *J Biol Chem* 257, 10893-10907.
- 219. Porter, N. A., Caldwell, S. E., and Mills, K. A. (1995) Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids, *Lipids 30*, 277-290.
- Peshenko, I. V., and Shichi, H. (2001) Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxynitrite, *Free Radic Biol Med 31*, 292-303.

- 221. Van Laer, K., Hamilton, C. J., and Messens, J. (2013) Low-molecular-weight thiols in thiol-disulfide exchange, *Antioxid Redox Signal 18*, 1642-1653.
- 222. Patel, M. P., and Blanchard, J. S. (1999) Expression, purification, and characterization of Mycobacterium tuberculosis mycothione reductase, *Biochemistry 38*, 11827-11833.
- 223. Mendes, P. (1993) GEPASI: a software package for modelling the dynamics, steady states and control of biochemical and other systems, *Comput Appl Biosci 9*, 563-571.
- 224. Hugo, M., Turell, L., Manta, B., Botti, H., Monteiro, G., Netto, L. E., Alvarez, B., Radi, R., and Trujillo, M. (2009) Thiol and sulfenic acid oxidation of AhpE, the one-cysteine peroxiredoxin from Mycobacterium tuberculosis: kinetics, acidity constants, and conformational dynamics, *Biochemistry 48*, 9416-9426.
- 225. Bergmeyer, H. U. (1974) *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 1, Academic Press, New York, NY.
- 226. Ordonez, E., Van Belle, K., Roos, G., De Galan, S., Letek, M., Gil, J. A., Wyns, L., Mateos, L. M., and Messens, J. (2009) Arsenate reductase, mycothiol, and mycoredoxin concert thiol/disulfide exchange, *J Biol Chem 284*, 15107-15116.
- 227. Van Laer, K., Buts, L., Foloppe, N., Vertommen, D., Van Belle, K., Wahni, K., Roos, G., Nilsson, L., Mateos, L. M., Rawat, M., van Nuland, N. A., and Messens, J. (2012) Mycoredoxin-1 is one of the missing links in the oxidative stress defence mechanism of Mycobacteria, *Mol Microbiol 86*, 787-804.
- 228. Winterbourn, C. C., and Metodiewa, D. (1999) Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide, *Free Radic Biol Med* 27, 322-328.
- 229. Rouhier, N., Gelhaye, E., and Jacquot, J. P. (2002) Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from poplar: protein-protein interaction and catalytic mechanism, *J Biol Chem* 277, 13609-13614.
- 230. Pedrajas, J. R., Padilla, C. A., McDonagh, B., and Barcena, J. A. (2010) Glutaredoxin participates in the reduction of peroxides by the mitochondrial 1-CYS peroxiredoxin in Saccharomyces cerevisiae, *Antioxid Redox Signal 13*, 249-258.
- 231. Hanschmann, E. M., Lonn, M. E., Schutte, L. D., Funke, M., Godoy, J. R., Eitner, S., Hudemann, C., and Lillig, C. H. (2010) Both thioredoxin 2 and glutaredoxin 2 contribute to the reduction of the mitochondrial 2-Cys peroxiredoxin Prx3, *J Biol Chem* 285, 40699-40705.
- 232. Reeves, S. A., Parsonage, D., Nelson, K. J., and Poole, L. B. (2011) Kinetic and thermodynamic features reveal that Escherichia coli BCP is an unusually versatile peroxiredoxin, *Biochemistry 50*, 8970-8981.
- 233. Reynolds, C. M., Meyer, J., and Poole, L. B. (2002) An NADH-dependent bacterial thioredoxin reductase-like protein in conjunction with a glutaredoxin homologue form a unique peroxiredoxin (AhpC) reducing system in Clostridium pasteurianum, *Biochemistry 41*, 1990-2001.
- 234. Chi, B. K., Busche, T., Laer, K. V., Basell, K., Becher, D., Clermont, L., Seibold, G. M., Persicke, M., Kalinowski, J., Messens, J., and Antelmann, H. (2013) Protein S-Mycothiolation Functions as Redox-Switch and Thiol Protection Mechanism in Corynebacterium glutamicum Under Hypochlorite Stress, *Antioxid Redox Signal 20*, 589-605.
- Hugo, M., Radi, R., and Trujillo, M. (2012) Thiol-Dependent Peroxidases in Mycobacterium tuberculosis Antioxidant Defense, Understanding Tuberculosis -Deciphering the Secret Life of the Bacilli, Dr. Pere-Joan Cardona (Ed.), ISBN: 978-953-307-946-2, InTech, DOI: 10.5772/32330.
- Dormeyer, M., Reckenfelderbaumer, N., Ludemann, H., and Krauth-Siegel, R. L. (2001) Trypanothione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides by Trypanosoma brucei ribonucleotide reductase, *J Biol Chem* 276, 10602-10606.

- 237. Holmgren, A. (1979) Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Characterization of the enzymatic mechanism of Escherichia coli glutaredoxin, *J Biol Chem* 254, 3672-3678.
- 238. Van Laer, K., Dziewulska, A. M., Fislage, M., Wahni, K., Hbeddou, A., Collet, J. F., Versees, W., Mateos, L. M., Tamu Dufe, V., and Messens, J. (2013) NrdH-redoxin of Mycobacterium tuberculosis and Corynebacterium glutamicum dimerizes at high protein concentration and exclusively receives electrons from thioredoxin reductase, *J Biol Chem* 288, 7942-7955.
- 239. Rawat, M., Johnson, C., Cadiz, V., and Av-Gay, Y. (2007) Comparative analysis of mutants in the mycothiol biosynthesis pathway in Mycobacterium smegmatis, *Biochem Biophys Res Commun* 363, 71-76.
- 240. Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., and Toledano, M. B. (2002) A thiol peroxidase is an H2O2 receptor and redox-transducer in gene activation, *Cell 111*, 471-481.
- 241. Fomenko, D. E., Koc, A., Agisheva, N., Jacobsen, M., Kaya, A., Malinouski, M., Rutherford, J. C., Siu, K. L., Jin, D. Y., Winge, D. R., and Gladyshev, V. N. (2011) Thiol peroxidases mediate specific genome-wide regulation of gene expression in response to hydrogen peroxide, *Proc Natl Acad Sci U S A 108*, 2729-2734.
- Azevedo, D., Tacnet, F., Delaunay, A., Rodrigues-Pousada, C., and Toledano, M. B. (2003) Two redox centers within Yap1 for H2O2 and thiol-reactive chemicals signaling, *Free Radic Biol Med 35*, 889-900.
- Contreras, V. T., Salles, J. M., Thomas, N., Morel, C. M., and Goldenberg, S. (1985) In vitro differentiation of Trypanosoma cruzi under chemically defined conditions, *Mol Biochem Parasitol 16*, 315-327.
- 244. Martinez, A., Peluffo, G., Petruk, A. A., Hugo, M., Pineyro, D., Demicheli, V., Moreno, D., Lima, A., Batthyany, C., Duran, R., Robello, C., Marti, M. A., Larrieux, N., Buschiazzo, A., Trujillo, M., Radi, R., and Piacenza, L. (2014) Structural and molecular basis of the peroxynitrite-mediated nitration and inactivation of Trypanosoma cruzi Fe-superoxide dismutases A and B: Disparate susceptibilities due to the repair of Tyr35 radical by Cys83 in Fe-SODB through intramolecular electron transfer, *J Biol Chem 289*, 12760-78.
- 245. Peluffo, G., Calcerrada, P., Piacenza, L., Pizzano, N., and Radi, R. (2009) Superoxide-mediated inactivation of nitric oxide and peroxynitrite formation by tobacco smoke in vascular endothelium: studies in cultured cells and smokers, *Am J Physiol Heart Circ Physiol 296*, H1781-1792.
- 246. Jasion, V. S., Polanco, J. A., Meharenna, Y. T., Li, H., and Poulos, T. L. (2011) Crystal structure of Leishmania major peroxidase and characterization of the compound i tryptophan radical, *J Biol Chem 286*, 24608-24615.
- 247. Dixon, M. a. W., E (1979) *Enzymes*, 3rd ed., Academic Press, New York.
- 248. Ceylan, S., Seidel, V., Ziebart, N., Berndt, C., Dirdjaja, N., and Krauth-Siegel, R. L. (2010) The dithiol glutaredoxins of african trypanosomes have distinct roles and are closely linked to the unique trypanothione metabolism, *J Biol Chem* 285, 35224-35237.
- 249. Coustou, V., Besteiro, S., Riviere, L., Biran, M., Biteau, N., Franconi, J. M., Boshart, M., Baltz, T., and Bringaud, F. (2005) A mitochondrial NADHdependent fumarate reductase involved in the production of succinate excreted by procyclic Trypanosoma brucei, *J Biol Chem 280*, 16559-16570.
- 250. Marquez, L. A., Quitoriano, M., Zilinskas, B. A., and Dunford, H. B. (1996) Kinetic and spectral properties of pea cytosolic ascorbate peroxidase, *FEBS Lett* 389, 153-156.
- 251. Hiner, A. N., Rodriguez-Lopez, J. N., Arnao, M. B., Lloyd Raven, E., Garcia-Canovas, F., and Acosta, M. (2000) Kinetic study of the inactivation of ascorbate peroxidase by hydrogen peroxide, *Biochem J 348*, 321-328.

- 252. Trujillo M, A. B., Souza JM, Romero N, Castro L, Thomson L, Radi R. (2010) Mechanisms and biological consequences of peroxynitrite-dependent protein oxidation and nitration., In *Nitric Oxide. Biology and Pathobiology* (Ignarro, L. J., Ed.) 2 ed., pp 1010-1050, Elsevier, Inc,.
- 253. Gupta, S., Bhatia, V., Wen, J. J., Wu, Y., Huang, M. H., and Garg, N. J. (2009) Trypanosoma cruzi infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes, *Free Radic Biol Med 47*, 1414-1421.
- 254. Li, P. F., Maasch, C., Haller, H., Dietz, R., and von Harsdorf, R. (1999) Requirement for protein kinase C in reactive oxygen species-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells, *Circulation 100*, 967-973.
- 255. Trujillo M., A. M. N., Piacenza L., Hugo M., Peluffo G., Radi R. (2013) Peroxynitrite as a Cytotoxic Effector Against *Trypanosoma Cruzi*: Oxidative Killing and Antioxidant Resistance Mechanisms, in Trypanosomatid Diseases: Molecular Routes to Drug Discovery (eds T. Jäger, O. Koch and L. Flohé), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

Publicaciones durante el desarrollo de esta tesis

Contribuciones originales

1. Resultados de esta tesis

Mycothiol/mycoredoxin 1-dependent reduction of the peroxiredoxin AhpE from Mycobacterium tuberculosis.

Hugo M, Van Laer K, Reyes AM, Vertommen D, Messens J, Radi R, Trujillo M. J Biol Chem. 2014 Feb 21;289(8):5228-39. doi: 10.1074/jbc.M113.510248. Epub 2013 Dec 30.

Oxidizing substrate specificity of Mycobacterium tuberculosis alkyl hydroperoxide reductase E: kinetics and mechanisms of oxidation and overoxidation. Reyes AM, **Hugo M**, Trostchansky A, Capece L, Radi R, Trujillo M. *Free Radic Biol Med*. 2011 Jul 15;51(2):464-73.

Thiol and sulfenic acid oxidation of AhpE, the one-cysteine peroxiredoxin from Mycobacterium tuberculosis: kinetics, acidity constants, and conformational dynamics. **Hugo M**, Turell L, Manta B, Botti H, Monteiro G, Netto LE, Alvarez B, Radi R, Trujillo M.

Biochemistry. 2009 Oct 13;48(40):9416-26.

El manuscrito con los resultados correpsondientes al capítulo 4 está en preparación.

2. Colaboraciones relacionadas a la tesis

Nitration transforms a sensitive peroxiredoxin 2 into a more active and robust peroxidase.

Randall LM, Manta B, **Hugo M**, Gil M, Batthyany C, Trujillo M, Poole LB, Denicola A. *J Biol Chem*. 2014 Apr 9.

Structural and molecular basis of the peroxynitrite-mediated nitration and inactivation of Trypanosoma cruzi Fe-superoxide dismutases A and B: Disparate susceptibilities due to the repair of Tyr35 radical by Cys83 in Fe-SODB through intramolecular electron transfer.

Martinez A, Peluffo G, Petruk AA, **Hugo M**, Pineyro D, Demicheli V, Moreno D, Lima A, Batthyany C, Duran R, Robello C, Marti MA, Larrieux N, Buschiazzo A, Trujillo M, Radi R, Piacenza L.

J Biol Chem. 2014 Mar 10.

Hydroperoxide and peroxynitrite reductase activity of poplar thioredoxin-dependent glutathione peroxidase 5: kinetics, catalytic mechanism and oxidative inactivation. Selles B, **Hugo M**, Trujillo M, Srivastava V, Wingsle G, Jacquot JP, Radi R, Rouhier N. *Biochem J.* 2012 Mar 1;442(2):369-80. doi: 10.1042/BJ20111378.

The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2.

Manta B, Hugo M, Ortiz C, Ferrer-Sueta G, Trujillo M, Denicola A.

Arch Biochem Biophys. 2009 Apr 15;484(2):146-54. doi: 10.1016/j.abb.2008.11.017. Epub 2008 Nov 24.

Revisiones

Trypanothione: a unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. Manta B, Comini M, Medeiros A, **Hugo M**, Trujillo M, Radi R. Biochim Biophys Acta. 2013 May;1830(5):3199-216.

Capítulos de libros

Thiol-Dependent Peroxidases in Mycobacterium tuberculosis Antioxidant Defense. **Hugo M**, Radi R, Trujillo M *Understanding Tuberculosis - Deciphering the Secret Life of the Bacilli* (2012). InTech, Book3. p.: 293 – 316

Peroxynitrite as a cytotoxic effector against Trypanosoma cruzi: oxidative killing and antioxidant resistance mechanisms.

Trujillo M, Alvarez MN, Piacenza L, Hugo M, Peluffo G, Radi, R

Drug Discovery for Trypanosomatid Diseases (2013). v.: 4, Editorial: Wiley-VCH , Weinheim

Thiol and Sulfenic Acid Oxidation of AhpE, the One-Cysteine Peroxiredoxin from *Mycobacterium tuberculosis*: Kinetics, Acidity Constants, and Conformational Dynamics[†]

Martín Hugo,^{‡,§} Lucía Turell,^{§,II} Bruno Manta,^{§,⊥} Horacio Botti,^{§,⊥} Gisele Monteiro,[#] Luis E. S. Netto,[#] Beatriz Alvarez,^{§,II} Rafael Radi,^{‡,§} and Madia Trujillo^{*,‡,§}

[‡]Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, [§]Center for Free Radical and Biomedical Research, Facultad de Medicina and^{II}Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, [⊥]Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, and [#]Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Received July 16, 2009; Revised Manuscript Received September 5, 2009

ABSTRACT: Drug resistance and virulence of *Mycobacterium tuberculosis* are partially related to the pathogen's antioxidant systems. Peroxide detoxification in this bacterium is achieved by the heme-containing catalase peroxidase and different two-cysteine peroxiredoxins. M. tuberculosis genome also codifies for a putative onecysteine peroxiredoxin, alkyl hydroperoxide reductase E (MtAhpE). Its expression was previously demonstrated at a transcriptional level, and the crystallographic structure of the recombinant protein was resolved under reduced and oxidized states. Herein, we report that the conformation of MtAhpE changed depending on its single cysteine redox state, as reflected by different tryptophan fluorescence properties and changes in quaternary structure. Dynamics of fluorescence changes, complemented by competition kinetic assays, were used to perform protein functional studies. MtAhpE reduced peroxynitrite 2 orders of magnitude faster than hydrogen peroxide $(1.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ vs } 8.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ at pH 7.4 and } 25 \text{ °C}$, respectively). The latter also caused cysteine overoxidation to sulfinic acid, but at much slower rate constant (40 $M^{-1} s^{-1}$). The pK_a of the thiol in the reduced enzyme was 5.2, more than one unit lower than that of the sulfenic acid in the oxidized enzyme. The pH profile of hydrogen peroxide-mediated thiol and sulfenic acid oxidations indicated thiolate and sulfenate as the reacting species. The formation of sulfenic acid as well as the catalytic peroxidase activity of *Mt*AhpE was demonstrated using the artificial reducing substrate thionitrobenzoate. Taken together, our results indicate that MtAhpE is a relevant component in the antioxidant repertoire of M. tuberculosis probably involved in peroxide and specially peroxynitrite detoxification.

Tuberculosis $(TB)^1$ is a serious, often lethal infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, which affects about onethird of the human population. Multidrug resistance TB is an emerging problem of great public health concern worldwide, making new drug development a priority (1). This bacterium is able to live and proliferate within the phagosomes of activated macrophages, where it is exposed to a strong oxidative stress (2) that includes hydrogen peroxide (H₂O₂) and peroxynitrite² production. Reactive oxygen and nitrogen species are cytotoxic (3–5), and several lines of evidence indicate their role in the control of

M. tuberculosis infection (5-7). Thus, the mechanisms that allow the pathogen to cope with these species constitute an active field of investigation (2, 8, 9).

BIOCHEMISTRY

The antioxidant defense in *M. tuberculosis* is unusual in many aspects. While *M. tuberculosis* lacks the typical glutathione system, it contains millimolar concentrations of mycothiol [2-(N-acetylcysteinyl)amido-2-deoxy- α -D-glucopyranosylmyoinositol](10), mycothiol reductase (11), and different thiol disulfide oxidoreductases (12, 13). It also contains catalase peroxidase, a hemedependent peroxidase that reduces different peroxides including peroxynitrite, and is responsible for the activation of the first line antituberculosis prodrug isoniazid (14, 15). As expected, mutations of katG result in resistance to this drug (16), and interestingly, infective forms of katG mutants show increased expression of alkyl hydroperoxide reductase C (AhpC) (17), a member of the peroxired xin (Prx) family. *M. tuberculosis* also expresses thioredoxin peroxidase (TPx), another two-Cys Prx, which is known to react rapidly with peroxynitrite (9) and has been recently proved to be an important virulence factor in cellular and animal models of TB (18). In addition, M. tuberculosis genome codifies for three other Prxs (19). Among them, the hypothetical bacterioferritin comigratory proteins have proved to be important for survival under oxidative stress conditions in other organisms (20, 21). Finally, a gene for a putative one-Cys Prx, alkyl hydroperoxide reductase E (AhpE, annotated as Rv2238c), has also been identified in M.

[†]This work was supported by grants from Programa de Desarrollo Tecnológico (PDT 079), Ministerio de Educación y Cultura, Uruguay, to M.T. and B.A., from Howard Hughes Medical Institute and International Centre of Genetic Engineering and Biotechnology to R.R., and from FAPESP and INCT de Processos Redox em Biomedicina, Brazil, to L.E.S.N. and G.M. M.H., B.M., L.T., and H.B. were supported by fellowships from PEDECIBA-ANII, Uruguay.

^{*}To whom correspondence should be addressed. E-mail: madiat@ fmed.edu.uy. Telephone: (5982)9249561. Fax: (5982)9249563.

¹Abbreviations: TB, tuberculosis; C_P, peroxidatic cysteine; DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoate); dtpa, diethylenetriaminepentaacetic acid; DTT, dithiothreitol; GSH, glutathione; HRP, horseradish peroxidase; LiP, lignine peroxidase; MtAhpE, Mycobacterium tuberculosis alkyl hydroperoxide reductase E; NAC, N-acetylcysteine; NEM, N-ethylma-leimide; Prx, peroxiredoxin; TNB, 5-thio-2-nitrobenzoate.

²The term peroxynitrite is used to refer to the sum of peroxynitrite anion (ONOO⁻) and peroxynitrous acid (ONOOH) unless specified. IUPAC recommended names for ONOO⁻ and ONOOH are oxoperoxonitrate(1-) and hydrogen oxoperoxonitrate, respectively.

Article

tuberculsosis and is highly conserved among many other Mycobacteria (19, 22). The regulated expression of MtAhpE has been reported at a transcriptional level (23), and the crystallographic structures of the recombinant protein under reduced and oxidized states have been determined (24). In solution, the enzyme was reported to be present as a mixture of dimeric and octameric forms, but redox state-dependent changes in its quaternary structure, as observed for other Prxs (25), have not been previously investigated. The functional properties of MtAhpE have not been addressed so far. MtAhpE protein contains a single cysteine residue (Cys45) that is predicted to be the peroxidatic cysteine (C_P), since it is located in a typical PXXXTXXC motif, well conserved in the amino acidic sequence of Prx active sites. Moreover, structural data on the recombinant enzyme show that an arginine residue (Arg116) interacts by hydrogen bonding with Cys45 (~3.5 Å distant) allowing thiolate stabilization, another conserved feature among different Prxs (26).

During the oxidative part of the catalytic cycle of Prxs the thiolate in C_P (Prx-S⁻) reduces peroxide substrates such as hydrogen peroxide (H₂O₂), peroxynitrous acid (ONOOH), or organic peroxides (ROOH) to water, nitrite, or alcohols (ROH), respectively, in a two-electron oxidation process that leads to sulfenic acid (Prx-SOH) formation:

$$\begin{array}{c} H_2O_2 & HO^-\\ Prx-S^- + \begin{array}{c} ONOOH \end{array} \rightarrow Prx-SOH + \begin{array}{c} NO_2^-\\ ROOH & RO^- \end{array}$$
(1)

In the crystal structure of the oxidized form of MtAhpE, Cys45 was oxidized to a stable sulfenic acid (24), as previously reported for the human one-Cys Prx (27). In contrast to most two-Cys Prxs (28), the reducing step of one-Cys Prxs is still unclear (29–33).

Alternatively, and in the presence of high peroxide concentrations, sulfenic acid in Prxs can be overoxidized to sulfinic acid (Prx- SO_2H), through the reaction with a second molecule of oxidizing substrate, in a process that results in enzyme inactivation.

$$Prx-SOH + ROOH \rightarrow Prx-SO_2H + ROH$$
 (2)

Overoxidation of the mammalian one-Cys Prx has been detected in cellular systems (34). There is just one estimation for the secondorder rate constant of the reaction in eq 2, which is related to mammalian Prx 1 overoxidation by H_2O_2 (57 M^{-1} s⁻¹ at physiological pH (35) estimated from ref 36). The mechanism of the reaction, including the reacting species (RSO⁻ vs RSOH) as well as the p K_a of Prx sulfenic acids, which may affect the rate of the reaction at physiological pH, is far from being resolved.

In this work we demonstrate the peroxidatic activity of the putative one-cysteine Prx of *M. tuberculosis*, AhpE. Taking advantage of the different intrinsic fluorescence properties of this enzyme at its different redox states, or by using competition kinetic approaches, we investigated the enzymatic selectivity toward the main peroxide substrates the bacterium may encounter during infection. We performed mechanistic and kinetic studies on enzymatic overoxidation. The pK_a values of the thiol in the reduced enzyme as well as that of the sulfenic acid in the oxidized enzyme were determined. The results obtained add to our knowledge of the peroxide detoxification mechanisms in *M. tuberculosis*, an important issue for understanding the biology of this extremely successful human pathogen.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Horseradish peroxidase (HRP) and lignine peroxidase (LiP) were obtained from Sigma and Fluka, respectively. Argon (99.5% pure) was from AGA Gas Co., Montevideo, Uruguay. H_2O_2 was from Mallinckrodt Chemicals. Peroxynitrite was synthesized from H_2O_2 and nitrous acid as described previously (*37*, *38*). Treatment of a stock solution of peroxynitrite with granular manganese dioxide eliminated H_2O_2 remaining from the synthesis. Nitrite contamination was typically less than 30% of peroxynitrite concentration. 5-Thio-2-nitrobenzoate (TNB) free of its disulfide, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoate) (DTNB), was synthesized as previously described (*39*). All other reagents were obtained from standard commercial sources and used as received.

All experiments were performed in 100 mM sodium phosphate buffer containing 0.1 mM diethylenetriaminepentaacetic acid (dtpa), pH 7.4 and 25 °C, unless otherwise indicated.

Protein Expression and Purification. MtAhpE (TB Database gene name Rv2238c) was expressed in Escherichia coli BL21(DE3) (expression vector pDEST17) as a recombinant His-tagged protein and purified as previously described (24). The MtAhpE mutant C45S was generated by site-directed mutagenesis using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) as described by the manufacturer (previously reported in ref 31) using the following primers: C45Sfw, 5' CAC GGG CAT CTC ACA GGG CGA GC 3'; C45Srev, 5' GCT CGC CCT GTG AGA TGC CCG TG 3'.

Peroxide, Protein, and Thiol Quantitation. The concentration of H₂O₂ stock solutions was measured at 240 nm ($\varepsilon_{240} = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (40). Peroxynitrite concentration was determined at alkaline pH at 302 nm ($\varepsilon_{302} = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (38). MtAhpE concentration was determined spectrophotometrically at 280 nm, using a molar absorption coefficient of 23950 M⁻¹ cm⁻¹ calculated according to ref 41, that was in good agreement with protein measurements by the biuret assay (not shown). Protein thiol content was measured by Ellman's assay ($\varepsilon_{412} = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Recently purified MtAhpE typically contained ~0.9 thiol/protein, and thiol content diminished with storage (under argon atmosphere, at -80 °C).³ The concentrations of HRP and LiP were determined by their absorption at the Soret band ($\varepsilon_{403} = 1.02 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (42) and $\varepsilon_{409} = 1.68 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (43), respectively).

Protein Thiol Reduction and Alkylation. MtAhpE was reduced immediately before use by incubation with 1 mM DTT for 30 min at 4 °C. Excess reductant was removed either by gel filtration using a HiTrap column (Amersham Bioscience) and UV–vis detection at 280 nm or, when using small volumes (<200 μ L), by passing the enzyme twice through Microbiospin 6 chromatography columns (Bio-Rad). Samples were extensively purged with argon once collected. For protein thiol alkylation, previously reduced *Mt*AhpE was incubated with *N*-ethylmaleimide (NEM) (5 or 10 mM) for 30 min at 4 °C, and excess NEM was removed as described for DTT.

Changes in the Intrinsic Fluorescence Intensity of MtAhpE. Emission spectra ($\lambda_{exc} = 280$ or 295 nm) of wild-type or C45S enzyme (1.5 μ M) were obtained using an Aminco Bowman Series 2 luminescence spectrophotometer.

Size-Exclusion Chromatography. MtAhpE (250 μ L, 0.1 mg of protein) under different redox states was resolved on a Superdex 75 10/300 column, preequilibrated with phosphate buffer (20 mM, 150 mM NaCl, pH 7.4), with UV detection

³Due to the rapid reaction of oxidized MtAhpE with TNB (see below), that could result in thiol content underestimation, thiol quantitations were performed in prereduced enzyme or in recently purified enzyme.

at 215 and 280 nm and a flow rate of 0.5 mL/min at 25 °C. The column was calibrated with molecular weight standards (Sigma-Aldrich).

Electrophoretic Analysis of MtAhpE. SDS–PAGE electrophoresis of reduced and oxidized enzyme under nonreducing conditions was performed using 13% acrylamide gels ($0.2 \mu g$ of protein per well) that were silver stained for protein detection.

Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) analysis. Freshly purified enzyme was incubated with the indicated concentrations of NEM (during 30 min), DTT or H_2O_2 (during 2 min), or H_2O_2 (during 1 min) followed by DTT, N-acetylcysteine (NAC), or glutathione (GSH) addition for 2 minutes in the above-mentioned buffer, pH 7.4 and 25 °C. Samples were passed twice through Microbiospin 6 columns equilibrated with H₂O, diluted into 1:1 acetonitrile:H₂O, 0.1% acetic acid, pH 4.5, to a final concentration of 1 μ M and loaded into a QTRAP 2000 mass spectrometer (Applied Biosystems/ MDS Sciex). Positive ion ESI mass spectra were collected using an m/z range of 700–1700, with ion spray voltage (IS) 5000 V, declustering potential (DP) 60 V, and entrance potential (EP) 10 V. Data acquisition was set to 3 min, and the final mass of MtAhpE was calculated by automatic deconvolution using Analyst 1.4 software.

Kinetics of MtAhpE Oxidation and Overoxidation Studied Using a Direct Fluorometric Approach. The rate constants of *Mt*AhpE oxidation by H_2O_2 and peroxynitrite (eq 1) were determined by taking advantage of the decrease in protein intrinsic fluorescence intensity ($\lambda_{exc} = 280$ nm) that occurred upon oxidation. Reduced, NEM-blocked wild-type MtAhpE or the C45S mutant (MtAhpEC45S) was rapidly mixed with either peroxynitrite or H2O2 in excess in an Applied Photophysics SX-17MV stopped-flow spectrophotometer with a mixing time of < 2 ms. Although peroxynitrite is an unstable species, it decays with a first-order rate constant of 0.27 s⁻¹ at pH 7.4 and 25 °C, much slower than the reaction with MtAhpE, so that pseudofirst-order conditions are maintained over the time course of the reaction (<0.1 s). Observed rate constants of fluorescence decrease (k_{obs}) were determined by fitting stopped-flow data to single exponential functions. Second-order rate constants for the reaction between prereduced enzyme and peroxynitrite or H_2O_2 were obtained from the slope of the plot of k_{obs} versus oxidant concentration.

For the determination of the rate constant of oxidized MtAhpE overoxidation by H₂O₂ (eq 2), we took advantage of the increase in the enzyme intrinsic fluorescence intensity that occurred when it was treated with a large excess of H₂O₂. Reduced or NEM-blocked wild-type MtAhpE (1 μ M) was mixed with H₂O₂ (100–450 μ M) in an Aminco Bowman Series 2 luminescence spectrophotometer, and time courses of fluorescence intensity change ($\lambda_{exc} = 295$ nm, $\lambda_{em} = 338$ nm) were registered. Second-order rate constants were obtained as described above for enzyme oxidation.

The p K_a of both the peroxidatic thiol group in reduced MtAhpE and the sulfenic acid in oxidized MtAhpE were measured by determining the rate constants of H₂O₂-mediated MtAhpE C_P oxidation and overoxidation (eqs 1 and 2, respectively) at different pH values. Buffer systems used were sodium phosphate, 100 mM, plus 0.1 mM dtpa (pH 5.8–7.8) or sodium acetate buffer, 100 mM, plus 0.1 mM dtpa (pH < 5.8), with NaCl additions so as to keep ionic strength constant. When analyzing the effect of pH on overoxidation, the reduced enzyme was previously oxidized to sulfenic acid by treatment with an

equimolar amount of H_2O_2 for 2 min at pH 7.4, 25 °C, and then exposed to excess H_2O_2 at the pH of interest. Rate constants for oxidation and overoxidation (k_{app}) were plotted against pH and fitted to

$$k_{\rm app} = k_2 \frac{K_{\rm AH}}{K_{\rm AH} + [\rm H^+]} \tag{3}$$

where k_{app} is the observed rate constant for MtAhpE thiol oxidation (k_{AhpE-S^-app}) or overoxidation ($k_{AhpE-SO^-app}$) at a given pH value, k_2 represents the maximum rate constants for the reactions at alkaline pH, i.e., the pH-independent rate constants, and K_{AH} is the equilibrium constant for the deprotonation processes, where AH represents either the peroxidatic thiol or the sulfenic acid intermediate.

Kinetics of MtAhpE Oxidation Studied by a Competition Approach. The second-order rate constants for the reactions between reduced MtAhpE and H_2O_2 or peroxynitrite were also determined by competition assays as reported previously (44–47). HRP was used to determine the rate constant for the reaction between MtAhpE and peroxynitrite, whereas LiP was used for determining that between MtAhpE and H_2O_2 . In both cases, the reactions were followed using an Applied Photophysics SX-17MV stopped-flow spectrophotometer.

In the case of peroxynitrite-mediated HRP oxidation, the reaction was followed at 398 nm and HRP-compound I concentration was measured using a $\Delta \varepsilon_{398} = 4.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (48). The rate constant of peroxynitrite-mediated HRP oxidation to compound I was determined as $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ under the experimental conditions employed herein (data not shown) in agreement with previously published data (49). The rate constant of peroxynitrite-mediated *Mt*AhpE oxidation was calculated as previously (44–47).

In the case of H₂O₂-mediated LiP oxidation, the reaction was followed at 401 nm (isosbestic point for LiP-compound I and II determined by us; data not shown), and LiP-compound I concentration was determined assuming an equimolar reaction with H₂O₂. The rate constant for H₂O₂-mediated LiP oxidation to compound I was measured as $6.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at pH 7.4 and 25 °C (data not shown), in agreement with previously reported values (43). The rate constant of H₂O₂-mediated *Mt*AhpE oxidation was calculated as above.

Computer-assisted simulations were performed using GEPA-SI 3 program (50, 51).

Kinetics of MtAhpE Reaction with TNB and DTNB. The reactions were studied using a Varian Cary 50 spectrophotometer with a stopped-flow accessory (Applied Photophysics RX 2000). Thionitrobenzoate has been previously used to quantify sulfenic acid formed in one-Cys Prxs and human serum albumin upon oxidation (39, 52). Herein, the kinetics of MtAhpE reduction by TNB was studied by mixing increasing concentrations of reduced MtAhpE ($0.5-2.5 \mu$ M) and TNB (74μ M) in one syringe with H₂O₂ (20 μ M) in the other syringe, at pH 7.4 and 25 °C, and recording TNB absorbance at 412 nm. The rate constant of reduced MtAhpE oxidation by DTNB was determined by measuring initial rates of TNB formation from the reaction between reduced MtAhpE (6μ M) with DTNB ($100-500 \mu$ M) at pH 7.4 and 25 °C.

RESULTS

MtAhpE Oxidation and Overoxidation Are Accompanied by Significant Structural Changes. (A) Changes on MtAhpE



FIGURE 1: Intrinsic fluorescence of MtAhpE under different redox states. (A) Fluorescence emission spectra ($\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$) of MtAhpE($1.5 \mu M, 0.83 \mu M$ thiol) without any further addition (solid line), plus $0.85 \mu M H_2O_2$ (dotted line), and plus 1 mM DTT (dashed line). (B) Prereduced $MtAhpE(1.0 \mu M)$ without any further addition (solid line) or after addition of 300 $\mu M H_2O_2$ for 1 min (dashed line) or 10 min (dotted line).

Fluorescence Intensity. When recombinant His-tagged MtAhpE $(1.5 \,\mu\text{M})$ was exposed to H₂O₂ (0.85 μ M), an important decrease in the intrinsic fluorescence intensity was observed (Figure 1A). This change was reverted by reduction with DTT (1 mM), which recovered intensities to even higher levels than initially (Figure 1A). This is in agreement with the fact that the enzyme used had been stored for some days and was only partially reduced. No change in the fluorescence intensity was observed when either reduced MtAhpE previously treated with NEM or MtAhpEC45S was exposed to the same treatments (not shown). These data confirm that the oxidation of the peroxidatic (and single) cysteine of MtAhpE is required for the observed fluorescence intensity changes. Moreover, when prereduced MtAhpE $(1 \,\mu\text{M})$ was treated with a large excess of H₂O₂ (300 μ M), there was an initial fast decrease followed by a slower increase in protein fluorescence intensity (Figure 1B). Again, these changes were precluded by pretreatment of the enzyme with NEM in excess (not shown), indicating the participation of the cysteine residue in the process, and supporting that H_2O_2 -dependent overoxidation of the sulfenic acid of the oxidized enzyme (C_P-SOH) to sulfinic acid (C_P-SO₂H) was responsible for the fluorescence recovery (see below).

(B) MtAhpE Quaternary Structure Is Dependent on Its Oxidation State. Reduced MtAhpE migrated as a monomer, and only a slight fraction of oxidized enzyme formed intramolecular disulfides when analyzed by nonreducing SDS-PAGE



FIGURE 2: Redox-mediated changes in quaternary structure of MtAhpE. (A) Elution profiles of MtAhpE on a Superdex 75 10/300 column. MtAhpE (0.1 mg) was loaded onto a column previously equilibrated with 20 mM phosphate buffer, and 150 mM NaCl, pH 7.4, with no previous treatment (solid line), upon incubation with equimolar H₂O₂ (1 min, dashed line; 60 min, dashed-dotted line), and after addition of a 20-fold excess of H₂O₂ (10 min, dotted line). Arrows indicate the position of molecular mass calibrants: from a to d, 67, 43, 25, and 13.7 kDa. (B) Solid line, the same as in (A) after treatment with equimolar amounts of H₂O₂ for 60 min and with further addition of 1 mM DTT (dashed line) or 2 mM *N*-acetylcysteine (dotted line).

electrophoresis (not shown). In size exclusion chromatography, reduced enzyme (60 μ M) eluted as a unique peak with an elution volume corresponding to a dimer (Figure 2A, solid line). Oxidation of the enzyme with an equimolar amount of H₂O₂ resulted in the slow formation of higher molecular weight species, while addition of excess H₂O₂ to promote enzyme overoxidation resulted again in a dimeric form (Figure 2A). The higher molecular weight species formed after incubation with equimolar H₂O₂ were reversed by the addition of 1 mM DTT (Figure 2B). Interestingly, addition of 1 mM N-acetylcysteine (NAC; low molecular weight thiol that can be formed from mycothiol enzymatic degradation in *M. tuberculosis* (53)) to *Mt*AhpE treated with equimolar H_2O_2 resulted in a destabilization of the dimer, leading to lower molecular weight species (Figure 2B). This could be due to the formation of a mixed disulfide through the reaction between the cysteine sulfenic acid (C_P-SOH) in oxidized MtAhpE and the thiol group of NAC, as confirmed by mass spectrometry (see below). These results show that the quaternary structure of the protein is tightly controlled by the redox state of the peroxidatic cysteine.

Mass Spectrometry Analysis of Cysteine Modifications in MtAhpE. Recently purified enzyme without further additions displayed a molecular mass of 19319 Da (Figure 3A). When



FIGURE 3: Covalent modifications of the MtAhpE cysteine residue. Electrospray ionization mass spectrometry analysis of MtAhpE (50 μ M) with no further treatment (A), incubated with 5 mM NEM during 30 min (B), oxidized with equimolar H₂O₂ for 1 min and then treated with either 1 mM DTT (C), 2 mM NAC (D), or 2 mM GSH (E), and treated with excess H₂O₂ (250 μ M) during 2 min (F). Samples were desalted and diluted to 1 μ M concentration for mass spectrometric analysis.

 $MtAhpE(50 \,\mu M)$ was incubated with excess NEM (5 mM during 30 min), the observed shift in molecular weight was consistent with the complete alkylation of C_P, indicating a $k > 0.5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for the reaction at pH 7.4 and 25 °C (Figure 3B). Upon oxidation of MtAhpE (50 μ M) with equimolar H₂O₂ we were unable to detect the free sulfenic acid form of the enzyme. In the search for potential traps for sulfenic acid in oxidized MtAhpE, the enzyme was exposed to equimolar H_2O_2 and 2 min later, it was incubated with excess DTT, NAC, or GSH. In the first case, a peak of 19319 Da was observed (Figure 3C), corresponding to the reduced enzyme. Incubation with NAC or GSH caused a mass shift of +162 and +306, respectively (Figure 3D,E), due to the formation of mixed disulfides with the oxidized enzyme. Finally, upon exposure of the enzyme (50 μ M) to excess H₂O₂ (250 μ M) for 2 min, a mass increment of 32 Da was detected, consistent with the addition of two oxygen atoms (Figure 3F).

Kinetics of Enzyme Oxidation by Peroxynitrite. (A) Direct Approach Determinations. Addition of increasing concentrations of excess peroxynitrite led to a dose-dependent increase in the observed rate constants of MtAhpE intrinsic fluorescence change (Figure 4A, line a and inset). Changes were not observed when the C45S mutated enzyme was used (Figure 4A, line b) or by mixing wild-type enzyme with peroxynitrite decomposition products (Figure 4A, line c). From the slope of the plot shown in Figure 4A inset, a second-order rate constant of $(1.9 \pm 0.2) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at pH 7.4 and 25 °C was determined.

(B) Competition Approach Measurements. The reaction between reduced MtAhpE and peroxynitrite was also studied by competition with HRP. As expected, increasing concentrations of MtAhpE inhibited peroxynitrite-mediated HRP-compound I formation (Figure 4B, inset). From these data the second-order rate constant for peroxynitrite reduction by MtAhpE was calculated as $(1.7 \pm 0.6) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at pH 7.4 and 25 °C, in close agreement with the value obtained by the fluorescence approach. Total compound I formation at different MtAhpE concentrations were consistent with yields expected according to computer-assisted simulations, assuming a simple competition system (Figure 4B).

Kinetics of Enzyme Oxidation by H_2O_2 . (A) Direct Approach Determinations. Mixing with increasing concentrations of excess H_2O_2 led to a dose-dependent increase in the observed rate constants of *Mt*AhpE fluorescence intensity change (Figure 5A). The second-order rate constant of this reaction was determined as $(8.2 \pm 1.5) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at pH 7.4 and 25 °C (Figure 5A, inset).



FIGURE 4: Kinetics of peroxynitrite-mediated MtAhpE oxidation. (A) Prereduced wild-type (a) or C45S MtAhpE (b) (0.25 μ M) was rapidly mixed with peroxynitrite (1.15 and 3.3 μ M, respectively) in sodium phosphate buffer, 100 mM, containing 0.1 mM dtpa, pH 7.4 and 25 °C, and the time-dependent decrease in total emission fluorescence intensity was determined. (c) As in (a) but using predecomposed peroxynitrite (3.3 μ M). The gray trace represents the fit of experimental data in (a) to a single exponential function. Inset: Effect of increasing peroxynitrite concentrations on the observed rate constants (k_{obs}) of fluorescence change. (B) HRP (5 μ M) was rapidly mixed with peroxynitrite (1.0 μ M) in the presence of increasing concentrations of prereduced MtAhpE. The concentration of compound I formed at each *Mt*AhpE concentration (squares) was determined. The continuous line represents the computerassisted simulation of compound I yields according to a simple competition system using the calculated rate constant ($k_2 = (1.7 \pm 0.6) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Inset: Time courses of HRP oxidation by peroxynitrite in the presence of increasing reduced MtAhpE concentrations (from bottom to top: 0, 0.47, 0.94, 1.9, and 2.8 μ M).

Second-order rate constants for H₂O₂-mediated MtAhpE oxidation were faster at alkaline pHs (Figure 5B), indicating that thiolate in C_P was the reacting species, in agreement with previously proposed mechanism of reaction (54, 55). MtAhpE was unstable and precipitated under low pH conditions (data not shown), thus limiting the pH range of our studies (pH > 4.5). Amplitudes of fluorescence change decreased at acidic pH, but still k_{obs} values linearly depended on oxidant concentration. The p K_a of the peroxidatic thiol was estimated as 5.2. This is, to our knowledge, the first p K_a value reported for a 1-Cys Prx.

(B) Competition Approach Measurements. In order to confirm the value for k_2 for H₂O₂-mediated MtAhpE oxidation obtained above, the reaction was also studied by a competition approach (44, 45). Up to 15 μ M MtAhpE failed to inhibit compound I formation from the reaction between HRP (1 μ M)



FIGURE 5: Kinetics of H2O2-mediated MtAhpE oxidation and peroxidatic thiol pK_a determination. (A) Prereduced MtAhpE (1.0 μ M) was rapidly mixed with H₂O₂ (20 μ M) in sodium phosphate buffer, 100 mM, containing 0.1 mM dtpa, pH 7.4 and 25 °C, and the time-dependent decrease in total emission fluorescence ($\lambda_{ex} = 280$ nm) was followed. The gray trace represents the best fit to a single exponential function. Inset: Effect of increasing H_2O_2 concentrations on the observed rate constants (k_{obs}) of fluorescence change, from which the apparent rate constant of the reaction at pH 7.4 was obtained. (B) Same as in (A) but performed in sodium acetate or sodium phosphate buffers of different pHs as indicated under Materials and Methods. Apparent second-order rate constants for the reaction between reduced enzyme and H_2O_2 obtained (\bullet) were plotted vs pH, and data points were fitted to eq 3 (continuous line). (C) Time courses of LiP $(5 \,\mu\text{M})$ oxidation by H₂O₂ $(1.0 \,\mu\text{M})$ in the presence of increasing concentrations of reduced MtAhpE (from bottom to top: 0, 3.3, 6.6, and 19.8 µM).



FIGURE 6: Kinetics of H₂O₂-mediated *Mt*AhpE overoxidation and sulfenic acid p*K*_a determination. (A) Reduced (a) or alkylated (b) *Mt*AhpE (1.0 μ M) was mixed with H₂O₂ (230 μ M) in sodium phosphate buffer, 100 mM, containing 0.1 mM dtpa, pH 7.4 and 25 °C, and the time-dependent protein fluorescence increase (λ_{ex} = 295 nm, λ_{em} = 338 nm) was determined. The gray trace represents the fit of experimental data in (a) to a single exponential function. Inset: Effect of increasing H₂O₂ concentrations on the observed rate constants (k_{obs}) of fluorescence change, from which the apparent rate constant of the reaction at pH 7.4 was obtained. (B) Same as in (A) but performed in sodium phosphate buffers (100 mM containing 0.1 mM dtpa) of indicated pHs. Apparent second-order rate constants for the reaction between reduced enzyme and H₂O₂ obtained (**m**) were plotted vs pH, and data points were fitted to eq 3 (continuous line).

and $0.75 \,\mu$ M H₂O₂ (not shown). Since the reaction of H₂O₂ with HRP is 2 orders of magnitude faster than with *Mt*AhpE according to the direct approach, high quantities of *Mt*AhpE (>100-fold excess over HRP) would be required to inhibit HRP-compound I formation. So, we selected another peroxidase, lignine peroxidase (LiP) (E.C. 1.11.1.14) which is known to react with H₂O₂ to form compound I with a slower rate constant than HRP. The addition of increasing concentrations of reduced *Mt*AhpE produced a dose-dependent inhibition of LiP-compound I formation (Figure 5C). The second-order rate constant for H₂O₂ reduction by *Mt*AhpE was calculated as (7 ± 3) × 10⁴ M⁻¹ s⁻¹ at pH 7.4 and 25 °C, which is in excellent agreement with the value obtained by the fluorometric approach.

Kinetics of Enzyme Overoxidation by H_2O_2 . The kinetics of H_2O_2 -mediated MtAhpE overoxidation to sulfinic acid was studied by taking advantage of the increase in intrinsic fluorescence intensity that took place during oxidized MtAhpE exposure to high excess oxidant concentrations, as observed in Figure 1B. Addition of increasing concentrations of H_2O_2 $(100-500 \ \mu\text{M})$ caused a dose-dependent increase in the observed rate constants of the intrinsic fluorescence change of MtAhpE (1 μ M), and a rate constant of $40 \pm 3 \ M^{-1} \ s^{-1}$ at pH 7.4 and 25 °C was determined. The enzyme previously incubated with NEM (5 mM, 30 min) exhibited no significant change in its fluorescence intensity (Figure 6A), that together with the +32 increase in protein molecular weight (Figure 3F) confirmed that the mentioned change was due to C_P overoxidation.

Apparent second-order rate constants of overoxidation were higher at alkaline pHs (Figure 6B), indicating a mechanism of reaction where sulfenate reacted with H₂O₂. The pH-independent rate constant of the reaction was $42 \pm 2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A p K_a value for *Mt*AhpE sulfenic acid of 6.6 ± 0.1 was determined, very similar to the p K_a value previously reported for the sulfenic acid intermediate formed in *Salmonella typhimurium* AhpC, a typical two-cysteine Prx (56).

Catalytic Consumption of Hydrogen Peroxide with Thionitrobenzoate as Reductant. When reduced MtAhpE (2.5 μ M) and TNB (70 μ M) were mixed with H₂O₂ (20 μ M), a decrease in TNB concentration was observed (Figure 7A). Under our experimental conditions, and considering the second-order rate constant reported herein, H₂O₂-mediated MtAhpE oxidation to sulfenic acid occurs almost immediately ($t_{1/2} = 0.42$ s). Furthermore, the oxidation of TNB by H₂O₂ is negligible (k =0.45 M⁻¹ s⁻¹ at pH 7.4 and 25 °C, data not shown). Thus, any decrease in TNB concentration observed would be due to its reaction with oxidized enzyme. Time courses of the reaction were biphasic, with a rapid phase that lasted about 15 s followed by a slower TNB oxidation. Data fitted an exponential plus straight line equation:

$$[TNB] = A \exp(-k_{obs}t) + St + offset$$
(4)

where A represents the amplitude, k_{obs} is the pseudo-first-order rate constant of the first phase, and S represents the slope of the second phase. The biphasic decay in TNB thus presented typical pre-steady-state kinetics, where the fast consumption of TNB by sulfenic acid (burst) was followed by the rate-limiting turnover of the enzyme. Thus, in addition to reactivity to sulfenic acid to form a mixed disulfide, TNB reacted with the latter, yielding the reduced form of the enzyme which in turn could be again oxidized by H₂O₂ constituting a catalytic cycle:

 $MtAhpE-SH+H_2O_2 \rightarrow MtAhpE-SOH+OH^-$ (very fast) (5)

 $MtAhpE-SOH+TNB \rightarrow MtAhpE-STNB+OH^{-}$ (fast) (6)

$$MtAhpE-STNB+TNB \Rightarrow MtAhpE-SH+DTNB$$
 (slow) (7)

The reaction finished after ~60 min, and the total consumption of TNB was twice the concentration of H₂O₂ used, confirming the catalytic mechanism proposed (not shown). The amplitude of the exponential phase was proportional to the enzyme concentration as expected for burst kinetics (Figure 7A, inset) and represented the amount of sulfenic acid that could be detected through mixed disulfide formation in our conditions, 77% of MtAhpE. The rate constant for the reaction of TNB with sulfenic acid (eq 6) was calculated after dividing k_{obs} by [TNB] as (1.5 ± 0.3) × 10³ M⁻¹ s⁻¹ and was independent of the enzyme concentration (data not shown). The rate constant for the reaction between the mixed disulfide and TNB (eq 7) was estimated from the plot of -(S) versus A (i.e., MtAhpE-STNB concentration), after dividing the slope by TNB concentration,



FIGURE 7: Catalytic reduction of MtAhpE by TNB. (A) Reduced MtAhpE (2.5 μ M) and TNB (70 μ M) in one syringe were mixed with H₂O₂ (20 μ M) in the second syringe using a stopped-flow accessory. The decrease in TNB concentration was followed at 412 nm (black trace). The gray trace represents the best fit to eq 4: [TNB] = 1.80 exp(-0.105t) - 0.037t + 72.03. Inset: Increasing concentrations of MtAhpE were used (0.5–2.5 μ M), and the amplitudes of the first phase (A) obtained from eq 4 were plotted against [MtAhpE]. (B) The slopes of the second phase (-*S*), obtained from the fit to eq 4, were plotted against (A).

giving a value of 266 $M^{-1} s^{-1}$ (Figure 7B). Finally, the rate constant of the reaction between reduced *Mt*AhpE and DTNB (reverse of eq 7) was measured as $180 \pm 9 M^{-1} s^{-1}$ at pH 7.4 and 25 °C (not shown).

DISCUSSION

Oxidation of recombinant MtAhpE occurred with a rapid decrease in its fluorescence intensity, which was reverted by DTT (Figure 1A), as well as by the addition of high excess concentrations of the oxidant (Figure 1B). These changes occurred when exciting either at 280 (not shown) or 295 nm (Figure 1A,B), indicating that at least one of the three tryptophan residues present in the protein sequence is involved in the process. Changes in fluorescence intensity pointed toward structural modifications of the protein under different redox states, which caused differential quenching of tryptophan fluorescence by neighboring, not yet identified, amino acid residues (57). Reduced MtAhpE was a noncovalent dimer in solution and oligomerized upon treatment with equimolar concentrations of H_2O_2 . These changes in quaternary structure were much slower and thus were not responsible for the fluorescence intensity decrease (Figure 2A) and were reverted by protein reduction

(Figure 2B). Oligomerization did not occur when the enzyme was exposed to high excess oxidant concentrations that caused overoxidation (Figure 2A). These data are consistent with the reported crystallography structure of MtAhpE, that evidenced important differences in conformation at reduced versus oxidized states⁴ (24). Although the structure of the overoxidized form of the enzyme is not available, our data suggest that reduced and overoxidized forms of *Mt*AhpE have similar conformations, as reported for 2-Cys Prxs (36). Oxidation of the thiol by equimolar peroxide concentrations led to sulfenic acid formation, that was trapped by GSH, NAC, and TNB leading to mixed disulfide formation (Figures 3D,E and 7A) and that was reduced by DTT and TNB (Figures 3C and 7B). This is in agreement with crystallography data which showed that the cysteine residue was oxidized to sulfenic acid in the oxidized form of the enzyme (24) and with our results indicating that only a slight fraction of the enzyme formed intermolecular disulfides upon oxidation.

The fact that the observed rate constant of fluorescence decrease showed a linear relationship with oxidant concentration indicated that oxidation was rate-limiting the overall process leading to changes in fluorescent intensity (Figures 4A and 5A). This was confirmed by using alternative approaches based on competition kinetics that yielded very similar k values (Figure 4A versus Figure 4B; Figure 5A versus Figure 5C). As in the case of human Prx5, but contrary to what we observed for human red blood cell Prx2, or was reported for mammal Prx 6, bacterial AhpC, or yeast TSA1 and TSA2, peroxynitrite-mediated MtAhpE oxidation was at least 2 orders of magnitude faster than that mediated by H_2O_2 (Table 1), indicating that the enzyme is a highly selective peroxidase. In general, kinetics of reactions of low molecular weight thiols with different peroxides follow the trend indicated by Edwards; i.e., those peroxides with the lower pK_a of the leaving group react faster than the others (58). The trend appears to be maintained in the case of $MtAhpEC_{P}$, at least for the peroxides tested so far. However, it is lost in many Prxs (46). Thus, the molecular basis for oxidizing substrate specificity in Prxs is intriguing, and its rationalization will require a thorough combined analysis of kinetic and structural data for Prxs of different subfamilies.

Thiolates are known to be the nucleophile species during peroxide reduction, and therefore peroxidatic thiol pK_a could affect this reactivity. In the case of MtAhpE this was 5.2 (Figure 4B), being the first determination for a 1-Cys Prx. A low pK_a value indicates that the thiol would be almost totally in its reactive form at pHs the enzyme is expected to encounter *in vivo*. This value is similar to those reported for other, 2-cys Prxs ($\leq 5-6.3$ (59)), in agreement with the similar active site geometry.

MtAhpE catalytic activity requires sulfenic acid reduction. Oxidized MtAhpE formed mixed disulfides with different monothiols tested (Figure 3D,E). For selected 1-Cys Prxs, mixed disulfide formation with GSH and their reduction have been reported (29, 30, 32). However, Mycobacteria lack glutathione and contain a particular set of low molecular weight thiols (10) and thiol-disulfide reductases (13), and evidence for enzymatic routes for MtAhpE-mixed disulfide reduction is lacking so far. Although we did not identify potential natural reducing substrates for the enzyme, we succeeded in designing a spectrophotometric

⁴Although the crystal structure of reduced enzyme reported was composed by two asymmetric dimers (24), for which we found no evidence in our gel filtration experiments, this probably reflects different experimental conditions and/or labile enzyme dimer association.

| Prx | Prx type | $k_{2 H_2 O_2} (M^{-1} s^{-1})$ | $k_{2 \text{ ONOOH}} (\mathrm{M}^{-1} \mathrm{s}^{-1})$ | ref |
|----------------------|----------------|---------------------------------|---|-----------|
| S. typhimurium AhpC | typical 2-Cys | $4 	imes 10^{7 b}$ | | 65 |
| | · · · · | | $1.5 \times 10^{6 c}$ | 62 |
| M. tuberculosis AhpE | 1-Cys | 8.2×10^4 | 1.9×10^{7} | this work |
| M. tuberculosis TPx | atypical 2-Cys | ND | 1.5×10^{7} | 9 |
| H. sapiens Prx 2 | typical 2-Cys | 1.3×10^7 | | 45 |
| | | 1.0×10^{8} | 1.4×10^{7} | 47 |
| H. sapiens Prx 5 | atypical 2-Cys | | 7×10^{7d} | 67 |
| | | 3×10^{5} | 6.7×10^{7d} | 46 |
| S. cerevisiae Tsa1 | typical 2-Cys | 2.2×10^7 | 7.4×10^{5} | 68 |
| S. cerevisiae Tsa2 | typical 2-Cys | 1.3×10^{7} | 5.1×10^{5} | 68 |

^{*a*}Rate constants were reported at pH 7.4 and 25 °C unless otherwise indicated. ND is not determined. ^{*b*}At pH 7. ^{*c*}At pH 6.75, a similar value was reported for peroxynitrite reduction by *M. tuberculosis* AhpC (62). ^{*d*}At pH 7.8.

method for easily measuring catalytic activity using the artificial reductant TNB. This reagent also allowed detecting and quantifying sulfenic acid in oxidized *Mt*AhpE (Figure 7).

As above-mentioned, excess H_2O_2 led to a rapid decrease followed by a slower increase in *Mt*AhpE fluorescence intensity that were precluded by thiol alkylation (Figures 1B and 6A). The observed rate constant of the second phase was linearly dependent on H₂O₂ concentration, again indicating that the bimolecular reaction was the rate-limiting step of the process (Figure 6A), and a + 32 molecular weight increase was detected (Figure 3F). Altogether, these data are indicative of H₂O₂mediated thiol overoxidation to sulfinic acid with a rate constant of 40 \pm 3 $M^{-1}\,s^{-1}$ at pH 7.4 and 25 °C. This value is very similar to the 57 M^{-1} s⁻¹ calculated previously for Prx 1 inactivation (35, 36) and much faster than reported rate constants for H₂O₂mediated oxidation of sulfenic acid in human serum albumin or streptococcal NADH peroxidase ($k = 0.4 \pm 0.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $0.14 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively (39, 60)). Moreover, rate constants of H₂O₂-mediated sulfenic acid oxidation were faster at alkaline pH, consistent with a mechanism of reaction where sulfenate is the reactive species, suggesting nucleophilic attack on the peroxidic oxygen (followed by rearrangement to sulfinic acid). The pH profile for this reaction allowed us to calculate the pK_a of the sulfenic acid at the oxidized enzyme as 6.6 ± 0.1 (Figure 6B), very similar to the reported pK_a (=6.1) of the sulfenic acid intermediate formed during peroxidatic thiol oxidation in the bacterial 2-Cys Prx AhpC (56). Since the intrabacterial pH of wild-type M. tuberculosis inside both nonactivated and IFN- γ -activated macrophages has been reported as 6.8-7.5 (61), >95% thiol and > 50% sulfenic acid would be deprotonated and therefore, at their reactive form with peroxides, in reduced and oxidized MtAhpE, respectively. Oxidative inactivation susceptibility is dictated by the competition between two processes: sulfenic acid oxidation to sulfinic acid vs its resolution. Our data give experimental support to the idea originally proposed by Wood et al. (36), indicating that rates of sulfenic acid oxidation are similar for different Prxs and that susceptibility to inactivation by overoxidation depends mainly in different rates of sulfenic acid reaction with the resolving thiol or substrate(s).

In conclusion, this work contributes to the functional characterization of the one-cysteine Prx codified in the genome of M. tuberculosis, MtAhpE, for which evidence of expression already exists at a transcriptional level (23). Its rapid reaction with peroxynitrite, which resulted as fast as with MtTPx and 10-fold faster than with catalase peroxidase (9, 15, 62), suggests that MtAhpE represents an important antioxidant defense against this cytotoxic molecule, which can be formed by activated

macrophages during infection (63). On the contrary, other M. tuberculosis enzymes, especially MtAhpC and catalase peroxidase, reduced H₂O₂ with a greater rate constant than MtAhpE (64, 65). However, it is important to consider at this point that preferential routes for peroxide reduction would be dictated not only by the rate constant, k, but by rates of reaction $(k \times [target])$. Concentrations of these enzymes are mostly unknown in M. tuberculosis and may change depending on different conditions (66). Thus, our in vitro data provide kinetic evidence indicating that *Mt*AhpE could play a role for selected cytotoxic peroxide detoxification, especially peroxynitrite, but further investigation will be required to understand its role in M. tuberculosis pathobiology. In this regard, it should be noted that although peroxidatic active site structure is conserved among different Prxs, MtAhpE structure differs in some aspects from Prxs present in mammal cells (24). Therefore, its functional and structural characterization is not only an important step toward the understanding the bacterial mechanisms of antioxidant defense but could also facilitate future investigation regarding its validation as a potential drug target for the treatment of the tuberculosis disease.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. Pedro Alzari from Institut Pasteur Paris, France, for kindly providing the plasmid of His-tag *Mt*AhpE and Dr. Gonzalo Peluffo from Universidad de la República, Uruguay, for assistance in mass spectrometry determinations.

REFERENCES

- WHO Report (2009) Global Tuberculosis Control: Epidemiology, Strategy, Financing, pp 6–33, World Health Organization.
- Zahrt, T. C., and Deretic, V. (2002) Reactive nitrogen and oxygen intermediates and bacterial defenses: unusual adaptations in *Myco-bacterium tuberculosis*. *Antioxid. Redox Signaling* 4, 141–159.
- Fang, F. C. (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 820–832.
- Nathan, C., and Shiloh, M. U. (2000) Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8841–8848.
- Shiloh, M. U., and Nathan, C. F. (2000) Reactive nitrogen intermediates and the pathogenesis of *Salmonella* and mycobacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 35–42.
- MacMicking, J. D., North, R. J., LaCourse, R., Mudgett, J. S., Shah, S. K., and Nathan, C. F. (1997) Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 94, 5243–5248.
- Nozaki, Y., Hasegawa, Y., Ichiyama, S., Nakashima, I., and Shimokata, K. (1997) Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 65, 3644–3647.
- Manca, C., Paul, S., Barry, C. E.III, Freedman, V. H., and Kaplan, G. (1999) *Mycobacterium tuberculosis* catalase and peroxidase activities

and resistance to oxidative killing in human monocytes in vitro. *Infect. Immun.* 67, 74–79.

- Jaeger, T., Budde, H., Flohe, L., Menge, U., Singh, M., Trujillo, M., and Radi, R. (2004) Multiple thioredoxin-mediated routes to detoxify hydroperoxides in *Mycobacterium tuberculosis*. Arch. Biochem. Biophys. 423, 182–191.
- Newton, G. L., Arnold, K., Price, M. S., Sherrill, C., Delcardayre, S. B., Aharonowitz, Y., Cohen, G., Davies, J., Fahey, R. C., and Davis, C. (1996) Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. *J. Bacteriol.* 178, 1990–1995.
- Patel, M. P., and Blanchard, J. S. (1999) Expression, purification, and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* mycothione reductase. *Biochemistry* 38, 11827–11833.
- Ordonez, E., Van Belle, K., Roos, G., De Galan, S., Letek, M., Gil, J. A., Wyns, L., Mateos, L. M., and Messens, J. (2009) Arsenate reductase, mycothiol, and mycoredoxin concert thiol/disulfide exchange. J. Biol. Chem. 284, 15107–15116.
- 13. den Hengst, C. D., and Buttner, M. J. (2008) Redox control in actinobacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 1201–1216.
- Timmins, G. S., and Deretic, V. (2006) Mechanisms of action of isoniazid. *Mol. Microbiol.* 62, 1220–1227.
- Wengenack, N. L., Jensen, M. P., Rusnak, F., and Stern, M. K. (1999) Mycobacterium tuberculosis KatG is a peroxynitritase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 256, 485–487.
- Wengenack, N. L., and Rusnak, F. (2001) Evidence for isoniaziddependent free radical generation catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* KatG and the isoniazid-resistant mutant KatG(S315T). *Biochemistry* 40, 8990–8996.
- Sherman, D. R., Mdluli, K., Hickey, M. J., Arain, T. M., Morris, S. L., Barry, C. E., and Stover, C. K. (1996) Compensatory ahpC gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis. Science* 272, 1641–1643.
- Hu, Y., and Coates, A. R. (2009) Acute and persistent *Mycobacterium* tuberculosis infections depend on the thiol peroxidase TpX. *PLoS* ONE 4, e5150.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, Squares, S., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S., and Barrell, B. G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature 393*, 537–544.
- 20. Kang, G. Y., Park, E. H., Kim, K., and Lim, C. J. (2009) Overexpression of bacterioferritin comigratory protein (Bcp) enhances viability and reduced glutathione level in the fission yeast under stress. *J. Microbiol.* 47, 60–67.
- Limauro, D., Pedone, E., Galdi, I., and Bartolucci, S. (2008) Peroxiredoxins as cellular guardians in *Sulfolobus solfataricus*: characterization of Bcp1, Bcp3 and Bcp4. *FEBS J.* 275, 2067–2077.
- 22. Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixera, F., Margis-Pinheiro, M., Ioannidis, V., Penel, C., Falquet, L., and Dunand, C. (2007) PeroxiBase: the peroxidase database. *Phytochemistry* 68, 1605–1611.
- Murphy, D. J., and Brown, J. R. (2007) Identification of gene targets against dormant phase *Mycobacterium tuberculosis* infections. *BMC Infect. Dis.* 7, 84.
- 24. Li, S., Peterson, N. A., Kim, M. Y., Kim, C. Y., Hung, L. W., Yu, M., Lekin, T., Segelke, B. W., Lott, J. S., and Baker, E. N. (2005) Crystal structure of AhpE from *Mycobacterium tuberculosis*, a 1-Cys peroxiredoxin. J. Mol. Biol. 346, 1035–1046.
- Wood, Z. A., Poole, L. B., Hantgan, R. R., and Karplus, P. A. (2002) Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry* 41, 5493–5504.
- Poole, L. B. (2007) The catalytic mechanism of peroxiredoxins. Subcell. Biochem. 44, 61–81.
- Choi, H. J., Kang, S. W., Yang, C. H., Rhee, S. G., and Ryu, S. E. (1998) Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 5, 400–406.
- Rhee, S. G., Chae, H. Z., and Kim, K. (2005) Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Biol. Med.* 38, 1543– 1552.
- 29. Ralat, L. A., Manevich, Y., Fisher, A. B., and Colman, R. F. (2006) Direct evidence for the formation of a complex between 1-cysteine peroxiredoxin and glutathione S-transferase pi with activity changes in both enzymes. *Biochemistry* 45, 360–372.

- Ralat, L. A., Misquitta, S. A., Manevich, Y., Fisher, A. B., and Colman, R. F. (2008) Characterization of the complex of glutathione S-transferase pi and 1-cysteine peroxiredoxin. Arch. Biochem. Biophys. 474, 109–118.
- Monteiro, G., Horta, B. B., Pimenta, D. C., Augusto, O., and Netto, L. E. (2007) Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104*, 4886–4891.
- Greetham, D., and Grant, C. M. (2009) Antioxidant activity of the yeast mitochondrial one-Cys peroxiredoxin is dependent on thioredoxin reductase and glutathione in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 29, 3229– 3240.
- 33. Pedrajas, J. R., Miranda-Vizuete, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J. A., and Spyrou, G. (2000) Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* 275, 16296–16301.
- 34. Kim, S. Y., Jo, H. Y., Kim, M. H., Cha, Y. Y., Choi, S. W., Shim, J. H., Kim, T. J., and Lee, K. Y. (2008) H₂O₂-dependent hyperoxidation of peroxiredoxin 6 (Prdx6) plays a role in cellular toxicity via up-regulation of iPLA2 activity. *J. Biol. Chem.* 283, 33563–33568.
- Stone, J. R. (2004) An assessment of proposed mechanisms for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 422, 119–124.
- Wood, Z. A., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2003) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300, 650–653.
- 37. Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 1620–1624.
- Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. J. Biol. Chem. 266, 4244–4250.
- 39. Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Ferrer-Sueta, G., Souza, J. M., Duran, R., Freeman, B. A., Radi, R., and Alvarez, B. (2008) Reactivity of sulfenic acid in human serum albumin. *Biochemistry* 47, 358–367.
- Claiborne, A., Miller, H., Parsonage, D., and Ross, R. P. (1993) Protein-sulfenic acid stabilization and function in enzyme catalysis and gene regulation. *FASEB J.* 7, 1483–1490.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4, 2411–2423.
- Schonbaum, G. R., and Lo, S. (1972) Interaction of peroxidases with aromatic peracids and alkyl peroxides. Product analysis. J. Biol. Chem. 247, 3353–3360.
- 43. Tien, M., Kirk, T. K., Bull, C., and Fee, J. A. (1986) Steady-state and transient-state kinetic studies on the oxidation of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol catalyzed by the ligninase of *Phanerocheate chrysosporium* Burds. J. Biol. Chem. 261, 1687–1693.
- 44. Ogusucu, R., Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L. E., and Augusto, O. (2007) Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. *Free Radical Biol. Med.* 42, 326–334.
- 45. Peskin, A. V., Low, F. M., Paton, L. N., Maghzal, G. J., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. C. (2007) The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H(2)O(2) is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. J. Biol. Chem. 282, 11885–11892.
- 46. Trujillo, M., Clippe, A., Manta, B., Ferrer-Sueta, G., Smeets, A., Declercq, J. P., Knoops, B., and Radi, R. (2007) Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 467, 95–106.
- Manta, B., Hugo, M., Ortiz, C., Ferrer-Sueta, G., Trujillo, M., and Denicola, A. (2008) The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. *Arch. Biochem. Biophys.* 484, 146–154.
- Hayashi, Y., and Yamazaki, I. (1979) The oxidation-reduction potentials of compound I/compound II and compound II/ferric couples of horseradish peroxidases A2 and C. J. Biol. Chem. 254, 9101–9106.
- Floris, R., Piersma, S. R., Yang, G., Jones, P., and Wever, R. (1993) Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase. *Eur. J. Biochem.* 215, 767–775.
- Mendes, P. (1993) GEPASI: a software package for modelling the dynamics, steady states and control of biochemical and other systems. *Comput. Appl. Biosci.* 9, 563–571.
- Mendes, P. (1997) Biochemistry by numbers: simulation of biochemical pathways with Gepasi 3. *Trends Biochem. Sci.* 22, 361–363.
- Peshenko, I. V., and Shichi, H. (2001) Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxynitrite. *Free Radical Biol. Med.* 31, 292–303.
- Steffek, M., Newton, G. L., Av-Gay, Y., and Fahey, R. C. (2003) Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* mycothiol S-conjugate amidase. *Biochemistry* 42, 12067–12076.
- Hofmann, B., Hecht, H. J., and Flohe, L. (2002) Peroxiredoxins. *Biol. Chem.* 383, 347–364.
- Wood, Z. A., Schroder, E., Harris, R. J., and Poole, L. B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 32–40.
- Poole, L. B., and Ellis, H. R. (2002) Identification of cysteine sulfenic acid in AhpC of alkyl hydroperoxide reductase. *Methods Enzymol.* 348, 122–136.
- 57. Lakowicz, J. R. (1999) Principles of Fluorescence Spectroscopy , 2nd ed.; Springer: New York.
- Edwards, J. O. (1962) Nucleophilic displacement on oxygen in peroxides, in Peroxide Reaction Mechanisms (Edwards, J. O., Ed.) pp 67–106, Interscience, New York.
- Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., and Radi, R. (2008) Peroxynitrite detoxification and its biologic implications. *Antioxid. Redox Signaling* 10, 1607–1620.
- Poole, L. B., and Claiborne, A. (1989) The non-flavin redox center of the streptococcal NADH peroxidase. II. Evidence for a stabilized cysteine-sulfenic acid. J. Biol. Chem. 264, 12330–12338.
- Vandal, O. H., Pierini, L. M., Schnappinger, D., Nathan, C. F., and Ehrt, S (2008) A membrane protein preserves intrabacterial pH in

intraphagosomal Mycobacterium tuberculosis. Nat. Med. 14, 849-854.

- Bryk, R., Griffin, P., and Nathan, C. (2000) Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* 407, 211–215.
- Alvarez, M. N., Piacenza, L., Irigoin, F., Peluffo, G., and Radi, R. (2004) Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to *Trypanosoma cruzi. Arch. Biochem. Biophys.* 432, 222–232.
- 64. Jakopitsch, C., Vlasits, J., Wiseman, B., Loewen, P. C., and Obinger, C. (2007) Redox intermediates in the catalase cycle of catalase peroxidases from *Synechocystis* PCC 6803, *Burkholderia pseudomallei*, and *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 46, 1183–1193.
- Parsonage, D., Karplus, P. A., and Poole, L. B. (2008) Substrate specificity and redox potential of AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105*, 8209–8214.
- 66. Springer, B., Master, S., Sander, P., Zahrt, T., McFalone, M., Song, J., Papavinasasundaram, K. G., Boettger, E., and Deretic, V. (2001) Silencing of oxidative stress response in *Mycobacterium tuberculosis*: expression patterns of ahpC in virulent and avirulent strains and effect of ahpC inactivation. *Infect. Immun.* 69, 5967–5973.
- Dubuisson, M., Vander Stricht, D., Clippe, A., Etienne, F., Nauser, T., Kissner, R., Koppenol, W. H., Rees, J. F., and Knoops, B. (2004) Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase. *FEBS Lett.* 571, 161–165.
- 68. Ogusucu, R., Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L. E., and Augusto, O. (2007) Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. *Free Radical Biol. Med.* 42, 326–334.



Contents lists available at ScienceDirect

Free Radical Biology & Medicine



journal homepage: www.elsevier.com/locate/freeradbiomed

Original Contribution

Oxidizing substrate specificity of *Mycobacterium tuberculosis* alkyl hydroperoxide reductase E: kinetics and mechanisms of oxidation and overoxidation

Aníbal M. Reyes ^{a,b}, Martín Hugo ^{a,b}, Andrés Trostchansky ^{a,b}, Luciana Capece ^c, Rafael Radi ^{a,b}, Madia Trujillo ^{a,b,*}

^a Departamento de Bioquímica, Universidad de la República, 11800 Montevideo, Uruguay

^b Center for Free Radical and Biomedical Research, Universidad de la República, 11800 Montevideo, Uruguay

^c Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física/INQUIMAE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

ARTICLE INFO

Article history: Received 23 December 2010 Revised 7 April 2011 Accepted 12 April 2011 Available online 17 April 2011

Keywords: Mycobacterium tuberculosis Peroxiredoxin Peroxidase Hydroperoxide Arachidonic acid Alkyl hydroperoxide reductase E Free radicals

ABSTRACT

Alkyl hydroperoxide reductase E (AhpE), a novel subgroup of the peroxiredoxin family, comprises *Mycobacterium tuberculosis* AhpE (*Mt*AhpE) and AhpE-like proteins present in many bacteria and archaea, for which functional characterization is scarce. We previously reported that *Mt*AhpE reacted ~10³ times faster with peroxynitrite than with hydrogen peroxide, but the molecular reasons for that remained unknown. Herein, we investigated the oxidizing substrate specificity and the oxidative inactivation of the enzyme. In most cases, both peroxidatic thiol oxidation and sulfenic acid overoxidation followed a trend in which those peroxides with the lower leaving-group pK_a reacted faster than others. These data are in agreement with the accepted mechanisms of thiol oxidation and support that overoxidation by fatty acid-derived hydroperoxides (~10⁸ and 10⁵ M⁻¹ s⁻¹, respectively, at pH 7.4 and 25 °C) were much faster than expected according to the Brønsted relationship with leaving-group pK_a . A stoichiometric reduction of the arachidonic acid hydroperoxide 15-HpETE to its corresponding alcohol was confirmed. Interactions of fatty acid hydroperoxides with a hydrophobic groove present on the reduced *Mt*AhpE surface could be the basis of their surprisingly fast reactivity.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Mycobacterium tuberculosis, the causative agent of tuberculosis disease, is an extremely successful pathogen, responsible for near 2 million deaths per year (http://www.who.int/tb/publications/global_report/2010/en/index.html). The variable efficiency of available vaccines, the emergence of multi- and extensively drug-resistant strains, and the frequent co-infection with HIV have resulted in the immediate need to identify unique targets for new therapeutic approaches [1–4]. *M. tuberculosis* exhibits diverse strategies to survive inside the hostile environment of host cells [5–7]. Among them, the antioxidant defenses that allow the bacteria to detoxify reactive oxygen and nitrogen species

formed by activated macrophages are under active investigation, because they could provide clues for rational drug development. Peroxynitrite and hydrogen peroxide (H₂O₂) are cytotoxic peroxides formed inside phagosomes upon macrophage activation [8-10]. These species, in turn, can participate in lipid peroxidation reactions through fatty acid-derived free radical production and propagation by autoxidation [11,12]. Lipid hydroperoxides can also be formed by enzymatic mechanisms through lipoxygenase-catalyzed reactions [13,14]. Fatty acid hydroperoxides are released from membranes by phospholipase A₂[15] and are cytotoxic for various microorganisms [16,17]. Indeed, peroxide detoxification is required for *M. tuberculosis* to survive in macrophages and to establish acute and persistent infections in animal tuberculosis models [18–20]. This is accomplished by heme-dependent and several thiol-dependent peroxidases of the peroxiredoxin (Prx) family. The catalase/peroxidase enzyme KatG [21] mediates isoniazid activation [22] and in pathogenic strains, its deficiency has been reported to be compensated for by overexpression of the Prx alkyl hydroperoxide reductase C [23]. A second M. tuberculosis peroxiredoxin, thioredoxin peroxidase, rapidly reduces H₂O₂ and peroxynitrite and seems to play a major role in infectivity [18,19]. The other Prxs codified by the *M. tuberculosis* genome are two bacterioferritin comigratory proteins and alkyl hydroperoxide reductase E (AhpE) [24].

Abbreviations: AhpE, alkyl hydroperoxide reductase E; BHT, butylated hydroxytoluene; 3-CPBA, 3-chloroperoxybenzoic acid; cumeneOOH, cumene hydroperoxide; DTPA, diethylenetriamine pentaacetic acid; DTNB, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid); DTT, 1,4-dithiothreitol; arachidonic acid, 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid; 15-HETE, (\pm) 15-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13*E*-eicosatetraenoic acid; 12-HETE-d8, 12S-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13*E*-eicosatetraenoic acid; 15-HPETE, 15S-hydroperoxy-5Z,8Z,11Z,13*E*-eicosatetraenoic acid; 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoic acid; LOX, lipoxidase; C_P, peroxidatic cysteine; Prx, peroxiredoxin; *t*-BuOOH, *tert*-butylhydroperoxide.

^{*} Corresponding author at: Departamento de Bioquímica and Center for Free Radical and Biomedical Research, Universidad de la República, General Flores 2125, 11800 Montevideo, Uruguay. Fax: + 598 2 9249563.

E-mail address: madiat@fmed.edu.uy (M. Trujillo).

^{0891-5849/\$ -} see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.023

AhpE, which has been identified in the *M. tuberculosis* membrane fraction using a proteomics approach [25], is described as a onecysteine Prx because it lacks a resolving cysteine. However, the structure and sequence of MtAhpE show greater similarity with twocysteine Prxs than with typical one-cysteine Prxs (http://peroxibase. toulouse.inra.fr/classes.php/[26] and http://www.csb.wfu.edu/prex/ [27]). Moreover, some AhpE-like proteins, conserved among actinobacteria and some other bacteria and archaea, contain additional cysteine residues in their sequence whose contribution to catalysis has not been investigated so far. MtAhpE transcription increases in models of the dormant phase of tuberculosis disease, indicating a regulated expression [28]. The crystallography structure of the enzyme has been resolved under reduced and oxidized states, with the peroxidatic cysteine (C_P) as thiol and sulfenic acid, respectively [29]. We have previously investigated the peroxidase activity of MtAhpE [30], being the first Prx of the AhpE family to be functionally characterized. The physiological reducing substrate(s) for MtAhpE (as well as other members of the AhpE class) is still unknown, but its catalytic activity was demonstrated using the artificial substrates dithiothreitol (DTT) and thionitrobenzoic acid [30]. The enzyme reduced peroxynitrite faster than H_2O_2 (1.9×10⁷ versus 8.2×10⁴ M⁻¹ s⁻¹ at pH 7.4 and 25 °C). This oxidizing substrate specificity is similar to what we reported for human peroxiredoxin 5, an atypical two-cysteine peroxiredoxin, but differs from what we and other groups have found for typical two-cysteine Prxs [31-34]. Taking advantage of the change in fluorescence intensity that occurred during MtAhpE treatment with H₂O₂ in excess, we also reported the oxidative inactivation by C_P overoxidation (40 M⁻¹ s⁻¹ at pH 7.4 and 25 °C) [30]. The fact that MtAhpE (a) forms a relatively stable sulfenic acid derivative upon oxidation, (b) presents a single cysteine residue per monomer, the C_{P} , and (c) changes intrinsic fluorescence properties upon C_P oxidation and overoxidation,¹ facilitating direct kinetic determinations, makes the enzyme a useful model to evaluate the catalytic and inactivation mechanisms for Prxs in general. Indeed, our previous work on MtAhpE indicated that the mechanism of C_P overoxidation involves sulfenate (RSO⁻) as the reactant species [30]:

$$C_{p} \text{ oxidation} : RS^{-} + H_{2}O_{2} \rightarrow RSOH + OH^{-}.$$
(1)

$$C_{\rm P}$$
 overoxidation : RSO⁻ + H₂O₂ \rightarrow RSO₂H + OH⁻. (2)

Herein, we have investigated the oxidizing substrate specificity as well as the mechanism and kinetics of oxidative inactivation of AhpE from *M. tuberculosis.* Our results indicate that for most peroxides, oxidation as well as oxidative inactivation rates correlate with leaving-group pK_{a} , indicating that both reactions occur by similar mechanisms. In contrast, the hydroperoxide at position 15 of arachidonic acid (15-HpETE) as well as linolenic acid-derived hydroper-oxides reacted surprisingly fast and the molecular mechanisms underlying this reactivity are proposed.

Materials and methods

Chemicals

tert-Butylhydroperoxide (t-BuOOH), cumene hydroperoxide (cumeneOOH), 3-chloroperoxybenzoic acid (3-CPBA), sodium bicarbonate (NaHCO₃), 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoate) (DTNB), soybean lipoxidase (LOX) type V, DTT, butylated hydroxytoluene (BHT), ferrous ammonium sulfate (Fe(NH₄)₂(SO₄)₂), and diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) were purchased from Sigma-Aldrich. H₂O₂ was from Mallinckrodt Chemicals. 5Z,8Z,11Z,14Z-Eicosatetraenoic acid (arachidonic acid), (\pm) 15-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid (15-HETE), 15S-hydroperoxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid (15-HpETE), 12S-hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraenoic-5,6,8,9,11,12,14,15-d8 acid (12-HETE-d8), and 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoic acid (α -linolenic acid) were obtained from Cayman Chemicals. 3',3"-Bis[bis(carboxymethyl)aminomethyl]cresolsulfonphthalein tetrasodium salt (xylenol orange) was from Applichem. Peroximonocarbonate (HCO_{4}^{-}) was obtained by the slow equilibrium reaction between H₂O₂ and bicarbonate as follows: H₂O₂ + HCO₃⁻ ↔ HCO₄⁻ + H₂O, $k_{on} = 3.1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}, k_{off} = 9.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}, K_{eq} = 0.31 \text{ M}^{-1}$ [35].

Both reactants were mixed and allow to equilibrate for 10–15 min so as to ensure equilibrium to be reached under the experimental conditions employed ($t_{1/2}$ = 1–1.1 min at 500 µM H₂O₂ and 50–150 mM HCO₃⁻, pH 7.4, and 25 °C). HCO₄⁻ concentrations were calculated from K_{eq} and the reactant concentrations.

Linolenic acid peroxidation was produced by incubating α linolenic acid (0.32 mM) with soybean LOX type V (9.5 nM) in 100 mM borate buffer plus 0.2% deoxycholate, pH 9 and 25 °C for 10 min. Reaction was stopped by adding, for lipid extraction purposes, a mixture of hexane/isopropanol/acetic acid (30/20/2, v/v/v) and lipids were extracted as reported [36]. Solvent was evaporated and lipids were resuspended into methanol and stored at -80 °C until used. Hydroperoxide concentrations before and after linolenic acid treatment with LOX were measured using the FOX assay (see below), with 15-HpETE as standard to obtain a calibration curve. Concentrations of fatty acid hydroperoxides were measured in parallel at 234 nm (ϵ_{234} = 28,000 M⁻¹ cm⁻¹[37]) with similar results.

Unless otherwise indicated, experiments were performed in 100 mM sodium phosphate buffer containing 0.1 mM DTPA, pH 7.4, and 25 $^\circ\text{C}.$

Protein expression and purification

Wild-type *Mt*AhpE (TB database gene name Rv2238c) and a mutated form of the enzyme lacking the peroxidatic cysteine (C45S *Mt*AhpE) were expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) (expression vector pDEST17) as recombinant His-tagged proteins and purified as previously described [30].

Protein and thiol quantitation

*Mt*AhpE concentration was measured at 280 nm ($\varepsilon_{280} = 23,959 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for both the wild-type and the mutant forms of the enzyme [30]). Protein thiol content was measured by Ellman's assay ($\varepsilon_{412} = 14,150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [38]. Recently purified *Mt*AhpE typically contained 0.9 thiol/protein and thiol content decreased with storage (under argon atmosphere, at -80 °C).

Protein thiol reduction and alkylation

*Mt*AhpE was reduced immediately before use by incubation with 1 mM DTT for 30 min at 4 °C. Excess reductant was removed by gel filtration using a HiTrap column (Amersham Bioscience) and UV–Vis detection at 280 nm. To avoid protein reoxidation, the elution buffer (100 mM sodium phosphate, pH 7.4, 0.1 mM DTPA) was extensively

¹ This was confirmed by the lack of any change in fluorescence intensity when *Mt*AhpE mutated in C_P instead of the wild-type enzyme was used; by the linear dependency of the observed rate constant of the change in intrinsic *Mt*AhpE fluorescence with peroxide concentration, indicating that a bimolecular reaction between the oxidant and the enzyme was the rate-limiting step in the process leading to the change in fluorescence intensity during both enzyme oxidation and overoxidation; by the identification of sulfenic acid as the product of enzyme oxidation by equimolar concentrations of the oxidant by trapping it with monothiols such as GSH and *N*-acetylcysteine and detection of the corresponding mixed disulfides and the identification of a +32 product after the addition of peroxide in excess by mass spectrometry; and by the identification of sulfinic acid in C_P by partial sequencing of the peptide containing C_P after the treatment of the enzyme with hydrogen peroxide in excess and trypsin digestion (see Ref. [30] and Supplementary Fig. 1 and Tables IS and IS).

degassed before use and samples were collected manually in rubbercapped tubes and maintained under argon atmosphere. In some cases, *Mt*AhpE C_P in reduced enzyme was alkylated by treatment with excess *N*-ethylmaleimide (NEM; 10 mM for 30 min) and excess NEM was removed by gel filtration as previously reported [30]. Residual thiol after alkylation was measured as above and was typically <10% of initial thiol content.

Changes in MtAhpE intrinsic fluorescence intensity

Emission spectra of reduced *Mt*AhpE before and after addition of various oxidizing substrates were recorded in an Aminco Bowman Series 2 luminescence spectrophotometer (λ_{ex} = 295 nm).

Kinetics of MtAhpE oxidation and overoxidation studies using a direct fluorimetric approach

The rate constants of *Mt*AhpE oxidation by various peroxides were determined by taking advantage of the decrease in the protein intrinsic fluorescence intensity upon oxidation as previously described [30]. Reduced *Mt*AhpE was rapidly mixed with the selected peroxide in excess in an Applied Photophysics SX-20 stopped-flow spectrofluorimeter (mixing time of ≤ 1.2 ms); the reaction was followed by total fluorescence intensity decrease ($\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$) upon oxidation. Observed rate constants were determined by fitting stopped-flow data to single exponential functions. Second-order rate constants for the reaction between prereduced enzyme and the various peroxides at pH 7.4 were calculated from the slope of the plot of k_{obs} versus oxidant concentration. For the determination of the rate constant of MtAhpE overoxidation by the various peroxides, we took advantage of the increase in the enzyme intrinsic fluorescence intensity that occurred upon treatment with a large excess of oxidant as previously reported [30]. In the case of *t*-BuOOH and cumeneOOH, enzyme overoxidation was followed using an Aminco Bowman Series 2 luminescence spectrofluorimeter ($\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$; λ_{em} 335 nm), whereas for those peroxides that caused a faster overoxidation of the enzyme, reactions were followed by total fluorescence intensity increase using a stopped-flow spectrofluorimeter ($\lambda_{ex} = 295$ nm). In all cases, large excess peroxide concentrations with respect to enzyme were used; experimental curves were fitted to exponentials to obtain observed rate constants of reactions, which were plotted versus peroxide concentrations to determine the second-order rate constants for the reactions at pH 7.4. The real, pH-independent, rate constants $(k_{pH ind})$ were calculated from the rate constant measured at pH 7.4 ($k_{\text{pH}~7.4}$) and considering the proposed mechanism of reaction in which thiolate (in MtAhpE oxidation) or sulfenate (in MtAhpE overoxidation) and protonated peroxides are the reactive species [30,39],

$$k_{pH-7.4} = k_{pHind} \times \frac{K_{a_{MLAhpE-S(O)H}}}{K_{a_{MLAhpE-S(O)H}} + [H^+]} \times \frac{[H^+]}{K_{a_{RO0H}} + [H^+]}$$
(3)

where $K_{a MtAhpE-S(O)H}$ and $K_{a ROOH}$ are the acidic dissociation constants of *Mt*AhpE thiol (in oxidation reactions) or sulfenic acid (in over-oxidation reactions) and the peroxide of interest, respectively.

Kinetics of MtAhpE reduction by DTT

We have previously demonstrated that oxidized enzyme was reduced by incubation with excess concentrations of DTT [30]. The kinetics of enzyme reduction was measured by following the increase in *Mt*AhpE fluorescence intensity that occurred when the enzyme was mixed with increasing DTT concentrations in excess. Experimental data were fit to single exponential curves. The rate constant of *Mt*AhpE reduction was determined from the slope of the plot of the observed rate constants of fluorescence change versus DTT concentration.

Catalytic and noncatalytic assay of peroxide reduction by MtAhpE

The catalytic reduction of various hydroperoxides by MtAhpE using DTT as the reducing substrate was determined by following hydroperoxide concentrations using the FOX assay [40]. Briefly, 2 mM DTT and 2 µM MtAhpE were incubated with the peroxide substrate $(100 \,\mu\text{M})$ in 50 mM sodium phosphate buffer plus 50 μM DTPA, pH 7.4, 25 °C. Aliquots (100 µl) were taken every 30 s and mixed with 900 μ l of the FOX reagent (100 μ M xylenol orange, 250 μ M Fe²⁺, $25 \text{ mM H}_2\text{SO}_4$, and 4 mM BHT in 90% (v/v) methanol) and further incubated for 30 min at room temperature before measurement at 560 nm. For measuring oxidizing substrate consumption by MtAhpE under noncatalytic conditions, reduced enzyme (25 µM) was mixed with the hydroperoxide of interest $(60 \,\mu\text{M})$ and the concentrations of the latter at indicated times were also measured by the FOX assay. Extinction coefficients for H₂O₂, t-BuOOH, and cumeneOOH were determined as 53,050, 55,800, and 56,300 $M^{-1} cm^{-1}$, respectively, in close agreement with previously reported values [41]. For 15-HpETE the extinction coefficient was 78,500 M^{-1} cm⁻¹, which was higher than the value reported previously for another fatty acid hydroperoxide (linolenic acid hydroperoxide) [40]. Concentrations were confirmed by conjugated diene measurements at 234 nm $(\epsilon_{234} = 28,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$ [37].

Mass spectrometric analysis of 15-HpETE reduction

Reduced *Mt*AhpE (5 μ M) or alkylated *Mt*AhpE (5 μ M, 10% residual thiol) were exposed to equimolar concentrations of 15-HpETE; after 30 s, reaction products were extracted [36] and formation of 15-HETE was analyzed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Before extraction, 10 ng of 12-HETE-d8 was added as an internal standard. Fatty acids were separated on a C₁₈ ODS, 5- μ m, 150×4.6-mm column (Waters Ltd.); the gradient used was 50–90% B over 40 min at 0.5 ml/min, with A being H₂O:ACN:acetic acid (75:25:0.1, v/v/v) and B being MeOH:ACN:acetic acid (60:40:0.1, v/v/v). Products were analyzed and quantified in the negative-ion mode on a Q-Trap 2000 (Applied Biosystems) using the following parent-to-daughter transitions of *m/z* in the multiple-reaction monitoring mode: *m/z* 319.2/219.1 (for 15-HETE) and *m/z* 327.2/184.1 (for 12-HETE-d8). Products were quantified using 12-HETE-d8 as an internal standard run in parallel under the same conditions.

Representation of MtAhpE under reduced state

Reduced *Mt*AhpE (PDB Accession No. 1XXU [29]) was represented using the Visual Molecular Dynamics program [42].

Results

Taking into account our previous work indicating that *Mt*AhpE C_P oxidation to sulfenic acid causes a decrease in enzyme intrinsic fluorescence intensity, and its overoxidation to sulfinic acid causes the fluorescence intensity to recover [30], we began an oxidizing substrate specificity study by analyzing the effects of various peroxides on the emission spectra of the enzyme. When reduced *Mt*AhpE (2 μ M) was mixed with an equimolar concentration of *t*-BuOOH, a decrease in the enzyme intrinsic fluorescence intensity occurred during the first minutes of reaction that did not recover later (Fig. 1A). In addition, incubation of the enzyme with excess concentrations of *t*-BuOOH (100 μ M) led to a rapid decrease followed by a slower increase in its fluorescence intensity (Fig. 1B). Similar results were obtained when using cumeneOOH as oxidant (not shown). The addition of increasing





Fig. 2. Kinetics of *Mt*AhpE peroxidatic thiol oxidation and overoxidation by *t*-BuOOH. Reduced *Mt*AhpE (0.8 μ M) was exposed to *t*-BuOOH (48 μ M) in 100 mM sodium phosphate buffer plus 0.1 mM DTPA, pH 7.4 and 25 °C, and the time course of the total intrinsic fluorescence change ($\lambda_{ex} = 295$ nm) was recorded. The inset shows the effect of peroxide concentration on the observed rate constant of fluorescence change during the oxidation (circles) and overoxidation (squares) reactions.

substoichiometric concentrations of 15-HpETE (1.2-4.8 µM) to reduced MtAhpE (5 µM) caused a rapid decrease in its intrinsic fluorescence intensity, consistent with CP oxidation to sulfenic acid. Further additions of the oxidant caused MtAhpE fluorescence intensity to increase, consistent with CP overoxidation to sulfinic acid (Fig. 1C). The emission spectrum of reduced MtAhpE was only minimally modified by similar concentrations of arachidonic acid, which most probably reflects the ~1% hydroperoxide contaminant in arachidonic stocks as determined by the FOX assay (not shown). Moreover, the addition of equimolar (Supplementary Fig. 1S) or excess (not shown) concentrations of 15-HpETE to C45S MtAhpE (2 µM) caused no change in its intrinsic fluorescence intensity, indicating that the peroxidatic thiol was required for fluorescence changes to occur (Supplementary Fig. 1S). Similar results were previously described for H₂O₂- and peroxynitrite-dependent MtAhpE fluorescence changes occurring upon enzyme oxidation and overoxidation [30].

Kinetics of MtAhpE oxidation and overoxidation by the organic hydroperoxides t-BuOOH and cumeneOOH

The time course of the reaction of reduced *Mt*AhpE (2 μ M) with excess *t*-BuOOH was biphasic, showing a rapid decrease in its fluorescence intensity due to C_P oxidation, followed by a slower phase of fluorescence increase due to C_P overoxidation (Fig. 2). The rate constants of *t*-BuOOH-mediated oxidation and overoxidation of *Mt*AhpE increased with oxidant concentration and were determined as $(8.0 \pm 0.8) \times 10^3$ and 13 ± 3 M⁻¹ s⁻¹, respectively, at pH 7.4 and 25 °C

Fig. 1. Effects of *t*-BuOOH and 15-HpETE on intrinsic *Mt*AhpE emission spectra. (A) Emission spectra ($\lambda_{ex} = 295$ nm) of reduced *Mt*AhpE (2 µM) in 100 mM sodium phosphate buffer, 0.1 mM DTPA, pH 7.4, 25 °C, before (trace a) and 1 (trace b), 4 (trace c), and 6 min (trace d) after the addition of *t*-BuOOH (2 µM). (B) Same as (A) but before (trace a) and 1 (trace b) and 6 min (trace c) after the addition of *t*-BuOOH (100 µM). (C) Emission spectra of reduced *Mt*AhpE (5 µM) in the same buffer as in (A) before (a) and 1 min after the addition of increasing concentrations of 15-HpETE (traces b, 1.2 µM; c, 2.4 µM; d, 3.6 µM; e, 4.8 µM; f, 6.0 µM; and g, 7.2 µM).

Table 1

| Kinetics of Mycobacterium | tuberculosis Ahpl | E oxidation and | overoxidation l | ov various | peroxides. |
|---------------------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|------------|------------|
| · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | | | | | |

| ROOH | pK _a | рК _{а ROH} | $k_{\rm ox \ pH \ 7.4} ({ m M}^{-1} { m s}^{-1})$ | $k_{\rm ox \ pH \ ind} \ (M^{-1} \ s^{-1})$ | $k_{\rm overox \ pH \ 7.4} \ ({\rm M}^{-1} \ {\rm s}^{-1})$ | $k_{\text{overox pH ind}} (M^{-1} s^{-1})$ | Reference |
|--|------------------|---------------------|---|---|---|--|-----------|
| H ₂ O ₂ | 11.7 | 15.7 | 8.2×10^4 | 8.2×10^{4} | 40 | 46 | [30] |
| ONOOH | 6.8 | 3.15 | 1.9×10^{7} | 9.5×10^{7} | ND | ND | [30] |
| t-BuOOH | 12.8 | 18 | 8.0×10^{3} | 8.0×10^{3} | 13 | 15 | This work |
| CumeneOOH | 12.6 | 14.5 | 4.0×10^{4} | 4.0×10^{4} | 65 | 76 | This work |
| HCO ₄ | >9 | 10.3 | 1.1×10^{7} | 1.1×10^{7} | 2.1×10^{3} | 2.5×10^{3} | This work |
| 3-CPBA | 7.57 | 3.82 | 2.4×10^{7} | 3.9×10^{7} | 2.0×10^{5} | 3.8×10^{5} | This work |
| 15-HpETE | $> 10^{a}$ | >10 ^a | 1.8×10^{8} | 1.8×10^{8} | 3.9×10^{5} | 4.5×10^{5} | This work |
| α -Linolenic acid hydroperoxides ^b | >10 ^a | >10 ^a | 2.7×10^{8} | 2.7×10^{8} | 3.7×10^{5} | 4.0×10^{5} | This work |

 pK_a indicates the pK_a value of the peroxide (ROOH) functional group. $pK_{a ROH}$ stands for leaving-group pK_a and indicates the pK_a value of the product formed upon peroxide reduction (ROH). k_{ox} and $k_{overox pH 7.4}$ are the rate constants of *MtAhpE* oxidation to and overoxidation at pH 7.4 and 25 °C, respectively; k_{ox} and $k_{overox pH 7.4}$ are the pH-independent rate constants of *MtAhpE* oxidation to and overoxidation at pH 7.4 and 25 °C, respectively; k_{ox} and $k_{overox pH 7.4}$ are the pH-independent rate constants of *MtAhpE* oxidation to and overoxidation at 25 °C, respectively. Reference refers to the kinetics values; references related to pK_a values are provided in the text.

^a Although pK_a values for the hydroperoxide group in 15-HpETE or the alcohol group in 15-HETE have not been determined, they should be similar to those of other alkyl hydroperoxides and alcohols, respectively, and therefore can be safely assumed to be >10.

^b Mixture of hydroperoxides formed from the LOX-catalyzed oxidation of α -linolenic acid.

(Fig. 2, inset). Similarly, the rate constants of *Mt*AhpE oxidation and overoxidation by cumeneOOH were determined as $(4.0 \pm 0.2) \times 10^4$ and $65 \pm 7 \, M^{-1} \, s^{-1}$ under the same experimental conditions (Supplementary Fig. 2S). According to Eq. (3)–considering reported pK_a values of *t*-BuOOH (12.8) and cumeneOOH (12.6) [43], as well as pK_a values of *Mt*AhpE peroxidatic thiol and sulfenic acid of 5.2 and 6.6, respectively [30]–real (pH-independent) rate constants were calculated as 8×10^3 and $4 \times 10^4 \, M^{-1} \, s^{-1}$ for *t*-BuOOH- and cumeneOOH-mediated C_P oxidation, respectively, and 15 and 76 $M^{-1} \, s^{-1}$ for *t*-BuOOH- and cumeneOOH-mediated C_P overoxidation, respectively (Table 1). These pH-independent values were equal or very similar to those obtained at pH 7.4, because the mechanism of reaction involves the protonated peroxide species and the thiolate (for oxidation) or sulfenate (for overoxidation) forms of C_P in *Mt*AhpE, which are by far the predominant species at the indicated pH.



Fig. 3. Kinetics of *Mt*AhpE thiol oxidation and overoxidation by HCO₄⁻. Reduced *Mt*AhpE (1 µM) was rapidly mixed with solutions of H₂O₂ (500 µM) without any further addition (dashed line, - HCO₃⁻) or preequilibrated with 100 mM HCO₃⁻ to allow HCO₄⁻ formation (continuous line, + HCO₃⁻), in sodium phosphate buffer plus 0.1 mM DTPA, pH 7.4 and 25 °C, and the rapid phase of fluorescence decrease corresponding to *Mt*AhpE oxidation followed by a slower phase of fluorescence increase due to overoxidation was measured using a stopped-flow spectrofluorimeter ($\lambda_{ex} = 295$ nm). The inset shows the effect of increasing HCO₄⁻ concentrations (calculated from the reported *K*_{eq} values, see Materials and methods) on the *k*_{obs} of *Mt*AhpE fluorescence change during the oxidation (circles) and overoxidation (squares) phases of the reaction.

Kinetics of MtAhpE oxidation and overoxidation by HCO_4^- and 3-chloroperoxybenzoic acid

When reduced $MtAhpE(1 \mu M)$ was rapidly mixed with increasing concentrations of preformed HCO₄, biphasic changes in fluorescence intensity, consistent with C_P oxidation followed by overoxidation, were observed (Fig. 3). Observed rate constants of each phase were slower for *Mt*AhpE treatment with H₂O₂ alone (in agreement with reported rate constant values of H₂O₂-mediated MtAhpE oxidation $((8.2 \pm 1.5) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$ and overoxidation $(40 \pm 3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$ [30]) and were faster in the presence of increasing concentrations of HCO₄⁻. The rate constants of MtAhpE oxidation and overoxidation by HCO_4^- were determined as $(1.1\pm0.4)\times10^7$ and $(2.1\pm$ $(0.8) \times 10^3$ M⁻¹ s⁻¹ at pH 7.4 and 25 °C (Fig. 3, inset). According to Eq. (3) and assuming a pK_a value for HCO₄⁻ dissociation >9 [44], and the above-mentioned pK_a values of the peroxidatic thiol and sulfenic acid at MtAhpE [30], the pH-independent rate constants of HCO₄mediated MtAhpE oxidation and overoxidation were calculated as 1.1×10^7 and 2.5×10^3 M⁻¹ s⁻¹ (Table 1). Similarly, the kinetics of the reaction of 3-chloroperoxybenzoic acid (a stable artificial peracid with a low leaving-group pK_a) with reduced MtAhpE were determined as 2.4×10^7 and $(2.0 \pm 0.2) \times 10^5$ M⁻¹ s⁻¹ at pH 7.4 and 25 °C for enzyme oxidation and overoxidation, respectively (Supplementary Fig. 3S). According to Eq. (3) and considering the pK_a values of 3-CPBA (7.5 [45]), *Mt*AhpE thiol, and sulfenic acid, the pH-independent rate constants of 3-CPBA-mediated MtAhpE oxidation and overoxidation were calculated as 3.9×10^7 and 3.8×10^5 M⁻¹ s⁻¹, respectively (Table 1).

Kinetics of MtAhpE oxidation and overoxidation by 15-HpETE

When reduced MtAhpE (2 µM) was rapidly mixed with excess 15-HpETE, a single phase of increase in enzyme intrinsic fluorescence was observed (not shown). Only at very low (<3 µM) 15-HpETE concentrations was the fast decrease in fluorescence intensity due to enzyme oxidation apparent in our stopped-flow apparatus (mixing time <2 ms), indicating a very fast reaction between the enzyme and this oxidant (Fig. 4A). Arachidonic acid by itself did not cause any change in MtAhpE fluorescence intensity during the same time scale (Fig. 4A). Methanol, used as vehicle in stock arachidonic acid and 15-HpETE solution, had no effect on the enzyme fluorescence spectra at the concentrations used (not shown). The rate constants of 15-HpETE-dependent MtAhpE oxidation and overoxidation were $(1.8 \pm 0.3) \times 10^8$ and $(3.9 \pm 0.5) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively, at pH 7.4 and 25 °C (Fig. 4B). Because the hydroperoxide functional group of 15-HpETE is fully protonated at pH <9, pH-independent rate constants were calculated according to Eq. (3) as 1.8×10^8 and $4.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for *Mt*AhpE oxidation and overoxidation, respectively (Table 1).



Fig. 4. Kinetics of *Mt*AhpE thiol oxidation and overoxidation by 15-HpETE. (A) Reduced *Mt*AhpE (2 μ M) was exposed to arachidonic acid (2 μ M; trace a) or 15-HpETE (2 μ M; trace b) in 100 mM sodium phosphate buffer plus 0.1 mM DTPA, pH 7.4 and 25 °C, and the time course of the total intrinsic fluorescence change ($\lambda_{ex} = 295$ nm) was recorded. (B) Reduced *Mt*AhpE (0.2 μ M) was exposed to excess 15-HpETE in the same buffer as in (A), and the rapid first phase of fluorescence intensity decreased (due to enzyme oxidation, circles), whereas the slower phase of fluorescence intensity increased (due to enzyme overoxidation and overoxidation were plotted versus 15-HpETE concentration to determine the rate constants of both processes.

To test whether the rapid 15-HpETE-mediated *Mt*AhpE oxidation and overoxidation observed were specific or also occurred for other long-chain fatty acid hydroperoxides, we tested the effects of α linolenic acid-derived hydroperoxides formed upon LOX-mediated α -linolenic acid oxidation on the enzyme. The addition of excess α -linolenic acid hydroperoxides to reduced *Mt*AhpE caused biphasic fluorescence changes consistent with enzyme oxidation and overoxidation (Supplementary Fig. 4S). Neither the addition of α -linolenic acid to reduced enzyme nor the addition of LOX-treated α -linolenic acid to alkylated enzyme caused any change in *Mt*AhpE intrinsic

Catalytic activity of MtAhpE using various oxidizing substrates

We next evaluated the ability of *Mt*AhpE to catalyze various hydroperoxide reductions, using DTT as reducing substrate. *Mt*AhpE



Fig. 5. Reduction of hydroperoxides by reduced *Mt*AhpE. (A) Catalytic activity of *Mt*AhpE using various hydroperoxides as oxidizing substrates. Time course of *t*-BuOOH (100 μ M) consumption by DTT (2 mM) in the absence (line a, black circles) or in the presence (line b, black squares) of *Mt*AhpE (2 μ M), in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 and 25 °C. The inset shows percentages of initial hydroperoxide concentrations that are left after 3 min incubation with DTT (2 mM) in the presence of *Mt*AhpE (2 μ M). (B) Oxidation yields of H₂O₂- and 15-HpETE-mediated *Mt*AhpE oxidation. Hydroperoxide concentrations before and 30 s or 30 min after the addition of reduced *Mt*AhpE (25 μ M) in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4. Black cycles, 15-HpETE; black triangles, H₂O₂. Numbers next to continuous lines (for H₂O₂) or dotted lines (for 15-HpETE) indicate the stoichiometries of peroxide consumption by *Mt*AhpE at the indicated times of incubation.



Fig. 6. 15-HETE formation from 15-HpETE reduction by *Mt*AhpE. Reduced (line a) or alkylated *Mt*AhpE (5 μ M) (line b) was mixed with 15-HpETE (5 μ M) in sodium phosphate buffer plus 0.1 mM DTPA, pH 7.4, and after 30 s of reaction 15-HETE formation was measured by mass spectrometry. Line c shows the peak corresponding to a standard solution of 15-HETE (3 μ M), and line d is 3 μ M 15-HpETE without any further addition.

(2 μ M) catalyzed H₂O₂, *t*-BuOOH, and cumeneOOH reduction by DTT (2 mM) (Fig. 5A). However, no 15-HpETE (100 μ M) catalytic consumption by DTT (2 mM) was observed (Fig. 5 inset). Because 15-HpETE-mediated overoxidation is ~10⁴ times faster than that produced by *t*-BuOOH or cumeneOOH, we considered the possibility that the enzyme could be inactivated by excess 15-HpETE reaction with the sulfenate form of the enzyme prior reduction by DTT. Therefore, we measured the rate constant of DTT-mediated *Mt*AhpE reduction, which was 90 M⁻¹ s⁻¹ at pH 7.4 and 25 °C (Supplementary Fig. 5S). Thus, under the conditions of the assay ([DTT] 2 mM, [peroxide] 100 μ M), DTT-mediated reduction would be able to compete with enzyme overoxidation by H₂O₂, *t*-BuOOH, and cumeneOOH but would be too slow to compete with enzyme overoxidation by 15-HpETE.²

Noncatalytic reduction of 15-HpETE to 15-HETE by MtAhpE

The addition of 15-HpETE (40 μ M) to reduced *Mt*AhpE (52 μ M) caused a stoichiometric oxidation of *Mt*AhpE thiol groups, as measured by the DTNB assay. As expected, arachidonic acid (40 μ M) did not cause any thiol oxidation on reduced *Mt*AhpE (data not shown). Incubation of 15-HpETE (60 μ M) with reduced *Mt*AhpE (25 μ M) in sodium phosphate buffer, pH 7.4 and 25 °C, caused the reduction of 50 μ M 15-HpETE in 30 s (Fig. 5B). This consumption is in agreement with a rapid C_P oxidation and overoxidation, which according to the kinetics reported above, should be completed in the indicated time ($t_{1/2}$ oxidation at 60 μ M 15-HpETE 0.05 s). Moreover, H₂O₂ (60 μ M) reduction by *Mt*AhpE (25 μ M) under the same conditions showed a 1:1 stoichiometry in 30 s and a 2:1 stoichiometry in 30 min (Fig. 5B). This is consistent with the slower rate constants of *Mt*AhpE [30]

 $(t_{1/2} \text{ oxidation at } 60 \,\mu\text{M} \,\text{H}_2\text{O}_2 \,0.14 \,\text{s}, t_{1/2} \text{ overoxidation at remaining } 35 \,\mu\text{M} \,\text{H}_2\text{O}_2 \,8 \,\text{min, calculated according to the rate constant reported in [30]}.$

Incubation of 15-HpETE (5 μ M) with reduced *Mt*AhpE (5 μ M) for 30 s in 100 mM sodium phosphate buffer plus 0.1 mM DTPA, pH 7.4, caused the formation of 15-HETE (Fig. 6, line a), which coeluted with the 15-HETE standard (Fig. 6, line c) and displayed the characteristic mass transition *m/z* 319/219. Quantitative determinations using 12-HETE-d8 as internal standard showed that 5 μ M *Mt*AhpE caused the formation of 4.86 \pm 0.23 μ M 15-HETE. The amount of 15-HETE formed from 15-HPETE (5 μ M) incubation with alkylated *Mt*AhpE (5 μ M, 0.5 μ M remaining thiols) was much lower (line b), 1.31 \pm 0.64 μ M, consistent with the small fraction of remaining thiols still available in the enzyme after treatment with NEM, which through oxidation and overoxidation reactions could lead to up to two 15-HETE/thiol formation. 15-HPETE (5 μ M) without any further addition showed no contaminating 15-HETE (line d).

Discussion

In a previous work, we reported that peroxynitrite reduction by the C_P in *Mt*AhpE was approximately 3 orders of magnitude faster than H_2O_2 reduction [30]. However, the molecular bases for those differential reactivities, as well as the possibility of other potential biologically relevant oxidizing substrates for the enzyme, were not investigated. Herein, we performed a comprehensive study on *Mt*AhpE oxidizing substrate specificity as well as on its oxidative inactivation by various peroxides, which could contribute to our understanding of the antioxidant systems that might play a role in *M. tuberculosis* success during host infection. Moreover, some of the results obtained could help to rationalize the molecular mechanisms of peroxide reduction by Prxs in general.

Peroxide reduction by thiolates is an SN2 or direct displacement reaction. The reaction takes place via the nucleophilic attack of the thiolate on one of the peroxide oxygens; a transition state is reached in which the negative charge of the attacking group is distributed among the two oxygen atoms and the sulfur. To complete the reaction the peroxide bond should break to release the leaving group. In the case of the low-molecular-weight thiol glutathione and the single free thiol of bovine serum albumin, reaction rates of thiolate oxidation are higher for peroxides with the lower leaving-group pK_a (i.e., the pK_a of the product formed upon peroxide reduction) [35]. For most peroxides tested, MtAhpE peroxidatic thiol oxidation was also faster for those peroxides with the lower leaving-group pK_a (Fig. 7, Table 1). This could explain the $\sim 10^3$ times faster *Mt*AhpE-dependent peroxynitrite reduction compared to H₂O₂ reduction that we previously reported [30] and can be easily observed as a negative correlation between intrinsic thiolate reactivities ($k_{2 pH ind}$) and leaving-group pK_a value shown as a Brønsted plot in Fig. 7. From the slope of this plot, a nucleophilic constant of the leaving group (β_{Lg}) of -0.27 was obtained, which is similar to that reported for peroxide-mediated GSH oxidation $(\beta_{1g} = -0.32)$, calculated from data reported in [35]), indicating that nucleophilic characteristics of leaving groups are important for defining the rate constant of the reactions. Of note, despite the similar trend in reactivities with leaving-group pK_a, rate constants of peroxidemediated peroxidatic thiol oxidation in MtAhpE are $\sim 10^3 - 10^4$ times faster than those of low-molecular-weight thiol oxidation, as has already been described for other Prxs.³ The protein factors responsible for such extraordinary increase in catalytic cysteine oxidation rates in peroxiredoxins are still a matter of speculation, although transition state stabilization is most probably involved [47].

² Rate constant times reactant concentration for DTT-mediated *Mt*AhpE reduction and peroxide-mediated *Mt*AhpE overoxidation should be compared. Hence, DTT-mediated enzyme reduction at pH 7.4 (90 M⁻¹ s⁻¹ × 2 × 10⁻³ M = 0.180 s⁻¹) would be competed by enzyme overoxidation by 15-HpETE (3.9 × 10⁵ M⁻¹ s⁻¹ × 100 × 10⁻⁶ M = 39 s⁻¹) but not by overoxidation by H₂O₂ (40 M⁻¹ s⁻¹ × 100 × 10⁻⁶ M = 4 × 10⁻³ s⁻¹), tr-BuOOH (13 M⁻¹ s⁻¹ × 100 × 10⁻⁶ M = 1.3 × 10⁻³ s⁻¹), or cumeneOOH (65 M⁻¹ s⁻¹ × 100 × 10⁻⁶ M = 6.5 × 10⁻³ s⁻¹) under the experimental conditions of the assays.

³ In the case of some Prxs, reaction rates can be even >>10⁴ faster compared to free cysteine oxidation, as for H₂O₂-mediated red blood cell Prx2 oxidation (k_{pH} ind = 1×10⁸ M⁻¹ s⁻¹[32] versus 18 M⁻¹ s⁻¹ for cysteine oxidation [46]).



Fig. 7. Brønsted plot relationship for the reactivities of various peroxides with reduced or oxidized *Mt*AhpE. pH-independent rate constants for various peroxide-mediated oxidations (circles) and overoxidations (squares) of *Mt*AhpE were calculated from the experimentally determined rate constants at pH 7.4 using Eq. (3). Logarithms of pH-independent rate constants were plotted versus the *K*_a values for the conjugated acids of the alkoxides formed as products from peroxide reductions (leaving-group *K*_a). Peroxides utilized were peroxynitrite (leaving group nitrite anion, NO₂⁻), 3-CPBA (leaving group 3-chlorobenzoate, 3-ClB⁻), HCO₄⁻ (leaving group carbonate anion, CO_3^{2-}), cumeneOOH (leaving group cumene alkoxide, cumeneO⁻), H₂O₂ (leaving group hydroxyl anion, OH⁻), *t*-BuOOH (leaving group *tert*-butylalkoxide, *t*-BuO⁻). Rate constants and *pK*_a values are shown in Table 1.

Based on the pH profile for H₂O₂-mediated MtAhpE overoxidation, we postulated a mechanism of reaction in which sulfenate (RSO⁻) and protonated peroxide were the reactive species (Eq. (2)) [30]. However, the pH profile could in fact also be explained by a mechanism of reaction involving sulfenic acid (RSOH) and HOO⁻, though a much faster pH-independent rate constant would be required to explain the results, so as to compensate for the small fraction of sulfenic acid ($pK_a = 6.6$ [30]) and, more importantly, HOO⁻ $(pK_a H_2O_2 = 11.7 [48])$ that would be present at the pH range explored (5<pH<8). Herein, we also found an inverse correlation between the pH-independent rate constant of peroxide-dependent *MtAhpE* C_P overoxidation to sulfinic acid and the leaving-group pK_{a} , indicating that both C_P oxidation and overoxidation occur by similar mechanisms of reaction. This is consistent with sulfenate (RSO⁻) (or its tautomeric sulfoxide [49]) being the reactive species, as originally proposed [30].

In the case of 15-HpETE, the rate constants of MtAhpE oxidation and overoxidation (Fig. 4, Table 1) were much higher than expected from the Brønsted relationship shown in Fig. 7. Although the pK_a of 15-HETE, the product formed from MtAhpE-dependent 15-HpETE reduction (Fig. 6), has not been reported, it should be in the range of other aliphatic alcohols and similar to those of H₂O₂, t-BuOOH, and cumeneOOH (i.e., >10). The reaction rates determined in Fig. 4B $(1.8 \times 10^8$ and $3.9 \times 10^5 \, \text{M}^{-1} \, \text{s}^{-1}$ for MtAhpE oxidation and overoxidation, respectively) were surprisingly fast. Rate constants were confirmed by other approaches: a 2:1 15-HpETE reduction per MtAhpE thiol group upon 30 s incubation time indicated that the enzyme was oxidized and overoxidized much faster than by H₂O₂ treatment, which required 30 min for the same stoichiometry to be achieved (Fig. 5B). Moreover, the fast oxidative inactivation produced by MtAhpE sulfenate reaction with 15-HpETE compared with DTTdependent reduction ($k = 90 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, Supplementary Fig. 5S) explains that whereas the enzyme consumed rapidly 15-HpETE under noncatalytic conditions (Fig. 5B), no catalytic activity could be observed when using DTT as reducing substrate, which cannot compete with the oxidative inactivation (Fig. 5A) ($k = 90 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, Supplementary Fig. 5S). Thus, MtAhpE reduced 15-HpETE (Fig. 4) and α -linolenic acid-derived hydroperoxides (Supplementary Fig. 4S) with rate constants that were even faster than those of the mammalian selenium-containing glutathione peroxidase 4, the enzyme with the greatest reactivity toward fatty acid hydroperoxides that had been identified so far [50]. The rate constant for C_P oxidation was as fast as human red blood cell Prx2 oxidation by $H_2O_2[32]$. In the case of MtAhpE overoxidation to sulfinic acid, similarly rapid reactions have been reported for linolenic acid hydroperoxide-mediated OhrR overoxidation to sulfinic acid, which occurs with a rate constant of 2×10^5 M⁻¹ s⁻¹[51]. The enzyme is also rapidly inactivated by these hydroperoxides, in a way that precludes the measurement of enzymatic activity using artificial DTT as reducing substrate. The identification of potential natural reducing substrates that could support MtAhpE catalytic activity before oxidative inactivation occurs would be the subject of future work.

Deviation from the expected Brønsted plot correlations with leaving-group pK_a is frequent in Prx-mediated peroxide reductions. In the case of human Prx5, oxidation was much faster with peroxynitrite than with H₂O₂, consistent with the former having a lower leaving-group pK_a [31]. However, when *t*-BuOOH- and



Fig. 8. Representations of reduced *Mt*AhpE (PDB Accession No. 1XXU [27]) show a surface-exposed hydrophobic groove. (A) The molecular surface of reduced *Mt*AhpE is colored according to residue type (blue, basic; red, acidic; green, polar; white, nonpolar). Cysteine 45 (C_P) is shown in yellow. The black oval indicates a hydrophobic groove close to C_P . (B) C_P of subunit A (Cys 45; 1) and non-polar amino acids that form the hydrophobic groove shown in (A): lle 113 (2), Pro 38 (3), Leu 39 (4), and Ala 111 (5) from subunit A (silver ribbons); Trp 95 (6), Phe 94 (7), and Pro 73 (8) from subunit B (green ribbons) of the homodimeric enzyme. In those residues, atoms are colored according to their type: red, oxygen; blue, nitrogen; yellow, sulfur.

cumeneOOH-mediated oxidations were analyzed, they greatly deviated above the reactivity trend. The crystal structure of reduced Prx5 presents a benzoate ion in close association with the active site [52], with one side of the active-site pocket containing several hydrophobic residues whose side chains are located in the neighborhood of the benzoate aromatic ring. Similar interactions could contribute to the fast reactivity of this enzyme with aliphatic or aromatic hydrophobic peroxides. In the case of all typical two-cysteine Prxs whose reactivity toward H₂O₂ and peroxynitrite has been determined so far, the former reacts equally or even faster than the latter oxidant, with the molecular reasons for this remaining unknown [32-34,53,54], and data regarding the kinetics of fatty acid hydroperoxide-mediated oxidation or overoxidation are lacking. Concerning MtAhpE, a noncovalent homodimeric enzyme, the reported structure of the reduced enzyme reveals a surface hydrophobic groove, which could serve as an anchoring site for fatty acid hydroperoxide binding (Fig. 8A). The groove is formed by nonpolar amino acids from the two subunits of the enzyme, namely Ile 113, Leu 39, Pro 38, and Ala 111 from subunit A and Phe 94, Trp 95, and Pro 73 from subunit B (Fig. 8B), whose hydrophobic interactions with these kinds of substrates could be the basis of their deviation from the general Brønsted correlation observed for other substrates (Fig. 7).

MtAhpE belongs to a new family of Prxs, comprising bacterial and achaean AhpE and AhpE-like enzymes. Functional data for any member of the group other than MtAhpE are lacking. Our data constitute a first step toward the characterization of this novel group of Prxs, for which we postulate a role in lipid-derived hydroperoxide reduction, in addition to the peroxynitrite reductase activity reported in our previous work [30]. In this regard, it is interesting that AhpE was identified in the membrane fraction of *M. tuberculosis* using a proteomics approach [25]. Free arachidonic acid is toxic to M. tuberculosis and this toxicity was found to be synergistic with that produced by reactive nitrogen species [55]. The mechanism behind the synergism is not clear in these bacteria, but the fact that free fatty acid-dependent toxicity to Helicobacter pylori increases in peroxidasedeficient strains indicates that fatty acid hydroperoxides are probably involved in the process leading to cell death [12]. Antioxidant systems such as the one described herein are of particular interest for understanding the mechanisms that contribute to the success of M. tuberculosis in infection processes and identifying novel potential therapeutic targets for tuberculosis treatment.

Acknowledgments

The authors thank ANII for financial support (FCE_516) to A.T. A.R. and M.H. were partially supported by fellowships from ANII. We also thank Marcelo Martí and Darío Estrín (Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física/INQUIMAE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina) for helpful discussion. R.R. is a Howard Hughes Medical Institute Research Scholar.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.023.

References

- Andersen, P. Vaccine strategies against latent tuberculosis infection. *Trends Microbiol.* 15:7–13; 2007.
- [2] Brandt, L.; Feino Cunha, J.; Weinreich Olsen, A.; Chilima, B.; Hirsch, P.; Appelberg, R.; Andersen, P. Failure of the Mycobacterium bovis BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect. Immun.* **70**:672–678; 2002.
- [3] Harries, A. D.; Zachariah, R.; Corbett, E. L.; Lawn, S. D.; Santos-Filho, E. T.; Chimzizi, R.; Harrington, M.; Maher, D.; Williams, B. G.; De Cock, K. M. The HIV-associated tuberculosis epidemic—when will we act? *Lancet* 375:1906–1919; 2010.

- [4] Kaye, K.; Frieden, T. R. Tuberculosis control: the relevance of classic principles in an era of acquired immunodeficiency syndrome and multidrug resistance. *Epidemiol. Rev.* 18:52–63; 1996.
- [5] Meena, L. S.; Rajni Survival mechanisms of pathogenic Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *FEBS J.* 277:2416–2427; 2010.
 [6] Yoshida, A.; Inagawa, H.; Kohchi, C.; Nishizawa, T.; Soma, G. The role of toll-like
- [6] Yoshida, A.; Inagawa, H.; Kohchi, C.; Nishizawa, T.; Soma, G. The role of toll-like receptor 2 in survival strategies of Mycobacterium tuberculosis in macrophage phagosomes. *Anticancer Res.* 29:907–910; 2009.
- [7] Rajavelu, P.; Das, S. D. A correlation between phagocytosis and apoptosis in THP-1 cells infected with prevalent strains of Mycobacterium tuberculosis. *Microbiol. Immunol.* 51:201–210; 2007.
- [8] Fang, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:820–832; 2004.
- [9] Nathan, C.; Shiloh, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 97:8841–8848; 2000.
- [10] Alvarez, M. N.; Peluffo, G.; Piacenza, L.; Radi, R. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized Trypanosoma cruzi: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *J. Biol. Chem.* **286**:6627–6640; 2011.
- [11] Radi, R.; Beckman, J. S.; Bush, K. M.; Freeman, B. A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 288:481–487; 1991.
- [12] Porter, N. A.; Caldwell, S. E.; Mills, K. A. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* **30**:277–290; 1995.
- [13] Lewis, J. G.; Hamilton, T.; Adams, D. O. The effect of macrophage development on the release of reactive oxygen intermediates and lipid oxidation products, and their ability to induce oxidative DNA damage in mammalian cells. *Carcinogenesis* 7:813–818; 1986.
- [14] Bonney, R. J.; Opas, E. E.; Humes, J. L. Lipoxygenase pathways of macrophages. *Fed. Proc.* 44:2933–2936; 1985.
- [15] Sevanian, A.; Wratten, M. L.; McLeod, L. L.; Kim, E. Lipid peroxidation and phospholipase A2 activity in liposomes composed of unsaturated phospholipids: a structural basis for enzyme activation. *Biochim. Biophys. Acta* 961:316–327; 1988.
- [16] Evans, M. V.; Turton, H. E.; Grant, C. M.; Dawes, I. W. Toxicity of linoleic acid hydroperoxide to Saccharomyces cerevisiae: involvement of a respiration-related process for maximal sensitivity and adaptive response. *J. Bacteriol.* 180:483–490; 1998.
- [17] Wang, G.; Hong, Y.; Johnson, M. K.; Maier, R. J. Lipid peroxidation as a source of oxidative damage in Helicobacter pylori: protective roles of peroxiredoxins. *Biochim. Biophys. Acta* **1760**:1596–1603; 2006.
- [18] Jaeger, T.; Budde, H.; Flohe, L.; Menge, U.; Singh, M.; Trujillo, M.; Radi, R. Multiple thioredoxin-mediated routes to detoxify hydroperoxides in *Mycobacterium tuberculosis. Arch. Biochem. Biophys.* **423**:182–191; 2004.
- [19] Hu, Y.; Coates, A. R. Acute and persistent Mycobacterium tuberculosis infections depend on the thiol peroxidase TpX. *PLoS One* 4:e5150; 2009.
- [20] Master, S. S.; Springer, B.; Sander, P.; Boettger, E. C.; Deretic, V.; Timmins, G. S. Oxidative stress response genes in Mycobacterium tuberculosis: role of ahpC in resistance to peroxynitrite and stage-specific survival in macrophages. *Microbiology* **148**:3139–3144; 2002.
- [21] Manca, C.; Paul, S.; Barry III, C. E.; Freedman, V. H.; Kaplan, G. Mycobacterium tuberculosis catalase and peroxidase activities and resistance to oxidative killing in human monocytes in vitro. *Infect. Immun.* 67:74–79; 1999.
- [22] Zhang, Y.; Heym, B.; Allen, B.; Young, D.; Cole, S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis. *Nature* 358:591–593; 1992.
- [23] Sherman, D. R.; Mdluli, K.; Hickey, M. J.; Arain, T. M.; Morris, S. L.; Barry III, C. E.; Stover, C. K. Compensatory ahpC gene expression in isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Science* **272:**1641–1643; 1996.
- [24] Jaeger, T. Peroxiredoxin systems in mycobacteria. Subcell. Biochem. 44:207–217; 2007.
- [25] Gu, S.; Chen, J.; Dobos, K. M.; Bradbury, E. M.; Belisle, J. T.; Chen, X. Comprehensive proteomic profiling of the membrane constituents of a Mycobacterium tuberculosis strain. *Mol. Cell. Proteomics* 2:1284–1296; 2003.
- [26] Oliva, M.; Theiler, G.; Zamocky, M.; Koua, D.; Margis-Pinheiro, M.; Passardi, F.; Dunand, C. PeroxiBase: a powerful tool to collect and analyse peroxidase sequences from Viridiplantae. *J. Exp. Bot.* **60**:453–459; 2009.
- [27] Soito, L.; Williamson, C.; Knutson, S. T.; Fetrow, J. S.; Poole, L. B.; Nelson, K. J. PREX: PeroxiRedoxin classification indEX, a database of subfamily assignments across the diverse peroxiredoxin family. *Nucleic Acids Res.* **39:**D332–D337 (database issue); 2010.
- [28] Murphy, D. J.; Brown, J. R. Identification of gene targets against dormant phase Mycobacterium tuberculosis infections. BMC Infect. Dis. 7:84; 2007.
- [29] Li, S.; Peterson, N. A.; Kim, M. Y.; Kim, C. Y.; Hung, L. W.; Yu, M.; Lekin, T.; Segelke, B. W.; Lott, J. S.; Baker, E. N. Crystal structure of AhpE from Mycobacterium tuberculosis, a 1-Cys peroxiredoxin. J. Mol. Biol. 346:1035-1046; 2005.
- [30] Hugo, M.; Turell, L.; Manta, B.; Botti, H.; Monteiro, G.; Netto, L. E.; Alvarez, B.; Radi, R.; Trujillo, M. Thiol and sulfenic acid oxidation of AhpE, the one-cysteine peroxiredoxin from Mycobacterium tuberculosis: kinetics, acidity constants, and conformational dynamics. *Biochemistry* **48**:9416–9426; 2009.
- [31] Trujillo, M.; Clippe, A.; Manta, B.; Ferrer-Sueta, G.; Smeets, A.; Declercq, J. P.; Knoops, B.; Radi, R. Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 467:95–106; 2007.
- [32] Manta, B.; Hugo, M.; Ortiz, C.; Ferrer-Sueta, G.; Trujillo, M.; Denicola, A. The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. Arch. Biochem. Biophys. 484:146–154; 2009.

- [33] Ogusucu, R.; Rettori, D.; Munhoz, D. C.; Netto, L. E.; Augusto, O. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. *Free Radic. Biol. Med.* **42:**326–334; 2007.
- [34] Parsonage, D.; Karplus, P. A.; Poole, L. B. Substrate specificity and redox potential of AhpC, a bacterial peroxiredoxin. Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A. 105:8209–8214; 2008.
- [35] Trindade, D. F.; Cerchiaro, G.; Augusto, O. A role for peroxymonocarbonate in the stimulation of biothiol peroxidation by the bicarbonate/carbon dioxide pair. *Chem. Res. Toxicol.* **19**:1475–1482; 2006.
- [36] Maskrey, B. H.; Bermudez-Fajardo, A.; Morgan, A. H.; Stewart-Jones, E.; Dioszeghy, V.; Taylor, G. W.; Baker, P. R.; Coles, B.; Coffey, M. J.; Kuhn, H.; O'Donnell, V. B. Activated platelets and monocytes generate four hydroxyphosphatidylethanolamines via lipoxygenase. J. Biol. Chem. 282:20151–20163; 2007.
- [37] Pryor, W. A.; Castle, L. Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides. *Methods Enzymol.* 105:293–299; 1984.
- [38] Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82:70-77; 1959.
- [39] Trujillo, M.; Radi, R. 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**:91–98; 2002.
- [40] Jiang, Z. Y.; Hunt, J. V.; Wolff, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* **202:**384–389; 1992.
- [41] Jiang, Z. Y.; Woollard, A. C.; Wolff, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange: comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26:853–856; 1991.
- [42] Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. J. Mol. Graphics 14:33–38 27–28; 1996.
- [43] Richardson, W. H.; Hodge, V. F. Acidities of tertiary alkyl hydroperoxides. J. Org. Chem. 35:4012–4016; 1970.
- [44] Richardson, S. E.; Yao, H.; Frank, K. M.; Bennet, D. A. Equilibria, kinetics and mechanisms in the bicarbonate activation of hydrogen peroxide: oxidation of sulfides by peroxymonocarbonate. J. Am. Chem. Soc. 122:1729–1739; 2000.

- [45] Davies, D. M.; Jones, P.; Mantle, D. The kinetics of formation of horseradish peroxidase compound I by reaction with peroxobenzoic acids: pH and peroxo acid substituent effects. *Biochem. J.* 157:247–253; 1976.
- [46] Winterbourn, C. C.; Metodiewa, D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 322–328; 1999.
- [47] Hall, A.; Parsonage, D.; Poole, L. B.; Karplus, P. A. Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on transition-state stabilization. J. Mol. Biol. 402: 194–209; 2010.
- [48] Perrin, D. Ionisation constants of inorganic acids and bases in aqueous solution. IUPAC Chemical Data Series. Pergamon Press, Oxford; 1984.
- [49] Ali, S. T.; Karamat, S.; Kona, J.; Fabian, W. M. Theoretical prediction of pK(a) values of seleninic, selenenic, sulfinic, and carboxylic acids by quantum-chemical methods. J. Phys. Chem. A 114:12470–12478; 2010.
- [50] Ursini, F.; Maiorino, M.; Gregolin, C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 839:62–70; 1985.
- [51] Soonsanga, S.; Lee, J. W.; Helmann, J. D. Oxidant-dependent switching between reversible and sacrificial oxidation pathways for Bacillus subtilis OhrR. *Mol. Microbiol.* 68:978–986; 2008.
- [52] Declercq, J. P.; Evrard, C.; Clippe, A.; Stricht, D. V.; Bernard, A.; Knoops, B. Crystal structure of human peroxiredoxin 5, a novel type of mammalian peroxiredoxin at 1.5 A resolution. J. Mol. Biol. 311:751–759; 2001.
- [53] Piñeyro, M. D.; Arcari, T.; Robello, C.; Radi, R.; Trujillo, M. Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi:* high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **507**:287–295; 2011.
- [54] Bryk, R.; Griffin, P.; Nathan, C. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* 407:211–215; 2000.
- [55] Åkaki, T.; Tomioka, H.; Shimizu, T.; Dekio, S.; Sato, K. Comparative roles of free fatty acids with reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates in expression of the anti-microbial activity of macrophages against Mycobacterium tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* **121**:302–310; 2000.



Martín Hugo, Koen Van Laer, Aníbal M. Reyes, Didier Vertommen, Joris Messens, Rafael Radi and Madia Trujillo J. Biol. Chem. 2014, 289:5228-5239. doi: 10.1074/jbc.M113.510248 originally published online December 30, 2013

Access the most updated version of this article at doi: 10.1074/jbc.M113.510248

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the JBC Affinity Sites.

Alerts:

When this article is cited

Mycobacterium tuberculosis

When a correction for this article is posted

Click here to choose from all of JBC's e-mail alerts

Reduction of the Peroxiredoxin AhpE from

This article cites 45 references, 19 of which can be accessed free at http://www.jbc.org/content/289/8/5228.full.html#ref-list-1

Mycothiol/Mycoredoxin 1-dependent Reduction of the Peroxiredoxin AhpE from *Mycobacterium tuberculosis**

Received for publication, August 13, 2013, and in revised form, December 23, 2013 Published, JBC Papers in Press, December 30, 2013, DOI 10.1074/jbc.M113.510248

Martín Hugo^{‡§1}, Koen Van Laer^{¶|}**², Aníbal M. Reyes^{‡§}, Didier Vertommen^{‡‡3}, Joris Messens^{¶|}**⁴, Rafael Radi^{‡§}, and Madia Trujillo^{‡§5}

From the [‡]Departamento de Bioquímica and [§]Center for Free Radical and Biomedical Research, Universidad de la República, 11800 Montevideo, Uruguay, the [¶]Structural Biology Research Center, Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB), 1050 Brussels, Belgium, the [∥]Brussels Center for Redox Biology, 1050 Brussels, Belgium, the **Structural Biology Brussels, Vrije Universiteit Brussel (VUB), 1050 Brussels, Belgium, and the ^{‡‡}de Duve Institute, Université Catholique de Louvain, 1200 Brussels, Belgium

Background: Mycothiol, the major low-molecular weight thiol of *Mycobacterium tuberculosis*, is important for peroxide detoxification and virulence.

Results: Mycothiol, together with mycoredoxin-1, a glutaredoxin-like protein, reduces the one-cysteine peroxiredoxin AhpE from the bacterium.

Conclusion: *Mycobacterium tuberculosis* AhpE is a mycothiol/mycoredoxin-1-dependent peroxidase.

Significance: Our results provide the first molecular link between a thiol-dependent peroxidase and the mycothiol/mycoredoxin-1 pathway in Mycobacteria.

Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis), the pathogen responsible for tuberculosis, detoxifies cytotoxic peroxides produced by activated macrophages. M. tuberculosis expresses alkyl hydroxyperoxide reductase E (AhpE), among other peroxiredoxins. So far the system that reduces AhpE was not known. We identified *M. tuberculosis* mycoredoxin-1 (*Mt*Mrx1) acting in combination with mycothiol and mycothiol disulfide reductase (MR), as a biologically relevant reducing system for MtAhpE. MtMrx1, a glutaredoxin-like, mycothiol-dependent oxidoreductase, directly reduces the oxidized form of MtAhpE, through a protein mixed disulfide with the N-terminal cysteine of MtMrx1 and the sulfenic acid derivative of the peroxidatic cysteine of MtAhpE. This disulfide is then reduced by the C-terminal cysteine in MtMrx1. Accordingly, MtAhpE catalyzes the oxidation of wt MtMrx1 by hydrogen peroxide but not of MtMrx1 lacking the C-terminal cysteine, confirming a dithiolic mechanism. Alternatively, oxidized MtAhpE forms a mixed disulfide with mycothiol, which in turn is reduced by MtMrx1 using a monothiolic mechanism. We demonstrated the H₂O₂-dependent NADPH oxidation catalyzed by *Mt*AhpE in the presence of MR,

Mrx1, and mycothiol. Disulfide formation involving mycothiol probably competes with the direct reduction by MtMrx1 in aqueous intracellular media, where mycothiol is present at millimolar concentrations. However, MtAhpE was found to be associated with the membrane fraction, and since mycothiol is hydrophilic, direct reduction by MtMrx1 might be favored. The results reported herein allow the rationalization of peroxide detoxification actions inferred for mycothiol, and more recently, for Mrx1 in cellular systems. We report the first molecular link between a thiol-dependent peroxidase and the mycothiol/Mrx1 pathway in Mycobacteria.

Mycobacterium tuberculosis is the causative agent of tuberculosis disease (TB).⁶ Despite the efforts made during the last two decades to reduce new TB cases and deaths, the global burden of the disease remains enormous (1). Moreover, the emergency of multi- and extensively drug resistant strains underlines the need for the urgent development of new therapeutic approaches (1, 2). However, since many aspects of the pathogenic mechanisms and virulence of *M. tuberculosis* are still unknown, the identification of novel drug targets has been very challenging (2).

M. tuberculosis survives inside the hostile environment of host cells with diverse defense strategies. These antioxidant defenses allow the pathogen to detoxify reactive oxygen and nitrogen species formed by activated macrophages (3–5). One particular feature of the antioxidant systems of *M. tuberculosis* as well as other Actinomycetes is the absence of glutathione,





^{*} This work was supported by grants from the National Institutes of Health (NIH) and Universidad de la República (to R. R.), agentschap voor innovatie door Wetenschap en technologie (IWT) (to K. V. L.), the Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB) and the FWO (Project Grant G.0305.12) (to J. M.), Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Uruguay, FCE_2011_1_5706) (to M. T.). We thank EMBO for the Visiting Grant 439-2011 (to M. H.).

¹ Supported in part by a PhD fellowship from ANII.

² Recipient of an IWT PhD fellowship.

³ Collaborateur Logistique at FRS-FNRS, Belgium.

⁴ Group leader at the VIB. To whom correspondence may be addressed: Structural Biology Research Center, Oxidative Stress Signaling Lab., Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB), Vrije Universiteit Brussel (VUB), Pleinlaan 2, 1050 Brussels, Belgium. Tel.: +32-2-6291992; Fax: +32-2-6291963; E-mail: joris.messens@vib-vub.be.

⁵ To whom correspondence may be addressed: Departamento de Bioquímica and Center for Free Radical and Biomedical Research, Universidad de la República, Avenida General Flores 2125, 11800 Montevideo, Uruguay. Tel.: 598-2-9249561; Fax: 598-2-9249563; E-mail: madiat@fmed.edu.uy.

⁶ The abbreviations used are: TB, tuberculosis disease; AhpE, alkyhydroperoxide reductase E; β-ME, β-mercaptoethanol; DTPA, diethylene triamine pentaacetic acid; DTT, dithiothreitol; NEM, N-ethylmaleimide; H₂O₂, hydrogen peroxide; HRP, horseradish peroxidase; Mrx1, mycoredoxin-1 from Mycobacterium tuberculosis; MSH, mycothiol; MR, mycothiol disulfide reductase; PEG-maleimide, methoxypolyethylene glycol maleimide; TCA, trichloroacetic acid.

and the presence of millimolar concentrations of 1-D-myo-inosityl 2-(N-acetyl-L-cysteinyl)amido-2-deoxy-α-D-glucopyranoside (mycothiol or MSH) (6,7) as the main low molecular weight thiol. Mycothiol is maintained in its reduced state by a mycothiol disulfide reductase that uses NADPH as electron donor (8) and plays a role in peroxide detoxification in vivo, as evidenced by the increased susceptibility to hydrogen peroxide (H₂O₂), menadione and *tert*-butyl hydroperoxide in *M. smeg*matis and M. tuberculosis mutant strains disrupted in the genes required for mycothiol biosynthesis (9-11). Compensatory overexpression of an organic hydroperoxide resistance protein (Ohr) in *M. smegmatis* lacking MSH suggests the existence of a MSH-dependent organic hydroperoxide peroxidase (12). Although these data are only indirect evidence for the presence of a MSH-dependent peroxidase in these bacteria, the molecular link between MSH and peroxidase activity has not been clearly established yet, and purified peroxidases studied so far failed in using MSH as reducing substrate (13). Despite the absence of glutathione, the M. tuberculosis genome encodes different glutaredoxin-like proteins (14). Among them, mycoredoxin 1 (MtMrx1 EC 1.20.4.3) has recently been described as a 10-kDa protein with a CGYC catalytic motif that accepts electrons from MSH and reduces MSH-containing mixed disulfides by a monothiolic mechanism (7, 15). Strains of M. smegmatis lacking Mrx1 are more susceptible to different forms of oxidative stress (15). Moreover, in *Corynebacterium glutamicum*, this protein participates in the arsenate resistance system by reducing the mycothiol arsenate adduct (16). More recently, twenty-five proteins of C. glutamicum including thiol peroxidase (TPx) were found mycothiolated under hypochloric stress conditions (17). The S-mycothiolation of Tpx inhibits its peroxidase activity, but could be restored after treatment with CgMrx1. So far no MtMrx1-dependent protein reduction has been described in Mycobacteria. M. tuberculosis expresses a heme-dependent peroxidase (catalase peroxidase, KatG, EC 1.11.1.6) and several thiol-dependent peroxidases of the peroxiredoxin (Prx, EC 1.11.1.15) type, including alkyl hydroperoxide reductase C, TPx, two bacterioferritin comigratory proteins (Bcp andBcpB) and alkyl hydroperoxide reductase E (*Mt*AhpE) (13, 18).⁷ As a one-cysteine peroxidase, MtAhpE lacks a resolving cysteine. However, the structure and sequence of *Mt*AhpE show greater similarity with two-cysteine Prxs than with other one-cysteine Prxs, and is considered as the prototype of a novel Prx subfamily (19-21). We have previously investigated the peroxidase activity of *Mt*AhpE, the only Prx of the AhpE subfamily to be functionally characterized. It is a broad-spectrum peroxidase with higher catalytic efficiency for fatty acid hydroperoxides and peroxynitrite than for H₂O₂. Upon reaction with the peroxide substrate (ROOH), the thiolate form of the peroxidatic cysteine $(C_{\rm p})$ is oxidized to a sulfenic acid (22, 23) as in Equation 1.

 $AhpE-S^{-} + ROOH \rightarrow AhpE-SOH + RO^{-}$ (Eq. 1)

MSH/Mrx1 Reduces AhpE from M. tuberculosis

MtAhpE catalytically reduces hydrogen peroxide (H₂O₂) in the presence of dithiothreitol (DTT) or thionitrobenzoate (TNB) as reducing agents (22). However, the physiological reducing substrate(s) for this enzyme (as well as for AhpE-like Prxs from several other bacteria) is/are still unknown. Neither *N*-acetyl-cysteine nor glutathione reduced oxidized MtAhpE, but led to the formation of mixed disulfides (22) in Equation 2.

$$AhpE-SOH + RS^{-} \rightarrow AhpE-SS-R + OH^{-}$$
(Eq. 2)

Similar disulfide formation involving the main low molecular weight thiol of the bacteria, mycothiol, had not been addressed so far.

Herein, we report that MtMrx1 and MtMrx1 in combination with mycothiol acts as a reducing substrate for MtAhpE. Our data not only constitute the first report for biologically relevant routes of reduction for an AhpE-like Prx, but also describe the first acceptor for the electrons provided by a mycoredoxin in Mycobacteria. We also propose a functional link between the mycothiol/mycoredoxin-1 pathway and the bacterial peroxide detoxification systems, which helps to rationalize the increased peroxide-dependent cytotoxicity in Mycobacteria with a reduced MSH content (9–11).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals— H_2O_2 was from Mallinckrodt Chemicals. Dithiotreitol (DTT), *N*-ethylmaleimide (NEM), β -mercaptoethanol (β -ME), diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), methoxypolyethylene glycol maleimide (PEG-maleimide), sodium dodecyl sulfate (SDS), 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, *N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid), (HEPES), and horseradish peroxidase (HRP) were from Sigma. β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced tetrasodium salt (NADPH) was from Applichem. PageRuler[®] prestained protein ladder was from Fermentas. Amplex[®] red was from Invitrogen. All other reagents were obtained from standard commercial sources and used as received. All experiments were performed in 100 mM phosphate buffer, 0.1 mM DTPA, pH 7.4, and 25 °C, except if otherwise indicated.

Mycothiol Purification—MSH was purified from *M. smegmatis* as described (7).

Protein Expression and Purification—Mycothiol disulfide reductase from either M. tuberculosis (MtMR) or C. glutamicum (CgMR) were expressed and purified as previously described (15, 16). The CgMR preparation was more robust and active compared with *Mt*MR, and therefore it was preferentially utilized. *Mt*AhpE was expressed in Escherichia coli BL21 (DE3) (expression vector pDEST17) as a recombinant His-tagged protein and purified as previously described (22). The enzyme was stored at -80 °C under argon atmosphere. Wild type MtMrx1 (MtMrx1wt) and a mutant form at the second cysteine residue (MtMrx1CXXA) were expressed in Escherichia coli BL21 Star and purified as previously described (15). Following the immobilized metal ion affinity chromatography step, MtMrx1CXXA was further purified by size exclusion chromatography using a Superdex 75 10/300 column in 100 mM phosphate buffer, 0.1 mM DTPA, pH 7.4. Both MtMrx1wt and MtMrx1CXXA were stored at -20 °C in the presence of 5 mM DTT. Excess reduc-



⁷ List of Gen Accession numbers (TubercuList) of peroxidases and mycoredoxin 1 from *M. tuberculosis*: catalase peroxidase, Rv1908; alkyl hydroperoxide reductase C, Rv2428; thioredoxin peroxidase, Rv1932; bacterioferritin comigratory protein, Rv2521; bacterioferritin comigratory protein B, Rv1608c; alkyl hydroperoxide reductase E, Rv2238c; mycoredoxin 1, Rv3198A.

tant was removed by gel filtration using a HiTrap desalting column (Amersham Bioscience) with UV-vis detection at 280 nm immediately before use.

*Protein Thiol Reduction—Mt*AhpE was reduced before use by incubation with 1 mM DTT for 30 min at 4 °C. Excess reductant was removed from all proteins immediately before use by gel filtration as above indicated.

Peroxide, Protein, and Thiol Quantitation—The concentration of H₂O₂ stock solutions was measured at 240 nm ($\lambda_{240} = 43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (24). *Mt*AhpE, *Mt*Mrx1wt, and *Mt*Mrx1CXXA concentrations were determined spectrophotometrically at 280 nm, using molar absorption coefficients of 23,950 (22), 9,974 and 9,942 M⁻¹ cm⁻¹, respectively, calculated from amino acidic composition. Protein concentrations calculated refer to those of monomers. The concentration of HRP was determined by its absorption at the Soret band ($\lambda_{403} = 1.02 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (25)). Protein thiol content was measured by Ellman's assay ($\lambda_{412} = 14,150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (26, 27). The concentration of MR was estimated by the absorption of the FAD cofactor at 463 nm ($\epsilon = 11,300 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) as previously (8).

Protein Thiol Alkylation by PEG-maleimide and Electrophoretic Analysis—Reaction mixtures (100 μl) containing reduced and/or oxidized MtAhpE in the presence or absence of MSH, MtMrx1wt, or MtMrx1CXXA at indicated concentrations were precipitated by addition of 10 μl of trichloroacetic acid (TCA) (10% (w/v)) and kept on ice for 30 min. Protein precipitates were pelleted, washed with 100 μl of ice-cold acetone, dried at 37 °C, resuspended in 15 μl of 3 mM PEG-maleimide (in 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, pH 7.5) and incubated at 45 °C for 45 min. Samples were immediately loaded on a 15% SDS-PAGE in the absence of β-ME, and proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue.

Mass Spectrometrical Identification of Reaction Products— Protein samples were diluted to $\sim 5 \,\mu$ M in 50% acetonitrile 0.1% acetic acid and intact protein mass measurements were performed by direct infusion in a microelectrospray ionization ion trap mass spectrometer (LTQ XL, ThermoFisher Scientific, San José, CA). The mass spectrometer was operated manually in positive ion mode with a source voltage set at 3.8 kV and the ion transfer tube at 220 °C The parent ions were submitted to insource dissociation (SID) using the minimal energy to promote efficient declustering of water molecules and salts adducts. The mass spectra were deconvoluted using the software ProMass Deconvolution from ThermoFisher Scientific.

For the identification of MtAhpE-MtMrx1CXXA mixed disulfide, the expected corresponding band was in-gel digested with sequencing grade trypsin (0.5 µg) overnight at 30 °C. The reaction was stopped by adding 0.1% trifluoroacetic acid. The peptides were analyzed by LC-MS/MS as described (28). The mass spectrometer was operated in the data-dependent-mode and switched automatically between MS, Zoom Scan for charge state determination and MS/MS for the most abundant ion. Each MS scan was followed by a maximum of five MS/MS using collision energy of 35%. Dynamic exclusion was enabled to allow analysis of co-eluting peptides. For peptide identification peak lists were generated using the application spectrum selector in the Proteome Discoverer 1.3 package. The resulting peak lists were searched using Sequest against a homemade protein database containing the MtMrx1 and MtAhpE sequences (Uniprot Q8VJ51 and Q73YJ5). The following parameters were used: trypsin was selected with cleavage only after lysine and arginine; the number of internal cleavage sites was set to 1; the mass tolerance for precursor and fragment ions was 1.1 Da and 1.0 Da, respectively; and the considered dynamic modifications were +15.99 Da for oxidized methionine and +71.0 Da for acrylamide addition to cysteine. Peptide matches were filtered using charge-state *versus* cross-correlation scores (Xcorr). The mixed disulfide peptide between MtMrx1 and MtAhpE was identified by the use of DBond software (29) and manually validated.

Rate Constant Determination of AhpE-mycothiol (AhpE-SS-M) Disulfide Formation—The kinetics of oxidized MtAhpE reaction with mycothiol to form the mixed disulfide described above was determined by a competition approach, following MtAhpE overoxidation to sulfinic acid by excess H_2O_2 in the absence and presence of mycothiol, which does not compete for initial oxidation of the peroxidatic cysteine due to the high rate constant of the latter enzyme. Overoxidation was measured following the accompanying intrinsic fluorescence increase, using an Aminco Bowman Series 2 luminescence spectrophotometer as previously (22), as in Equation 3.

$$AhpE-SO^{-} + H_2O_2 \rightarrow AhpE-SO_2^{-} + H_2O \qquad (Eq. 3)$$

Reduced *Mt*AhpE (2 μ M) was mixed with H₂O₂ (150 μ M) in the absence or presence of MSH (11–33 μ M) producing a rapid decrease in the enzyme intrinsic fluorescence intensity, corresponding to its oxidation to sulfenic acid ($k = 8.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, reaction half-life under this conditions is ~0.06 s), followed by an increase in fluorescence corresponding to the enzyme overoxidation ($k_1 = 40 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, reaction half-life under this conditions is 115 s), as reported previously (22). Observed rate constants of fluorescence increase (k_{obs}) were determined by fitting experimental data to single exponentials. In the presence of mycothiol, in Equation 4,

$$k_{\text{obs}} = k_1 \times [H_2O_2] + k_2[\text{MSH}]$$
(Eq. 4)

where k_2 is the second order rate constant for the reaction between oxidized *Mt*AhpE and reduced mycothiol. k_2 at pH 7.4 and 25 °C was obtained from the slope of k_{obs} *versus* MSH concentration, and the offset corresponds to $k_1 \times [\text{H}_2\text{O}_2]$.

Reduction of MtAhpE-SS-M by MtMrx1wt—Reaction mixtures containing reduced MtAhpE (20 μ M) were treated with mycothiol disulfide (MSSM, 20 μ M) or oxidized with an equimolar concentration of H₂O₂. Immediately after oxidation, reduced MSH was added to reach a final concentration of 20 μ M and incubated for 30 min to form MtAhpE-SS-M. Time of incubation was selected to allow \geq 90% mixed disulfide formation as calculated using Gepasy 3 software (30) and the rate constant of the reaction reported below. Then, MtMrx1 wt was added to one of the MtAhpE-SS-M containing samples (20 μ M Mrx1 and 10 μ M MtAhpE-SS-M final concentrations). After 15 min, samples were precipitated with TCA and analyzed by alkylation with PEG-maleimide.

Reduction of MtAhpE-SOH by MtMrx1wt—Oxidized *Mt*AhpE was prepared by incubation of reduced *Mt*AhpE (17 μ M) with an



equimolar concentration of H_2O_2 for 1 min immediately after the oxidation step, reduced MtMrx1 was added to reach a final concentration of 16 μ M MtMrx1 and 10 μ M MtAhpE. Aliquots (90 μ l) were taken at different times of incubation (0.2, 0.5, and 4 min) and were directly added into tubes containing 10 μ l of 100% TCA to stop the reaction and to precipitate the proteins. Samples before H_2O_2 addition (reduced MtAhpE) and after oxidation and before MtMrx1 addition (oxidized MtAhpE) were used as positive and negative controls, respectively. Samples were analyzed by alkylation with PEG-maleimide.

Reaction of Oxidized MtAhpE with the Nucleophilic Thiol in MtMrx1—Reaction mixtures containing reduced MtAhpE (10 μ M) in the absence or presence of MtMrx1wt or MtMrx1CXXA (30 μ M) were treated with H₂O₂ (10 μ M). After 15 min, TCA was added, and samples were analyzed by SDS-PAGE.

Reaction of MtAhpE-SS-M with MtMrx1wt or MtMrx1CXXA— Reaction mixtures containing reduced MtAhpE (16 μ M) in the absence or presence of MSH (30 μ M) were treated with H₂O₂ (16 μ M), to form MtAhpE-SOH and MtAhpE-SS-M, respectively. After 30 min, MtMrx1 wt or MtMrx1CXXA was added (20 μ M MtMrx1wt or CXXA and 10 μ M MtAhpE-SOH or MtAhpE-SS-M final concentrations). After 30 min, 10 mM NEM was added and incubated for 15 min, and samples were analyzed by SDS-electrophoresis in the absence of reductant.

Kinetics of Reaction of Oxidized MtAhpE with the Nucleophilic Thiol in MtMrx1CXXA-For the determination of the second-order rate constant of reaction between MtAhpE-SOH and MtMrx1 CXXA, reaction mixtures containing 1 µM *Mt*AhpE and increasing concentrations of *Mt*Mrx1CXXA (10, 25 and 40 μ M) were treated with 1 μ M H₂O₂. Because of the high reactivity of the peroxidatic thiol in *Mt*AhpE (8×10^4 M⁻¹ s⁻¹ (22)) compared with the thiol groups of MtMrx1 (6.6 $M^{-1} s^{-1}$, see below), H_2O_2 is reduced by the former. 90-µl aliquots were taken at different time points and pipetted into Eppendorf tubes containing 10 μ l of 100% TCA to stop the reaction and to precipitate the proteins. Samples were analyzed by SDS-PAGE, and Coomassie-stained gels were scanned in an Oddysey® LI-COR at 700 nm. Band intensity corresponding to the MtAhpE-MtMrx1CXXA mixed disulfide (as identified by in gel digestion and mass spectrometry analysis, see below) was normalized against *Mt*Mrx1CXXA intensity, which was in \geq 10-fold excess over MtAhpE and therefore, should not be appreciably consumed during the assays. Relative disulfide intensity was plotted as a function of time, and plots were fitted to exponential growth curves. The second-order rate constant of the reaction of MtAhpE-SOH with MtMrx1CXXA was obtained from the slope of the plot of the observed rate constants of mixed disulfide formation versus MtMrx1CXXA concentration.

Determination of the pK_a of the Thiols in Nucleophylic Cysteines of MtMrx1wt and CXXA—The pK_a of the nucleophilic cysteines of MtMrx1wt and the MtMrx1CXXA mutant were determined spectrophotometrically as described (31). Note that we used alkylated protein instead of oxidized (S-S) protein to correct for the background. The proteins were alkylated with 10 mM iodoacetamide for 30 min at room temperature. Excess of iodoacetamide was removed using size exclusion chromatography on Superdex75 10/300.

MSH/Mrx1 Reduces AhpE from M. tuberculosis

Kinetics of MtMrx1 Oxidation by H_2O_2 —The intrinsic fluorescence intensity of MtMrx1 ($\lambda_{exc} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 335 \text{ nm}$) decreased upon oxidation by H_2O_2 , in a way that was fully reversible by DTT-treatment. We took advantage of this spectral change to measure the kinetics of MtMrx1 reaction with H_2O_2 , as previously reported for *Trypanosoma brucei* tryparedoxin 1 oxidation (32). Reduced MtMrx1 (10 μ M) was mixed with an excess of H_2O_2 (0.25–1.0 mM) in an Aminco Bowman Series 2 luminescence spectrophotometer, and time courses of intrinsic fluorescence decrease (k_{obs}) were determined by fitting experimental data to single exponentials. The second order rate constant for the reaction between reduced MtMrx1 and H_2O_2 at pH 7.4 and 25 °C was obtained from the slope of the plot of k_{obs} versus H_2O_2 concentration.

Catalytic Consumption of H_2O_2 by MtAhpE in the Presence of MtMrx1— H_2O_2 was slowly delivered into solutions containing 2 μ M MtAhpE and/or reduced wild type or CXXA MtMrx1 (50 μ M) using a motor-driven syringe system (KD Scientific) under continuous stirring (flux = 1 μ M/min during 15 min). Aliquots of 20 μ l were taken at different times and directly pipetted into plate wells (Fisherbrand® flat bottom well plate, clear) containing 180 μ l of a solution of 1 μ M HRP and 20 μ M Amplex® red. H₂O₂-dependent Amplex® red oxidation was measured using a Fluostar BMG Lab plate fluorescence reader ($\lambda_{ex} = 515$ nm, $\lambda_{em} = 590$ nm). H₂O₂ concentration of each sample was determined according to appropriate calibration curves.

NADPH-dependent Peroxidase Activity in the Presence of MtMrx1 and MtAhpE—NADPH oxidation during MtAhpEmediated H₂O₂ reduction was determined using an enzymecoupled assay. Briefly, reaction mixtures containing 100 μ M NADPH, 20 μ M reduced MtAhpE, 5 μ M reduced wt or CXXA MtMrx1, were incubated in 50 mM HEPES, 0.5 mM EDTA, pH 7.8 at 25 °C, followed by sequential addition of 0.13 μ M CgMR, 30 μ M MSSM, and 20 μ M H₂O₂. NADPH reduction was monitored at 340 nm ($\epsilon_{340} = 6,220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) using a thermostated Shimadzu UV-2450 spectrophotometer. Reaction mixtures lacking MtAhpE or MtMrx1 were used as negative controls.

RESULTS

Reaction of AhpE-SOH with MSH—When reduced *Mt*AhpE was incubated with an excess of PEG-maleimide and then analyzed by SDS-PAGE, a protein molecular weight shift of 5 kDa was observed, in agreement with the addition of one molecule of PEG/protein and the presence of one thiol per MtAhpE monomer. As expected, this increase in the molecular weight was not observed when the enzyme was first oxidized to its sulfenic acid derivative by addition of equimolar H_2O_2 , in agreement with specific alkylation of reduced cysteine residues (Fig. 1A). When oxidized *Mt*AhpE was incubated with reduced MSH, no thiol alkylation was observed, indicating that no reduction of AhpE-SOH by MSH took place (Fig. 1A). However, incubation with MSH did protect MtAhpE from oxidation-dependent dimerization, a slow process that takes place after initial sulfenic acid formation (22). Considering that AhpE-SOH reacts with glutathione and N-acetylcysteine to form mixed disulfides, we hypothesized that protection was due to the formation of an *Mt*AhpE-SS-M adduct according to Equation 5.





FIGURE 1. **Oxidized MtAhpE reacts with MSH forming a mixed disulfide that is reduced by MtMrx1.** *A*, alkylation of *Mt*AhpE with PEG-maleimide. Reduced or oxidized *Mt*AhpE (20 μ M) was incubated with or without MSH (200 μ M). Proteins were precipitated with TCA, treated with PEG-maleimide (5 mM), and evaluated on a CBB-stained 15% SDS-PAGE. *B*, identification of *S*-mycothiolation on cysteine 45 of *Mt*AhpE. Sample was obtained by adding MSH (60 μ M) to oxidized *Mt*AhpE (20 μ M). The LC-MS/MS spectrum shows data obtained from a 3 + parent ion with *m/z* = 1026.5. The spectrum displays one major daughter ion at *m/z* 966.4 corresponding to the neutral loss of inositol (180 Da) after fragmentation at a C-O bond. The *y*- and *b*- series of ions allowed exact localization of the mixed disulfide between mycothiol and the cysteine residue. *C*, kinetics of reaction of oxidized MtAhpE (2 μ M) in the absence (*A*) or presence (*B*) of MSH (18 μ M) upon addition of H₂O₂ (150 μ M) in 100 mM sodium phosphate buffer plus 0.1 mM DTPA. *D*, effect of the MSH concentration on the observed rate constants of *Mt*AhpE intrinsic fluorescence change caused by overoxidation. *E*, MtAhpE-SS-M reduction by MtMrx1. Reduced (*lanes* 1 and 2) or oxidized (*lanes* 3 and 4) (20 μ M) was incubated with MSSM (*lane* 2) or MSH (*lanes* 3 and 4) (20 μ M) for 30 min, followed by incubation without (*lane* 3) or with *Mt*Mrx1 (*lane* 4) (20 μ M) word for 5 min. Samples were treated with PEG-maleimide (5 mM) and evaluated by CBB-stained 15% SDS-PAGE.

$$AhpE-SOH + MSH \rightarrow AhpE-SS-M + H_2O$$
 (Eq. 5)

MS studies demonstrated the *S*-thiolation of *Mt*AhpE on cysteine 45 (Fig. 1*B*): the mass of the Cys-45 containing peptide was found to be 484 Da higher, consistent with the covalent attachment of MSH. Upon fragmentation of the precursor ion of m/z 1026.5 (z = 3), a predominant neutral loss of 180 Da was observed, corresponding to inositol and consistent with previous results (15). The LC-MS/MS spectrum also allowed exact localization of the mixed disulfide between mycothiol and the cysteine residue.

Kinetics of MtAhpE-SOH Reaction with Mycothiol—Incubation of reduced MtAhpE with H_2O_2 in excess caused enzyme overoxidation to sulfinic acid, followed by the accompanying change in Trp fluorescence as previously described (22). After the addition of H_2O_2 in the presence of excess mycothiol, we observed a decrease in the amplitude and an increase in the observed rate constants (k_{obs}) of MtAhpE overoxidation (Fig. 1*C*). The k_{obs} of the process linearly depended on the MSH concentration (Fig. 1*D*). The slope results in a second-order rate constant (k_2) of 237 ± 30 M⁻¹ s⁻¹ for the reaction of *Mt*AhpE-SOH with MSH at pH 7.4 and 25 °C. The offset corresponds to $k_1 \times [H_2O_2]$ and perfectly agrees with the previously determined rate constant of enzyme overoxidation (22).

Reduction of MtAhpE-SS-M by MtMrx1—When reduced MtAhpE (20 μ M) was incubated with mycothiol disulfide (MSSM, 20 μ M) alkylation with PEG-maleimide was not abolished, indicating that at least under these conditions the reduced enzyme is not oxidized by the disulfide form of mycothiol. When MtMrx1 was added to pre-formed MtAhpE-SS-M and further treated with PEG-maleimide, the protein was alkylated (Fig. 1*E*), indicating that MtMrx1 reduces MtAhpE-SS-M.

Reduction of MtAhpE by MtMrx1—When oxidized MtAhpE (10 μ M) was incubated with reduced MtMrx1 (16 μ M) for 0.2–4 min and further treated with PEG-maleimide, the enzyme was alkylated (Fig. 2A), indicating that MtAhpE is reduced by MtMrx1 according to Equation 6.





FIGURE 2. **MtAhpE is reduced by wild type MtMrx1 by a dithiolic mechanism.** *A*, reduced (*lane 1*) or oxidized (*lanes 2–6*) *Mt*AhpE (10 μ M) incubated in the absence (*lanes 1–3*) or presence of reduced *Mt*Mrx1 (16 μ M) for indicated times (*lanes 4–6*) and treated with 5 mM PEG-maleimide were evaluated on a Coomassie Brilliant Blue (CBB) stained 15% SDS-PAGE. *B*, reduced and oxidized *Mt*AhpE alone (10 μ M), or oxidized *Mt*AhpE incubated with *Mt*Mrx1 wt or *Mt*Mrx1 CXXA (30 μ M) for 15 min were evaluated on a CBB-stained 15% SDS-PAGE in the absence (*lanes 1–4*, respectively) or presence (*lanes 4–8*, respectively) of *β*-ME. A novel band with a molecular mass compatible with a mixed disulfide formation between *Mt*AhpE and *Mt*Mrx1CXXA is indicated as *Mt*AhpE-SS-*Mt*Mrx1. *C*, mass spectrometric analysis of the *Mt*AhpE-SS-*Mt*Mrx1 complex is shown in Fig. 2B. A quadruply charged parent ion of [M+4H]⁴⁺ = 1183.7 Da shows fragmentation characteristics of a disulfide linkage between Cys¹⁷ of *Mt*Mrx1 and Cys⁴⁵ of *Mt*AhpE, as determined by the DBond software (29). *P**, one strand of a dipeptide; *p**, the other strand of a dipeptide; *capital letters*, fragment ions from peptide *P**; *lowercase letters*, fragment ions from peptide *P**; *lowercase letters*, fragment ions from peptide *P**; *lowercase letters*, *a* alone (*lanes 2*, 4, and 6), or incubated with MSH during 30 min (*lanes 3*, 5, and 7), were incubated in the absence (*lanes 2* and 3) or presence of *Mt*Mrx1 wt (*lanes 4* and 5) or *Mt*Mrx1CXXA (*lanes 6* and 7) for 15 min. Reaction was stopped by addition of 5 mM NEM, and samples were evaluated on a CBB-stained 15% SDS-PAGE under non-reducing conditions. A novel band with a molecular mass compatible with a mixed disulfide formation between *Mt*AhpE and *Mt*AhpE (*lanes 2-7*) alone (*lanes 3* and 7) for 15 min. Reaction was stopped by addition of 5 mM NEM, and samples were evaluated on a CBB-stained 15% SDS-PAGE under non-reducing conditions. A novel band with a molecular mass c

$$AhpE-SOH + Mrx1-(SH)_2 \rightarrow AhpE-SH + Mrx1-S_2 + H_2O$$

(Eq. 6)

MtMrx1-dependent reduction of MtAhpE was ~50% complete after 0.2–0.5 min, suggesting a relatively fast reaction. Interestingly, the addition of MtMrx1 partially inhibits the dimerization of MtAhpE, which slowly occurs after oxidation (Fig. 2A).

Di- versus mono-thiolic Reduction of MtAhpE by MtMrx1— In C. glutamicum Mrx1, only the N-terminal cysteine residue of the CXXC active site sequence motif was found to be essential for the reduction of the arsenate-mycothiol adduct intermediate (16, 33). For the MtMrx1, however, the C-terminal cysteine mutated to alanine (MtMrx1 CXXA) was not able to reduce MtAhpE. It formed a mixed disulfide (MtAhpE-MtMrx1 CXXA), which was reducible by β -ME (Fig. 2B), indicating that both cysteine residues of MtMrx1 are essential for the reduction of MtAhpE under these conditions, according to the following mechanism in Equations 7 and 8.

AhpE-SOH + Mrx1-(SH)₂
$$\rightarrow$$
 AhpE-SS-Mrx1-SH + H₂O

(Eq. 7)

 $AhpE-SS-Mrx1-SH \rightarrow AhpE-SH + Mrx1-S_2$ (Eq. 8)

Mass spectrometrical studies confirmed the mixed disulfide formation. A tryptic digest of the proteins present in the band corresponding to *Mt*AhpE-*Mt*Mrx1 CXXA in Fig. 2*B* revealed a mixed disulfide between two cysteine-containing tryptic peptides from each individual protein (Fig. 2*C*).

As above indicated, wild type *Mt*Mrx1 could directly reduce *Mt*AhpE-SOH (Fig. 2, *A* and *B*). Interestingly, when *Mt*Mrx1CXXA was added to *Mt*AhpE-SS-M, the AhpE-SS-Mrx1 mixed disulfide was not observed (Fig. 2*D*), indicating that the cysteine in *Mt*Mrx1CXXA reacts with the sulfur atom of MSH, yielding reduced *Mt*AhpE through the following reaction in Equation 9,

 $AhpE-SS-M - Mrx1-SH \rightarrow AhpE-SH + Mrx1-SS-M$

(Eq. 9)

which is the reaction for a monothiolic mechanism of reduction.

Kinetics of MtAhpE-SOH Reaction with MtMrx1CXXA— When we oxidized *Mt*AhpE to its sulfenic acid derivative in the



MSH/Mrx1 Reduces AhpE from M. tuberculosis



FIGURE 3. **Kinetics of the reaction of MtAhpE-SOH with the nucleophilic thiol in MtMrx1CXXA**. *A*, oxidized *Mt*AhpE (1 μm) was incubated with *Mt*Mrx1CXXA (25 μm), aliquots were taken at different incubation times and the reaction was stopped by addition of 10% TCA. Samples were evaluated on a CBB-stained 15% SDS-PAGE. *B*, time-dependent increase of the relative band intensity of the mixed disulfide shown in *A*, expressed as *Mt*AhpE-SS-*Mt*Mrx1/*Mt*Mrx1CXXA. *Mt*Mrx1CXXA in concentrations of more than 10 times excess remain constant, and was used as protein load control. The continuous line shows the best fit to an exponential curve. *C*, effect of increasing *Mt*Mrx1CXXA concentrations on the observed rate constants of intermolecular disulfide formation.

presence of excess MtMrx1CXXA, a time-dependent increase of the mixed disulfide between MtAhpE and MtMrx1CXXA was observed (Fig. 3*A*). Time courses of formation of this mixed disulfide fitted to exponential curves (Fig. 3*B*), and the observed rate constants were dependent on the MtMrx1CXXA concentration (Fig. 3*C*). From the slope of the plot shown in Fig. 3*C*, a second-order rate constant, for the reaction between oxidized MtAhpE and the N-terminal thiol in MtMrx1CXXA to form a mixed disulfide, of $(1.6 \pm 0.3) \times 10^3$ M⁻¹ s⁻¹ at pH 7.4 and 25 °C was determined.

 pK_a Values of the Nucleophylic Cysteines in MtMrx1wt and MtMrx1CXXA—In previous work, we had determined the pK_a value of the nucleophilic cysteine residue of MtMrx1wt as 6.8 (15). To investigate the possible influence of the CXXA mutation on the reactivity of the nucleophilic cysteine, we determined the pK_a value of the nucleophilic cysteine of MtMrx1CXXA. We obtained a midpoint value of 7.6 (Fig. 4A).

Kinetics of MtMrx1 Thiol Oxidation by H_2O_2 —When MtMrx1 (10 μ M) was oxidized with H_2O_2 (1 mM), a time-dependent decrease in protein intrinsic fluorescence was observed in a way that was fully reversible by DTT treatment, indicating specificity for protein thiol oxidation (Fig. 4*B*). Time courses of fluorescence decay fitted to exponential curves, and observed rate constants were dependent on H_2O_2 concentrations (Fig. 4*C*). From the slope of the plot, a second-order rate

constant for *Mt*Mrx1 oxidation by H_2O_2 of (6.6 ± 0.6) $M^{-1} s^{-1}$ at pH 7.4 and 25 °C was obtained.

MtAhpE-catalyzed H₂O₂ Reduction via MtMrx1—We tested whether MtAhpE was able to catalytically consume H₂O₂ in the presence of reduced MtMrx1. When a flux of H_2O_2 (1 μM min^{-1}) was infused to reduced *Mt*Mrx1 (50 μ M), a time-dependent increase of H₂O₂ was observed (Fig. 5). After 15 min, nearly 14 μ M H₂O₂ was accumulated, indicating that <10% of the H_2O_2 was consumed. This is consistent with a low reactivity of MtMrx1 toward H₂O₂ (6.6 ± 0.6 M⁻¹ s⁻¹ at pH 7.4, Fig. 4C). Reduced MtAhpE (2 μ M) alone was not able to catalytically consume H_2O_2 . However, when the same flux of H_2O_2 was infused to a mixture containing both reduced MtMrx1 and MtAhpE, a much slower increase in H_2O_2 concentration was observed: 2.8 μ M H₂O₂ accumulated after 15 min, indicating that 81% of the infused H_2O_2 has been consumed (Fig. 5). Importantly, while MtAhpE catalytically consumed H₂O₂ in the presence of wt *Mt*Mrx1, the peroxidase activity of *Mt*AhpE abolished when the MtMrx1CXXA variant was used, once again indicating that both cysteine residues of MtMrx1 are essential for direct *Mt*AhpE reduction (Fig. 5).

MtAhpE Catalyzes the H_2O_2 -dependent NADPH Oxidation— The addition of MSSM (30 μ M) to a reaction mixture containing NADPH (100 μ M), reduced MtAhpE (20 μ M), reduced MtMrx1 wt (5 μ M), and CgMR (0.13 μ M) caused a rapid





FIGURE 4. **MtMrx1 thiol** pK_a determinations and kinetics of oxidation by H_2O_2 . *A*, pK_a titration curves for wild type (*circles*) (15) and the CXXA mutant (*triangles*). The specific absorption of the thiolate ion at 240 nm as a function of the pH is shown. A_{exp} is determined as described (31). Data were fitted with the Henderson-Hasselbach equation. *B*, time-dependent decrease in the total intrinsic fluorescence intensity ($\lambda_{ex} = 295$ nm, $\lambda_{em} = 335$ nm) of *MtMrx1* wt (10 μ M) upon oxidation by H_2O_2 in 100 mM sodium phosphate buffer plus 0.1 mM DTPA, at pH 7.4 and room temperature. The *first arrow* indicates the addition of excess H_2O_2 (1.5 mM) and the second, the addition of DTT (1.5 mM). *C*, effect of H_2O_2 concentration on the observed rate constants of wt/MtMrx1 intrinsic fluorescence change.



FIGURE 5. **MtAhpE catalyzes H₂O₂ reduction in the presence of MtMrx1.** H₂O₂ was infused (J = 1 μ M min⁻¹) to reaction mixtures containing 50 μ M reduced *Mt*Mrx1 wt (*triangles*), 50 μ M reduced *Mt*Mrx1 CXXA + 2 μ M *Mt*AhpE (*circles*), or 50 μ M reduced *Mt*Mrx1 wt + 2 μ M *Mt*AhpE (*squares*). Remaining H₂O₂ was measured at different time points, using Amplex®red oxidation assay. Data points represent an average of $n = 3 \pm$ S.D.

decrease in NADPH concentration, coupled to the reduction of MSSM, after which the absorbance remained constant. Subsequent addition of H_2O_2 (20 μ M) led to an acceleration of NADPH consumption (1.6 \pm 0.1 μ M/min) indicating that the complete system supports a NADPH-dependent peroxidase activity (Fig. 6, *A* and *B*). This acceleration was not seen in the

absence of MtMrx-1 or MtAhpE. Notably, even when the CXXA mutant instead of wt MtMrx-1 was used, a H₂O₂-dependent acceleration of NADPH consumption was observed, although to a lower extent (~65% with respect to wt MtMrx-1)(Fig. 6*B*).

DISCUSSION

In previous work, we demonstrated the peroxidase activity of the one-cysteine peroxiredoxin from *M. tuberculosis*, *Mt*AhpE, using different peroxides and artificial reducing substrates. We found peroxynitrite and fatty acid hydroperoxides as preferential oxidizing substrates for this enzyme (22, 23), which interestingly was found associated to the membrane fraction of the bacterium (34). We have also proposed and used *Mt*AhpE as a model to study the mechanisms of cysteine residues oxidation (from thiol to sulfenic acid) and overoxidation (from sulfenic to sulfinic acid) in proteins (23). However, the identification of a biologically relevant reducing pathway to complete its catalytic cycle was lacking so far.

In the present work, we demonstrate that MSH is not able to reduce the sulfenic derivative of *Mt*AhpE, but forms a mixed disulfide with the enzyme, as confirmed by mass spectrometry (Fig. 1, *A* and *B*), with a rate constant of 237 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ at pH 7.4 and 25 °C (Fig. 1, *C* and *D*). Mycoredoxin-1 was able to reduce the mixed disulfide formed between the enzyme and mycothiol





FIGURE 6. **NADPH consumption during MtAhpE-mediated H₂O₂ reduction.** *A*, time-dependent consumption of NADPH (100 µM) in a coupled assay containing 20 µM MtAhpE, 5 µM MtMrx1wt, 0.13 µM CgMR, 30 µM MSSM, and 20 µM H₂O₂ in 50 mM HEPES, 0.5 mM EDTA, pH 7.8 at 25 °C. The *arrows* indicate the addition of the last three mentioned components to the mixture. *B*, NADPH consumption upon addition of H₂O₂ (*arrow*) in mixtures as in *A* (Mrx1 wt); with CXXA instead of *wt Mt*Mrx1 (Mrx1 CXXA); in the absence of *Mt*Mrx1 (w/o Mrx1) or in the absence of *Mt*AhpE (w/o AhpE). Representative traces that were repeated in independent days with the same results are shown.

(Fig. 1*E*). The second thiol moiety of *Mt*Mrx1 was not needed for MtAhpE-SS-M reduction, as indicated by the lack of detection of MtAhpE-S-S-MtMrx1 adduct upon incubation with the MtMrx1CXXA mutant (Fig. 2D). Moreover the catalytic consumption of NADPH by a coupled assay consisting of NADPH/ CgMR/MSH/MtMrx1/MtAhpE/H2O2 was also functional when MtMrx1 was substituted for MtMrx1 CXXA (Fig. 6B). These results are consistent with the reported data for CgMrx1-dependent reduction of arsenate by CgArsC1 and CgArsC2. In these enzymes, the proposed mechanism of reaction involves the initial formation of an arseno (V)-sulfur complex, followed by a nucleophilic attack by MSH resulting in a arseno mycothiol (As(V)-MSH) complex. Mrx1 reacts with the latter, releasing As(III) and forming a mixed disulfide with MSH which is then reduced by a second molecule of MSH yielding reduced Mrx1 and mycothiol disulfide. For MtAhpE-SS-M reduction by MtMrx1, we propose an analogous monothiolic mechanism (16, 33), as illustrated in Fig. 7 described below.

We also showed that MtMrx1 reduces oxidized MtAhpE as shown by thiol alkylation assays (Fig. 2A). However, a mutant form of MtMrx1 where the C-terminal cysteine was substituted for alanine (MtMrx1CXXA) forms a mixed disulfide with oxidized MtAhpE, which was evidenced on SDS-PAGE (Fig. 2B) and peptide identification by mass spectrometry (Fig. 2C). Thus, the sulfenic acid at the peroxidatic cysteine in oxidized MtAhpE reacts with the N-terminal Cys residue in MtMrx1, which is subsequently reduced by the second thiol moiety present in wild type MtMrx1, regenerating reduced MtAhpE. Accordingly, wild type but not CXXA *Mt*Mrx1 supports the catalytic consumption of fluxes of H₂O₂ by MtAhpE (Fig. 5). To note, reduced MtMrx1 caused a marginal H₂O₂ consumption in the absence of *Mt*AhpE, in agreement with the lack of peroxidase activity of MtMrx1 previously reported (15), and consistent with the rate constant of the reaction determined herein (6.6 \pm 0.6 $\mbox{m}^{-1}\mbox{s}^{-1}$ at pH 7.4, Fig. 4). This value agrees with the quite low nucleophilic cysteine pK_a value (6.8) previously



FIGURE 7. Mechanisms proposed for MSH/Mrx1-dependent MtAhpE reduction. *Mt*AhpE is oxidized by the peroxide to form a sulfenic acid (*reaction 1*). Sulfenic acid is then directly reduced by *Mt*Mrx1 (*reactions 2* and 3), or through an intermediate disulfide formation with mycothiol (*reaction 4*), followed by reduction by *Mt*Mrx1 (*reaction 5*). The leaving Mrx1-S₂ and Mrx1-SS-M disulfide species are then reduced by a second mycothiol molecule forming mycothiol disulfide (MSSM) and reduced *Mt*Mrx1 as reported (7, 15). The formed MSSM is in turn reduced by the NADPH dependent flavoenzyme, mycothiol disulfide reductase (MR), as previously reported (8, 15). Both reducing pathways may compete with enzyme oxidative inactivation (overoxidation) to a sulfinic acid (*reaction 6*). The lower pathway (*reactions 4–5*) would predominate in the cytosol while the upper one (*reactions 2–3*) could be favored in membrane-associated compartments due to the hydrophilic nature of MSH.

reported (15), and pH-independent rate constants of thiolate oxidation by H_2O_2 in the 18–26 $M^{-1}s^{-1}$ range (35).

The *Mt*Mrx1CXXA mutant was used to estimate the secondorder rate constant of the reaction between the sulfenic acid of *Mt*AhpE and the nucleophilic cysteine in *Mt*Mrx1 as $(1.6 \pm 0.3) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ at pH 7.4 (Fig. 3). This value is similar to that determined for the reaction between the sulfenic acid of *Mt*AhpE and the aromatic thiolate thionitrobenzoate ((1.5 ± 0.3) $\times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ at pH 7.4 (22)) and higher than that determined for enzyme reduction by DTT (90 M⁻¹s⁻¹, at pH 7.4 (23)). The rate constant determined this way is that of the first step leading to *Mt*AhpE reduction (Equation 8) and relies on a



MSH/Mrx1 Reduces AhpE from M. tuberculosis

mutant with potentially altered properties. In this respect, the pK_a value of the nucleophilic cysteine in *Mt*Mrx1CXXA is 7.6, which is 0.8 pH units higher than that of *Mt*Mrx1wt (Fig. 4A). Thus, the nucleophilic thiol is 80% deprotonated at pH 7.4 for MtMrx1wt and only 40% for its CXXA mutant, which could result in a \sim 50% lower reactivity at physiological pH. The rate constant obtained using this mutant is most probably a lower limit for the rate-limiting step during the overall process (Equation 7), since experiments using wild type MtMrx1 (16 μ M) showed an important fraction of MtAhpE (10 μ M) reduction $(\geq 50\%)$ in only 0.2–0.5 min (Fig. 2A), which is consistent with a global rate constant of reduction in the ${\sim}10^3\text{-}10^4~\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ range according to computer-assisted simulations using Gepasy 3 software. When comparing with reduction of other MtPrxs by thioredoxins, MtMrx-1-catalyzed MtAhpE reduction seems to approach the reported rate constant of thioredoxin-mediated reduction of other Prxs (MtTPx or MtAhpC), which occur with rate constants in the $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ range (13, 36). The rate constant of MtAhpE reduction by MtMrx1 is \sim 10-fold higher than that of mixed disulfide formation with mycothiol (Fig. 1, C and D). However, as mentioned above, the concentration of mycothiol is in the millimolar range in the M. tuberculosis cytosolic fraction (6) and therefore, to effectively compete with mycothiol for oxidized MtAhpE, the MtMrx1concentration (which is unknown so far) should be \geq 50 μ M. As indicated, proteomic analysis found *Mt*AhpE in the membrane-associated fraction. Direct MtMrx1-dependent MtAhpE reduction might be favored in these hydrophobic compartments that are difficult to reach for a polar molecule, such as MSH. In any case, both direct reduction by MtMrx1 and mixed disulfide formation with mycothiol are fast enough to compete with H₂O₂-mediated enzyme oxidative inactivation (rate constant of 40 $M^{-1}s^{-1}$) (Figs. 3C and 1D, respectively). Whether MtAhpE oxidative inactivation can compete with enzyme reduction by MSH/MtMrx1 in vivo will not only depend on the rate constants of reactions, but also on the steady-state concentrations of reducing as well as oxidizing substrates.

MtAhpE reduction by the MSH/Mrx-1 system led to mycothiol oxidation that was reduced by CgMR as indicated by the NADPH consumption observed using a coupled assay shown in Fig. 6. No NADPH-dependent peroxidase activity occurred in the absence of MtAhpE. This was also true in the absence of MtMrx-1, indicating that oxidized MtAhpE or the mixed disulfide MtAhpE-SM adduct could not be reduced directly by MR/NADPH. Moreover, MtMrx1CXXA had 65% of the activity measured using *Mt*Mrx1wt, indicating that in the presence of mycothiol most MtAhpE reduction occurs through a monothiolic mechanism. These results are in agreement with the lack of AhpE-Mrx1CXXA adduct detection by SDS-PAGE in the presence of mycothiol (Fig. 2D, lane 7). To our knowledge, this is the first identification of a biologically relevant reducing enzyme for this one-cysteine peroxiredoxin from M. tuberculosis or any other member of the AhpE family of Prxs. It is also the first report on the reduction of a mycothiol-containing protein mixed disulfide by Mrx1 from Mycobacteria. Moreover, the data reported herein specifies a molecular link between a peroxidase system and the mycothiol/mycoredoxin-1 pathway in

Mycobacteria. We propose a mechanism of peroxide sensing and/or detoxification (Fig. 7) where MtAhpE is oxidized by the peroxide to form a sulfenic acid (Fig. 7, reaction 1). The sulfenic acid is then directly reduced by MtMrx1 (Fig. 7, reactions 2 and 3), by a dithiolic mechanism involving a *Mt*AhpE-SS-*Mt*Mrx1 intermediate. Alternatively, disulfide formation with MSH followed by reduction by MtMrx1 occurs (Fig. 7, reactions 4 and 5). In any case, the leaving MtMrx1-S₂ and MtMrx1-SS-M disulfide are then reduced by mycothiol (7, 15) which in turn is maintained in its reduced state by mycothiol disulfide reductase (MR) at the expense of NADPH (8). Both reducing pathways compete with enzyme overoxidation to sulfinic acid (Fig. 7, reaction 6). To note, glutaredoxins from different cellular sources have been reported to be involved in homologous Prxs reduction and both monothiolic and dithiolic mechanisms have been proposed (37-41).

A recent report using thiol redox proteomic and mass spectrometry to identify *S*-mycothiolated proteins in *C. glutamicum* during NaOCl stress revealed that TPx was one of the proteins that is modified on its thiols. *S*-Mycothiolation affected *Cg*TPx activity that was restored by incubation with *Cg*Mrx1 (17). MSH/Mrx1-dependent reduction has not been described in other Prxs from Mycobacteria (TPx and AhpC) studied so far, where NADPH/thioredoxin reductase is directly used to reduce different isoforms of thioredoxin, the reducing substrates for most of the bacterial Prxs (13, 18). For *Mt*AhpC, an alternative reducing system, based on dihydrolipoamide linked to metabolic enzymes, has been demonstrated (42). Mrx-1 was not evaluated as reducing substrate for other peroxiredoxins from *M. tuberculosis* (Bcp and BcpB) so far.

Thioredoxins, tryparedoxins, as well as different glutaredoxins and NrdH-redoxins, are known to reduce many other protein substrates besides thiol-dependent peroxidases, such as ribonucleotide reductases (43–45). Similarly, we propose that reduction of protein oxidized cysteine residues, either at the sulfenic acid or MSH-mixed disulfide state, by MtMrx1, may be not specific for MtAhpE. Ongoing structural and functional studies on the MtAhpE-Mrx1 adduct will help to understand the bases of the interaction, which could predict protein molecular features required for a dithiolic mechanism of Mrx1-dependent protein reduction to operate. Similarly, structural data regarding the MtAhpE-SSM mixed disulfide could provide the basis for the identification of proteins susceptible to this modification, which, as glutathionylation in other cellular systems, may importantly affect protein function.

MtMrx1-dependent MtAhpE reduction provides an explanation for the increased susceptibility to oxidative stress in strains of Mycobacteria lacking functional Mrx1 or with a low MSH content⁸ (7–9, 11). Moreover, Prxs and other thiol-dependent peroxidases have recently been proposed as key mediators in peroxide signaling (46–48). The results shown herein, taken together with our previous reports establishing peroxynitrite and fatty acid hydroperoxides as preferential substrates for MtAhpE (23), provide a possible route for sensing these peroxides in Mycobacteria (12). The importance of this metabolic



⁸ Mrx1-deletion studies were performed in *M. smegmatis*, which contains an AhpE with 71% protein identity to *Mt*AhpE according to PeroxiBase (20).

pathway *in vivo* and its possible consequences on infectivity and pathogenesis will be the subject of future investigations.

Acknowledgments—We thank Dr. E. Paek (Hanyang University, Korea) for help with the use of DBond software and Gaetan Herinckx for experimental assistance.

REFERENCES

- 1. World Health Organization. (2012) Global Tuberculosis Report
- 2. Nathan, C. (2009) Taming tuberculosis: a challenge for science and society. *Cell Host Microbe.* **5**, 220–224
- Alvarez, M. N., Peluffo, G., Piacenza, L., and Radi, R. (2011) Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized Trypanosoma cruzi: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *J. Biol. Chem.* 286, 6627–6640
- Fang, F. C. (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 820–832
- Nathan, C., and Shiloh, M. U. (2000) Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8841–8848
- Newton, G. L., and Fahey, R. C. (2002) Mycothiol biochemistry. Arch. Microbiol. 178, 388–394
- Van Laer, K., Hamilton, C. J., and Messens, J. (2013) Low-molecularweight thiols in thiol-disulfide exchange. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 1642–1653
- Patel, M. P., and Blanchard, J. S. (1999) Expression, purification, and characterization of Mycobacterium tuberculosis mycothione reductase. *Biochemistry* 38, 11827–11833
- 9. Rawat, M., Johnson, C., Cadiz, V., and Av-Gay, Y. (2007) Comparative analysis of mutants in the mycothiol biosynthesis pathway in *Mycobacterium smegmatis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **363**, 71–76
- Rawat, M., Kovacevic, S., Billman-Jacobe, H., and Av-Gay, Y. (2003) Inactivation of mshB, a key gene in the mycothiol biosynthesis pathway in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 149, 1341–1349
- Rawat, M., Newton, G. L., Ko, M., Martinez, G. J., Fahey, R. C., and Av-Gay, Y. (2002) Mycothiol-deficient Mycobacterium smegmatis mutants are hypersensitive to alkylating agents, free radicals, and antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 3348–3355
- Ta, P., Buchmeier, N., Newton, G. L., Rawat, M., and Fahey, R. C. (2011) Organic hydroperoxide resistance protein and ergothioneine compensate for loss of mycothiol in *Mycobacterium smegmatis* mutants. *J. Bacteriol.* 193, 1981–1990
- Jaeger, T., Budde, H., Flohé, L., Menge, U., Singh, M., Trujillo, M., and Radi, R. (2004) Multiple thioredoxin-mediated routes to detoxify hydroperoxides in *Mycobacterium tuberculosis. Arch. Biochem. Biophys.* 423, 182–191
- Cole, S. T., and Barrell, B. G. (1998) Analysis of the genome of *Mycobac*terium tuberculosis H37Rv. Novartis Found Symp. 217, 160–172; discussion 172–167
- Van Laer, K., Buts, L., Foloppe, N., Vertommen, D., Van Belle, K., Wahni, K., Roos, G., Nilsson, L., Mateos, L. M., Rawat, M., van Nuland, N. A., and Messens, J. (2012) Mycoredoxin-1 is one of the missing links in the oxidative stress defense mechanism of Mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 86, 787–804
- Ordoñez, E., Van Belle, K., Roos, G., De Galan, S., Letek, M., Gil, J. A., Wyns, L., Mateos, L. M., and Messens, J. (2009) Arsenate reductase, mycothiol, and mycoredoxin concert thiol/disulfide exchange. *J. Biol. Chem.* 284, 15107–15116
- Chi, B. K., Busche, T., Laer, K. V., Basell, K., Becher, D., Clermont, L., Seibold, G. M., Persicke, M., Kalinowski, J., Messens, J., and Antelmann, H. (2013) Protein S-Mycothiolation Functions as Redox-Switch and Thiol Protection Mechanism in *Corynebacterium glutamicum* Under Hypochlorite Stress. *Antioxid. Redox Signal.*, In press
- Hugo, M., Radi, R., and Trujillo, M. (2012) Thiol dependent peroxidases in Mycobacterium tuberculosis in Understanding Tuberculosis: Deciphering the Secret Life of the Bacilli (Cardona, P.-J., ed.), InTech. pp. 293–316

- Soito, L., Williamson, C., Knutson, S. T., Fetrow, J. S., Poole, L. B., and Nelson, K. J. (2011) PREX: PeroxiRedoxin classification indEX, a database of subfamily assignments across the diverse peroxiredoxin family. *Nucleic Acids Res.* 39, D332–337
- Oliva, M., Theiler, G., Zamocky, M., Koua, D., Margis-Pinheiro, M., Passardi, F., and Dunand, C. (2009) PeroxiBase: a powerful tool to collect and analyse peroxidase sequences from Viridiplantae. *J. Exp. Bot.* **60**, 453–459
- Li, S., Peterson, N. A., Kim, M. Y., Kim, C. Y., Hung, L. W., Yu, M., Lekin, T., Segelke, B. W., Lott, J. S., and Baker, E. N. (2005) Crystal Structure of AhpE from *Mycobacterium tuberculosis*, a 1-Cys peroxiredoxin. *J. Mol. Biol.* 346, 1035–1046
- Hugo, M., Turell, L., Manta, B., Botti, H., Monteiro, G., Netto, L. E., Alvarez, B., Radi, R., and Trujillo, M. (2009) Thiol and sulfenic acid oxidation of AhpE, the one-cysteine peroxiredoxin from *Mycobacterium tuberculosis:* kinetics, acidity constants, and conformational dynamics. *Biochemistry* 48, 9416–9426
- Reyes, A. M., Hugo, M., Trostchansky, A., Capece, L., Radi, R., and Trujillo, M. (2011) Oxidizing substrate specificity of *Mycobacterium tuberculosis* alkyl hydroperoxide reductase E: kinetics and mechanisms of oxidation and overoxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 464–473
- Hildebraundt, A. G., and Roots, I. (1975) Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) dependent formation and breakdown of hydrogen peroxide during mixed function oxidation reactions in liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **171**, 385–397
- Schonbaum, G. R., and Lo, S. (1972) Interaction of peroxidases with aromatic peracids and alkyl peroxides. Product analysis. J. Biol. Chem. 247, 3353–3360
- Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70–77
- Riddles, P. W., Blakeley, R. L., and Zerner, B. (1979) Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)-a reexamination. *Anal. Biochem.* 94, 75-81
- Pyr Dit Ruys, S., Wang, X., Smith, E. M., Herinckx, G., Hussain, N., Rider, M. H., Vertommen, D., and Proud, C. G. (2012) Identification of autophosphorylation sites in eukaryotic elongation factor-2 kinase. *Biochem. J.* 442, 681–692
- Choi, S., Jeong, J., Na, S., Lee, H. S., Kim, H. Y., Lee, K. J., and Paek, E. (2010) New algorithm for the identification of intact disulfide linkages based on fragmentation characteristics in tandem mass spectra. *J. Proteome Res.* 9, 626–635
- Mendes, P. (1993) GEPASI: a software package for modelling the dynamics, steady states and control of biochemical and other systems. *Comput. Appl. Biosci.* 9, 563–571
- Roos, G., Garcia-Pino, A., Van Belle, K., Brosens, E., Wahni, K., Vandenbussche, G., Wyns, L., Loris, R., and Messens, J. (2007) The conserved active site proline determines the reducing power of *Staphylococcus aureus* thioredoxin. *J. Mol. Biol.* 368, 800–811
- Piñeyro, M. D., Arcari, T., Robello, C., Radi, R., and Trujillo, M. (2011) Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 507, 287–295
- Villadangos, A. F., Van Belle, K., Wahni, K., Dufe, V. T., Freitas, S., Nur, H., De Galan, S., Gil, J. A., Collet, J. F., Mateos, L. M., and Messens, J. (2011) *Corynebacterium glutamicum* survives arsenic stress with arsenate reductases coupled to two distinct redox mechanisms. *Mol. Microbiol.* 82, 998–1014
- Gu, S., Chen, J., Dobos, K. M., Bradbury, E. M., Belisle, J. T., and Chen, X. (2003) Comprehensive proteomic profiling of the membrane constituents of a *Mycobacterium tuberculosis* strain. *Mol. Cell Proteomics* 2, 1284–1296
- 35. Winterbourn, C. C., and Metodiewa, D. (1999) Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol. Med.* **27**, 322–328
- Trujillo, M., Mauri, P., Benazzi, L., Comini, M., De Palma, A., Flohé, L., Radi, R., Stehr, M., Singh, M., Ursini, F., and Jaeger, T. (2006) The mycobacterial thioredoxin peroxidase can act as a one-cysteine peroxiredoxin. *J. Biol. Chem.* 281, 20555–20566
- 37. Rouhier, N., Gelhaye, E., and Jacquot, J. P. (2002) Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from poplar: protein-protein interaction and catalytic



MSH/Mrx1 Reduces AhpE from M. tuberculosis

mechanism. J. Biol. Chem. 277, 13609-13614

- Pedrajas, J. R., Padilla, C. A., McDonagh, B., and Bárcena, J. A. (2010) Glutaredoxin participates in the reduction of peroxides by the mitochondrial 1-CYS peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antioxid Redox Signal* 13, 249–258
- Hanschmann, E. M., Lönn, M. E., Schütte, L. D., Funke, M., Godoy, J. R., Eitner, S., Hudemann, C., and Lillig, C. H. (2010) Both thioredoxin 2 and glutaredoxin 2 contribute to the reduction of the mitochondrial 2-Cys peroxiredoxin Prx3. *J. Biol. Chem.* 285, 40699 – 40705
- Reeves, S. A., Parsonage, D., Nelson, K. J., and Poole, L. B. (2011) Kinetic and thermodynamic features reveal that *Escherichia coli* BCP is an unusually versatile peroxiredoxin. *Biochemistry* 50, 8970–8981
- Reynolds, C. M., Meyer, J., and Poole, L. B. (2002) An NADH-dependent bacterial thioredoxin reductase-like protein in conjunction with a glutaredoxin homologue form a unique peroxiredoxin (AhpC) reducing system in *Clostridium pasteurianum. Biochemistry* **41**, 1990–2001
- Bryk, R., Lima, C. D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Nathan, C. (2002) Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. *Science* 295, 1073–1077
- Dormeyer, M., Reckenfelderbäumer, N., Ludemann, H., and Krauth-Siegel, R. L. (2001) Trypanothione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase. J. Biol. Chem.

276, 10602–10606

- Holmgren, A. (1979) Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Characterization of the enzymatic mechanism of *Escherichia coli* glutaredoxin. *J. Biol. Chem.* 254, 3672–3678
- Van Laer, K., Dziewulska, A. M., Fislage, M., Wahni, K., Hbeddou, A., Collet, J. F., Versées, W., Mateos, L. M., Tamu Dufe, V., and Messens, J. (2013) NrdH-redoxin of *Mycobacterium tuberculosis* and *Corynebacterium glutamicum* dimerizes at high protein concentration and exclusively receives electrons from thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* 288, 7942–7955
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., and Toledano, M. B. (2002) A thiol peroxidase is an H2O2 receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111, 471–481
- Fomenko, D. E., Koc, A., Agisheva, N., Jacobsen, M., Kaya, A., Malinouski, M., Rutherford, J. C., Siu, K. L., Jin, D. Y., Winge, D. R., and Gladyshev, V. N. (2011) Thiol peroxidases mediate specific genome-wide regulation of gene expression in response to hydrogen peroxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 108, 2729–2734
- Azevedo, D., Tacnet, F., Delaunay, A., Rodrigues-Pousada, C., and Toledano, M. B. (2003) Two redox centers within Yap1 for H2O2 and thiolreactive chemicals signaling. *Free Radic Biol. Med.* 35, 889–900



