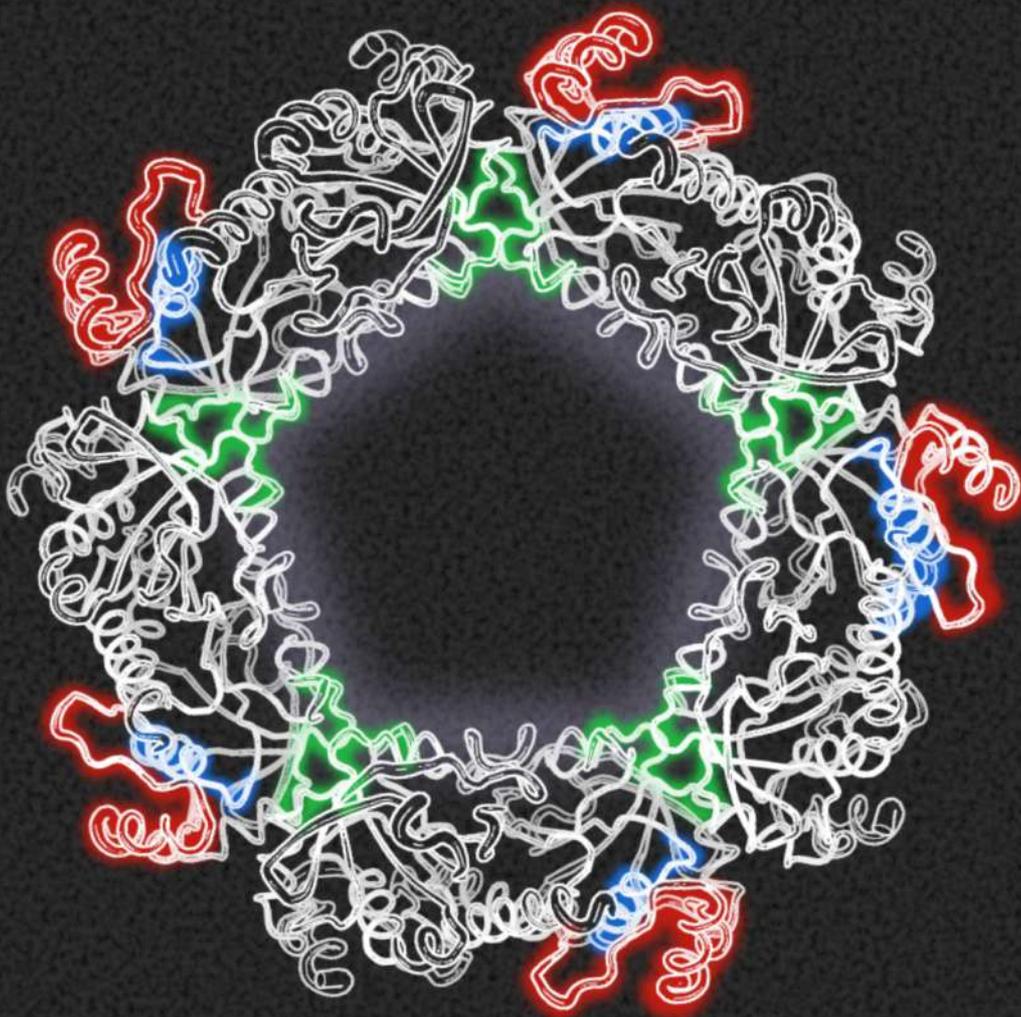


Reducción y oligomerización de peroxirredoxinas humanas y su rol en la señalización por H₂O₂



Lic. Sebastián F. Villar

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas
Universidad de la República
Facultad de Ciencias



Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas
Universidad de la República
PEDECIBA Biología
Opción Bioquímica

Reducción y oligomerización de peroxirredoxinas humanas y su rol en la señalización por H₂O₂

Lic. Sebastián F. Villar

Directores:

Dra. Ana Denicola

Dr. Gerardo Ferrer-Sueta

Laboratorio de Físicoquímica Biológica
Facultad de Ciencias, Udelar
Montevideo, Uruguay
Febrero 2025

“Dedicated to those who put doubt above belief”

Gregorio Weber

Agradecimientos

Sinceramente les agradezco a mis directores de tesis Ana y Gerardo por haberme acompañado en mi formación, llenándome de oportunidades para realizarme como investigador y docente, compartiendo el entusiasmo por todo el trabajo y siempre darme el espacio para desarrollar mis ideas.

Una gran parte del crédito de este trabajo también se la llevan Matías Möller y Ari Zeida, por los consejos y las charlas extensas sobre biofísica de proteínas. Agradezco a Ari nuevamente, por enseñarme todo lo que se sobre herramientas computacionales.

También quiero destacar el aporte de Dave Jameson y Leonel Malacrida. A Dave por compartirnos el faser y a Leonel por siempre estar dispuesto a conversar sobre fluorescencia.

Al querido FQB-ENZ, pero más que nada a los queridos integrantes, pasados y actuales, porque cada uno de nosotros hicimos de ese lugar un entorno en el que es fácil y da gusto trabajar, algo absolutamente fundamental. A cada uno de ellos gracias por su apoyo y por todos los momentos compartidos.

Al Dr. Tobias P. Dick, por haberme recibido en su laboratorio de regulación redox y a todos sus integrantes por el cariño y la amistad.

Agradecer a las instituciones que financiaron este posgrado, a la comisión académica de posgrado (CAP) por las becas de maestría y finalización de doctorado, a la agencia nacional de investigación e innovación (ANII) por la beca de doctorado, a la comisión sectorial de investigación científica (CSIC) por el proyecto de iniciación a la investigación y el apoyo para mi pasantía de investigación en el exterior y al programa de desarrollo de las ciencias básicas (PEDECIBA) por apoyarme durante mi posgrado y la pasantía de investigación en el exterior.

A mi familia, por ser los pilares de quien fui, soy y seré y por darme las herramientas para enfrentar lo que venga.

A Meche, por tenernos y ponernos mejor con el tiempo.

Índice

Resumen.....	9
Abreviaturas y acrónimos.....	11
Capítulo 1: Introducción	13
1.1 Peroxirredoxinas	15
1.1.1. Breve reseña histórica.....	15
1.1.2. Evolución y clasificación	19
1.1.3. Ciclo catalítico de AhpC/Prx1.....	28
1.1.4. Estructura y oligomerización	35
1.2. Principios de señalización redox	45
1.2.1. Especies reactivas y estrés oxidativo.....	45
1.2.2. H ₂ O ₂ como segundo mensajero.....	48
1.3. Transducción de señales a través de Prx	57
1.3.1. Transferencia de equivalentes de oxidación	57
1.4. Objetivos	61
Objetivo general.....	61
Objetivos específicos.....	61
Capítulo 2: Dinámica de oligomerización de Prx y vínculo con su actividad peroxidasa	63
2.1. Metodología.....	67
2.1.1. Procedimientos generales	67
2.1.2. Procedimientos específicos	70
2.2. Resultados y discusión.....	79
2.2.1. Dependencia de las propiedades de fluorescencia de <i>HsPrx1</i> con la concentración... 79	
2.2.2. Estudio de la disociación de <i>HsPrx1</i> por el análisis de τ mediante fasores	80
2.2.3. Estudio de la disociación de <i>HsPrx1</i> por fasores espectrales	82
2.2.4. Validación de los resultados por SEC.....	83
2.2.5. Dinámica de oligomerización de <i>HsPrx1</i> y <i>HsPrx2</i> en estado reducido y oxidado.....	85
2.2.6. Cinética de la transición de dímeros oxidados a decámeros reducidos.....	89
2.2.7. Formación de decámeros mixtos entre <i>HsPrx1</i> y <i>HsPrx2</i>	90
2.2.8. Formación de decámeros covalentes en <i>HsPrx1</i>	92
2.2.9. Efecto del NaCl y la urea en la oligomerización.....	93
2.2.10. Oxidación de <i>HsPrx1</i> y <i>HsPrx2</i> en presencia de NaCl y urea	95
2.3. Conclusiones.....	99
Capítulo 3: Estudio cinético y estructural de la reducción de Prx por Trx.....	101
3.1. Metodología.....	105

3.1.1. Procedimientos generales	105
3.1.2. Procedimientos específicos	108
3.1.3. Procedimientos computacionales.....	114
3.2. Resultados y discusión.....	119
3.2.1. Reducción de <i>HsPrx1</i> y <i>HsPrx2</i> por TCEP y DTT.....	119
3.2.2. Reducción de <i>HsPrx2</i> por GSH.....	121
3.2.3. Reducción de <i>HsPrx1</i> y <i>HsPrx2</i> por Trx	122
3.2.3. Efecto del pH en la reducción de <i>HsPrx2</i> por Trx	127
3.2.4. Reducción y transición desde LU a FF.....	130
3.2.5. Análisis inicial de la dinámica estructural de la interacción Prx-Trx.....	132
3.2.6. Consecuencias energéticas y estructurales de las dinámicas con $C_N S^-$	135
3.2.7. Simulaciones del disulfuro mixto C_N-C_R en el complejo <i>HsPrx2-HsTrx1</i>	138
3.3. Conclusiones	141
Capítulo 4: Caracterización funcional de la señalización a través de Prx.....	143
4.1. Metodología.....	147
4.1.1. Procedimientos generales	147
4.1.2. Procedimientos específicos	150
4.2. Resultados y discusión.....	153
4.2.1. Oxidación directa de <i>HsANXA2</i> con H_2O_2	153
4.2.2. Oxidación de <i>HsANXA2</i> con H_2O_2 a través de <i>HsPrx1</i> y <i>HsPrx2</i>	154
4.2.3. Estudio de la interacción <i>HsANXA2-Prx</i>	156
4.2.4. Estudio de la oxidación de <i>HsCBS</i> con H_2O_2 en células HEK293	158
4.2.5. Efecto de mutantes de Cys en la oxidación de <i>HsCBS</i> por H_2O_2	161
4.2.6. Dependencia de <i>HsPrx1</i> y <i>HsPrx2</i> en la oxidación de <i>HsCBS</i> por H_2O_2	163
4.4. Conclusiones	167
Conclusión general y perspectivas	169
Bibliografía.....	173
Anexo.....	187
5.1. Figuras.....	187
5.1.1. Calibración de la columna Superdex 200 5/150 GL (Cytiva).....	187
5.1.2. Efecto de la dilución de la señal en experimentos de fasores	188
5.1.3. Alineamiento de <i>HsPrx1</i> y <i>HsPrx2</i>	188
5.1.4. Dilución de decámeros covalentes.....	189
5.1.5. Reacción de peroxidación de <i>HsPrx2</i> en presencia de urea 2M	189
5.1.6. Espectros de excitación de <i>HsPrx1</i> y <i>HsPrx2</i> en distintos estados de oxidación	190
5.1.7. Reducción de <i>HsPrx2(S)</i> ₂ con <i>TbTxn</i> y <i>EhTrx212</i>	190
5.1.8. Oxidación de <i>HsPrx2</i> en función del pH	191

5.1.9. Docking a ciegas	191
5.1.10. Distancias relevantes en las simulaciones de los complejos <i>HsPrx2</i> -Trx	192
5.1.11. Cambios conformacionales de W31 en <i>HsTrx2</i> y <i>EcTrx</i>	193
5.1.12. Expresión construcciones <i>HsCBS</i>	193
5.2. Otros documentos.....	195
5.2.1. Relevamiento de complejos entre Trx y sustratos en el PDB.....	195
5.2.2. Script selección residuos de interfase a partir de las simulaciones.....	196
5.2.3. Lista de sistemas simulados	197

Resumen

La paradoja de la vida en aerobiosis es que el mismo O_2 que respiramos puede resultar tóxico y terminar generándonos daño. Hoy sabemos que la acción de oxidantes en los organismos aerobios no es exclusivamente dañina, de hecho, necesitamos un flujo bajo y constante para funcionar fisiológicamente. Dentro de estos oxidantes, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se destaca como molécula señalizadora por su estabilidad, capacidad de difundir por membranas biológicas y ser disparador de distintos procesos fisiológicos. Por lo tanto, en el metabolismo del H_2O_2 tiene que haber mecanismos para disminuir todo aumento que represente un peligro y al mismo tiempo permitir niveles necesarios para inducir eventos de señalización. Si bien varios componentes del sistema antioxidante son capaces de reducir el H_2O_2 , las peroxirredoxinas (Prx) se destacan por su especificidad, reactividad y abundancia. Las Prx son enzimas ubicuas que catalizan la reducción de una variedad de peróxidos mediante la excepcional reactividad de su cisteína “peroxidática” (C_P). Dentro de esta familia, las AhpC/Prx1, tienen una cisteína de sitio activo adicional, llamada “resolutiva” (C_R), que reacciona con la forma oxidada de C_P para generar un disulfuro intermolecular, que es reducido por el sistema tiorredoxina (Trx) a expensas de NADPH. Además, tienen una estructura cuaternaria que consiste en un arreglo de homodímeros que forman un decámero (o dodecámero), cuya estabilidad depende del estado de oxidación de sus cisteínas de sitio activo. El hecho de ser ubicuas y de participar en procesos fisiológicos relacionados con el H_2O_2 , colocaron a estas Prx en el foco de las investigaciones en señalización redox. En este contexto, se las destaca por su capacidad de transferir la oxidación desde el H_2O_2 a cisteínas en proteínas blanco de señalización, regulando su función.

La idea principal de este trabajo fue caracterizar ciertos aspectos del ciclo catalítico y dinámica estructural de AhpC/Prx1, para entender las bases bioquímicas de su función en la señalización por H_2O_2 . Trabajamos con dos Prx humanas citosólicas (*HsPrx1* y *HsPrx2*) y evaluamos la reducción de su forma disulfuro con distintas Trx y reductores de bajo peso molecular, para lo cual se desarrolló una metodología específica. Estudiamos la dinámica de oligomerización en distintas condiciones mediante la implementación del análisis de tiempos de vida de emisión de fluorescencia por fasores, e investigamos el efecto de alterar el equilibrio decámero-dímero sobre la cinética de oxidación. Además, comenzamos a caracterizar la reacción e interacción de estas Prx con las proteínas blanco de señalización anexina A2 (ANXA2) y cistationina- β -sintasa (CBS).

Dentro de los resultados más destacados, caracterizamos las interacciones en el complejo Prx-Trx, donde observamos que los aminoácidos más conservados son los más importantes para su formación. Además, notamos que la reactividad de la cisteína nucleofílica de Trx (C_N) se vio aumentada en el complejo ya que su tiolato queda menos expuesto al solvente y que el residuo de triptófano (W31) conservado en Trx tiene un rol estérico en la catálisis. En cuanto a la oligomerización, vimos que *HsPrx2* forma decámeros más estables que *HsPrx1* y que la fuerza iónica y agentes desnaturalizantes, influyen en la distribución de especies en el equilibrio. La

cinética de la formación del disulfuro aumentó hasta 10 veces cuando se desestabilizó al decámero y disminuyó significativamente al estabilizarlo. Teniendo en cuenta el estudio con blancos de señalización, observamos que ANXA2 interacciona y reacciona con *HsPrx2* formando disulfuros mixtos. Por último, el estudio de la influencia de *HsPrx1* y *HsPrx2* sobre la oxidación de CBS por H_2O_2 sugiere que, si bien ambas Prx participan del proceso, *HsPrx2* es la que más contribuye.

En conclusión, las AhpC/Prx1 reúnen características claves para ser reguladores maestros del metabolismo del H_2O_2 . Su excepcional reactividad y su capacidad de transferir la oxidación a proteínas específicas, permite integrar la información de los niveles de H_2O_2 a otros procesos celulares. Además, su plasticidad estructural puede llevar a cambios en la reactividad que permitan ajustar la respuesta al H_2O_2 en distintas regiones subcelulares ante determinados estímulos.

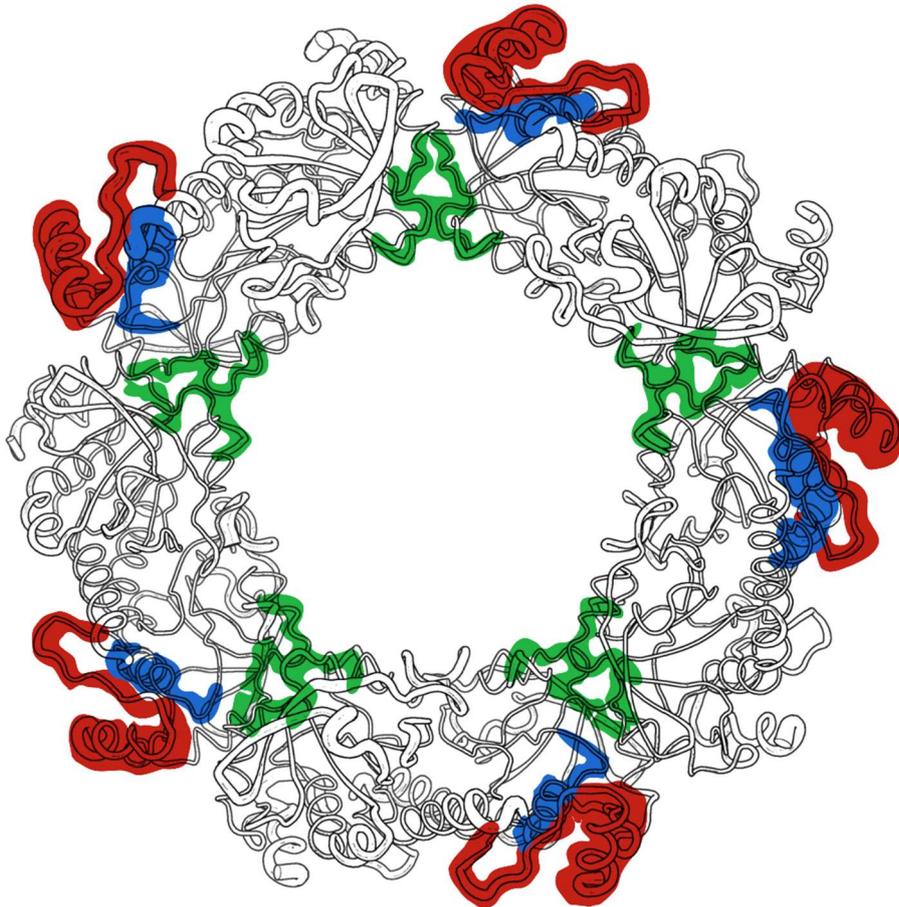
Abreviaturas y acrónimos

A		DTT		Ditiotreitol
Abs	Absorbancia	E		
AhpC	Alquil hidroperóxido reductasa C	E°'	Potencial estándar de reducción, a pH7	
AhpD	Alquil hidroperóxido reductasa D	EdH	Enlace de hidrógeno	
AhpE	Alquil hidroperóxido reductasa E	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	
AhpF	Disulfuro reductasa de flavina	<i>EhTrx212</i>	Trx212 de <i>Entamoeba histolytica</i>	
AQP	Acuaporina	Ero1	Oxidorreductina 1 del retículo endoplásmico	
B		F		
BCP	Proteína co-migradora de bacterioferritina	F _{DEC}	Fracción de decámero	
BSA	Albúmina sérica bovina	FF	Fully folded	
C		FLIM	Florescence lifetime imaging	
CAT	Catalasa	Fos	Fos proto-oncogene	
Cdc25B	Fosfatasa 2 inductora de fase M	FoxO	Forhead box O	
CHAPS	(3-[[3-Colamidopropil]-dimetilamonio]-propano-sulfonato)	FRET	Förster resonance energy transfer	
CHP	Hidroperóxido de cumeno	G		
CM	Centro de masa espectral	GGLG	Motivo estructural Gly-Gly-Leu-Gly de AhpC/Prx1	
CMP	Proteína maduradora de citocromos	GPx	Glutatió peroxidasa	
C _N	Cisteína nucleofílica de Trx	GR	Glutatió reductasa	
C _N S ⁻	Tiolato de cisteína nucleofílica de Trx	<i>g(r)</i>	Función de distribución radial	
CoQ	Coenzima Q en forma quinona	Grx	Glutarredoxina	
CoQH ₂	Coenzima Q reducida (ubiquinol)	GSSG	Disulfuro de glutatió	
C _P	Cisteína peroxidática	GST	Glutatió transferasa	
C _P -C _R	Disulfuro entre C _P y C _R	H		
C _P loop	Loop previo a C _P	HEK293	Human embryonic kidney 293	
C _P S ⁻	Cisteína peroxidática tiolato	Histag	Etiqueta de afinidad de 6 His	
C _P SH	Cisteína peroxidática tiol	<i>HsANXA2</i>	Anexina A2 humana	
C _P SOH	Ácido sulfénico de C _P	<i>HsCBS</i>	Cistationina β sintasa humana	
C _P SO ₂ H	Ácido sulfínico de C _P	<i>HsGrx2</i>	Glutarredoxina 2 humana	
C _P SO ₃ H	Ácido sulfónico de C _P	<i>HsPrx</i>	Peroxirredoxina humana	
C _R	Cisteína resolutive	<i>HsPrx(S)</i> ₂	Peroxirredoxina humana disulfuro	
C _R loop	Loop de C _R	<i>HsSTAT3</i>	STAT3 humano	
C _R SH	Cisteína resolutive tiol	<i>HsSOD2</i>	Superóxido dismutasa 2 humana	
C-terminal	Extremo carboxilo terminal	I		
C _{0.5}	Concentración donde la proporción entre dímeros y decámeros es igual	IAM	Iodoacetamida	
D		IB	Inmunoblot	
DEAE	Dietilaminoetil celulosa	IMAC	Cromatografía de afinidad por iones metálicos	
DKFZ	Deutscheskrebsforschungszentrum Instituto alemán de investigación del cáncer	IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido	
DNAsa	Desoxirribonucleótido endonucleasa	ITC	Calorimetría de titulación isotérmica	
Dsb	Disulfuro isomerasa procariota	K		
DTPA	Ácido dietilentriaminopentacético	<i>k_{ap}</i>	Constante de velocidad aparente	
		<i>K_{aV}</i>	Coeficiente de retención	
		<i>k_{cat}</i>	Constante catalítica	

K_D	Constante de disociación	SBP	Péptido de unión a streptavidina
$k_{H_2O_2}$	Constante de reacción con H_2O_2	SDS	Dodecil sulfato de sodio
KO	Remoción de un gen	SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida
k_{Obs}	Constante de velocidad observada	SEC	Cromatografía de exclusión molecular
L		SeOH	Ácido selenénico
LB	Medio Luria-Bertani	siRNA	ARN corto de interferencia
LED	Light emitting diode	SOD	Superóxido dismutasa
LOOH	Peróxido lipídico	<i>S.pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Sp</i>
LU	Locally unfolded	Srx	Sulfirredoxina
M		Sty1	Quinasa de respuesta a estrés
M	Modulación relativa	<i>S.typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>St</i>
MAS	Magic angle spinning	S100A	Proteína de unión a calcio
MSR	Receptor scavenger de macrófagos	T	
<i>M.tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>TbTxn</i>	Triparredoxina de <i>Trypanosoma brucei</i>
N		<i>t</i> -BHP	ter-butil hidroperóxido
<i>n</i>	Número de Hill	TCEP	Tris(2-carboxietil) fosfina
$N\pi$	Nitrógeno pi	TEVp	Proteasa del virus del grabado del tabaco
$N\zeta$	Nitrógeno zeta	TMA	Amortiguador tris, MES, ácido acético
NATA	N-acetil-L-triptofanamida	TPx	Tiorredoxina peroxidasa
NEM	N-etilmaleimida	Tpx	Tiol peroxidasa
NK	Células natural killer	TR	Tiorredoxina reductasa
NOX	NADPH oxidasa	Tsa	Proteína antioxidante específica de tioles
N-terminal	Extremo amino terminal	W	
O		wt	Wild type
OD	Densidad óptica	Y	
ON	Over Night	Yap1	Yeast AP-1 like transcription factors
ONOOH	Ácido peroxinitroso	Ybp1	Proteína de unión a Yap
P		YF	Motivo estructural Tyr-Phe de Prx
PBS	Amortiguador fosfato salino	$\Delta G_{Unión}$	Energía libre de unión
PDB	Protein data bank	ϵ	Coeficiente de absortividad
pI	Punto isoeléctrico	λ_{em}	Longitud de onda de emisión
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	λ_{ex}	Longitud de onda de excitación
PMT	Tubo fotomultiplicador	μ	Fuerza iónica
PREX	Base de datos de Prx	τ	Tiempo de vida de emisión de fluorescencia
Prx	Peroxirredoxinas	4-Tpy	4-Tiopiridona
PTP1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B	4,4-DTDPy	4,4-Ditiodipiridina
Pyk1	Piruvato quinasa 1	15(S)HpEPE	Hidroperóxido derivado del ácido eicosapentanoico
PVDF	Fluoruro de polivinilideno		
R			
RNS	Reactive nitrogen species		
ROOH	Hidroperóxido		
RONS	Reactive oxygen and nitrogen species		
ROSH	Reactive oxygen species		
RSH	Tiol		
RS ⁻	Tiolato		
R-SOH	Ácido sulfénico		
RSSH	Persulfuro		
S			
S _P	Átomo de azufre de C _P		
S _R	Átomo de azufre de C _R		

Capítulo 1

Introducción



1.1 Peroxirredoxinas

1.1.1. Breve reseña histórica

Descubrimiento

La nomenclatura de proteínas en el área de la bioquímica puede llegar a ser bastante confusa, ya sea por nombres excéntricos, complicados, difíciles de recordar, o por casos en los que existen múltiples denominaciones para la misma molécula. Teniendo en cuenta que no existe un nomenclátor curado y que los autores usan la denominación que les parece más pertinente, asociar un nombre con una proteína puede llegar a ser una tarea que requiera más tiempo del que quisiéramos dedicarle. Sin embargo, hay ciertos casos en los que podemos llegar a aprovechar este caos para poder entender la función de la proteína. En el caso de las Prx, se descubrieron en varios contextos biológicos y fueron nombradas de forma distinta en cada ocasión.

Fueron literalmente vistas por primera vez en 1969 por J. R. Harris¹, en un estudio de proteínas derivadas de fantasmas de eritrocitos. Aplicando técnicas de tinción de contraste negativo en microscopía electrónica de transmisión, Harris visualizó una estructura cilíndrica hueca de 125 Å de diámetro y 170 de altura, compuesta por al menos cuatro anillos de una proteína que denominó “torina” (por su forma toroide, ver **Figura 1.1**). La torina mostró tener una estequiometría de 10 subunidades por anillo y fue definida como una proteína asociada a la membrana eritrocitaria.

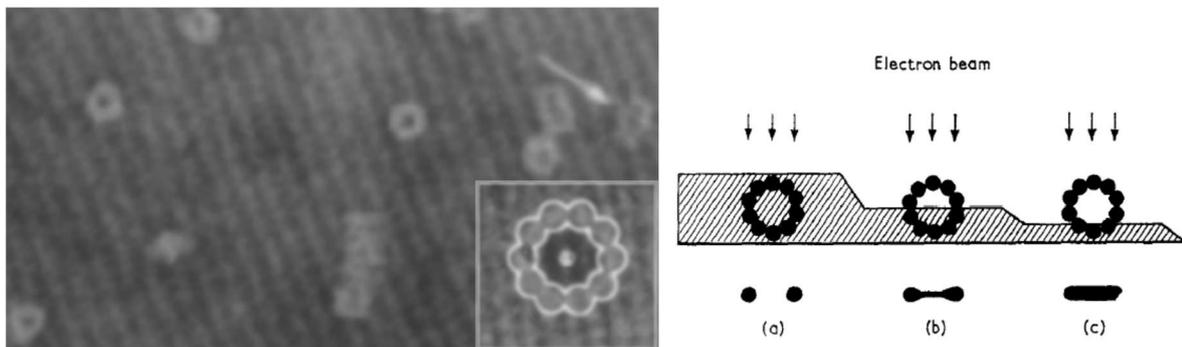


Figura 1.1. Primer hallazgo de Prx. En la figura de la izquierda se muestra parte de la micrografía de “torina” en tinción negativa. Abajo a la derecha se muestra una ampliación sobre una vista vertical del anillo, a la cual se le superpuso el contorno del dibujo de la representación esquemática original del artículo, que se muestra a la derecha. El esquema indica los patrones esperados según la profundidad de la tinción. Extraído y modificado de Harris et al¹.

Casi 20 años después, en 1988, el grupo de Earl Stadtman aisló una proteína de levadura capaz de proteger la actividad de la enzima glutamina sintetasa en mezclas que presentan un sistema generador de especies reactivas del oxígeno y azufre, constituido por oxígeno (O_2), hierro férrico (Fe^{3+}) y dadores de electrones con grupos tiol (RSH) como el ditiotreitól (DTT) o el glutatión (GSH)². En este trabajo se realizó una extensa caracterización bioquímica en la que se estudió por primera vez la función antioxidante de Prx, que fue vinculada inicialmente a la protección contra especies

reactivas en presencia de tioles, por lo que la proteína recibió el nombre de “thiol-specific antioxidant” (Tsa). Además, estimaron el peso molecular de la subunidad de Prx (27 kDa) y observaron por cromatografía de exclusión molecular una distribución de especies con un pico mayoritario de alrededor de 500 kDa. Teniendo en cuenta la estequiometría planteada por Harris 20 años atrás, esta especie equivaldría aproximadamente a un cilindro más corto de torina de dos anillos apilados.

Prácticamente en paralelo (1989), el grupo de Bruce Ames encuentra una proteína de 22 kDa en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, como parte de los genes de respuesta al estrés inducido por peróxido de hidrógeno (H_2O_2)³. Esta proteína era capaz de reducir hidroperóxidos orgánicos (hidroperóxido de cumeno, en este caso) a sus respectivos alcoholes a expensas de dinucleótidos de nicotinamida y adenina (NADH), a través de una flavoenzima. La proteína recibió el nombre de alquil hidroperóxido reductasa C (AhpC) y la flavoenzima reductora fue denominada AhpF. Este trabajo marcó un hito en el estudio de peroxidasas independientes de grupo hemo y glutatión.

En los años siguientes surgieron trabajos donde se encontraron a estas proteínas de alrededor de 25 kDa relacionadas a distintas funciones en diversos contextos biológicos. El primero fue en 1989, cuando un grupo japonés reporta el clonado de un gen tipo “house-keeping” específicamente sobreexpresado en células de eritroleucemia murina, al cual se llamó MER5⁴. El ARN mensajero de este gen demostró estar relacionado con los niveles de ARNm de las globinas durante la diferenciación celular de la línea eritroide. Otro trabajo a destacar es el de Plishker, que descubrió una proteína abundante del citosol del glóbulo rojo, capaz de modular la actividad de canales de potasio (K^+) dependientes de calcio (Ca^{2+})^{5,6}. Esta proteína, que se denominó calpromotina, presentó el peso monomérico esperado para Prx, una distribución de especies de alto peso molecular y una función sensible a agentes alquilantes de tioles. En 1993, Hungyi Shau y colaboradores purificaron una proteína del citosol de eritrocitos de características estructurales idénticas a la calpromotina, capaz de activar a las células natural killer (NK) para destruir células cancerígenas y recibió el nombre de “natural killer enhancing factor” (NKEF)⁷. También vinculado a la función inmune, otro grupo japonés identificó una proteína homóloga a AhpC cuyos niveles de expresión en macrófagos peritoneales de ratón aumentaba ante el estrés inducido por peróxido de hidrógeno y agentes alquilantes, la cual fue llamada “macrophage stress protein 23” (MSP23)⁸.

Poco después, el grupo de S. G. Rhee logró unir las piezas del puzle entre los hallazgos de los trabajos de Stadtman y Ames y descubrieron que la Tsa pertenecía a la misma familia de proteínas que la AhpC y que era en realidad una peroxidasa dependiente de NADPH⁹. En este caso el sistema reductor de la peroxidasa de levadura está compuesto por la tiorredoxina (Trx) y tiorredoxina reductasa (TR) y fue renombrada tiorredoxina peroxidasa (TPx). La entonces flamante TPx, dependía de dos residuos de cisteína (Cys) para catalizar la reducción de peróxidos: Cys40 y Cys170. En este trabajo se postula por primera vez el ciclo catalítico de Prx, donde Cys40 es la que reacciona primero con el peróxido, para luego formar un disulfuro con Cys170, siendo este último

reducido por Trx-TR a expensas de NADPH. En este trabajo también se elucidó que las Prx forman un dímero unido por un enlace disulfuro en su estado oxidado, que es reducible por DTT. A raíz de este resultado, se racionaliza por primera vez que la unidad catalítica es un dímero y que el enlace disulfuro se forma entre Cys40 y Cys170 de monómeros adyacentes. Finalmente, en 1994, estos múltiples descubrimientos decantan en el trabajo del grupo de S. G. Rhee donde se define a la familia de las Prx¹⁰. Aquí se reunió toda la información de las secuencias nucleotídicas obtenidas para las distintas Prx identificadas hasta el momento, para formar un dendrograma y comenzar con el proceso de clasificación de los miembros de la familia.

Sin contar el avistamiento de Harris en 1969, el proceso de descubrimiento de las Prx ocurrió en un período breve de 6 años, donde distintos grupos intervinieron prácticamente en paralelo. La multiplicidad de nombres que recibieron y funciones que se le asociaron, rápidamente hicieron destacar su importancia en la fisiología celular. Podemos hacer el ejercicio de aprovechar los distintos nombres para repasar características clave de las Prx. De torina, sabemos que parte de ellas poseen una estructura cuaternaria compleja compuesta por distintos arreglos de la misma subunidad. Tsa, AhpC y TPx, representan la función antioxidante y la actividad peroxidasa dependiente de residuos de cisteína y a expensas de NAD(P)H. Los otros nombres (MER5, calpromotina, NKEF, MSP23, entre otros¹¹⁻¹³) son ejemplos de participación en distintos procesos fisiológicos, ya sea directa o indirectamente. Al juntar esta información, podemos concluir que las Prx son proteínas de estructura cuaternaria compleja que forman parte de la respuesta de los organismos ante hidroperóxidos y, en ciertas situaciones, acoplan esta función a la regulación de procesos celulares.

Estado actual de la investigación en Prx

El área de investigación en Prx naturalmente aumentó en tamaño y complejidad desde 1994 hasta el presente. En la **Figura 1.2A** se muestran el número de resultados por año para la búsqueda “peroxiredoxin” cada cien mil publicaciones en la plataforma PubMed by Year, entre 1988 y 2024. Se puede observar cómo el número de publicaciones incrementó exponencialmente desde 1994, llegando a un máximo en el año 2010, a partir del cual se nota un descenso sostenido hasta el 2022.

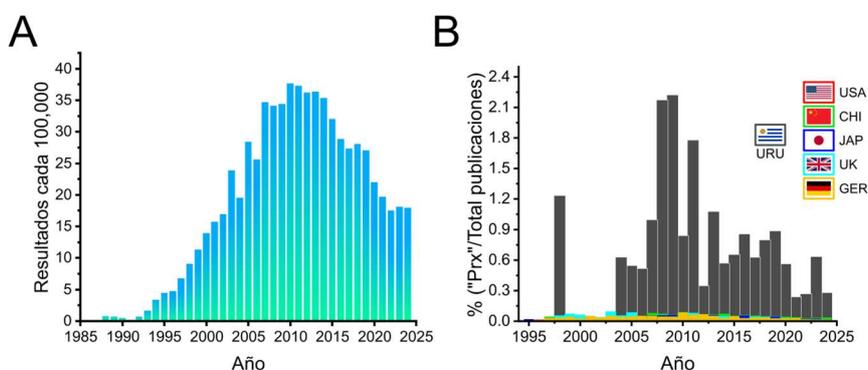


Figura 1.2. Publicaciones en el área Prx. A. Resultado de la búsqueda en PubMed de la palabra “peroxiredoxin” dividido por el total de las publicaciones registradas por año multiplicado por 10⁵. B. Porcentaje de publicaciones con el término “peroxiredoxin” sobre el total de las publicaciones en bioquímica, genética y biología molecular por año, para Uruguay y para los países del top 5 mundial (ordenados de arriba hacia abajo)¹⁴.

Independientemente de su descenso, ésta es un área de investigación activa con varios grupos a nivel nacional e internacional que se han comprometido y aportado conocimiento muy valioso. A nivel nacional se destacan los grupos del Laboratorio de Fisiología Biológica de Facultad de Ciencias, el Departamento de Bioquímica de Facultad de Medicina y el Institut Pasteur de Montevideo, que son reconocidos por su profundidad en el conocimiento de estas enzimas y por la calidad de los trabajos publicados. Además, el estudio de Prx actuó como catalizador para que estos grupos pudieran profundizar las investigaciones en bioquímica redox de tioles en cisteínas proteicas. En la **Figura 1.2B**, se muestra el resultado de la búsqueda en PubMed de la palabra “peroxiredoxin” y el filtrado de los resultados por país. En promedio y desde el año 1994, Uruguay produce alrededor de 10 veces más publicaciones relacionadas con Prx sobre el total que cualquiera de los países del top 5 mundial en el área bioquímica, genética y biología molecular.

A grandes rasgos podemos decir que los trabajos publicados en el área son de tres tipos: los que aspiran a dilucidar el detalle molecular del funcionamiento de Prx; los que intentan responder preguntas fisiológicas por aumento o disminución de niveles de Prx en distintas condiciones y los que tratan de tomar elementos de los dos anteriores para investigar el papel de Prx en procesos celulares.

En un trabajo reciente de revisión de la literatura en Prx que publicó nuestro grupo¹⁵, repasamos las publicaciones del período entre 2020 y 2022 donde se destacaron las relacionadas a la fisiología y biología celular por su cantidad. Por otro lado, notamos relativamente pocas publicaciones en lo que respecta a mecanismos moleculares de reacción, bioquímica y biofísica. Observamos que hay un gran conjunto de evidencia que involucra a las Prx en diferentes procesos (desarrollo del cáncer, respuesta inmune, desarrollo neural, entre otros), que termina dejando la impresión de que estas enzimas cumplen roles importantes prácticamente en todo. Sin embargo, muchos de estos trabajos no brindan información suficiente del mecanismo. Por lo tanto, concluimos que hace falta un acercamiento interdisciplinario donde los aspectos enzimológicos, bioquímicos y biofísicos de estas enzimas sean incorporados a la hora de investigar su participación en la fisiología.

1.1.2. Evolución y clasificación

Evolución a partir de Trx

Las Prx pertenecen a la suprafamilia de proteínas que presentan plegamiento tipo Trx. Esta comprende una amplia colección de superfamilias con una gran variedad de funciones y estructuras. Todas ellas comparten uno o más módulos del pequeño dominio Trx que consiste en 4 hebras beta intercaladas entre 3 hélices alfa (**Figura 1.3**)¹⁶. Las proteínas con plegamiento Trx se encuentran en todos los organismos y cumplen roles importantes en la defensa antioxidante (Trx, Grx, GPx, Prx), plegamiento oxidativo de proteínas (PDI, Dsb), metabolismo de xenobióticos (GST) y maduración de citocromos (CMP), entre otras (**Figura 1.4A**). No obstante, hasta el momento, apenas el 5.6% de las proteínas con plegamiento Trx han sido manualmente anotadas y asociadas con una función¹⁷.

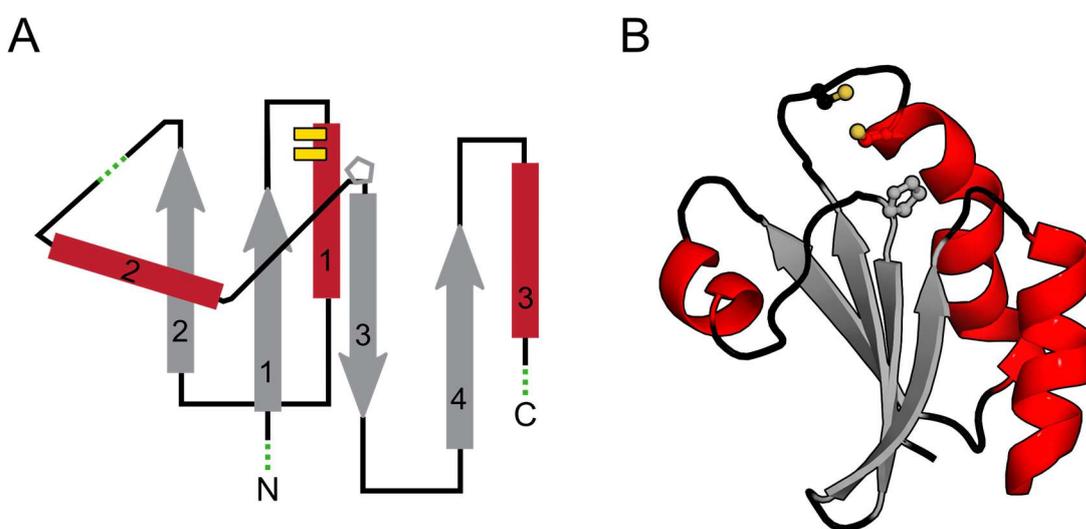


Figura 1.3. Núcleo básico de plegamiento Trx. A. Esquema topológico del plegamiento tipo Trx, las líneas punteadas verdes indican los sitios de inserciones y extensiones a partir del plegamiento canónico. Los rectángulos amarillos representan las Cys del motivo CxxC y el pentágono gris la *cis*-Pro. B. Representación de Trx1 humana (PDB: 3TRX) siguiendo el código de colores del esquema topológico, las Cys de sitio activo y la *cis*-Pro están representadas como varillas y esferas.

La función canónica de Trx consiste en la reducción de disulfuros proteicos mediante intercambio tiol-disulfuro, a partir de un sitio activo de dos Cys del tipo CxxC donde la primera Cys está ubicada en el extremo N-terminal de una hélice alfa y es la encargada de realizar el ataque nucleofílico al sustrato, formando un disulfuro mixto (i, **Figura 1.4B**). La segunda Cys, ubicada hacia el C-terminal de la misma hélice, reacciona con el disulfuro (ii, **Figura 1.4B**) reduciendo al sustrato y generando un disulfuro intramolecular en la enzima (iii, **Figura 1.4B**). Otro elemento clave del plegamiento Trx es la presencia de una prolina en conformación *cis* (*cis*-Pro) que se encuentra en el extremo N-terminal de β 3 (**Figura 1.3**) y está más conservado que la propia diada catalítica CxxC. Como se representa en la **Figura 1.4A**, no todas las familias conservan el arreglo CxxC para ejercer sus funciones, las variantes más comunes son de Cys por Ser/Thr, en la primera o segunda posición. Curiosamente, una proporción considerable de los miembros de esta suprafamilia (GST) ni siquiera presentan Cys en la posición correspondiente al motivo CxxC¹⁷.

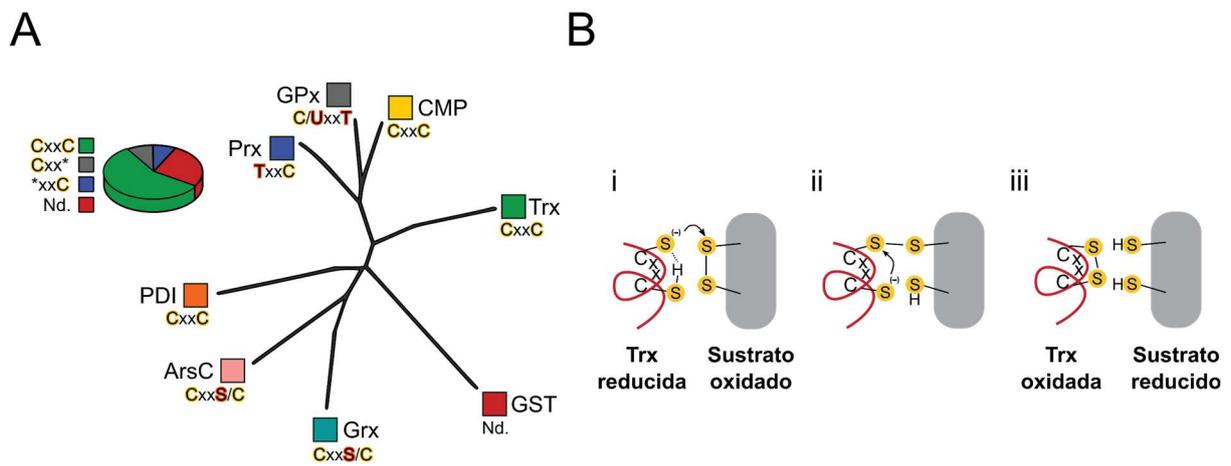


Figura 1.4. Filogenia y función canónica de la suprafamilia Trx. **A.** Dendrograma de la suprafamilia Trx extraído y modificado a partir de Atkinson y Babbitt¹⁷. Debajo de cada familia se indica el motivo típico de sitio activo (Nd. No determinado), las letras con fondo rojo representan los residuos en lugar de las Cys del motivo canónico. Arriba a la izquierda, gráfico de tarta de la proporción de secuencias con los distintos motivos de sitio activo: CxxC (56.8%), Cxx* (8.9%), *xxC (7.6%) y Nd. (23.3%). ArsC: arsenato reductasa. **B.** Esquema de la función canónica de Trx.

Al igual que sucede con otras proteínas dentro de este plegamiento, se postula que las Prx evolucionaron de un ancestro tipo Trx a partir de sustituciones, inserciones y extensiones sobre la estructura canónica. Sin embargo, establecer estas relaciones evolutivas es una tarea compleja debido a la gran divergencia que presentan las secuencias de ambas familias. Utilizando una metodología basada en la búsqueda de secuencias proteicas que vincularan a Trx con Prx, Copley y colaboradores¹⁸ encontraron que la familia de las CMP es el eslabón que las une evolutivamente, debido a que presentan una relación cercana con Trx a nivel de secuencia y una más estrecha aún con Prx a nivel estructural (**Figura 1.5**). Más tarde, otro trabajo confirma el hallazgo de Copley, utilizando una red basada en similitud de secuencia sobre un set de datos de 4082 secuencias y 159 estructuras, donde además se encuentra que las GPx también son intermediarios estructurales entre Trx y Prx¹⁷. El hecho de que las GPx sean estructuralmente más cercanas a CMP que las Prx (**Figura 1.4A**), permite plantear un escenario donde las GPx fueron las primeras peroxidasas generadas a partir de cambios menores en el bloque estructural CMP, mientras que mayores modificaciones llevaron a la aparición de las Prx.

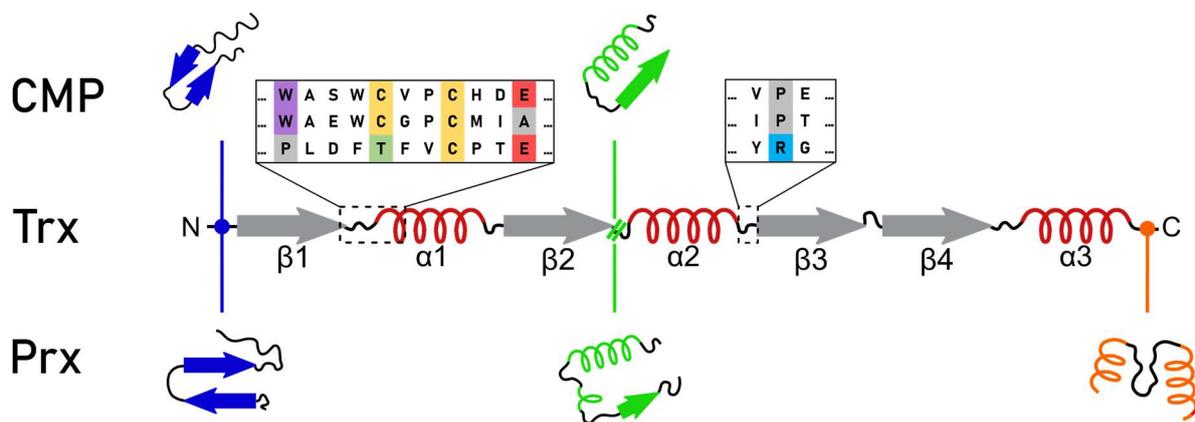


Figura 1.5. Relaciones de estructura primaria y secundaria entre Trx, CMP y Prx. En el centro se esquematiza la organización de elementos de estructura secundaria del plegamiento Trx canónico de N a C-terminal. En azul, verde y naranja se representan los elementos estructurales adicionales en CMP y Prx y donde ocurren a nivel del arreglo canónico. En los recuadros se alinearon las regiones donde se ubican los residuos más conservados del plegamiento Trx para CcmG de *Bradyrhizobium japonicum* (CMP), EcTrx y HsPrx2. Se colorearon las posiciones más conservadas según la identidad fisicoquímica del residuo: apolar (gris), polar (verde), aromático (violeta), negativo a pH neutro (rojo), positivo a pH neutro (azul) y Cys (amarillo).

Las CMP presentan extensiones en el N-terminal y una inserción entre $\beta 2$ y $\alpha 2$ respecto al plegamiento Trx y conservan el sitio activo canónico junto con la *cis*-Pro. A diferencia de la Trx que tienen un amplio repertorio de sustratos, estas proteínas actúan como disulfuro oxidorreductasas para blancos específicos en las rutas de maduración de citocromos, como el c^{19} y el $aa3^{20}$.

Las Prx, al igual que las CMP, presentan una extensión N-terminal y una inserción entre $\beta 2$ y $\alpha 2$ del plegamiento Trx, pero, a diferencia de las CMP, pueden exhibir largas extensiones en el C-terminal. Por otro lado, solo conservan la Cys C-terminal del motivo CxxC ya que generalmente se encuentra una treonina (Thr) o una serina (Ser) en el lugar de la N-terminal. Además, presentan un residuo de arginina (Arg) conservado en lugar de la *cis*-Pro y una Pro conservada en lugar de un triptófano (Trp). La sustitución de la *cis*-Pro por la Arg es la modificación que caracteriza y marca el comienzo evolutivo de las Prx dentro de la suprafamilia Trx (**Figura 1.6B**)¹⁷. Por otro lado, en algunas Prx la segunda Cys de sitio activo puede aparecer en distintas posiciones, en la misma o en otra cadena polipeptídica y a varios residuos de distancia hacia el C-terminal.

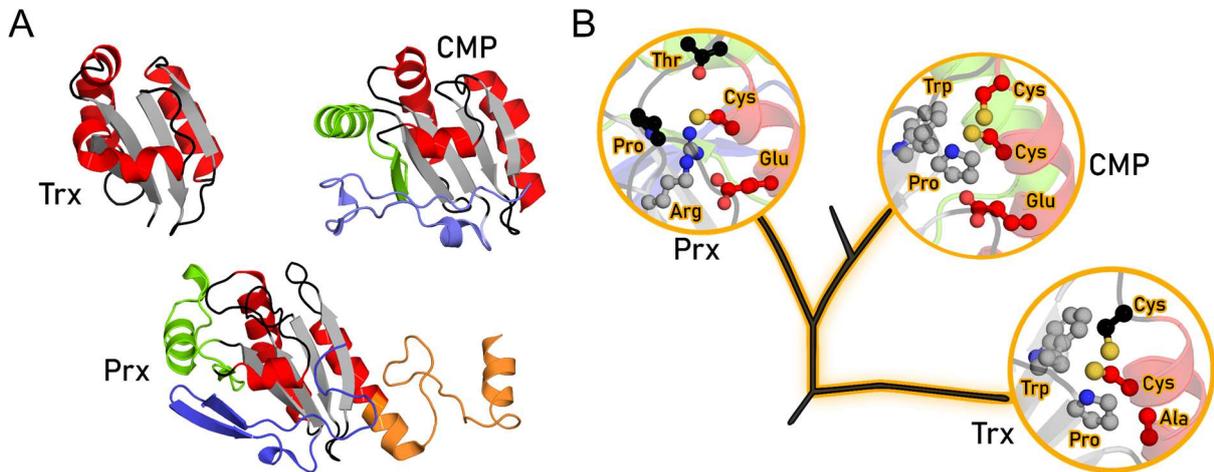


Figura 1.6. Vista estructural de las relaciones evolutivas entre Trx, CMP y Prx. **A.** Estructuras cristalográficas de Trx, CMP y Prx (PDB: 1XOA, 1KNG y 7KIZ respectivamente). En gris, rojo y negro se representan los elementos de estructura secundaria correspondientes al plegamiento Trx canónico (mismo esquema de colores que en las figuras anteriores) y en azul, verde y naranja se destacan la extensión N-terminal, la inserción $\beta 2$ - $\alpha 2$ y la extensión C-terminal respectivamente. **B.** Mismo dendrograma de la **Figura 1.4A**, pero con la representación estructural de los aminoácidos en las posiciones más conservadas para Trx, CMP y Prx. El trazo amarillo sobre el dendrograma representa el camino evolutivo desde Trx a Prx a través de CMP a partir de la incorporación de Arg en lugar de *cis*-Pro. Adaptado a partir de Atkinson y Babbitt¹⁷.

Dejando de lado la extensión C-terminal que ocurre particularmente en dos grupos de Prx, el tipo de estructura secundaria presente en la inserción $\beta 2$ - $\alpha 2$ y la extensión N-terminal es muy similar entre Prx y CMP, como se ve representado en el esquema de la **Figura 1.5** y la **Figura 1.6A**. En los alineamientos de la **Figura 1.5** queda clara la similitud entre CMP y Trx y la relativa lejanía de Prx a nivel de secuencia. Sin embargo, CMP y Prx comparten la presencia de un residuo de Glu conservado a dos residuos de distancia de la segunda Cys del motivo CxxC, ubicado por debajo dentro de la misma hélice (**Figura 1.6B**).

Además de su función de reducir peróxidos, otra ganancia evolutiva de las Prx es su capacidad de formar oligómeros de distintos tamaños y formas. Existen dos tipos de interfases por las cuales las Prx pueden formar dímeros: la interfase tipo A ("A" de alternativa o ancestral) donde los monómeros se unen "punta con punta" a través de la inserción central entre $\beta 2$ y $\alpha 2$ del plegamiento Trx. Por otro lado, la interfase tipo B ("B" de basado en hoja β) consiste en la interacción lateral entre la última hoja β de dos monómeros de Prx (**Figura 1.7**)^{21,22}.

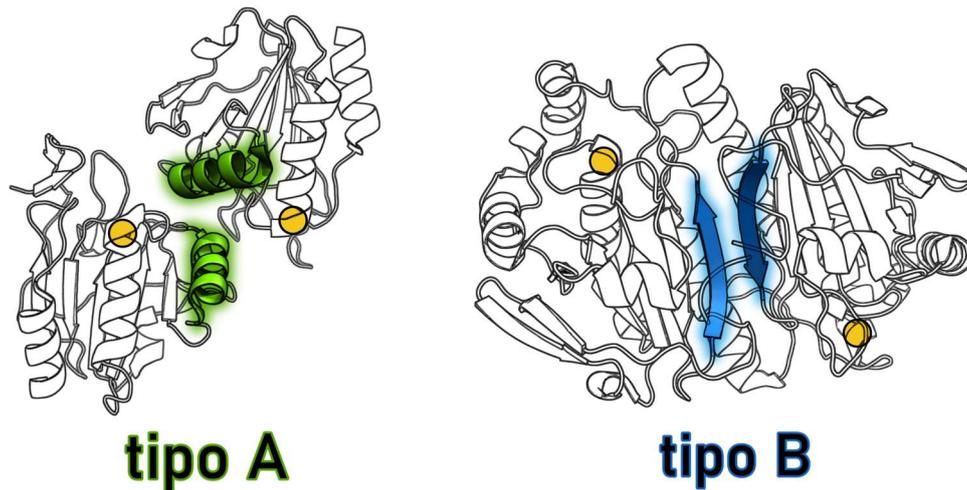


Figura 1.7. Interfases de oligomerización de Prx. A la izquierda y derecha se muestran las estructuras de los dímeros de *HsPrx2* (PDB: 7KIZ) y *Streptococcus pneumoniae* Tpx (PDB: 1PSQ) representadas en forma de trazo. En verde y azul se colorean los elementos de estructura secundaria sobre los que se centra la interacción y los círculos amarillos representan las cisteínas de sitio activo.

Clasificación

El primer criterio con el que se comenzó a diferenciar Prx en distintas clases se construyó con base en sus diferencias catalíticas y arquitectura de sitio activo. Otros aspectos que varían entre Prx son su estado oligomérico, su susceptibilidad a la inactivación a altas concentraciones de peróxido y sus especificidades por sistema reductor y sustratos.

Todas las Prx comparten la presencia de un residuo de cisteína de sitio activo absolutamente conservado que recibe el nombre de **cisteína peroxidática (C_P)**, cuya función es reducir la molécula de peróxido formando ácido sulfénico (C_PSOH) como se representa en el primer paso de la **Figura 1.8B**. La C_P junto con los aminoácidos mencionados en la **Figura 1.5** (Pro, Thr y Arg) forman la tétrada catalítica del sitio activo que sostiene la función peroxidasa. A nivel local el motivo de sitio activo es PxxxTxxC_P, mientras que la Arg se encuentra varios residuos apartada hacia el C-terminal, pero muy próxima a nivel tridimensional (**Figura 1.8A**). Tanto la presencia de la carga positiva del grupo guanidinio de la Arg, como la capacidad del grupo OH de la Thr/Ser de formar enlace de hidrógeno con el grupo tiol (RSH) de C_P, son requisitos indispensables para generar la forma reactiva del tiol, el tiolato (RS⁻)²³. Otras posiciones conservadas son la de un aminoácido aromático, generalmente un Trp o Phe, en α3 y la presencia de una Ser en β4 (**Figura 1.8A** y **Figura 1.9**). Para ambas posiciones, se sugiere que tienen la función de mantener la estabilidad del sitio activo²⁴. Además, todas las Prx comparten un núcleo estructural común, que consiste en siete hebras β y cinco hélices α. Cinco de las siete hebras (β5, β4, β3, β6 y β7) forman una hoja β central, que se dispone en el interior de la estructura y se encuentra cubierta por β1-β2-α1 y α4 de un lado y α2, α3 y α5 en el lado opuesto (**Figura 1.8C**).

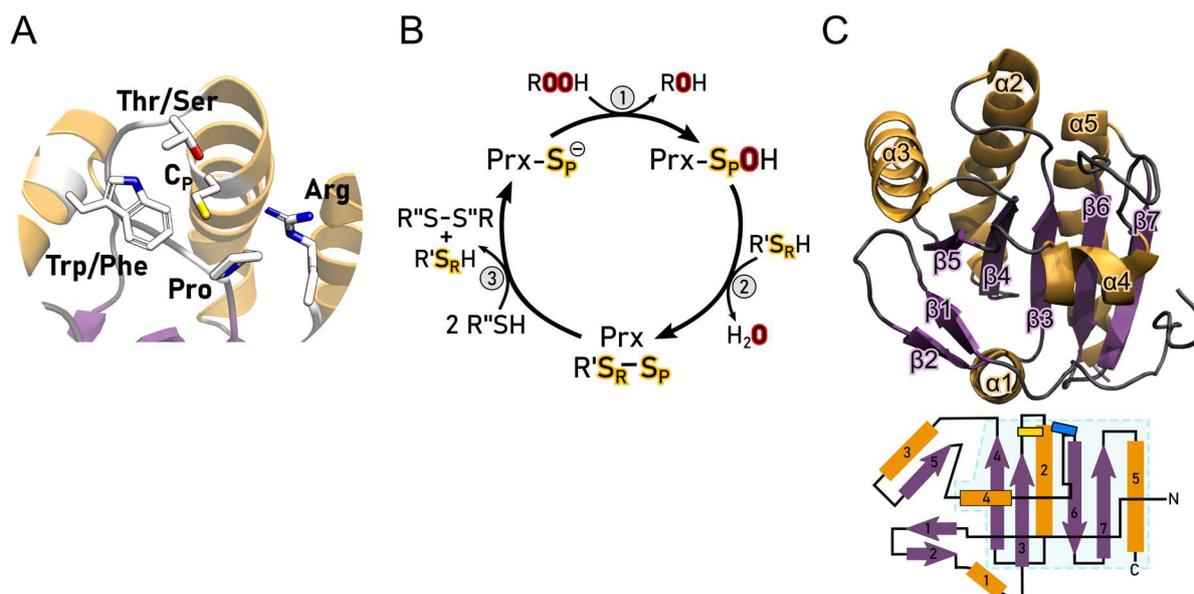


Figura 1.8. Elementos comunes en Prx. **A.** Representación de los aminoácidos conservados del sitio activo como varillas sobre la estructura tridimensional de una Prx de levadura (PDB: 2A4V). **B.** Pasos elementales del ciclo catalítico de Prx. **C.** Representación del núcleo estructural común de Prx (PDB: 2A4V), donde se numeraron los elementos de estructura secundaria. En la imagen inferior se muestra un mapa topológico de N a C-terminal, donde los recuadros amarillo y azul representan la ubicación de C_P y el residuo de Arg conservado respectivamente. En el recuadro celeste se ubican los elementos estructurales correspondientes al plegamiento Trx canónico.

Las Prx comienzan a diferenciarse a partir del paso de regeneración de la enzima reducida, es decir, desde C_PSOH hacia la forma tiol de C_P (pasos 2 y 3, **Figura 1.8B**). En muchas Prx una segunda cisteína ubicada en el C-ter, llamada **cisteína resolutive (C_R)**, reacciona con C_PSOH liberando una molécula de agua y formando un enlace disulfuro (paso 2, **Figura 1.8B**), que posteriormente es reducido a la forma “ditiol” (C_PSH , C_RSH) por sistemas reductores dependientes de tioles (paso 3, **Figura 1.8B**). Este grupo de Prx se clasifica como Prx de dos cisteínas o 2-Cys Prx. A su vez, dentro de esta clase se identifican dos subclases: las 2-Cys típicas y atípicas. En las primeras, el enlace disulfuro se forma entre subunidades adyacentes dentro de un dímero, mientras que en las últimas es intrasubunidad. Por último, están las Prx de una cisteína, o 1-Cys Prx, que carecen de C_R y se propone que un tiol de otra proteína o de bajo peso molecular son responsables de regenerar la enzima (pasos 2 y 3, **Figura 1.8B**).

Este criterio de clasificación es bastante conveniente para comenzar a entender el mecanismo catalítico de Prx, pero no es muy útil a la hora de representar la variedad dentro de la superfamilia. En varios trabajos se ha intentado clasificar los distintos subgrupos utilizando alineamientos de secuencia y armado de árboles filogenéticos; según la posición de la C_R o de la identidad de ciertos aminoácidos cercanos a C_P ; por su estructura cuaternaria y por la presencia y naturaleza de la extensión C-terminal^{18,21,23,25}.

En 2011, el trabajo de Kimberly J. Nelson²⁴ logró unificar la clasificación de Prx y llegar a un criterio mediante el uso de herramientas bioinformáticas que permitieron definir un perfil funcional de sitio activo en base a las estructuras disponibles. Se definieron “huellas” de sitio activo para cada estructura, tomando todos los residuos cuyos átomos estuvieran a 10 Å del centro geométrico de

los aminoácidos más conservados (Pro, Thr/Ser, C_P y Trp/Phe) y representándolos como secuencias de N a C-terminal de forma tal de poder alinearlos con las secuencias presentes en el GeneBank. Para las Prx que forman disulfuro intersubunidad (2-Cys típicas) la C_R no fue incluida porque la herramienta solo considera aminoácidos en una única cadena polipeptídica.

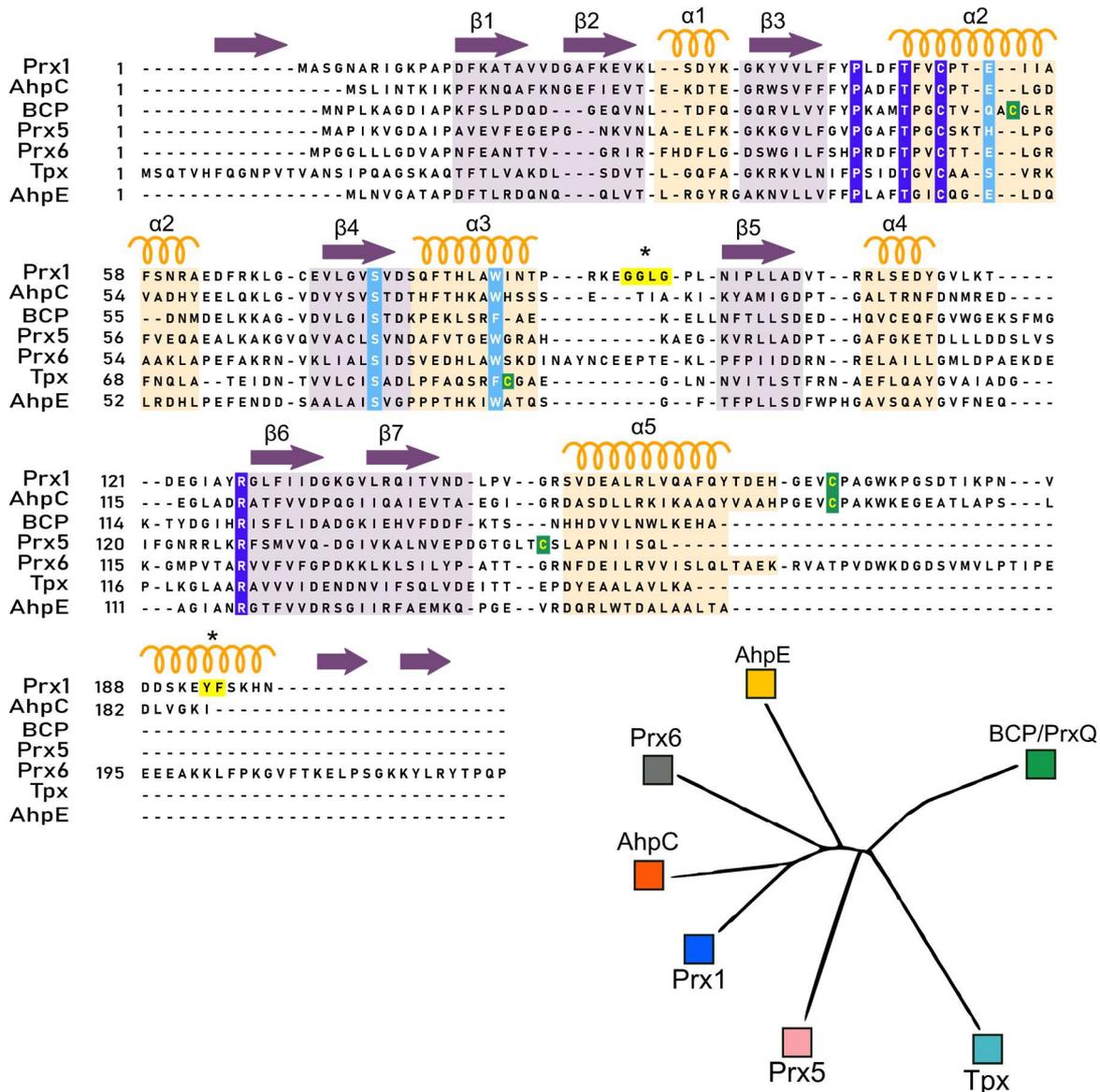


Figura 1.9. Alineamiento de secuencia de las subfamilias de Prx. Alineamiento estructural de secuencia para miembros representativos de las distintas familias de Prx (AhpC/Prx1: *StAhpC/HsPrx2*, BCP: *EcBCP*, Prx5: *HsPrx5*, Prx6: *HsPrx6*, Tpx: *EcTpx*, AhpE: *MtAhpE*). Los elementos de estructura secundaria comunes al plegamiento Prx se encuentran numerados y las secuencias correspondientes se colorearon según el tipo de estructura (hebras β en violeta y hélices α en naranja). El resto de los elementos que no son compartidos entre Prx no fueron numerados. En fondo azul y letras blancas se representan los aminoácidos conservados de sitio activo, otras posiciones conservadas se muestran con fondo celeste y letras blancas. C_R se representó con fondo verde y letras amarillas. Las regiones marcadas en amarillo y con asterisco, son motivos de secuencia conservados en la familia Prx1. En la parte inferior derecha, se muestra un dendrograma de la superfamilia Prx, extraído y modificado de Peroxiredoxin classification index (PREX)²⁶.

Como resultados de la agrupación jerárquica de los distintos perfiles de sitio activo se identificaron 6 subfamilias de Prx: AhpC/Prx1, Prx6, Prx5, Tpx, BCP/PrxQ y AhpE, nombradas por uno o dos miembros representativos de cada una.

La subfamilia AhpC/Prx1 es la más grande y ampliamente distribuida, con miembros en todos los seres vivos. Además del núcleo estructural común, estas Prx presentan una extensión C-terminal que incluye a la C_R en una posición conservada (C172 numeración HsPrx2), en un 99.1% de sus miembros (**Figura 1.10**). Estas proteínas forman un dímero (interfase tipo B, **Figura 1.7**) como unidad catalítica mínima y pueden llegar a presentarse con estructuras cuaternarias más complejas como decámeros y dodecámeros. Las BCP/PrxQ incluyen a las proteínas bacterianas BCP (proteína co-migradora de bacterioferritina) y a la PrxQ de plantas. Son las Prx más ancestrales y se propone que el resto de las familias emergieron a partir de ellas (**Figura 1.9**)^{18,24}. Esta clase está principalmente distribuida en bacterias, aunque también se encuentra en eucariotas (plantas y levaduras) y son las únicas Prx monoméricas. Se sugiere que pueden actuar mediante un mecanismo tipo 2-Cys atípicas o 1-Cys y C_R se posiciona a 5 residuos de C_P en α 2, en el 54% de sus miembros (**Figura 1.10**).

La subfamilia Prx5 se nombró a partir de HsPrx5 y están distribuidas en todos los dominios de la vida. Sus miembros forman dímeros, por una interfase tipo A (**Figura 1.7**) y pueden ser 1-Cys (14%) o 2-Cys. En esta clase C_R se puede encontrar en el loop previo a α 5 (17%), sin embargo, en la mayoría de las secuencias su posición es incierta (69%). Los miembros pertenecientes a la subfamilia Prx6 son bastante parecidos a las AhpC/Prx1 debido a que poseen una extensión C-terminal y forman dímeros a través de la interfase B e incluso estados oligoméricos mayores. Sin embargo, poseen predominantemente una única cisteína de sitio activo (40% de las secuencias) aunque para muchos de sus miembros la posición de C_R es incierta (57%); generalmente se desconoce el reductor directo. Otra característica de esta familia es que la extensión C-terminal es más grande y con motivos de estructura secundaria adicionales. También pueden presentar Cys adicionales en esta región, pero no se ha reportado que tengan un rol catalítico²⁷. La subfamilia Tpx es la más pequeña y menos diversa desde el punto de vista filogenético. Sus miembros se encuentran en bacterias y presentan 2 cisteínas de sitio activo en la misma cadena polipeptídica, donde C_R generalmente se posiciona en α 3 inmediatamente después del Trp/Phe conservado (96.4%). De forma análoga a las Prx5, los miembros de esta familia forman dímeros a través de la interfase A, aunque no es necesario para la catálisis. Por último, las AhpE se encuentran principalmente en bacterias gram-positivas del orden *Actinomycetes*, son poco parecidas al resto de las subfamilias y pueden tener una o dos cisteínas de sitio activo. Generalmente C_R se encuentra en α 2 (56%) al igual que los miembros de la familia BCP y presentan dímeros a través de la interfase A.

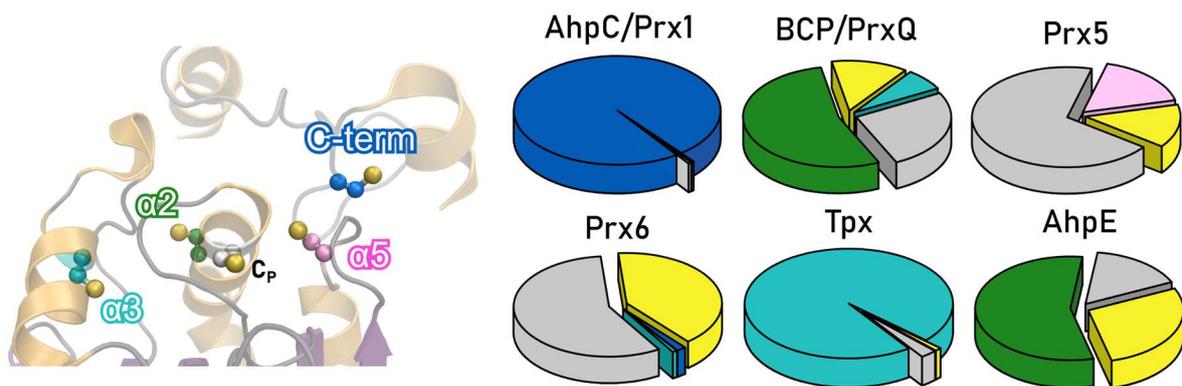


Figura 1.10. Presencia de C_R en Prx. A la izquierda se muestra la estructura canónica de Prx junto con la porción C-terminal presente en las AhpC/Prx1 (PDB:7KIZ) sobre la cual se ubicaron C_P y las distintas posiciones posibles de C_R . A la derecha se representan diagramas de torta que expresan el porcentaje de miembros de cada familia que presentan C_R en el extremo C-terminal (azul), α_2 (verde), α_3 (turquesa), α_5 (rosado), no presentan C_R (amarillo), o que su posición es incierta (gris). Porcentajes extraídos de Nelson et al²⁴.

Familia AhpC/Prx1 e isoformas humanas

El hecho de que esta familia sea la más grande y de las más estudiadas, dio la posibilidad de identificar subgrupos con propiedades características. El análisis de huellas de sitio activo de las secuencias pertenecientes a esta familia²⁴, indica que existen 4 subgrupos dentro de AhpC/Prx1 que se corresponden con características biológicas conocidas. Las del grupo 1 son las más abundantes y presentes en todos los dominios de la vida, cuentan con los motivos estructurales “GGLG” (también pueden encontrarse Ile y Val en lugar de la Leu) y “YF” (Figura 1.9) que está asociado a la susceptibilidad a la inactivación por exceso de hidróperóxido (sobreoxidación), propiedad que se relaciona frecuentemente con las de origen eucariota^{27,28}. Su reductor principal es el sistema Trx o un análogo organismo-específico, como la triparredoxina en tripanosomátidos. Los otros 3 grupos no presentan los motivos de susceptibilidad y se encuentran principalmente en bacterias. Los grupos 2 y 3 se caracterizan por estar asociados a los sistemas reductores AhpF y AhpD respectivamente y el 4 se asocia con dos géneros específicos de bacteria (Flavobacteria y Chlamydia) y es el menos caracterizado funcional y estructuralmente. Se ha visto que algunos parásitos (*Trypanosoma*, *Leishmania*) y bacterias (*Helicobacter*, *Chlamydia*) pueden presentar los motivos de susceptibilidad a la sobreoxidación. La presencia de estos motivos estructurales en estas Prx puede haber sido el resultado de la transferencia horizontal de genes entre huésped y hospedero²⁹.

Los ejemplares de esta familia en humanos corresponden al grupo 1 dentro de las AhpC/Prx1 y son las Prx 1 a la 4. Las HsPrx1 y 2 son las proteínas protagonistas de este trabajo, comparten más de un 90% de similitud y se ubican principalmente en el citoplasma y en el núcleo, mientras que HsPrx3 y 4 se localizan en la mitocondria y el retículo endoplásmico respectivamente. En general, todas estas Prx se expresan constitutivamente en la mayoría de los tejidos y células humanas, por lo que rara vez se asocian con un tejido o tipo celular específico. Sin embargo, existen algunas excepciones: HsPrx2 es la tercera proteína más abundante en glóbulos rojos, HsPrx4 presenta especificidad en páncreas y altos niveles de expresión en células espermáticas tardías y HsPrx1 junto con HsPrx3 se expresan con relativa abundancia en células tubulares proximales³⁰.

1.1.3. Ciclo catalítico de AhpC/Prx1

Conceptualmente podemos dividir el ciclo catalítico en dos mitades: una de oxidación y otra de reducción. Ambas mitades están conectadas por una transición conformacional en el sitio activo, desde un estado completamente plegado (“fully folded”, FF) a uno localmente desplegado (“locally unfolded”, LU), cuyas estructuras se describirán en la sección 1.1.4. Además, existen ciertas reacciones alternativas como la sobreoxidación, que puede ser revertida o no, y la reducción por mecanismos distintos al sistema Trx. A continuación, se muestra un esquema con el ciclo catalítico completo, cuyas etapas describiré en las siguientes secciones.

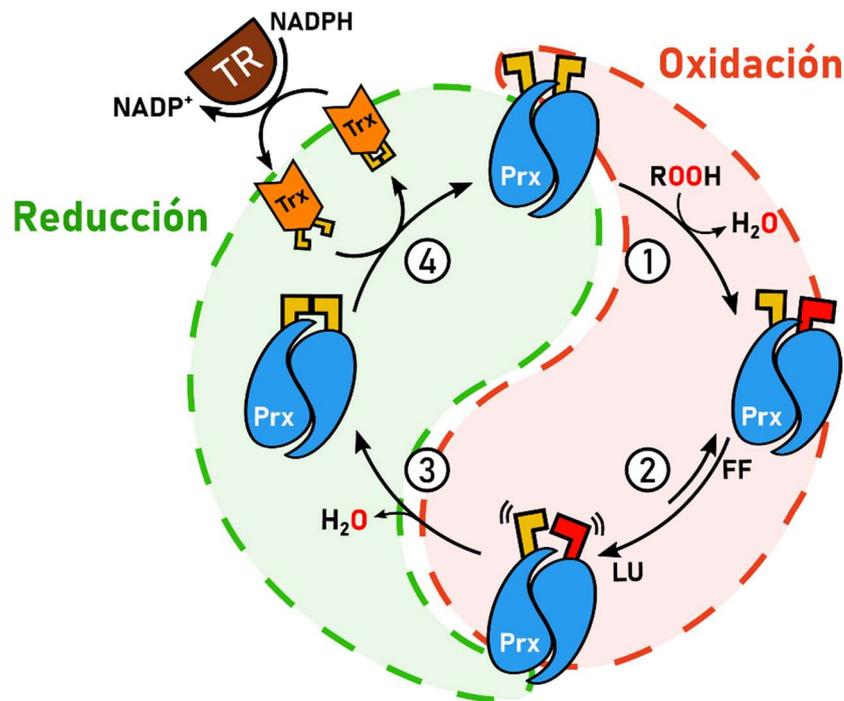


Figura 1.11. Esquema general del ciclo catalítico de AhpC/Prx1. Los números representan los distintos pasos del ciclo: 1. Peroxidación de C_p 2. Transición FF-LU. 3. Resolución. 4. Reducción por el sistema Trx-TR-NADPH. Se eligió representar un sitio activo por dímero de Prx. Las formas amarillas representan residuos de cisteína en su estado tiol cuando están separadas y disulfuro si están juntas. Las formas rojas representan C_pSOH.

Oxidación

En el primer paso de la oxidación ocurre la peroxidación, donde el tiolato de C_p realiza un ataque nucleofílico sobre uno de los oxígenos del H₂O₂ para formar C_pSOH y H₂O (paso 1, **Figura 1.11**). Como se mencionó en la sección 1.1.2, el motivo conservado Pxxx(T/S)xxC y la Arg127 (numeración HsPrx2) garantizan la reactividad de C_p tanto estabilizando el tiolato, como, posicionando el peróxido de forma catalíticamente eficiente (**Figura 1.12 A-C**). De esta manera, C_p no solo es más ácida que una cisteína convencional (pK_A 5-6.3 vs. 8.3-8.5), sino que también presenta una reactividad varios órdenes de magnitud superior a la esperada para un tiol de bajo peso molecular con el mismo pK_A³¹ (**Figura 1.12D**). Es importante mencionar que la nucleofilia de los tioles no necesariamente va de la mano de su acidez; si bien un pK_A bajo refleja una mayor disponibilidad de tiolato a pH fisiológico, su basicidad tiene que mantenerse regulada como para retener su nucleofilia y que la reacción transcurra de forma rápida. Como se muestra en la **Figura**

1.12D, lo que se ve en tioles proteicos es que no hay correlación entre su acidez y reactividad con un electrófilo dado, a diferencia de tioles de bajo peso molecular³².

No obstante, la arquitectura del sitio activo no fue seleccionada por la evolución solo para aumentar la reactividad de C_P. También se propone que Arg conservadas (R127/150) forman una red de enlaces de hidrógeno con el H₂O₂ y así estabilizan el estado de transición, aumentan la electrofilia del oxígeno proximal (oxígeno A, **Figura 1.12B**) y facilitan la salida del grupo RO⁻³³⁻³⁶ (**Figura 1.12C**).

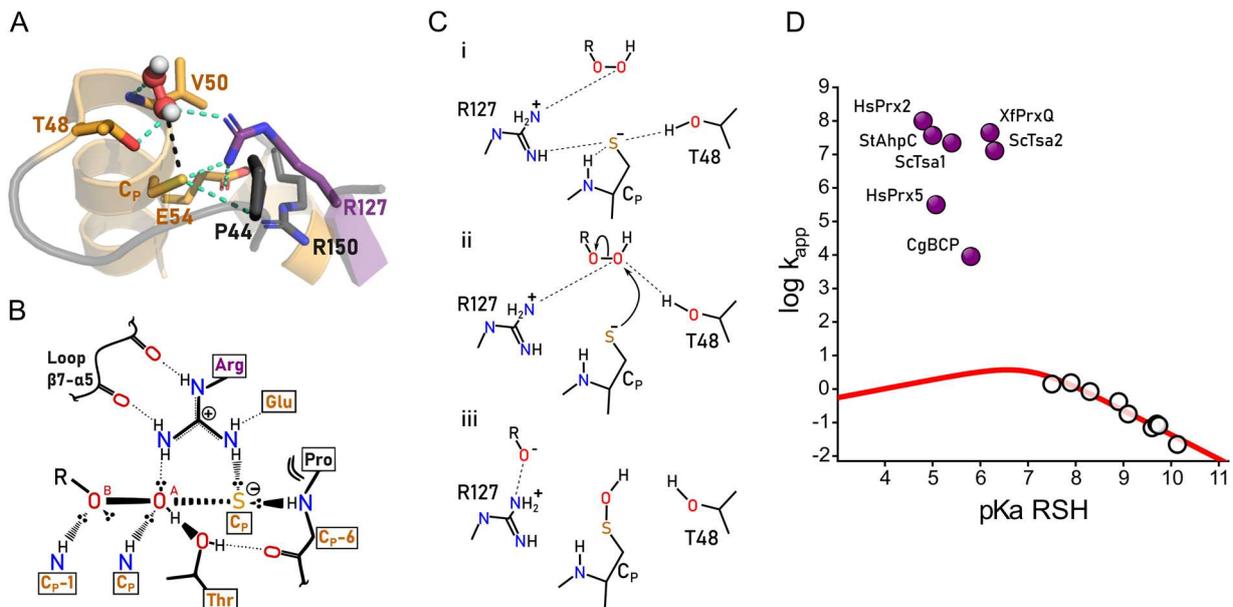


Figura 1.12. Complejo enzima-sustrato, formación de C_PSOH y reactividad de tioles con peróxidos. **A.** Estructura del complejo de Prx de *Aeropyrum pernix* con H₂O₂ (PDB: 3A2V), se representaron los aminoácidos de la tétada catalítica junto con E54 y R150 (numeración *HsPrx2*). Las líneas punteadas celestes indican interacciones entre los residuos de sitio activo y con el H₂O₂, mientras que la negra representa la orientación de C_P con respecto al H₂O₂. **B.** Esquema de las interacciones dentro del complejo enzima-sustrato, extraído y modificado de Hall et. al³⁶. **C.** Esquema de la reacción de peroxidación de C_P, **i.** ingreso del peróxido al sitio activo de Prx. **ii.** Cambio en la red de enlace de hidrógeno del tiolato al peróxido promoviendo el ataque nucleofílico sobre el oxígeno A. **iii.** Rotura del enlace del peróxido y estabilización del grupo saliente por R127³¹. **D.** Gráfico de la relación de Brønsted (línea roja; constante de reacción a pH 7 vs pK_A) para tioles de Prx (círculos violetas; Xf: *Xylella fastidiosa*; Cg: *Corynebacterium glutamicum*) y tioles de bajo peso molecular (círculos vacíos) en relación a su reacción con H₂O₂ (k_{ap}). Tioles de bajo peso molecular de menor a mayor pK_A: L-Cys-etil ester, L-Cys-Gly, L-Cys, GSH, homocisteína, 2-mercaptoetanol, ácido dimercaptosuccínico, N-acetil-Cys, captopril.

Este grupo de Prx contiene enzimas excepcionalmente rápidas, con constantes de velocidad que se aproximan al límite difusional, en un rango de 10⁵ a 10⁸ M⁻¹ s⁻¹³⁷⁻⁴². Medir la velocidad de formación de C_PSOH no es para nada sencillo y presenta desafíos a nivel experimental. En primer lugar, dada la velocidad de la reacción es recomendable hacer cinética pre-estacionaria y usar dispositivos de flujo detenido (“stopped-flow”), que permiten registrar el avance de la reacción pocos milisegundos después del mezclado de los reactivos. En cuanto a la detección, se han utilizado métodos de competencia cinética con hemoperoxidasas, siguiendo la señal de formación de intermediarios catalíticos por espectroscopía UV-VIS³⁸⁻⁴⁰. Una alternativa más directa, surge

del descubrimiento de que los residuos de Trp conservados cercanos al sitio activo (W86, *HsPrx2*), pueden utilizarse para seguir la reacción por el cambio en la señal de fluorescencia^{43,44}, ya que la emisión del Trp es muy sensible a cambios fisicoquímicos en su entorno.

Si bien el H₂O₂ es el sustrato específico, existe una variedad de hidroperóxidos (ROOH) que pueden reaccionar con C_P de forma análoga. Algunos de ellos son: ácido peroxinitroso (ONOOH), *ter*-butil hidroperóxido (*t*-BHP), hidroperóxido de cumeno (CHP) y peróxidos lipídicos (LOOH). El ONOOH es un agente oxidante fuerte, formado a partir de la reacción entre el radical aniónico superóxido (O₂⁻) y el óxido nítrico (NO[•])⁴⁵. Su reactividad es muy similar a la del H₂O₂, con constantes de velocidad en el orden de 10⁷ M⁻¹ s⁻¹⁴¹. Tanto el *t*-BHP como el CHP son peróxidos sintéticos capaces de oxidar C_P³⁸, con velocidades que dependen de la Prx y que en algunos casos superan a la del H₂O₂³⁵. Estos hidroperóxidos junto con los LOOH son llamados hidroperóxidos de alquilo y se caracterizan por tener un grupo R alifático, generalmente voluminoso. En realidad, *t*-BHP y CHP se utilizan como análogos de LOOH, debido a que su grupo R más corto facilita el trabajo en sistemas acuosos⁴⁵. Los LOOH son producto de la peroxidación de lípidos en membranas y su presencia está asociada al daño oxidativo y al novedoso proceso de muerte celular llamado ferroptosis⁴⁶. No todas las Prx presentan una reactividad apreciable con estos peróxidos, sin embargo, una reciente caracterización cinética demostró que LOOH derivados de los ácidos araquidónico y eicosapentanoico (15(S)-HpEPE) pueden oxidar *HsPrx3* con constantes de velocidad de 10⁷ M⁻¹ s⁻¹⁴⁷.

Transición FF-LU y resolución

El próximo paso es un cambio conformacional en el sitio activo favorecido por la formación de C_PSOH (paso 2, **Figura 1.11**). Este movimiento es fundamental para que C_PSOH y C_R puedan acercarse, ya que inicialmente se encuentran a 13.4 Å de distancia (**Figura 1.13**). Una vez que C_R y C_PSOH están lo suficientemente cerca, reaccionan formando un enlace disulfuro y H₂O (paso 3, **Figura 1.11**)^{28,48}. Este paso recibe el nombre de “cierre de disulfuro” o “resolución” y su velocidad puede variar tanto como la del primer paso, de 10⁻¹ a 10² s⁻¹^{41,42,44}. La formación de este disulfuro bloquea al sitio activo en el estado LU, por lo que la enzima queda detenida hasta que un dador de electrones reduzca el enlace. La determinación directa de la velocidad de resolución se logra mediante experimentos de cinética pre-estacionaria y nuevamente aprovechando la emisión de fluorescencia del Trp. En este caso, se sugiere que el Trp C-terminal (W176, *HsPrx2*) es responsable del cambio en la señal de fluorescencia relacionado a la resolución⁴⁴.

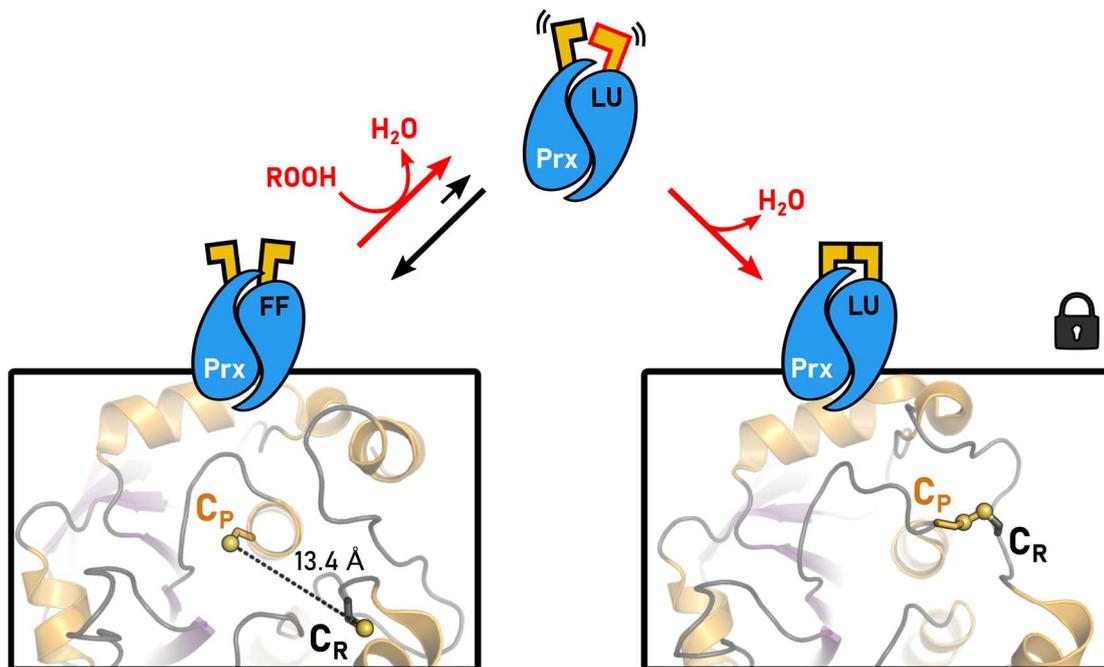


Figura 1.13. Equilibrio conformacional FF-LU durante el ciclo catalítico de Prx. El esquema representa el equilibrio de la transición FF-LU antes y después de la reacción con ROOH (flechas negras y rojas respectivamente). Una vez que se condensa el enlace disulfuro, el sitio activo se bloquea en el estado LU. Las estructuras cristalográficas de *HsPrx2* en su estado reducido “FF” (PDB:7KIZ) y oxidado a disulfuro “LU” (PDB:5IJT) se ubican debajo de las representaciones esquemáticas. En ambos casos se representan C_P y C_R como varillas y sus átomos de azufre como esferas y la distancia entre azufres como línea punteada.

Existe una relación directa entre la velocidad de este paso y la susceptibilidad a la inactivación por sobreoxidación (**Figura 1.15**). Una resolución lenta, implica que C_PSOH permanece más tiempo disponible como para que otra molécula de H_2O_2 lo oxide, mientras que una resolución rápida disminuye el tiempo de exposición de C_PSOH , haciendo menos probable que la sobreoxidación ocurra^{42,49,50}. A partir de este concepto deriva la denominación de Prx sensibles y robustas, donde las primeras tienen una resolución más lenta que las últimas. Los estados FF y LU, y su relación con la reactividad, fueron definidos a partir de estructuras cristalográficas de Prx con sus cisteínas de sitio activo en los estados ditiol y C_P-SO_3H (FF) y disulfuro y C_PSOH (LU)⁵¹⁻⁵⁴. La noción de que FF es el estado en el que la reacción con H_2O_2 ocurre de forma más favorable, es inferida a partir de la observación de estas estructuras. Se observa que en FF se preserva la arquitectura “correcta” del sitio activo, donde los residuos se disponen como para estabilizar C_P-S^- y el estado de transición. En cambio, en LU se pierden las interacciones entre C_P y los residuos conservados y hay un desplegamiento del extremo C-terminal que contiene a C_R .

Actualmente, se maneja el concepto de que el sitio activo de Prx se encuentra en un equilibrio entre los estados FF y LU previo a la reacción con H_2O_2 ^{21,55-58}. Se plantea que la velocidad de la resolución es proporcional a la probabilidad con la que la enzima visita el estado LU, o, de qué tan desplazado está el equilibrio hacia esta especie. Es importante dejar en claro que las estructuras de LU en el equilibrio conformacional no tiene por qué ser iguales a las del disulfuro C_P-C_R , es más,

seguramente esas estructuras representan un estado conformacional únicamente accesible luego de la formación del enlace disulfuro⁴⁸.

Reducción

El sistema reductor principal, o canónico, son las Trx, aunque algunos miembros pueden tener reductores homólogos específicos (AhpF para AhpC y triparredoxinas para Prx de tripanosomátidos). Estas son enzimas pequeñas (11-14 kDa), termoestables, ubicuas e involucradas en una gran variedad de procesos fisiológicos^{59,60}. Su función consiste en reducir disulfuros (principalmente de origen proteico) mediante dos intercambios tiol-disulfuro consecutivos (**Figura 1.4**), que involucran la oxidación reversible de sus Cys de sitio activo (WCGPC)⁶¹. Dada la gran variedad de sustratos que pueden reducir⁶⁰, las Trx son tildadas de enzimas promiscuas. Se sabe que su sitio de unión a sustrato presenta un surco hidrofóbico y que se requieren cambios conformacionales en la enzima y el sustrato para favorecer o guiar la reacción⁶²⁻⁶⁴. Las adaptaciones conformacionales entre Trx y sus sustratos son clave⁶³, ya que las reacciones de intercambio tiol-disulfuro se caracterizan por un estado de transición donde los átomos de azufre se encuentran alineados.

En el último paso del ciclo, la Trx reduce el disulfuro C_P-C_R llevando a la Prx a su estado ditiol (C_PSH , C_RSH) basal (**Figura 1.14**). En primer lugar, la Trx forma un complejo con la Prx oxidada en la conformación LU (paso1, **Figura 1.14**). Luego, ocurre el primer intercambio tiol-disulfuro donde el tiolato de la cisteína N-terminal del sitio activo de Trx (C_N) realiza un ataque nucleofílico sobre C_R , formando el disulfuro mixto Prx-Trx entre C_R y C_N y dejando a C_P en su forma reducida (paso 2, **Figura 1.14**). Inmediatamente después, la cisteína C-terminal de sitio activo de Trx (C_{35}) reacciona con el disulfuro C_R-C_N para formar un disulfuro intramolecular (C_N-C_{35}) en Trx y liberar C_R reducida⁶² (paso3, **Figura 1.14**). A continuación, ambas proteínas se disocian y el sitio activo de Prx recupera su conformación FF para comenzar un nuevo ciclo.

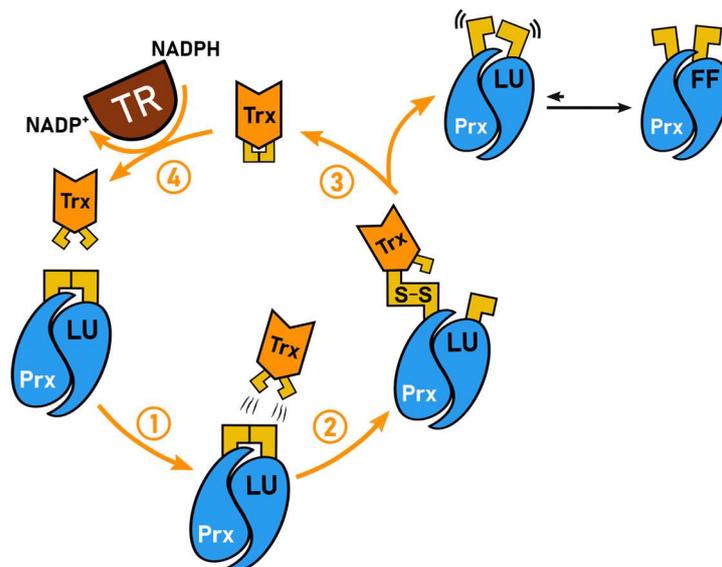


Figura 1.14. Reducción de AhpC/Prx1 por el sistema Trx. Los números representan los distintos pasos del ciclo: **1.** Formación del complejo Prx-Trx **2.** Ataque nucleofílico de C_N y formación del disulfuro mixto C_R-C_N . **3.** Ataque nucleofílico de C_{35} sobre el disulfuro C_R-C_N . **4.** Reducción de Trx por TR a expensas de NADPH. Se eligió representar un sitio activo por dímero de Prx.

La regeneración de Trx (paso 4, **Figura 1.14**) depende de una reductasa específica llamada tiorredoxina reductasa (TR), cuya versión de mamífero es una enzima que contiene dinucleótido de adenina y flavina (FAD), un residuo de selenocisteína (Sec, U) y usa NADPH como fuente de equivalentes de reducción⁶⁵. La TR reduce el disulfuro C_N-C₃₅ en una serie de pasos donde el flujo de electrones va desde el NADPH al FAD, del FAD al motivo de sitio activo C-U y de este al disulfuro de Trx^{66,67}.

Reacciones alternativas

Las AhpC/Prx1, particularmente las que tienen el motivo GGLG y YF, pueden sufrir una modificación química llamada sobreoxidación que las retira momentánea o definitivamente de su ciclo catalítico. En la sobreoxidación C_PSOH reacciona con una o dos moléculas de H₂O₂ para formar ácido sulfínico (C_P-SO₂H) o sulfónico (C_P-SO₃H) respectivamente (S y S', **Figura 1.15**). Cuanto más "vueltas" dé la Prx por su ciclo catalítico, mayor es la probabilidad de que ocurra este proceso, cuya constante de velocidad se encuentra en el rango de 10³-10⁴ M⁻¹ s⁻¹^{42,49,50,52,68}. Al igual que con la oxidación otros hidroperóxidos pueden sobreoxidar Prx, incluso de forma más eficiente que el H₂O₂, con constantes de velocidad del orden de 10⁵ M⁻¹ s⁻¹ (ONOOH)⁴² y 10⁷ M⁻¹ s⁻¹ (15(S)-HpEPE)⁴⁷.

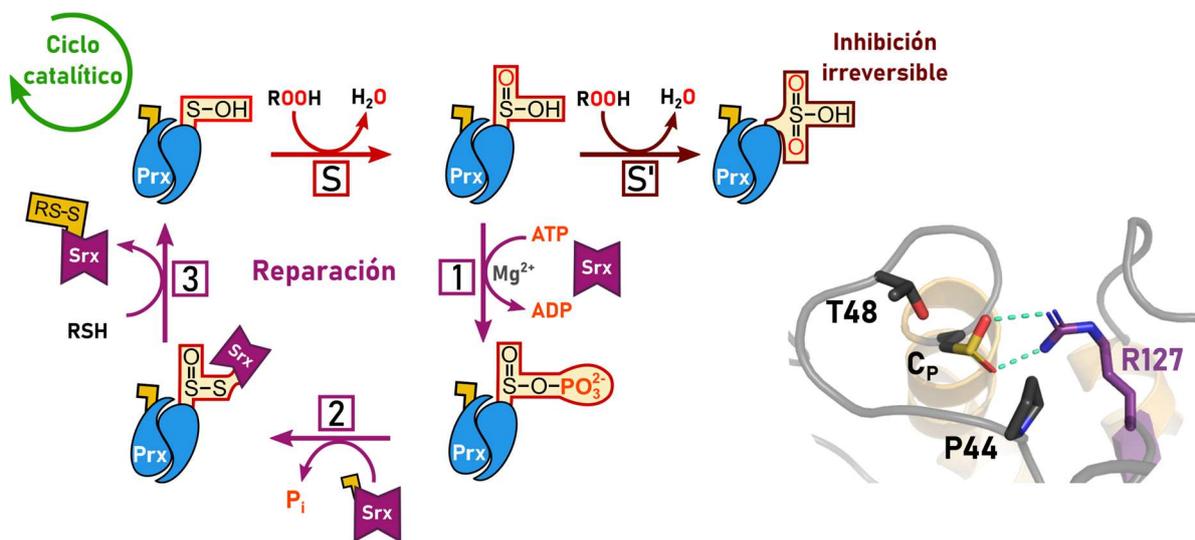


Figura 1.15. Sobreoxidación de Prx y reparación mediada por Srx. A la izquierda, esquema de las reacciones de sobreoxidación y reparación de C_P-SO₂H. A la derecha se muestra la estructura de HsPrx2 sobreoxidada (PDB:1QMV), junto con los aminoácidos de la tétada catalítica. Se puede observar cómo R127 forma interacciones del tipo puente salino con la forma desprotonada de C_P-SO₂H.

Mientras que la forma C_P-SO₃H es considerada una modificación inhibitoria e irreversible, C_P-SO₂H puede ser recuperada a C_PSOH mediante el sistema sulfirredoxina a expensas de ATP-Mg²⁺ y así rescatar la enzima del estado inactivo⁶⁹. Se sugiere que el mecanismo de rescate, o reparación, implica en primer lugar la fosforilación de C_P-SO₂H, a partir del ATP unido a Srx, en la cual el sulfinato (C_P-SO₂⁻) ataca al fosfato γ, liberando ADP y formando un éster fosfórico en el ácido

sulfínico (paso 1, **Figura 1.15**). A continuación, una Cys conservada de Srx (Cys99 en *HsSrx*) reacciona con el éster para formar tiosulfinato y liberar fosfato (paso 2, **Figura 1.15**). En el último paso, un tiol o H₂S reduce el tiosulfinato y genera un disulfuro o persulfuro en la Cys99 y C_PSOH, que retorna al ciclo catalítico⁷⁰ (paso 3, **Figura 1.15**). En el caso de *HsSrx*, no se conoce específicamente quien lleva a cabo la reducción del tiosulfinato. A partir de ensayos de reparación in vitro con *HsSrx* y *HsPrx3*, se demostró que la enzima funciona con DTT, H₂S y GSH, en orden decreciente de velocidad⁷¹.

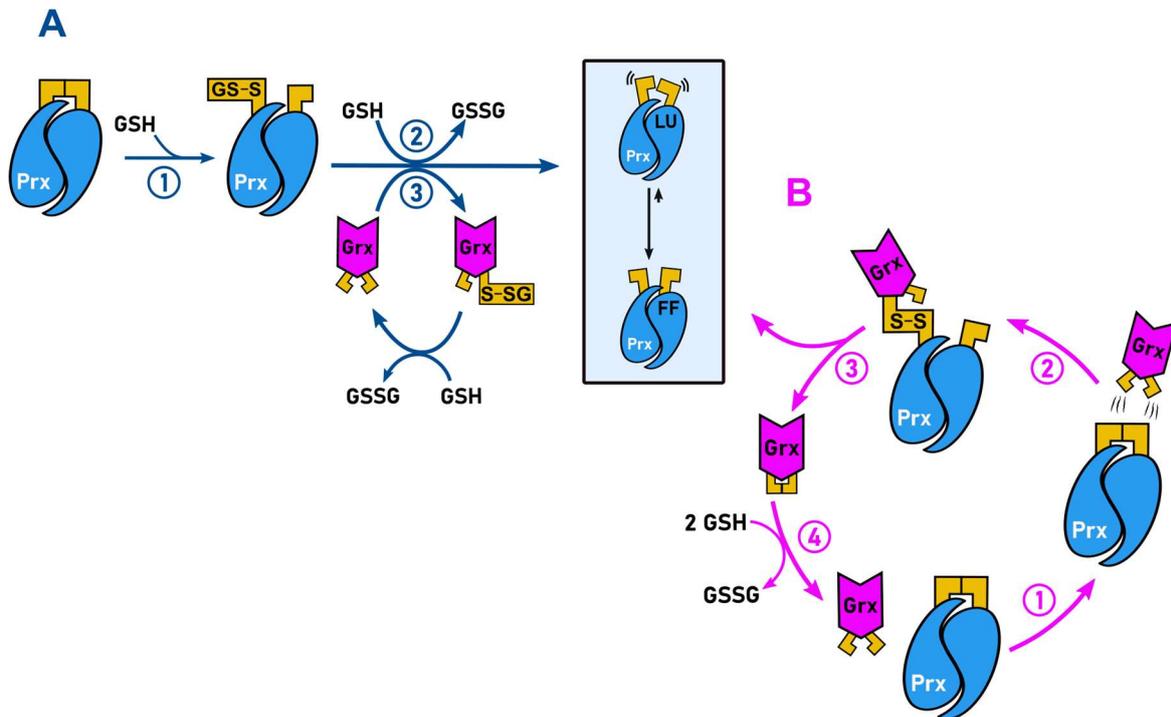


Figura 1.16. Reducción de AhpC/Prx1 por vías dependientes de GSH y Grx. En la parte **A**, se muestran la serie de reacciones de reducción de Prx a partir de su forma disulfuro con GSH o GSH y Grx. **1.** Formación de C_P o C_R glutationilada. **2.** Reducción del disulfuro mixto Prx-GSH por GSH. **3.** Reducción del disulfuro mixto Prx-GSH por Grx. **B.** Reducción del disulfuro de Prx por Grx sin la participación de GSH. **1.** Formación del complejo Prx-Grx **2.** Formación del disulfuro mixto Prx-Grx. **3.** Oxidación de Grx y liberación de Prx reducida. **4.** Reducción de Grx a expensas de GSH.

El sistema Trx-TR no es el único que puede hacer llegar los electrones del NADPH a las Prx. Existe evidencia de que el tripéptido glutatión (GSH), puede reaccionar tanto con C_PSOH, como, con C_P-C_R y reducir Prx parcial o totalmente⁷² (**Figura 1.16A**). En el caso de la formación de Prx glutationilada en C_P o C_R, las glutarredoxinas (Grx) facilitarían la deglutationilación. Luego, el glutatión disulfuro (GSSG) generado se reciclaría a su forma reducida a través de glutatión reductasa (GR) a expensas de NADPH. Otra alternativa de reducción se observó con *HsPrx3* mitocondrial, donde *HsGrx2* es capaz de reducirla a través de un mecanismo independiente de GSH (**Figura 1.16B**), análogo al de Trx y con una cinética similar a *HsTrx2*⁷³. En una última instancia, el disulfuro generado en Grx se reduce por GSH para regenerar a la enzima reducida y formar GSSG.

Otros mecanismos de reducción pueden incluir a residuos de Cys en proteínas que no tengan una función redox aparente. Este mecanismo es la base de la teoría de señalización a través de Prx que se aborda en detalle en la sección **1.3.1**.

1.1.4. Estructura y oligomerización

Para poder entender la catálisis de Prx es necesario racionalizarla sobre su estructura. La complejidad estructural de Prx iguala a la de su mecanismo catalítico, cumpliendo con el principio de reciprocidad entre estructura y función. A continuación, describiré la estructura del dímero y el decámero de Prx y su equilibrio de oligomerización, tomando *HsPrx2* como referencia.

El dímero

Fuera del núcleo estructural común de Prx, los monómeros de AhpC/Prx1 de humanos presentan el motivo "GGLG" entre $\alpha 3$ y $\beta 5$ del núcleo común, una extensión C-terminal compuesta por un loop donde se ubica C_R (C_R loop) y una última hélice $\alpha 7$ (**Figura 1.17A y B**). La hebra $\beta 7$ que queda expuesta en el monómero, se cubre cuando dos subunidades se arreglan de forma lateral ($\beta 7$ - $\beta 7$) para formar el dímero (**Figura 1.7**). Esta interacción basada en hojas β (interfase tipo B) es la que genera el arreglo de 10 hebras a lo largo del dímero, o 14, si se tienen en cuenta $\beta 1$ - $\beta 2$ ²². Además de la interfase β central, los monómeros interaccionan de forma cabeza-cola donde C_R loop y $\alpha 7$ de una subunidad abraza la cara externa de la otra en $\alpha 2$, $\alpha 4$ y el loop $\beta 7$ - $\alpha 6$ (**Figura 1.17C**). Estas interfases adicionales son las que forman los sitios activos. Cada dímero tiene un peso molecular de alrededor de 44 kDa y posee dos sitios idénticos dispuestos en caras opuestas y en forma diagonal, constituidos por una mitad N y otra C-terminal de la subunidad adyacente (**Figura 1.17C**). Por lo tanto, el dímero es la unidad catalítica mínima de este grupo de Prx.

Podemos identificar distintas secciones en la región N-terminal del sitio activo: en la hélice $\alpha 2$ está C_P (C51) en su extremo N-terminal, entre una valina (V50) y una prolina (P52) y una vuelta más abajo se ubica el residuo de glutamato conservado (E54). En el loop previo a C_P (C_P loop, $\alpha 2$ - $\beta 3$) se encuentran Thr48 y Pro44 de la tétrada catalítica y otros residuos aromáticos conservados como las fenilalaninas 47 y 49 (F47, F49) y tirosina 43 (Y43) (**Figura 1.18 A y B**). La Arg de la tétrada catalítica (R127) se ubica en el inicio de $\beta 6$ apuntando su grupo guanidinio a C_P , mientras que el otro residuo de Arg importante para la catálisis (R150) se encuentra en el final de un loop entre $\beta 7$ y $\alpha 6$ formando un puente salino con E54. Se postula que esta interacción estabiliza al oxígeno del grupo saliente del H_2O_2 y/o es indispensable para el correcto posicionamiento de R127^{33,36}. Además de R150, los oxígenos carbonílicos de la cadena principal de otros residuos del loop $\beta 7$ - $\alpha 6$ también contribuyen a la estabilización de R127³⁶ (**Figura 1.12B**). Por último, el Trp conservado (W86) está ubicado detrás de C_P en $\alpha 3$ y el motivo "GGLG" se posiciona por debajo de W86 en un loop entre $\alpha 4$ y $\beta 5$. Existe un conjunto de interacciones hidrofóbicas entre GGLG, W86 y los residuos aromáticos del C_P loop (F47, Y43), que forman un cinturón que contiene a la primera vuelta de la hélice donde está C_P (**Figura 1.18B**). Mutantes de W por F en esta posición alteran las velocidades de formación de C_PSOH y C_P-C_R ^{44,74}.

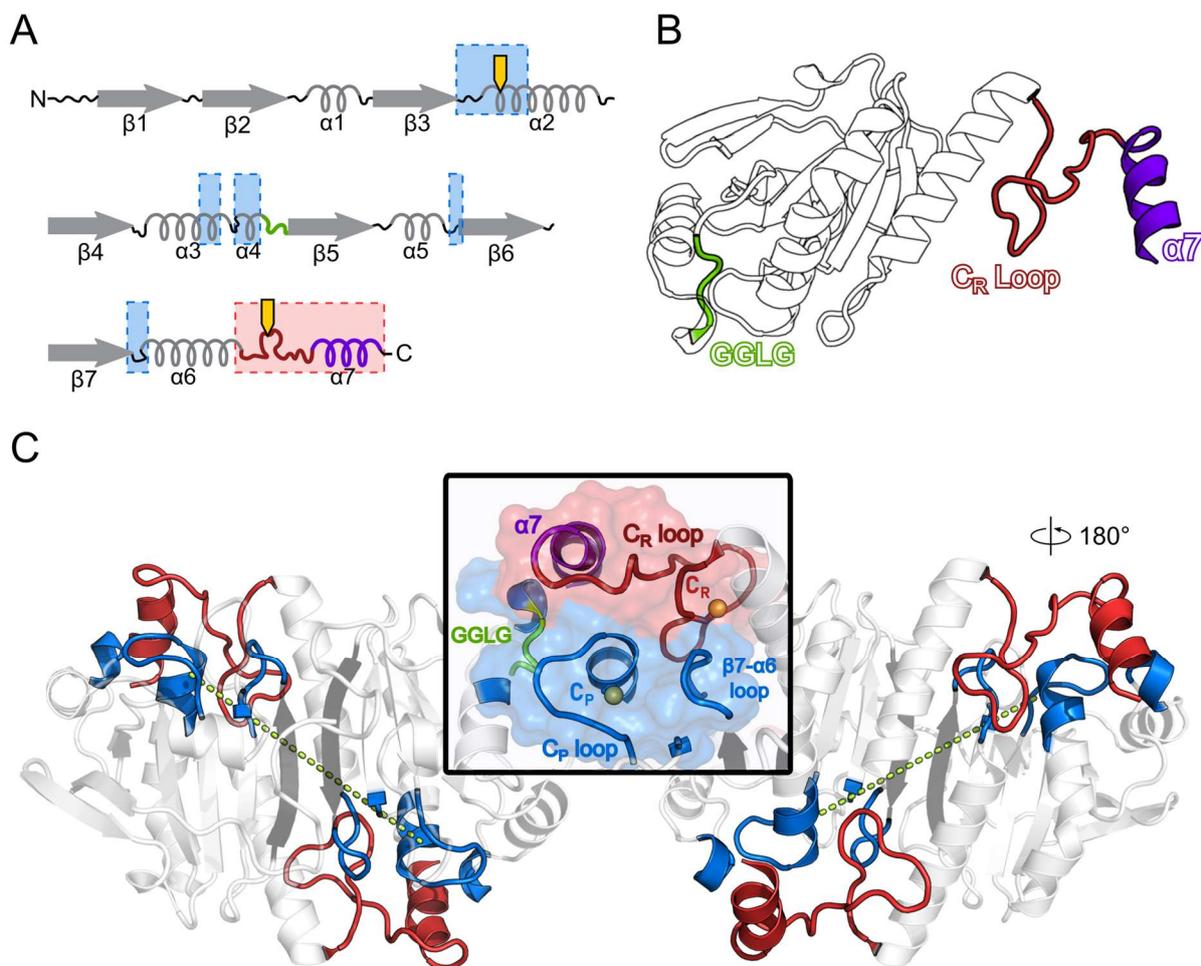


Figura 1.17. Organización estructural del dímero de AhpC/Prx1. **A.** Mapa de elementos de estructura secundaria de AhpC/Prx1 humanas de N a C-terminal. Las mellas amarillas representan C_P (en α_2) y C_R (en el C_R loop); los recuadros azules y rojos indican las regiones que forman la mitad N y C-terminal del sitio activo; los elementos coloreados en verde, rojo y violeta representan GGLG, C_R loop y α_7 respectivamente. **B.** Monómero de *HsPrx2* (PDB: 7KIZ) con los motivos GGLG, C_R loop y α_7 coloreados según **A**. **C.** Dímero de *HsPrx2* (mismo PDB) con sus mitades de sitio activo coloreadas según **A**. La línea punteada verde representa la distancia entre los átomos de azufre de C_P entre sitios activos, con el fin de destacar la disposición diagonal de los mismos. Las hebras β_7 de subunidades vecinas se representan en un tono gris oscuro y destacan la interfase B. En el recuadro central se muestra uno de los sitios activos con los distintos motivos estructurales.

La mitad C-terminal del sitio activo ha sido en general menos explorada y todavía no se entiende completamente el rol de alguno de sus residuos en la catálisis. No obstante, podemos hacer el mismo ejercicio de distinguir regiones e identificar residuos e interacciones relevantes. Entre α_6 y α_7 se encuentra el C_R loop, donde C_R (C172) se ubica entre una valina (V171) y una prolina (P173), al igual que C_P en la mitad N-terminal. Otro residuo altamente conservado es el W176, cuyo anillo aromático cubre al átomo de azufre de C_R (**Figura 1.18C**). La sustitución de W176 por otro residuo aromático (F), desestabiliza la estructura del loop y disminuye la velocidad de peroxidación^{44,74}. En cuanto a C_R , sustituciones “leves” (C172S) anulan completamente la parte reductiva del ciclo catalítico, pero no afectan la capacidad de reducir H_2O_2 . Sin embargo, otras variantes más disruptivas (C172D, C172W) pueden afectar también el paso de oxidación⁵⁴. La otra región de interés es α_7 , donde se destacan el par de residuos del motivo conservado “YF” (Y193 y F194) y otros residuos poco conservados que están relacionados con la susceptibilidad a la sobreoxidación (G175, K177, G179 y D181)^{50,68}. Por otra parte, mediante la visualización de

estructuras se logra detectar que el ambiente de C_R se caracteriza por ser altamente hidrofóbico, encontrándose completamente excluida del solvente por residuos de $\alpha 6$ y el propio C_R loop.

A su vez, esta colección de residuos de ambas mitades del sitio activo establece una intrincada red de interacciones que mantienen su integridad estructural. Particularmente, $\alpha 7$ es una región que nuclea varias interacciones: conecta con C_R loop (K196 con D181), hace de puente entre las prolinas de los motivos VCP de monómeros adyacentes a través de interacciones hidrofóbicas con Y193 y F194 y establecen interacciones con residuos previos al motivo GGLG (K191 con E93) de la subunidad vecina. Además, P147 y V148 del loop $\beta 7$ - $\alpha 6$ cubren uno de los lados de C_R y contribuyen a reducir su exposición al solvente (**Figura 1.18D**). Trabajos con mutantes y quimeras^{50,52,56,68,75,76}, versiones truncas^{77,78} y modificaciones postraduccionales (particularmente en Y193) en $\alpha 7$ ⁷⁹, sugieren que la estabilidad y dinámica de esta región influye directamente en la actividad peroxidasa. Se da como un efecto dominó, en el que la perturbación de algunas de estas interacciones lleva a la desestabilización de otras, terminando en una disminución o aceleración de algunos de los pasos del ciclo catalítico. En general, se ve que entorpecer estas interacciones genera Prx aparentemente más robustas, con distintos grados de pérdida de velocidad de peroxidación.

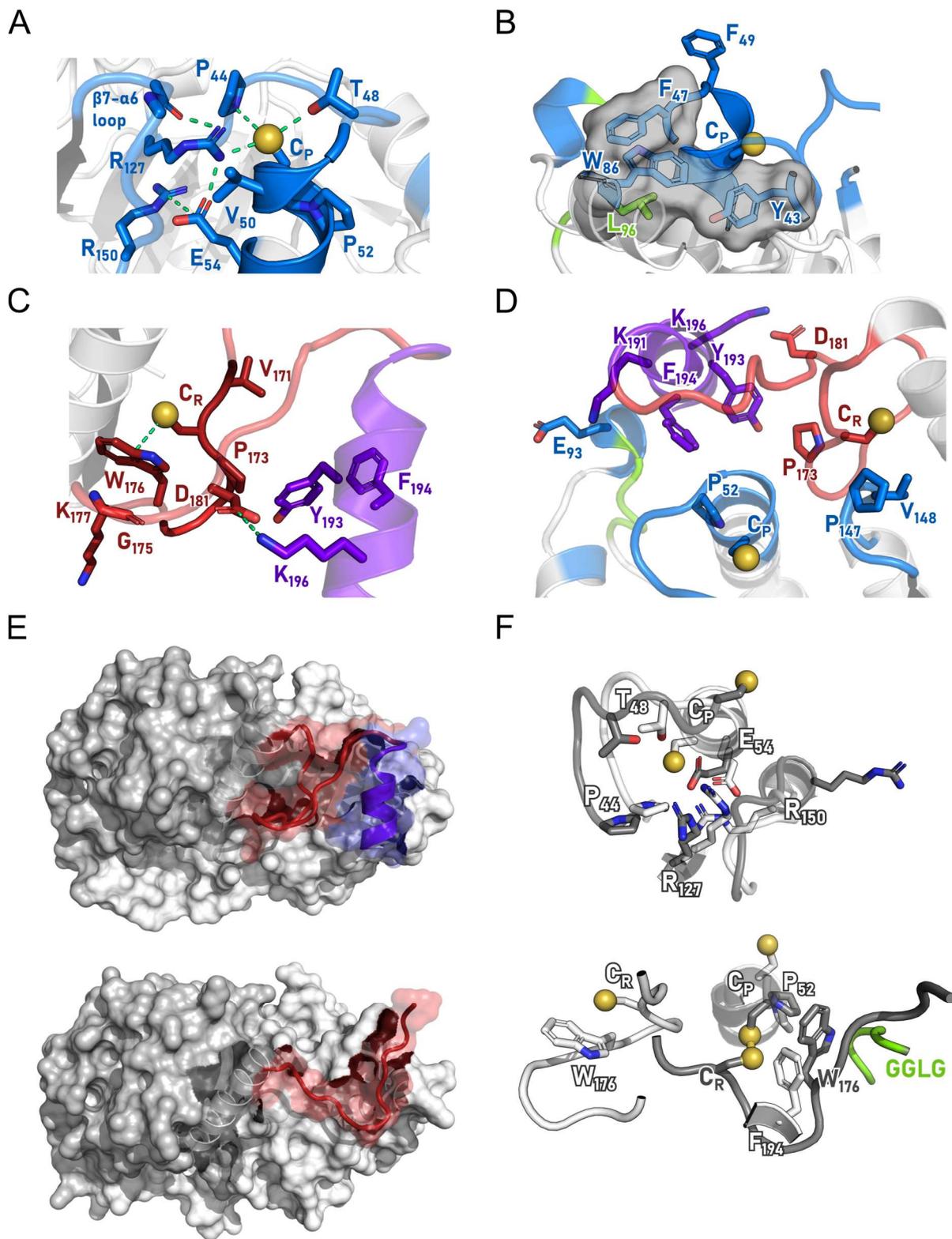


Figura 1.18. Interacciones dentro del sitio activo de AhpC/Prx1 y comparación FF-LU. **A.** Interacciones entre residuos dentro de la porción N-terminal del sitio activo (azul) alrededor de C_P y α_2 , representadas como líneas punteadas verdes (PDB: 7KIZ). En **B** se representa las interacciones entre residuos hidrofóbicos (unificado dentro de la superficie gris) que rodean la primera vuelta de α_2 (motivo GGLG en verde). **C.** Detalle estructural de la mitad C-terminal del sitio activo donde se destaca el loop C_R en rojo y α_7 en violeta. **D.** Aminoácidos involucrados en las interacciones entre las dos mitades del sitio activo. **E.** Comparación entre dímeros de *HsPrx2* con el motivo C-terminal en la forma FF (arriba) reducida y LU (abajo) oxidada a disulfuro (PDB: 5IJT). Los monómeros adyacentes están coloreados de gris y blanco. **F.** Alineamiento de las estructuras FF (blanco) y LU (gris) en las mitades N y C-terminal del sitio activo (arriba y abajo respectivamente).

Cada mitad de sitio activo tiene un propósito específico dentro del ciclo catalítico: la mitad N-terminal está especializada en la reducción del hidroperóxido (pasos de oxidación y sobreoxidación), donde está el arreglo estructural adecuado para la estabilización de C_p-S^- y el estado de transición. Por otro lado, la función de la mitad C-terminal está centrada en garantizar la etapa de reducción, es decir, reaccionar con C_pSOH y formar el enlace disulfuro intersubunidad que es sustrato de Trx. La base de la sinergia entre ambas funciones es la plasticidad conformacional que tiene el sitio activo en conjunto, descrita por la transición FF-LU.

Las estructuras cristalográficas de LU se asocian a la forma disulfuro de la enzima^{51,52} y las de FF al estado ditiol⁵⁴ (C_pSH , C_rSH) o C_p-SO_2H ⁵³. La gran movilidad conformacional de los aminoácidos del C-terminal en el estado LU impide la determinación estructural de los últimos 17 a 20 aminoácidos (parte de C_r loop y $\alpha 7$), por lo que las estructuras quedan truncas (**Figura 1.18E**). No obstante, se puede apreciar el gran desmantelamiento de la estructura de FF si comparamos con LU. En la región N-terminal, se desenrolla la parte de $\alpha 2$ donde está C_p , haciendo que la cisteína se de vuelta para orientarse hacia C_r . R127 deja de interactuar con C_p y pasa a formar un puente salino con E54 y desplaza a R150 (**Figura 1.18F**). Por otro lado, el C_r loop se estira desde $\alpha 6$ hasta la región GGLG del monómero adyacente y W176 pasa a ocupar una posición similar a la de F194 en FF, donde queda en cercanía con el motivo GGLG, W86 y la prolina del motivo VCP de C_p . El movimiento de extensión del C_r loop, deja expuesto al disulfuro, lo que facilitaría la reducción por Trx.

Algo que sigue siendo poco explorado, es la cooperatividad y/o alosterismo entre sitios activos dentro del dímero. Algunos trabajos sugieren un camino de aminoácidos que conectan ambos sitios, estableciendo una comunicación intersubunidad⁸⁰. Otro trabajo, sugiere que *HsPrx2* presenta cooperatividad positiva y negativa entre sitios activos del mismo dímero⁸¹. En este caso, se plantea que la formación de C_pSOH en un sitio estimula la oxidación en el otro, mientras que la forma disulfuro la desfavorece. Al día de hoy, no se ha propuesto un mecanismo claro de funcionamiento alostérico. De todos modos, estas Prx cumplen con los requisitos para ser enzimas alostéricas: son homooligómeros simétricos que presentan sitios activos idénticos en subunidades distintas.

El decámero

En el decámero, 5 dímeros interactúan entre sí para formar un anillo toroide de alrededor de 220 kDa, con una distintiva simetría pentagonal, donde los monómeros establecen interacciones a través de los dos tipos de interfases posibles en Prx, la A y la B²². La asociación ocurre a través de la interfase tipo A entre monómeros de dímeros vecinos y ocupa una superficie de alrededor de 650 Å² por monómero (**Figura 1.19B**). Podemos dividir la superficie de interacción en 4 regiones (**Figura 1.19A**): las primeras dos están centradas en el C_p loop y $\alpha 3$ respectivamente, son complementarias entre monómeros adyacentes y constituyen el 70% de la superficie de interacción junto con F25 en $\beta 2$ y V187 en $\alpha 7$ ⁸². El resto de la superficie de interacción se da de la misma forma complementaria entre las regiones III y IV, ubicadas en loops entre $\beta 5-\alpha 5$ y $\alpha 5-\beta 6$, respectivamente.

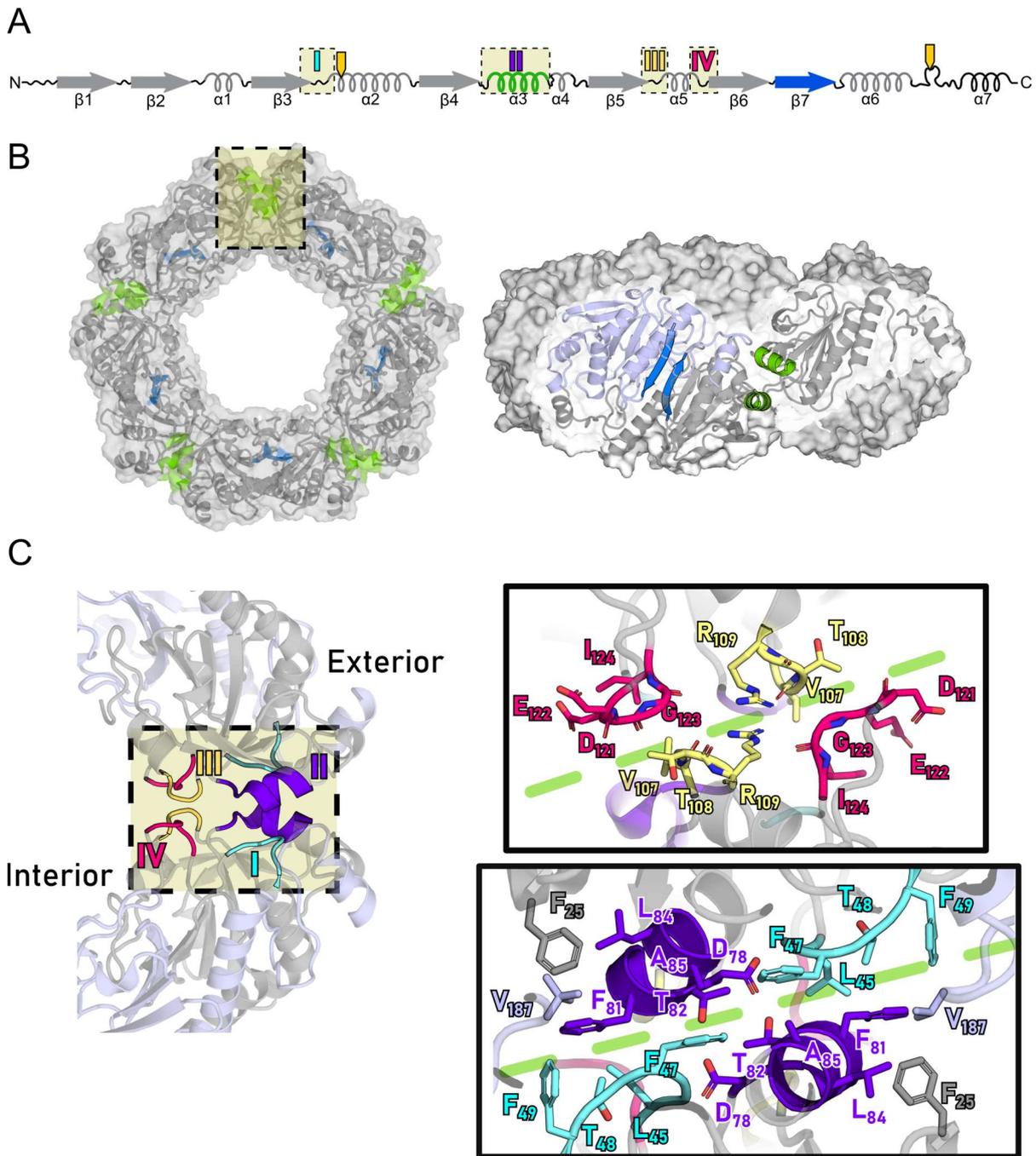


Figura 1.19. Decámero de AhpC/Prx1. **A.** Mapa de elementos de estructura secundaria de AhpC/Prx1, donde se destacan en verde y azul los elementos en los que se centran las interfases tipo A y B respectivamente. Los recuadros amarillos con líneas punteadas ubican las regiones I a IV de la interfase de decamerización. Las etiquetas amarillas representan C_p y C_r . **B.** Vistas frontal y lateral del decámero de *HsPrx2* (PDB:7KIZ), en la última se destacan los dos tipos de interfases (A verde, B azul). Los monómeros que interactúan a través de la interfase A se representan en gris y el que lo hace a través de la B en azul claro. **C.** A la izquierda se representan las regiones I a IV dentro de la interfase de decamerización coloreadas según **A**. En los paneles de la derecha se muestran los residuos involucrados en la interacción entre las distintas regiones. La línea punteada verde marca el límite entre dímeros vecinos en la interfaz.

Si trazamos una línea a lo largo de la superficie de interacción, las regiones I y II se encuentran en la parte externa del anillo, mientras que III y IV se ubican en el interior (**Figura 1.19C**). Las interacciones entre las primeras dos regiones son mayoritariamente hidrofóbicas, donde los residuos F49 y F81 han demostrado ser cruciales para la interacción^{83,84}. No obstante, también

se dan algunos contactos polares, por ejemplo, entre T82 en el centro de la superficie de contacto. Generalmente se elige mutar esta posición para obtener variantes exclusivamente diméricas^{37,71,85,86}. Las regiones III y IV forman una superficie de contacto más pequeña y menos hidrofóbica debido a una mayor presencia relativa de residuos cargados (R109), que acomodan sus porciones alílicas en el interior y exponen sus grupos cargados al solvente⁸².

Un rol importante del decámero tiene que ver con la interacción con proteínas del ciclo catalítico. En el caso de AhpC de *Salmonella*, los decámeros oxidados son mejor sustrato de AhpF que los dímeros, en el paso de reducción⁷⁴. Para la reducción dependiente de Trx aún no es claro el rol del estado oligomérico. Por otro lado, para las formas sobreoxidadas, la estructura del anillo permite que se den interacciones específicas con Srx, indispensables para regenerar C_PSOH a partir de C_P-SO₂H⁷¹.

El decámero no es el estado oligomérico más grande que estas Prx pueden lograr, en algunas circunstancias se han visto agregados de mayor peso molecular formando filamentos de anillos apilados^{87,88}, o, dodecaedros⁸⁹. Se sugiere que el apilamiento entre anillos ocurre entre hélices α2 y α6 y hojas β2 de decámeros vecinos, en una interfase llamada “tipo R”⁹⁰. Estas estructuras están asociadas a una función tipo chaperona/holdasa⁹¹, como indican experimentos de prevención y resolución de la formación de agregados proteicos^{92,93}. Se sugiere que la función holdasa ocurre cuando se pierde la actividad peroxidasa por sobreoxidación de C_P, lo que representa un “switch” funcional.

Dinámica de oligomerización

Existen varios factores que desplazan el equilibrio de oligomerización de Prx hacia decámero, dímeros, o incluso formas de alto peso molecular (APM). Algunos son parte del comportamiento nativo de la enzima y otros son de origen artificial, inducidos por condiciones experimentales. En la figura se esquematizan aspectos generales que influyen en la distribución de especies en el equilibrio.

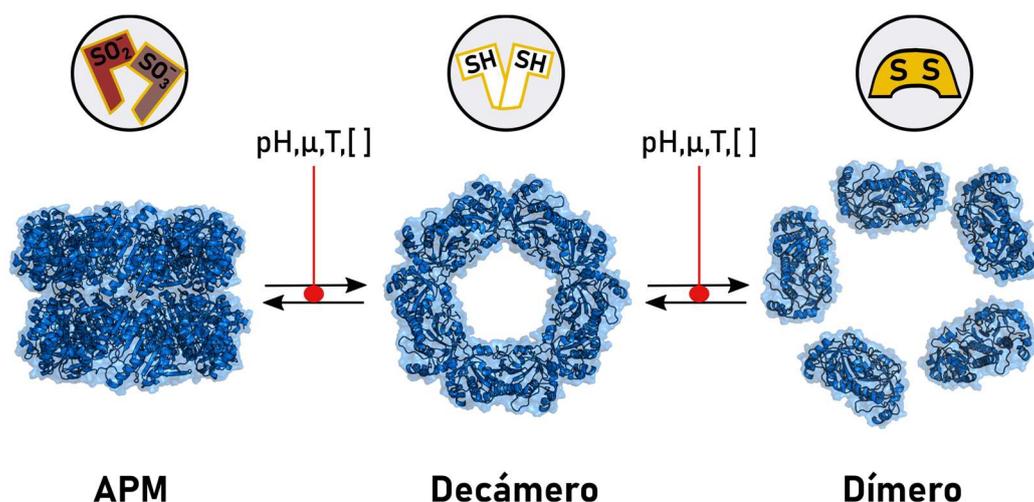


Figura 1.20. Dinámica de oligomerización de AhpC/Prx1. El estado redox de las cisteínas de sitio activo se representa arriba de cada forma oligomérica. En el caso de la forma de alto peso molecular (APM) se representa C_P en su forma sulfinato (SO₂⁻) y sulfonato (SO₃⁻). Además del estado redox, el pH, la fuerza iónica (μ), la temperatura (T) y la concentración de proteína ([]) pueden afectar los equilibrios de oligomerización. Representaciones construidas a partir de PDB:7KIZ.

El hecho de que C_P loop sea parte de la interacción, hace que las C_P en dímeros vecinos estén comunicadas estructuralmente a través de la interfase tipo A. Por lo tanto, los cambios estructurales en uno de esos sitios activos van a ser percibidos por el otro, a través de la superficie de interacción. Las modificaciones oxidativas de las cisteínas catalíticas son una clara evidencia de este fenómeno. El estado ditiol se asocia con la estructura del anillo, en cambio la formación del disulfuro C_P-C_R , acompañada de la transición conformacional FF-LU, tiende a separar el decámero en dímeros^{82,85,94-96}, situación que se revierte luego del agregado de reductores como DTT^{11,54,96}. Las formas sobreoxidadas C_P-SO_2H y C_P-SO_3H generan un estado FF metaestable, favoreciendo al decámero y, en ciertos casos, induciendo la formación de estructuras de mayor peso molecular relacionadas con la función holdasa⁹⁷.

Al mismo tiempo, esta evidencia implícitamente sugiere un vínculo directo entre la dinámica de oligomerización y la de la transición FF-LU. Se podría plantear, que cuanto menos móvil sea la región del C_P loop, C_R loop y $\alpha 7$, más estable es el decámero y más se conservan las interacciones del estado FF que maximizan la reacción con H_2O_2 . Cualquier modificación que desestabilice FF y favorezca LU, llevará al colapso parcial o total de la estructura decamérica. En muchos de los ejemplos anteriores, donde mutantes, modificaciones o versiones truncas de Prx generaban cambios en la estabilidad del sitio activo (tanto en N como C-terminal) y la actividad peroxidasa, también presentaban alteraciones en la proporción de dímeros y decámeros con respecto a la versión salvaje o *wild type* (wt)^{54,77,78,96,98}. Siguiendo la línea del trabajo con Prx humanas y sobreoxidación, la evidencia sugiere que el dímero es más robusto que el decámero. En otras palabras, cuanto mayor sea la estabilidad del decámero, más probable será que la Prx se sobreoxide^{28,56,77,78,82,95}. Esto podría deberse a un cambio en la velocidad de sobreoxidación y/o en la de resolución.

Sin embargo, la liberación de las restricciones conformacionales inducidas por el decámero no son solo ganancia. Mutaciones que generan Prx exclusivamente diméricas, presentaron pérdidas de dos órdenes de magnitud (o más) en la velocidad de formación de C_PSOH y un aumento del pK_A de C_P , acompañado de una disminución de k_{cat} en el ensayo en presencia de reductor^{37,74,83,99}. En el caso de Tsa1 de *S. cerevisiae*, mutantes exclusivamente diméricas carecieron de actividad peroxidasa, tanto en el ensayo con el sistema Trx, como en medidas de oxidación directa siguiendo fluorescencia de Trp en stopped-flow⁸⁶.

Sustituciones en los aminoácidos de la tétrada catalítica también repercuten en la proporción de dímero y decámeros en el equilibrio y en la actividad peroxidasa. La sustitución C_P por Ser favorece al decámero e incluso formas de mayor peso molecular, mientras que en variantes de C_R por Ala, Ser, Asp o Trp se ve un aumento de la proporción de dímeros^{54,74,85}. Mutantes de aminoácidos del C_P loop (Thr48 y Phe 49) alteran el equilibrio de oligomerización hacia dímeros o decámeros dependiendo de la sustitución y la Prx en cuestión^{74,86,98}. Por último, otra región cuya modificación altera el equilibrio conformacional es el extremo N-terminal. En el caso de HsPrx3, el hecho de

introducir una cola de histidina en esa región como etiqueta de afinidad, estabiliza la forma decamérica e incluso induce la formación de anillos apilados^{88,95,100}.

Otros factores que alteran la oligomerización de Prx son la fuerza iónica (μ), el pH, la temperatura y la concentración de proteína. Desde bastante temprano en la historia de Prx, se ha visto que iones como sulfato (SO_4^-) y fosfato (PO_4^-) al igual que el agregado de sales como KCl tienden a favorecer el decámero¹⁰¹. Sin embargo, en el caso de AhpC de *M.tuberculosis* una concentración de NaCl de 1.5 M aumentó la presencia de dímeros¹⁰² y en Prx1 de rata se vio una tendencia a la disociación con concentraciones crecientes de NaCl¹⁰³. En suma, el efecto de la fuerza iónica sobre la dinámica de oligomerización depende del tipo de sal y Prx a estudiar. En cuanto a la influencia del pH, generalmente se observa que a valores por debajo de 6 predominan los decámeros y los APM, mientras que a un pH superior a 7.5 se favorece la forma dimérica^{88,104,105}. En definitiva, tanto el efecto de μ , como el pH, destacan la relevancia de las interacciones polares e iónicas en el equilibrio de oligomerización.

1.2. Principios de señalización redox

1.2.1. Especies reactivas y estrés oxidativo

La señalización redox se puede definir como la respuesta celular ante la presencia de moléculas que modifican el estado de oxidación de componentes celulares específicos, mediante reacciones de oxidación y reducción. Las primeras moléculas identificadas como segundos mensajeros de este tipo de señalización, fueron especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS, “reactive oxygen species”) y el nitrógeno (RNS, “reactive nitrogen species”), que principalmente actúan como oxidantes. También existe una sigla que agrupa ROS y RNS en un solo término, que es el de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (RONS, “reactive oxygen and nitrogen species”). Además de las RONS, especies derivadas del sulfuro de hidrógeno y azufre sulfano (de origen orgánico e inorgánico) también se han visto involucradas en la regulación de procesos fisiológicos, actuando como reductores u oxidantes de componentes de la maquinaria celular¹⁰⁶. La efectividad de la señalización a través de estas especies va a depender de su estabilidad, especificidad y metabolismo. A continuación, me centraré en las especies derivadas del oxígeno, describiendo su origen, remoción y ejemplos de regulación de procesos celulares en los que están involucradas.

La vida en aerobiosis y especies reactivas del oxígeno

La aparición de O₂ en la atmósfera representó una oportunidad para el desarrollo de formas de vida más complejas, debido en parte a una mayor eficiencia energética por usar al O₂ como aceptor final de electrones en el metabolismo¹⁰⁷. Sin embargo, trabajos en el área de radicales y oxidantes revelaron que la función biológica de los organismos aerobios está ligada a la producción de oxidantes fuertes, que potencialmente podrían representar un peligro para la vida. A este concepto se lo define como la paradoja del O₂, donde se lo describe como indispensable y peligroso al mismo tiempo.

El término “ROS”, es definitivamente amplio e incluye especies parcialmente reducidas del O₂, como el radical anión superóxido (O₂^{•-}), H₂O₂ y radical hidroxilo (HO[•]). También quedan comprendidas en este término moléculas como el radical peroxilo (ROO[•]), radical alcoxilo (RO[•]) e hidroperóxidos orgánicos (ROOH). Incluso, podemos desafiar los límites de las definiciones de otras especies reactivas, como las RNS, y decir que también son ROS, ya que el oxígeno es el átomo que actúa como oxidante (ONOOH y NO[•]). Por eso, ante tal ambigüedad, se incita a los lectores que se quieran introducirse en el mundo de la biología redox, a no caer en la tentación de la simplicidad de una palabra de 3 letras y mencionar la especie oxidante específica siempre que sea posible.

La fuente principal de las ROS tradicionales (O₂^{•-}, H₂O₂ y HO[•]) a nivel intracelular en condiciones fisiológicas es la mitocondria, ya que es el organelo donde la mayoría del O₂ es reducido¹⁰⁸. Dentro de las mitocondrias, el O₂^{•-} es la ROS que primero se genera. La generación mitocondrial de O₂^{•-} es considerada no-enzimática, se vincula con los complejos I, II y III^{109,110} y la cantidad producida se relaciona con el estado redox de los transportadores de electrones¹⁰⁸ y el estado del gradiente

quimiosmótico a través de la membrana mitocondrial interna¹¹¹. El $O_2^{\cdot-}$ también puede generarse de forma enzimática, a través de la actividad de las enzimas NADPH oxidasa (NOX), xantina oxidasa y el sistema citocromo P450, entre otras^{110,112}. El $O_2^{\cdot-}$ es una especie bastante inestable, ya que rápidamente puede transformarse en H_2O_2 a través de una reacción de dismutación espontánea, con una velocidad en el orden de $10^5 M^{-1} s^{-1}$. Además, esta reacción puede ser acelerada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), llegando a velocidades cercanas al límite de difusión ($10^9 M^{-1} s^{-1}$)¹¹³.

Estrés oxidativo y señalización redox

El concepto inicial de estrés oxidativo, definido por Helmut Sies en el año 1985¹¹⁴, se basa en una inclinación del balance entre prooxidantes y antioxidantes hacia los primeros. Esto remite a una situación donde el aumento de oxidantes a partir de cierto valor conduce al daño celular y eventualmente a la patología. Este concepto escaló rápidamente en el campo de la medicina, incluso llegando hasta el público general, instaurando la idea de que la calidad de vida se mejora manteniendo los niveles de oxidantes al mínimo o directamente eliminándolos. Sin embargo, esta visión extremista no ayuda a responder qué sucede con los prooxidantes cuando no se pasa ese valor umbral, ni tampoco alcanza para explicar cómo se regula el balance prooxidantes-antioxidantes. A medida que avanzaron las investigaciones y el conocimiento en el área de la biología y biomedicina redox, empezó a ser necesario idear términos para definir distintos estados del balance entre prooxidantes y antioxidantes. En consecuencia, se comenzó a categorizar al estrés oxidativo según su intensidad y formas específicas a través de las que ocurre^{110,115}. Dentro de la categoría de intensidad, es interesante detenerse en el concepto de estrés oxidativo basal, o, “eustrés” oxidativo (también estrés oxidativo fisiológico y positivo). En esta situación existe una relación sana entre la cantidad de moléculas oxidantes y la sobrevivencia celular y es prueba que la presencia de oxidantes en efecto es necesaria para sustentar la fisiología. El estrés oxidativo, tanto como modificación oxidativa reversible, o, como producción de daño en biomoléculas, atraviesa los niveles fundamentales de la biología, desde la integridad y el mantenimiento del genoma hasta el proteoma y el metaboloma (**Figura 1.21**).

En el contexto del estrés oxidativo fisiológico, es donde podemos comenzar a hablar de regulación mediada por procesos de señalización redox, es decir, regulación redox. De esta forma, se integra la información de los niveles de oxidantes a la red de regulación de los procesos fisiológicos, a través de una compleja comunicación entre actividades oxidantes y antioxidantes. Es necesario mencionar, que no es correcto hablar de un potencial redox global en la célula, debido a que dentro y fuera de la misma pueden coexistir distintos estados redox, por ejemplo, en distintos compartimentos subcelulares. Además, hablar de potencial redox implica hablar de equilibrio, lo que también es incorrecto debido a que los sistemas biológicos están fuera del equilibrio y se encuentra definidos por un estado estacionario. Los flujos de generación y consumo de oxidantes en distintas ubicaciones dentro de una célula o un tejido, van a definir una “tonicidad” redox, que dependerá principalmente de actividades enzimáticas. Por eso, cada tipo celular contará con un perfil redox específico, dado por los niveles de expresión de genes pro y antioxidantes, para su funcionamiento dentro del margen fisiológico¹¹⁰.

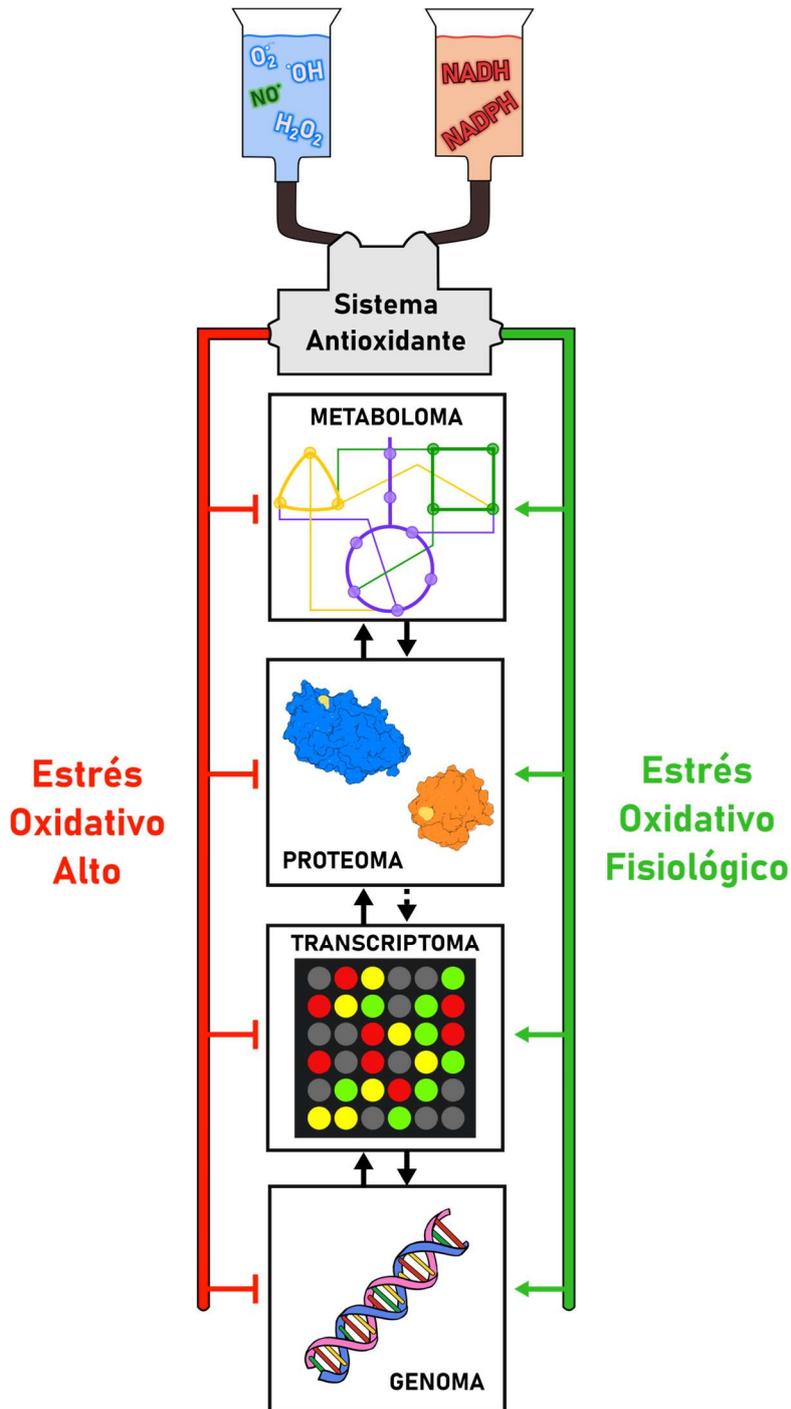


Figura 1.21. Importancia del estrés oxidativo en la biología. El esquema representa la importancia que tiene la relación entre prooxidantes y antioxidantes en establecer condiciones propicias para el funcionamiento biológico a través de la regulación redox en condiciones de estrés oxidativo fisiológico. Cuando el organismo se aleja de esta situación, el aumento de oxidantes y fenómeno de oxidación de biomoléculas, afecta la coordinación y funcionamiento de procesos biológicos en el estrés oxidativo alto.

La regulación redox puede ocurrir por modificación de una actividad enzimática u otra función proteica, o a nivel transcripcional. Por ejemplo, el heterodímero formado entre los factores de transcripción Fos y Jun cambia su unión al ADN a partir de la oxidación/reducción de residuos de Cys conservados en su dominio de unión al ADN¹¹⁶. Además, la familia de factores de transcripción

FoxO, que controla la transcripción de genes que codifican proteínas antioxidantes mitocondriales (*HsSOD2*, *HsPrx3* y *HsPrx5*), está sujeta a regulación redox a nivel de sus modificaciones postraduccionales, interacciones con reguladores, entre otros¹¹⁷. Incluso, otros mecanismos de señalización pueden estar bajo el control de la regulación redox. Esto sucede en el caso de fosfatasa y quinasas, donde la regulación redox puede controlar la duración y amplificación de las señales de fosforilación¹¹⁸. Por otro lado, la modificación oxidativa de las cadenas laterales de Cys, Met, Pro, His y Trp (en orden decreciente de reactividad y reversibilidad) puede modificar la función de proteínas¹¹⁹. Uno de los casos más frecuentes, son las modificaciones reversibles en los grupos tiol de Cys¹²⁰. Uno de los primeros casos en los que se detectó que la modificación redox de un tiol regulaba un proceso biológico, fue en el transporte de hexosas, donde la oxidación de Cys era necesaria para mantener la actividad del transportador de 3-O-metilglucosa¹²¹. Las posibles modificaciones redox reversibles en Cys son la formación de enlaces disulfuro intra o intermoleculares, generación de ácidos sulfénicos (R-SOH), nitrosación o glutationilación¹²²⁻¹²⁴. La reversibilidad de estas modificaciones esta mediada principalmente por Trx y Grx-GSH a expensas de sus respectivas reductasas y NADPH.

1.2.2. H₂O₂ como segundo mensajero

Dentro de las ROS, el H₂O₂ es el mejor candidato para ser segundo mensajero de señales de oxidación¹²⁵. En primer lugar, es de las especies más estables dentro de las ROS, ya que no es un radical y tiene una reactividad con moléculas biológicas más limitada¹²⁶, a diferencia del HO• que reacciona esencialmente con cualquier biomolécula con una velocidad dependiente de su difusión^{110,127}. Esto le permite difundir una distancia determinada hasta reaccionar con un blanco adecuado. En segundo lugar, tiene una especificidad de reacción bastante marcada, ya que reacciona preferentemente con tiolatos, seleno proteínas y centros metálicos¹²⁷. Por último, al no poseer carga neta, el H₂O₂ puede difundir libremente a través de membranas, ya sea atravesándolas directamente¹²⁸, o, por canales como acuaporinas¹²⁹ o peroxiporinas¹³⁰.

Fuentes y sistemas de consumo

Como se mencionó en la sección 1.2.1, una de las fuentes principales de H₂O₂ es el O₂^{-•}. Todo fenómeno o sistema capaz de generar O₂^{-•} también formará H₂O₂, siempre y cuando el primero no se consuma por otras vías. Los primeros reportes de presencia de H₂O₂ en sistemas biológicos mencionan a peroxisomas¹³¹ y mitocondrias¹³² como compartimentos que producen este oxidante. Incluso, trabajos anteriores a estos sugieren la producción de H₂O₂ a partir de actividades enzimáticas específicas, como la de la xantina oxidasa¹³³. Dentro de la mitocondria, el H₂O₂ se produce a partir de la generación de O₂^{-•} en los complejos I, II y III de la cadena de transporte de electrones¹³⁴ y su dismutación por SOD1 (espacio intermembrana) y SOD2 (matriz). La producción de O₂^{-•} y, por lo tanto de H₂O₂, depende de la concentración de O₂, el estado del gradiente de protones (fuerza protón-motriz), el estado de la producción de ATP y los cocientes NADH/NAD⁺ y CoQH₂/CoQ (CoQ, coenzima Q)¹³⁵. Sin embargo, existen otras fuentes de H₂O₂ mitocondriales, a través de enzimas cuya catálisis tiene como producto O₂^{-•} que luego pasa a H₂O₂ por la actividad de las SOD. Algunas de estas enzimas son de la matriz mitocondrial, por ejemplo,

el complejo de la piruvato deshidrogenasa, deshidrogenasa de aminoácidos de cadena ramificada y la α -cetoglutarato deshidrogenasa del ciclo de Krebs¹³⁶. Otras enzimas, se encuentran unidas a la membrana mitocondrial interna y producen H_2O_2 en el espacio intermembrana; por ejemplo, succinato-quinona reductasa, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, prolina deshidrogenasa, entre otras¹³⁴.

El H_2O_2 también puede ser producido en otros compartimentos celulares, por otras actividades enzimáticas (**Figura 1.22**). Una de las principales fuentes de H_2O_2 fuera de la mitocondria son las enzimas NOX. Estas enzimas catalizan la reducción por un electrón del O_2 para formar inicialmente $O_2^{\cdot-}$ que luego es transformado en H_2O_2 por dismutación espontánea o acción de SOD. Las mismas fueron descubiertas en células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, etc.), debido a que representan una herramienta fundamental para combatir microorganismos mediante el uso de ROS¹²⁷. Sin embargo, el descubrimiento de distintas isoformas en células no fagocíticas, demostró que la función NOX va más allá de la eliminación del patógeno y que juega un rol importante en la producción de H_2O_2 para mediar eventos de señalización relacionados con factores de crecimiento y citoquinas^{137,138}.

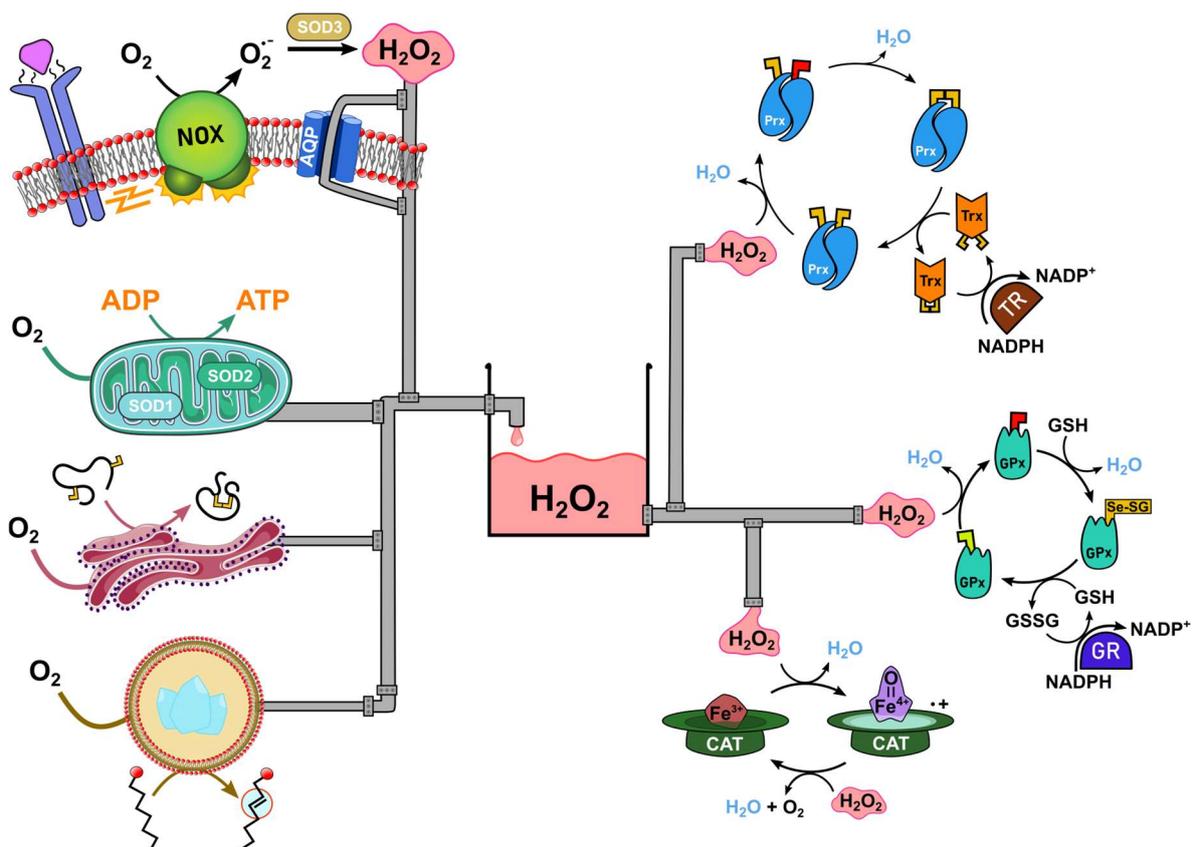


Figura 1.22. Fuentes y consumo de H_2O_2 . A la izquierda se representan las fuentes principales de H_2O_2 . De arriba hacia abajo: activación de NOX por procesos relacionados a unión receptor-ligando y producción H_2O_2 extracelular, que luego puede ingresar por difusión simple o facilitada por canales (AQP, acuaporina); producción mitocondrial de H_2O_2 ; producción de H_2O_2 en el retículo endoplásmico en el proceso de plegamiento oxidativo de proteínas; producción de H_2O_2 por oxidasas de lípidos en el peroxisoma. En el lado derecho se esquematizan los principales sistemas de consumo de H_2O_2 , Prx, GPx y Catalasa (CAT). Los rectángulos sobre las proteínas representan residuos de sitio activo en distintos estados de oxidación: Cys-SH (amarillo), Sec-SeH (verde lima), Cys-SOH y Sec-SeOH (rojo) y disulfuros (dos amarillos unidos, o, un amarillo alargado cuando es con GSH).

Otro compartimento celular que mantiene una producción sostenida de H_2O_2 es el retículo endoplásmico. Allí, el plegamiento oxidativo de proteínas mediante formación de enlaces disulfuro mediado por las PDI y la oxidorreductina del retículo endoplásmico (Ero1), genera un mol de H_2O_2 por cada disulfuro¹³⁹. Por último, otra fuente de H_2O_2 es la actividad de oxidasas peroxisomales de la β -oxidación de lípidos¹⁴⁰.

Para contrarrestar los aumentos indeseados de H_2O_2 , existen sistemas antioxidantes de enzimas que se encargan de descomponerlo eficientemente. Las defensas principales contra el H_2O_2 , son las Catalasas, GPx y Prx, en orden histórico. La actividad de la catalasa se encuentra generalmente confinada en los peroxisomas de las células, aunque también se han detectado en otros compartimentos¹⁴¹, como mitocondrias¹⁴², mientras que GPx y Prx presentan varias isoformas en distintos compartimentos.

Las catalasas son peroxidasas ubicuas presentes en todos los organismos aerobios, que dependen de un grupo hemo para descomponer 2 moléculas H_2O_2 en H_2O y O_2 . La enzima consiste en un tetrámero de 240 kDa, donde cada subunidad posee un grupo hemo férrico (protoporfirina IX) de sitio activo, dentro de una cavidad pequeña. La catálisis consiste, en primer lugar, en la oxidación del grupo hemo por H_2O_2 , para formar el compuesto I y liberar una molécula de H_2O . El compuesto I, consiste en un oxoferril Fe^{IV} y el radical catiónico en el anillo de la porfirina y tiene un espectro UV-VIS que se caracteriza por el descenso en la absorbancia a 400 nm aproximadamente³⁹. En el segundo paso, una segunda molécula de H_2O_2 reacciona con el compuesto I para formar H_2O y O_2 (**Figura 1.22**). Desde el punto de vista cinético, la enzima no presenta un comportamiento clásico de Michaelis-Menten, ya que no es posible saturarla. Además, su actividad comienza a disminuir a concentraciones altas de H_2O_2 ($> 3 \text{ M}$) por inhibición por sustrato¹⁴³. De todas formas, se trata de una de las enzimas más rápidas, con una constante de velocidad en el orden de $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ¹⁴⁴, y un k_{cat} entre 50×10^3 y 10^6 s^{-1} ¹⁴⁵. Otros aspectos relevantes son su robustez ante condiciones extremas como pH y $[\text{H}_2\text{O}_2] > 5 \text{ M}$ ¹⁴⁵ y su capacidad de unir NADPH¹⁴⁶.

Las GPx, al igual que las Prx, pertenecen al grupo de las peroxidasas independientes de grupos prostéticos o cofactores, también son enzimas ubicuas y presentan residuos de selenocisteína (Sec) o Cys de sitio activo. Estas proteínas pertenecen a la suprafamilia Trx y presentan una variedad estructural amplia, desde monómeros a tetrámeros e incluso miembros asociados a membranas¹⁴⁷. A diferencia de las Prx, esta familia de peroxidasas usa GSH para reducir H_2O_2 y otros ROOH, en un mecanismo análogo al de Prx, que comienza con la formación de ácido selenénico (SeOH) y H_2O al reaccionar con H_2O_2 . Luego, el selenolato inicial es reestablecido a partir de dos reacciones consecutiva con GSH, donde se libera una segunda molécula de H_2O y se genera GSSG, que es finalmente reciclado a GSH a partir de GR y NADPH¹⁴⁸ (**Figura 1.22**). No obstante, existen GPx (generalmente las que poseen Cys en lugar de Sec) que pueden reducirse por vías independientes de GSH, como, por ejemplo, Trx-TR-NADPH o incluso PDI¹⁴⁷. Desde el punto de vista cinético, estas enzimas son igual de reactivas que Prx y catalasas en el primer paso de peroxidación, con constantes de velocidad en el orden de $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ⁴⁵. Al igual que las

catalasas, las GPx tampoco presentan una cinética michaeliana clásica y son “insaturables” en el primer paso dependiente de ROOH, acorde al mecanismo propuesto por Flohé¹⁴⁹. Sin embargo, la etapa de reducción es más compleja, ya que requiere de dos pasos de reacción consecutivos con GSH que implican procesos adicionales de asociación y disociación de GSH y GSSG. Este paso se caracteriza por una constante de velocidad en el rango de 10^3 - 10^5 $M^{-1} s^{-1}$ y va a depender de la GPx y el reductor en cuestión⁴⁵. Ambos sistemas (Prx y GPx), dependen finalmente del poder reductor proveniente del NADPH, por lo tanto, la regeneración metabólica de NADPH es un aspecto clave de los sistemas de consumo de H_2O_2 .

Volviendo al concepto de estrés oxidativo (ilustrado en la **Figura 1.21**), el rango de concentraciones de H_2O_2 va a estar relacionado con los procesos biológicos que puedan ocurrir en la células, desde proliferación y migración (1-100 nM, “eustrés”), respuestas adaptativas a estreses moderados (0.1-1 μ M), hasta el arresto del crecimiento celular y muerte (>1 μ M, estrés oxidativo alto)¹³⁸. En estos escenarios, la concentración de H_2O_2 , no sólo dependerá del flujo de producción, sino también de su eliminación por parte de las proteínas antioxidantes que conforman su sistema de consumo (Catalasa, GPx, Prx). Como se mencionó anteriormente, la puja entre las fuentes y los sistemas de consumo, va a definir la concentración de estado estacionario de H_2O_2 adecuada en una ubicación celular determinada para mantener un proceso biológico, o, para disparar una respuesta de adaptación ante un estrés.

Tioles como blancos biológicos

Las Cys son particularmente interesantes en el campo de la señalización redox, ya que los tioles pueden reaccionar de forma apreciable con casi todos los oxidantes fisiológicos. La oxidación de tioles puede ocurrir por oxidantes de uno o dos electrones, dando como resultado distintos productos¹⁵⁰ (**Figura 1.23**). En el caso de la oxidación por dos electrones de un tiol proteico, el primer producto formado es el ácido sulfénico que, a su vez, puede formar disulfuros intra o intermoleculares con otros tioles dentro de la misma cadena polipeptídica o con otras subunidades o proteínas. R-SOH también puede reaccionar con tioles de bajo peso molecular como GSH, coenzima A o ácido lipoico, para formar disulfuros mixtos. Además, puede generarse la condensación reversible entre P-SOH y amidas adyacentes para formar sulfenilamidas. Por último, la reacción de P-SOH con oxidantes fuertes puede llevar a productos de oxidación como el ácido sulfínico (P-SO₂H), sulfónico (P-SO₃H), sulfinamidas y sulfonamidas^{151,152}. Algunos de estos productos de oxidación son irreversibles (como el caso de C_p-SO₃H en Prx).

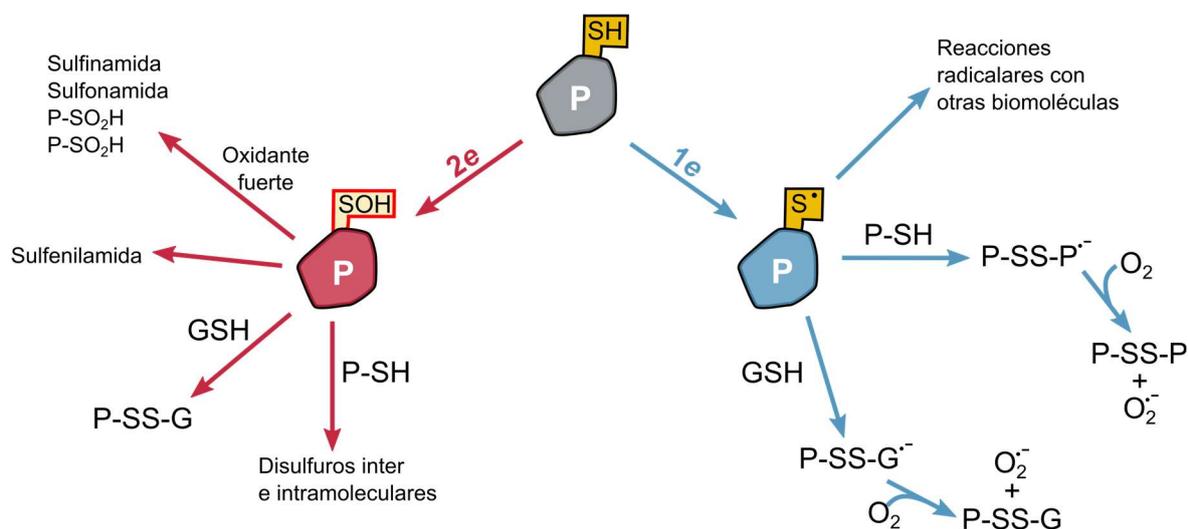


Figura 1.23. Vías de oxidación de tioles proteicos por uno y dos electrones. Las flechas rojas representan las vías de oxidación por dos electrones, mientras que las azules las de un electrón. La letra "P" es proteínas y la "G" representa el resto de la molécula de GSH. Extraído y modificado de Winterbourn y Hampton¹⁵⁰.

En cambio, la oxidación por un electrón lleva a la formación del radical tiol ($P-S\cdot$), que tiene un distinto conjunto de reacciones posibles, siendo la más favorecida en condiciones aerobias la reacción con tiolatos para formar el anión disulfuro radical. Tanto esta especie, como $P-S\cdot$, pueden reaccionar con O_2 para formar $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , contribuyendo al aumento de oxidantes y propagación de reacciones radicalares^{153,154}. Por último, $P-S\cdot$ también puede reaccionar con otras biomoléculas como ácidos grasos insaturados y antioxidantes como el ascorbato^{150,155}.

Dada su reactividad preferencial con los grupos tiol de residuos de Cys, el mecanismo general planteado para la señalización por H_2O_2 es a través de la oxidación de estos residuos en proteínas^{110,114,126,127,138,150,156-159}. Sin embargo, a pesar de ser un oxidante fuerte ($E^0 = 1.32$ V), las reacciones entre H_2O_2 y moléculas biológicas en general son bastante lentas, incluso con tioles proteicos¹⁶⁰ y de bajo peso molecular¹⁵¹. Esto se debe a la alta energía de activación que caracteriza a estas reacciones, lo que las hace depender más de la cinética que de la termodinámica. Una característica clave para la reactividad del H_2O_2 , es la polarizabilidad del enlace O-O que le permite ser un electrófilo. Como se vio en la catálisis de Prx, el aumento de la polarización del enlace O-O en el sitio activo hace que el H_2O_2 incremente su reactividad con Cys hasta 7 órdenes de magnitud si se compara con Cys libre en solución. Al ser un oxidante de dos electrones, el H_2O_2 reaccionará con tiolatos en residuos de Cys, GSH u otros tioles de bajo peso molecular y generará R-SOH como modificación oxidativa inicial (**Figura 1.23**). Los ácidos sulfénicos son más reactivos y menos estables en general, por lo que rápidamente pueden reaccionar con tioles dentro de la misma u otra proteína, tioles de bajo peso molecular, o, formar sulfenamidas entre otros productos (**Figura 1.23**).

En este sentido, el H_2O_2 inicia la señalización mediante la generación de ácido sulfénico, que tiene una reactividad más diversa y aumentada¹⁵², permitiendo así amplificar la señal. Otro detalle muy importante, es que estas modificaciones son reversibles, algo clave en los fenómenos de señalización y modulación covalente, ya que marca la duración y la amplitud del estímulo. Los

disulfuros proteicos pueden ser reducidos por el sistema Trx, mientras que los disulfuros con GSH, los ácidos sulfénicos y las sulfenamidas, pueden reducirse con GSH o GSH-Grx.

Ahora bien, la señalización por H_2O_2 a través de la reacción con tioles tiene un gran problema, que es la colosal diferencia de reactividad entre Cys de proteínas que no tienen una función antioxidante con las Cys o Sec excepcionalmente reactivas de los sistemas Prx y GPx. En este escenario de competencia, si se calcula el porcentaje de H_2O_2 que reaccionará con los grupos tiol de los distintos competidores (teniendo en cuenta pK_A , concentraciones celulares y constantes de velocidad), se espera que casi todo el H_2O_2 sea captado por las Prx, dejando un menor porcentaje al sistema GPx debido a una menor abundancia (**Figura 1.24A**). Mientras tanto, tioles como el del GSH y el de Cys regulatorias en proteínas blanco de señalización (como PTP1B), están ampliamente desfavorecidos en esta competencia, con porcentajes de consumo esperados menores al 0.01%¹²⁶.

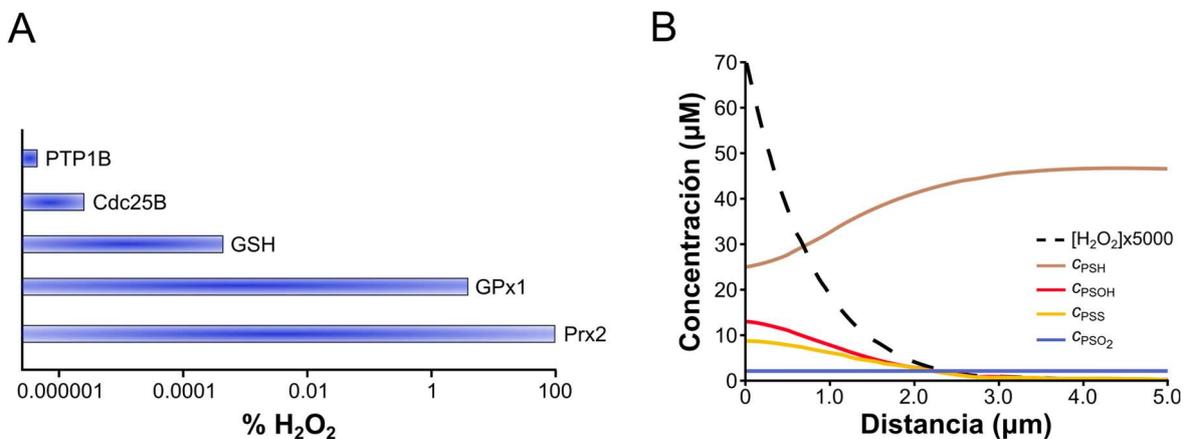


Figura 1.24. Reactividad y difusión del H_2O_2 en presencia de tiol-peroxidases. A. Porcentaje de H_2O_2 consumido por distintos tioles proteicos y GSH (Cdc25B, fosfatasa 2 inductora de fase M). Extraído y modificado de Winterbourn¹²⁶. B. Simulación de concentraciones de H_2O_2 , C_{PSH} , C_{PSOH} , C_{P-CR} y C_{PSO_2H} (de Prx 1 y 2 humanas) en función de la distancia desde una membrana a un flujo de $0.4 \mu M H_2O_2$. Extraído y modificado de Travasso et al¹⁶¹.

Otro aspecto a tener en cuenta es el de la difusión del H_2O_2 . Se ha planteado como alternativa para explicar la oxidación de tioles poco reactivos, la difusión restringida y aumento de la concentración local de H_2O_2 en el sitio donde se encuentra el tiol blanco. Sin embargo, esto es muy poco probable dado el alto coeficiente de difusión del H_2O_2 (sería muy similar al del H_2O), por lo que seguramente la molécula se escape, o sea consumida, antes de poder encontrarse de forma reactiva con ese tiol. Además, en el caso de que el H_2O_2 deba difundir a un sitio específico para oxidar un blanco, esa difusión se encuentra limitada a menos de $3 \mu m$ debido a la intercepción por parte de los sistemas Prx y GPx (**Figura 1.24B**)^{150,161,162}. En suma, la proximidad del blanco con la fuente de H_2O_2 podría ser necesaria, pero, no garantiza la oxidación.

Entonces, ¿cómo es posible que el H_2O_2 llegue a reaccionar con esas Cys ante la presencia de sistemas antioxidantes tan eficientes y potentes? Esta es una pregunta clave en el campo de la señalización redox, ya que catalizó la formulación de dos paradigmas sobre la señalización por H_2O_2 .

Paradigmas de señalización

Existen dos modelos para explicar los fenómenos de transducción de señales del H_2O_2 a proteínas, a través de la oxidación de Cys. Los mismos intentan explicar cómo el H_2O_2 logra oxidar Cys regulatorias poco reactivas (a priori) en proteínas con bajos niveles de expresión, ante la presencia de peroxidasas excepcionalmente reactivas y abundantes.

El primer paradigma es el del modelo, o, hipótesis de “floodgate” (compuerta en español). Este modelo, introducido por Wood²⁸, sostiene que la señalización por H_2O_2 ocurre a expensas de la inactivación o inhibición de su sistema de consumo principal, es decir, Prx (**Figura 1.25**). En otras palabras, la única manera que tienen las Cys regulatorias de competir sería eliminando a su oponente. Las bases de esta hipótesis radican en la sensibilidad de Prx a la inactivación por sobreoxidación. Entonces, a partir de ciertos valores umbrales de H_2O_2 , las Prx comenzarían a inactivarse por sobreoxidación, lo que causaría un aumento local en la concentración de H_2O_2 que facilitaría la reacción directa con Cys regulatorias. Al ser un efecto local, el resto de los blancos celulares no serían activados, garantizando una especificidad espacio-temporal. La sobreoxidación no sería la única manera posible para inactivar Prx. Algunos trabajos han demostrado que la modificación covalente de Prx por fosforilación a través de quinasas disminuye su actividad peroxidasa a nivel local. La disminución de la actividad peroxidasa permite que los niveles de H_2O_2 aumenten haciendo posible la oxidación de proteínas fosfatasa y de esta forma regular procesos de fosforilación/desfosforilación^{163,164}. En ambos escenarios, la reparación de Prx sobreoxidada por Srx y la desfosforilación por fosfatasa, haría que el sistema vuelva a su estado inicial.

Por otro lado, está el modelo de “redox relay” (relevos redox en español), donde se propone que las peroxidasas dependientes de tioles (Prx y GPx) actúan como sensores de H_2O_2 , oxidándose y transfiriendo esta oxidación a los tioles menos reactivos de proteínas blanco, a través de sus formas R-SOH o disulfuro, entre otras^{127,150,159,165} (**Figura 1.25**). Este modelo garantiza la especificidad de la transmisión de la señal, debido a que implica interacciones proteína-proteína entre la peroxidasa y la proteína blanco. Además, la excepcional reactividad de las peroxidasas junto con su abundancia, hace que el sistema pueda responder rápidamente a pequeños cambios en las concentraciones del oxidante y ser compatible con los tiempos en los que ocurren los eventos de señalización. En este modelo, las peroxidasas dejan de ser competidores y pasan a ser facilitadores de la oxidación de tioles en Cys regulatorias. La primera evidencia de una peroxidasa involucrada en este mecanismo de señalización, fue en *S. cerevisiae*, donde se identificó a GPx3 como sensor y transductor de la señal de H_2O_2 hacia el factor de transcripción Yap1¹⁶⁶. En este caso, se encontró que luego de oxidar con H_2O_2 , la Cys peroxidática de GPx3 forma un enlace disulfuro con una Cys de Yap1, que luego se resuelve a un disulfuro intramolecular en Yap1, que es su forma activa. Más tarde, se observó que esta transferencia de oxidación desde GPx3 a Yap1, dependía de una proteína “scaffold” llamada Ybp1¹⁶⁷. Otra situación similar, se observó en *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), donde una AhpC/Prx1 (Tpx1) forma un disulfuro mixto con una quinasa de respuesta a estrés (Sty1) a través de C_p en presencia de H_2O_2 ¹⁶⁸. Esta modificación activa a la quinasa y permite amplificar la señal de estrés.

Floodgate

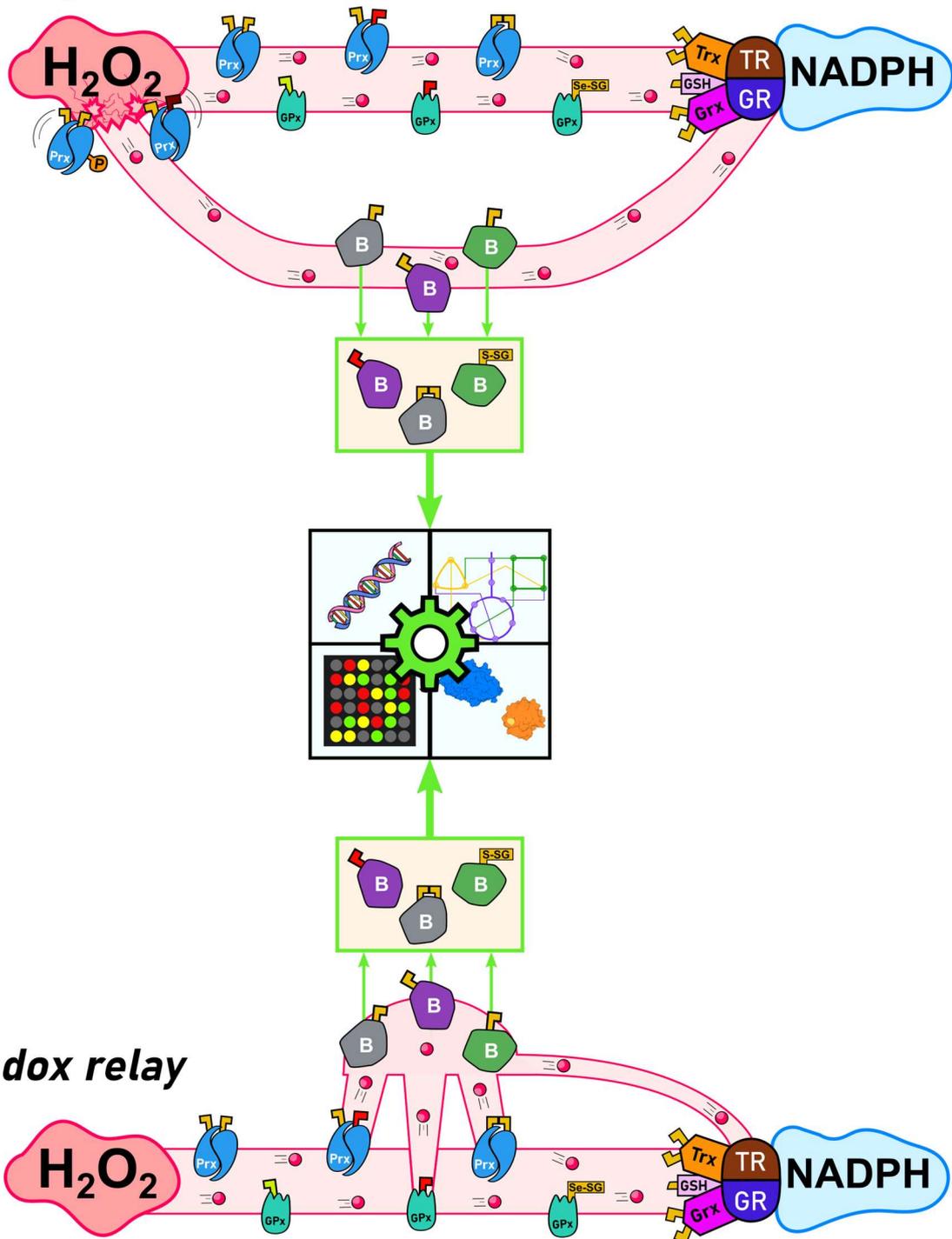


Figura 1.25. Modelos de señalización por H₂O₂ a través de la oxidación de tioles proteicos. En la figura se esquematizan los modelos de Floodgate y Redox relay, donde las esferas rojas representan los equivalentes de oxidación que van desde el H₂O₂ hasta la fuente de poder reductor (NADPH), a través de las peroxidasas dependientes de tioles (Prx y GPx). En el modelo de Floodgate, formas modificadas e inactivas de Prx (fosforilada y sobreoxidada) permiten que los equivalentes de oxidación lleguen directamente a las Cys de proteínas blanco (B) y que se oxiden a distintas formas (Cys-SOH, disulfuro intramolecular, disulfuro con GSH, recuadro verde). Las formas oxidadas de estas proteínas (quinasas, fosfatasa, factores de transcripción, etc.) sufren cambios funcionales que pueden: afectar procesos de señalización adicionales, generar cambios en la expresión génica, modular vías metabólicas, modificar la función de otra proteína, etc (recuadro central). En el modelo de Redox relay, la modificación de las Cys de proteínas blanco sucede únicamente a través de peroxidasas de tioles desde sus formas oxidadas (Cys-SOH, Sec-SeOH, disulfuro, etc). Los rectángulos sobre las proteínas representan residuos de sitio activo en distintos estados de oxidación: Cys-SH (amarillo), Sec-SeH (verde lima), Cys-SOH y Sec-SeOH (rojo), Cys-SO₂H (bordó) y disulfuros (dos amarillos unidos, o, un amarillo alargado cuando es con GSH).

En cualquiera de estos casos, la reducción de disulfuros para volver al estado basal sería mediante el sistema Trx.

Ambos modelos tienen sus pros y contras, sin embargo, la hipótesis de floodgate es la que más hace agua, por así decirlo. En primer lugar, el modelo ignora tanto la difusión del H₂O₂ fuera del sitio, como, la de peroxidasas activas desde el citosol hacia el sitio de inactivación. Tampoco se tiene en cuenta que a medida que aumenta la concentración local de H₂O₂ se forma rápidamente un gradiente que depende del consumo de H₂O₂ citosólico. Este modelo también ignora el hecho de que no todas las peroxidasas pueden inactivarse (catalasas y GPx).

Trabajos de biología de sistemas^{161,169}, sugieren que la formación de estos micro dominios de H₂O₂ nunca llegarían a concentraciones lo suficientemente altas como para directamente oxidar Cys regulatorias, ni siquiera en el ápex del gradiente. Según estas predicciones, sería necesario inactivar el consumo de H₂O₂ citosólico, además del local, para llegar a concentraciones de H₂O₂ razonables para la oxidación de Cys como las de fosfatasa. De lo contrario, la inactivación local sería rápidamente compensada por la difusión de Prx activa al lugar. Por otro lado, el modelo asume que la oxidación de Cys ocurre de forma directa, por lo tanto, disminuir la cantidad o eliminar algunas de las peroxidasas debería resultar en un aumento en la oxidación de Cys en la célula. Sin embargo, algunos trabajos demuestran que el proteoma redox no cambia significativamente en células knock out para *HsPrx1* o *HsPrx2*, o, que incluso disminuye la cantidad de Cys oxidadas¹⁷⁰.

Por último, por más defectuoso que parezca el modelo de floodgate para explicar señalización en rangos de concentración de H₂O₂ fisiológicos (1 a 100 nM), podría cobrar sentido en situaciones donde la concentración sea lo suficientemente alta. En este escenario, la inactivación de peroxidasas y el daño colateral a otras biomoléculas, marcaría un punto de no retorno, causando la muerte celular programada¹⁶⁵.

1.3. Transducción de señales a través de Prx

Las Prx, particularmente las AhpC/Prx1, tienen un gran potencial como sensores y transductores de H₂O₂. Desde el punto de vista de su reactividad, abundancia y distribución intracelular, estas Prx son sensores de H₂O₂ extraordinarios. Luego, la plasticidad estructural de su sitio activo hace posible transferir su estado de oxidación a distintos blancos, formando interfases proteicas con arquitecturas diversas. Por último, su estructura oligomérica puede servir de plataforma de interacción para formar complejos de señalización que incluyan varios miembros, además de la proteína cuya Cys es blanco de oxidación.

1.3.1. Transferencia de equivalentes de oxidación

Uno de los conceptos centrales del modelo de “redox relay” basado en tiol-peroxidasas, es que toda modificación oxidativa en la Cys de la proteína blanco surge de la formación de Cys-SOH o Sec-SOH en el sitio activo de Prx o GPx. De esta forma, las peroxidasas son una fuente de equivalentes de oxidación provenientes del H₂O₂, que luego son distribuidos específicamente a la proteína adecuada¹⁵⁹. Recientemente, se ha acumulado una cantidad relativamente alta de evidencia experimental que demuestra que las Prx se encuentran interaccionando con cientos de proteínas a nivel celular y que su presencia es indispensable para la oxidación de Cys regulatorias en algunas de ellas.

Mecanismos

Como se mencionó anteriormente, el paso inicial de transferencia de equivalentes de oxidación del H₂O₂, es la formación de C_PSOH. A partir de esta especie es que las Prx podrían pasarle la posta del H₂O₂ a Cys en otras proteínas. En el caso de que la transferencia sea directa (**Figura 1.26A**), el producto primario de oxidación, C_PSOH, puede reaccionar directamente con el tiol blanco para dar un disulfuro (**i, Figura 1.26A**). Para eso, Prx y su proteína blanco deben estar formando un complejo, de lo contrario, la reacción de resolución o la intercepción de C_PSOH por otro tiol (GSH, por ejemplo) no permitiría que se forme el disulfuro de señalización. De forma alternativa, el disulfuro C_P-C_R, o, disulfuros mixtos entre C_P o C_R y GSH, también podrían oxidar al tiol blanco a través de una reacción de intercambio tiol-disulfuro, generando el tiol blanco glutationilado o el disulfuro Prx-proteína blanco (**ii-iii, Figura 1.26A**). En ambos casos, estas reacciones compiten con los sistemas Trx y GSH-Grx, por lo que la proximidad entre el tiol blanco y la Prx puede llegar a ser fundamental. Una alternativa, sería que C_PSOH reaccione con H₂S para formar un persulfuro y este ser transferido al tiol blanco, en una reacción de transpersulfuración (**iv, Figura 1.26A**). Otra posibilidad, es que el equivalente de oxidación no sea totalmente transferido y que la formación del disulfuro Prx-proteína ya sea suficiente como para modular la función del blanco de señalización. Luego de compartir el equivalente de oxidación por un tiempo, el mismo podría volver a Prx, o, ser tomado por otro reductor. Un ejemplo que se ajusta a esta situación, es el anteriormente mencionado de Tpx1 de *S. pombe*. También podría ser necesaria la presencia de otras proteínas y/o estructuras subcelulares para estabilizar la interacción entre Prx y su proteína blanco. Estas estructuras adaptadoras podrían impedir el acceso de oxidorreductasas (o GSH y

H₂S) al sitio activo de Prx y al mismo tiempo posicionar la Cys de la proteína blanco de manera favorable, haciendo que la transferencia sea efectiva¹⁵⁹.

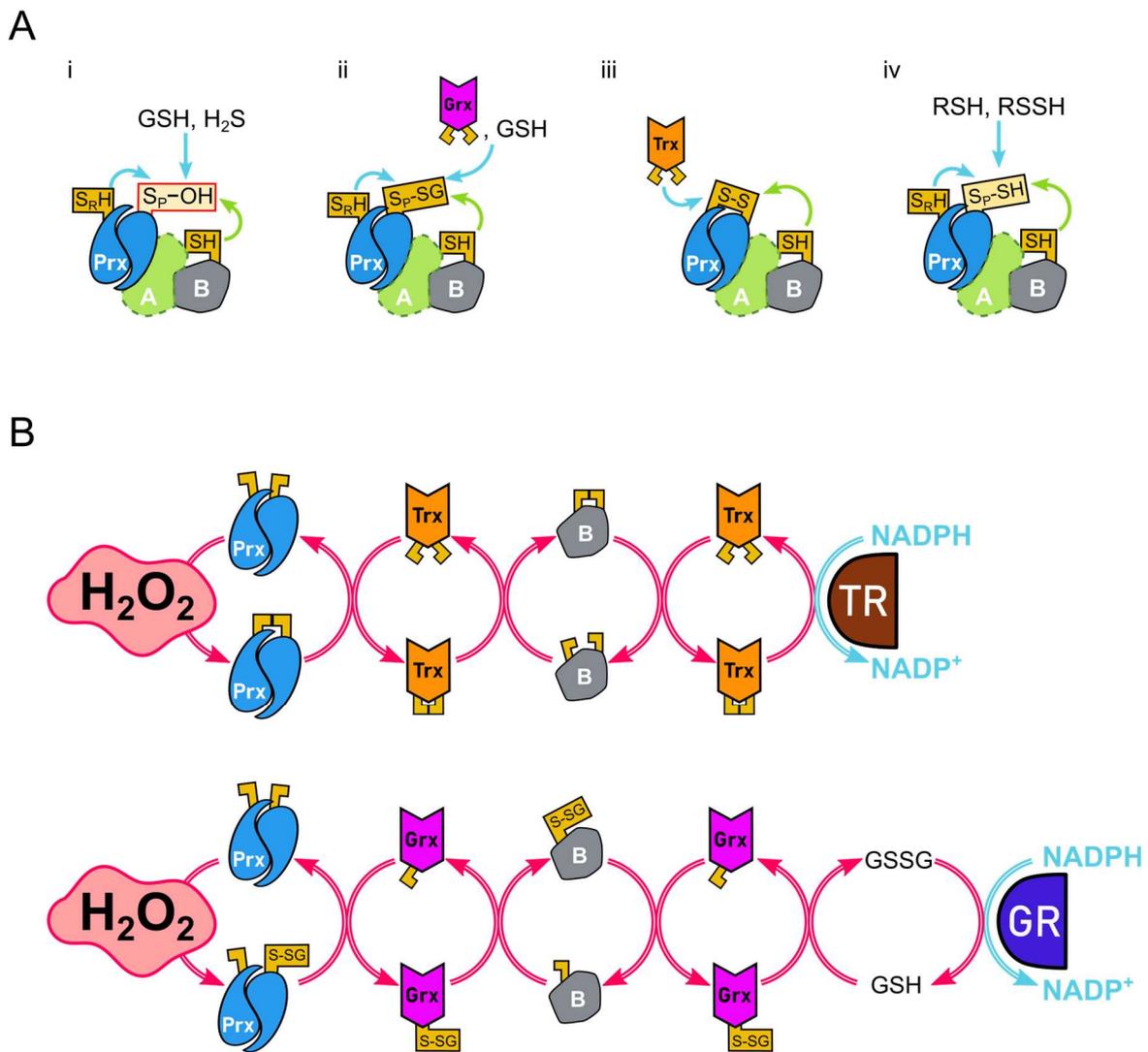


Figura 1.26. Mecanismos de transferencia de equivalentes de oxidación a través de Prx. A. Mecanismos de transferencia directa desde Prx a Cys en proteínas blancos de señalización (B, gris) en presencia de una proteína adaptadora (A, verde). Las líneas verdes representan la reacción de transferencia desde Prx a la proteína blanco y, las azules, las reacciones de competencia. La transferencia puede ocurrir a través de 4 estado de oxidación del sitio activo: C_PSOH (i), C_PS-SG (ii), C_P-C_R (iii) y C_PS-SH (iv). B. Mecanismos de transferencia indirecta a partir de los sistemas de oxidorreductasas Trx y Grx/GSH. Los rectángulos amarillos representan los residuos de Cys en su estado tiol (libres) o disulfuro (unidos).

En cambio, si la transferencia es indirecta (**Figura 1.26B**), la Prx primero transfiere los equivalentes de oxidación a una oxidorreductasa (Trx o Grx) que luego puede oxidar a otro tiol blanco. En el caso de ser a través de Trx, la reacción canónica de reducción genera Trx disulfuro, que luego puede transferir los equivalentes de oxidación a través de un intercambio tiol-disulfuro. Algo a destacar de este mecanismo, es su dependencia con la actividad/niveles de TR y la disponibilidad de NADPH. Por otro lado, una Prx glutationilada podría deglutationilarse con Grx, que luego podría glutationilar al tiol blanco, en una reacción de transglutinationilación. En ambos casos, tanto Trx como Grx pueden revertir la modificación oxidativa en la proteína blanco.

Como se mencionó al inicio, un aspecto interesante de Prx para sus funciones de señalización o regulación redox, es su estructura. La dinámica conformacional de su sitio activo puede habilitar superficies de interacción para transferir equivalentes de oxidación a Cys en proteínas blanco. En ese sentido, no es casualidad que los distintos estados de oxidación tengan estructuras diferentes. Se sabe que la forma disulfuro induce a la extensión del C_R loop por encima del extremo N-ter en el sitio activo, exponiendo el disulfuro C_P-C_R. Además, en la interacción con Srx, tanto C_R loop como α7 “abrazan” a Srx para que su sitio activo entre en contacto con C_P-SO₂H^{70,71}. Por lo tanto, podemos empezar a plantear modos de interacción entre Prx y otras proteínas en base a como interaccionan con proteínas que las reducen. Por último, podrían existir situaciones donde la señalización o regulación dependa del estado redox de Prx, pero que este no sea transferido. Esto se puede relacionar con la estructura cuaternaria y el efecto del estado redox sobre la misma. Por ejemplo, en un caso hipotético donde la formación de un complejo multiproteico dependa de la estructura del decámero, la oxidación y formación del disulfuro podría desmantelarlo, alterando el propósito del mismo.

Participación de Prx en redox relays

La evidencia acumulada sugiere que las Prx no solo participan en funciones de señalización, sino que también en la regulación redox de otras proteínas. Tan significativo es el rol de Prx en la regulación, que su ausencia puede anular mecanismos transcripcionales en respuesta a H₂O₂¹⁷¹, o, aumentar la cantidad de Cys reducidas en proteínas¹⁷⁰. Otra evidencia que justifica su papel en eventos de señalización y regulación, es la cantidad de proteínas con las que interacciona. En primer lugar, un estudio de proteómica en células HEK293, reveló que todas las 2-Cys Prx (*HsPrx1* a 5) interaccionan con un grupo específico de proteínas, de forma dependiente e independiente de sus Cys de sitio activo¹⁷². Algunos de estos ejemplos incluyen la detección de disulfuros mixtos entre Prx y otras proteínas, como es el caso de *HsPrx1* con la quinasa ASK1, cuya activación depende de la interacción con *HsPrx1*¹⁷³. Mientras tanto, *HsPrx2* demostró ser necesaria para la oxidación del factor de transcripción *HsSTAT3*, donde se encontró formando disulfuros con varias Cys del mismo¹⁷⁴. Luego, se descubrió que la oxidación dependía de una proteína adicional, la anexina A2 (*HsANXA2*), para que ocurra de forma eficiente, en donde la misma tiene el rol de proteína adaptadora (situación similar a la de GPx3-Ybp1-Yap1)¹⁷⁵. Otros ejemplos provienen de levaduras. En el redox relay GPx3-Ybp1-Yap1, se vio que Tsa1 puede oxidar a Yap1 en cepas de *S. cerevisiae* que carecen de Ybp1¹⁷⁶. En otro ejemplo, la misma Tsa1 fue hallada formando un disulfuro con la enzima piruvato quinasa (Pyk1) de forma dependiente de C_P, causando la disminución adaptativa de la actividad quinasa dependiente de H₂O₂¹⁷⁷.

1.4. Objetivos

Objetivo general

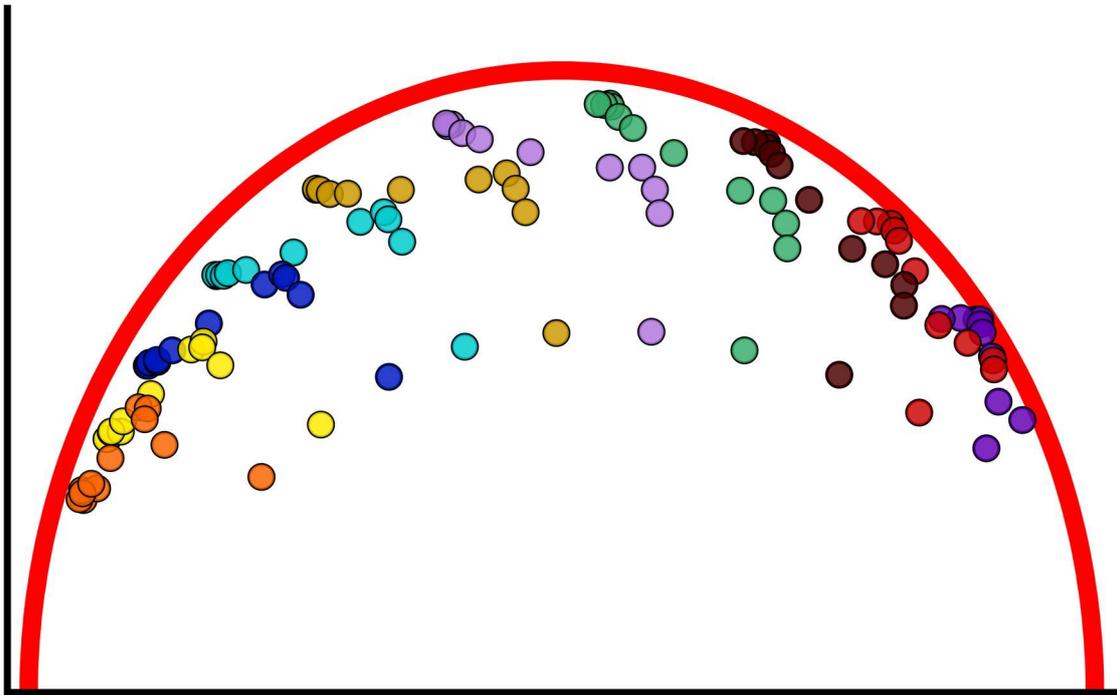
Estudiar aspectos bioquímicos y biofísicos relevantes de *HsPrx1* y *HsPrx2* en relación a sus funciones como transductores de la señal de H_2O_2 .

Objetivos específicos

- Estudiar la dinámica de oligomerización de *HsPrx1* y *HsPrx2* en distintas condiciones y estados redox de sitio activo.
- Investigar el vínculo entre la dinámica de oligomerización y la reactividad con H_2O_2 .
- Determinar constantes de velocidad de reducción de los disulfuros de *HsPrx1* y *HsPrx2* por Trx.
- Caracterizar la interacción Prx-Trx a nivel estructural y su dinámica mediante herramientas computacionales.
- Analizar la reactividad e interacción de complejos redox entre *HsPrx1* y *HsPrx2* con *HsANXA2*.
- Estudiar la influencia de *HsPrx1* y *HsPrx2* en la oxidación de la cistationina β sintasa (*HsCBS*) por H_2O_2 .

Capítulo 2

Dinámica de oligomerización de Prx y vínculo con su actividad peroxidasa



Prefacio

Como se mencionó en la introducción, la formación de decámeros a partir de 5 homodímeros es una de las características principales de las AhpC/Prx1 y, por ende, de las proteínas de esta tesis. Ya en los trabajos iniciales sobre Prx, se demostró que la estabilidad relativa de dímeros y decámeros es dependiente del estado de oxidación del sitio activo, donde la forma reducida favorece al decámero y la oxidada a disulfuro al dímero. Esta dependencia fue rápidamente extrapolada a una relación entre oligomerización y actividad catalítica en uno de los artículos más influyentes de la literatura de Prx⁸². En ese trabajo se propuso que sólo los decámeros pueden oxidarse y que solo los dímeros pueden reducirse, generando un escenario binario donde la asociación y disociación serían pasos obligatorios en la catálisis. Esta noción es repetida a lo largo de la literatura, sin embargo, la evidencia experimental demuestra que el equilibrio decámero-dímero no tiene un comportamiento universal y cambia según especie e isoforma.

Los trabajos que apuntaron a determinar la relación entre dímeros y decámeros en solución, utilizaron cromatografía de exclusión molecular (size exclusion chromatography, SEC) acoplado a equipos de HPLC o ultracentrifugación analítica, que tienen la desventaja de diluir la muestra durante la medición y por lo tanto alterar el equilibrio de oligomerización. Otras técnicas más sofisticadas como calorimetría de titulación isotérmica¹⁷⁸ ("ITC" en inglés) y fotometría de masas de molécula única¹⁷⁹ (single molecule mass photometry), han sido usadas para estudiar la oligomerización de Prx a concentraciones proteicas constantes e incluso determinar valores de $C_{0.5}$, que es la concentración de proteína total en la cual la proporción de decámeros y dímeros es igual (similar al punto de inflexión de una curva sigmoide). No obstante, estas técnicas pueden llegar a requerir mucha muestra (ITC) y ser de difícil acceso (mass photometry). Una gran parte de esta tesis y este capítulo se centró en desarrollar una metodología alternativa para estudiar el equilibrio de oligomerización de *HsPrx1* y *HsPrx2*, mediante la determinación y el análisis del tiempo de vida de emisión de fluorescencia utilizando vectores de fase (fasores). El desarrollo de este método permitió evaluar el equilibrio de oligomerización en distintas condiciones de fuerza iónica, desnaturalizantes y estado redox de sitio activo. La última parte del trabajo realizado en este capítulo, se centró en aprovechar la información obtenida del estudio de la dinámica de oligomerización para comenzar a entender su relación con la actividad peroxidasa. Para eso evaluamos la reacción de *HsPrx1* y *HsPrx2* con H_2O_2 en condiciones donde el equilibrio estuviera desplazado hacia dímeros o decámeros.

Volviendo al tema central de esta tesis, la dinámica de oligomerización de Prx puede llegar a ser crucial en su función como transductores de señales, ya que tiene un potencial impacto en la interacción con proteínas blanco de señalización, favoreciendo o impidiendo la transmisión de la señal. Por otro lado, que dos isoformas de Prx (como en este caso *HsPrx1* y *HsPrx2*) tuvieran una dinámica de oligomerización distinta, podría aumentar las posibilidades de mediar la señalización por H_2O_2 . Particularmente *HsPrx1* y *HsPrx2* presentan un 91% de similitud y 78% de identidad de secuencia, lo que genera dudas en cuanto a la necesidad de tener dos proteínas prácticamente iguales en el mismo compartimento celular. No obstante, la caracterización cinética ha

demostrado que son muy distintas en la velocidad de resolución y susceptibilidad a la sobreoxidación^{41,42} (*HsPrx2* más lenta y más susceptible a la inactivación por H_2O_2). Es por esto que consideramos fundamental investigar la dinámica de oligomerización de estas Prx para poder aportar a la comprensión global de su participación en el proceso de señalización y metabolismo del H_2O_2 .

2.1. Metodología

2.1.1. Procedimientos generales

Amortiguadores de uso general

Se utilizaron dos sistemas de amortiguadores a nivel experimental. El primero, es un amortiguador fosfato salino (PBS), compuesto por Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1.8 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM y ácido dietilentriaminopentacético (DTPA) 0.2 mM, pH 7.2-7.4. El segundo sistema está compuesto por 30 mM Tris, 15 mM MES, 15 mM ácido acético, 120 mM NaCl y 0.1 mM DTPA pH 6.9-7.1, fue utilizado como amortiguador de amplio rango de pH y va a ser referido como amortiguador TMA. En el caso de trabajar con las proteínas reducidas, se suplementaron los amortiguadores con 1 mM DTT, para asegurar el estado reducido durante el experimento. A lo largo de este trabajo, notamos que la presencia de tioles (DTT o GSH) en solución genera H_2O_2 , posiblemente catalizado por trazas de metales (como el hierro) y oxígeno disuelto. Por lo tanto, lo más recomendable es aumentar la concentración del quelante DTPA en el caso de suplementar con tioles y/o saturar la solución con un gas inerte como el nitrógeno o el argón. La problemática de la presencia de H_2O_2 en los amortiguadores cobra más importancia en el capítulo 3 y será discutida nuevamente.

Amortiguadores de purificación de proteínas

Para la purificación de *HsPrx2* (IMAC) se utilizó amortiguador unión IMAC: 50 mM NaPi, 150 mM NaCl, 0.1 mM DTPA, 20 mM imidazol, pH 8; amortiguador elución IMAC: amortiguador de unión más 280 mM imidazol (300 mM final), pH 8; amortiguador de lisis: amortiguador de unión suplementado con 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1 mg/mL lisozima de huevo de gallina, 10 mM de MgCl_2 y 0.6 U/mL de DNAsa; amortiguador de almacenamiento: 50 mM NaPi, 150 mM NaCl, 0.1 mM DTPA, pH 7.4. Este amortiguador también se utilizó para medir actividad en varias ocasiones (también llamado PBS2). En el caso de *HsPrx1* se utilizó un amortiguador Tris 25 mM, pH 8.8 suplementado con 1 mM EDTA y 2 mM DTT (amortiguador DEAE). En el caso de la lisis, se utilizó el mismo amortiguador sin DTT y suplementado con 0.5 mM de PMSF.

Reducción de proteínas

Para obtener la forma reducida (ditiol) de las proteínas, los stocks concentrados se redujeron con 10 mM DTT o 10 mM tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP) por 30 min para *HsPrx2* o 1 hora para *HsPrx1*, a temperatura ambiente y con agitación orbital o por inclinación. El exceso de reductor se quitó usando columnas de desalado PD10 de Cytiva y en caso de ser necesario, las proteínas se concentraron por centrifugación utilizando centricones Amicon Ultra (Millipore) de corte de peso molecular de 10 kDa, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración de proteína fue determinada mediante espectrofotometría UV a partir de los coeficientes de extinción molar a 280 nm (ϵ_{280}) calculados según la secuencia aminoacídica en la plataforma web ProtParam: *HsPrx1*, $18500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; *HsPrx2*, $21500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Cuantificación de RSH

Para determinar la concentración de RSH en proteínas, se usó el reactivo 4,4'-ditiopiridina (4-DTDPy), que al reaccionar con tioles da el producto 4-tiopiridona (4-Tpy) que absorbe a 324 nm ($\epsilon = 21400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)^{180,181}. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente con 4,4-DTDPY en exceso (160 μM), con no más de 40 μM de RSH esperados, e incubando por 5 min. A partir de los valores de absorbancia (Abs) 324 nm y ϵ se calculó la concentración de tioles, que luego fue dividida por la concentración de proteína utilizada en la medida para obtener el cociente de tioles por proteína. Los residuos de Cys cuantificables en *HsPrx2* son C_P y C_R , ya que el residuo de Cys adicional (C_{70}) está en el interior de la estructura y es inaccesible al solvente. En el caso de *HsPrx1* hay 3 Cys cuantificables: C_P , C_R y C_{83} (interfase entre dímeros); el equivalente a C_{70} en *HsPrx1* tampoco es cuantificable. Para poder cuantificar todos los RSH es necesario agregar un agente desnaturizante (por ejemplo, SDS 1%).

Cuantificación de H_2O_2

La cuantificación de H_2O_2 se realizó a partir de su Abs a 240 nm y $\epsilon = 39.4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ¹⁸².

Oxidación estequiométrica de Prx

La oxidación estequiométrica de Prx para obtener la forma disulfuro se realizó de la siguiente forma: primero se redujo la Prx con DTT o TCEP, se eliminó el exceso de agente reductor y se determinó la concentración de proteína como se mencionó anteriormente. Luego se procedió a cuantificar la cantidad de grupos tiol por proteína. Sabemos que cada mol de H_2O_2 oxida 2 moles de tioles en estas Prx (formación de disulfuro C_P - C_R), por lo tanto, la concentración final de H_2O_2 en la muestra tiene que ser igual a la de Prx para lograr una oxidación estequiométrica. En la práctica, siempre se agregó un 20% más de H_2O_2 para asegurar la oxidación total sin llegar a sobreoxidar. La oxidación se hizo de forma tal de enfrentar a la solución de Prx con la menor cantidad de H_2O_2 posible para evitar sobreoxidación. A modo de ejemplo, para obtener una solución de un volumen final de 1 mL de 10 μM de *HsPrx2* oxidada, se prepararon 0.5 mL de proteína y 0.5 mL de H_2O_2 por separado en amortiguador al doble de la concentración y luego se las mezcló. De esta forma, la enzima en la mezcla se enfrenta a una menor concentración de H_2O_2 (20 μM) que si agregáramos directamente del stock concentrado (por ejemplo: 1 mM).

Todas las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Cary 50 UV-Vis (Agilent).

Expresión y purificación de proteínas

Vectores

Partimos de construcciones con los genes de *HsPrx1* y *HsPrx2*, obtenidas en el trabajo del MSc. Joaquín Dalla Rizza⁴². *HsPrx2* se encuentra en un vector pET28a (resistencia a kanamicina), con una etiqueta de 6 histidinas (Histag) y un sitio de corte para la proteasa del virus del grabado de tabaco (TEVp por su sigla en inglés) en el extremo 5' de la secuencia nucleotídica (N-terminal de la secuencia aminoacídica). En cambio, para *HsPrx1* utilizamos una construcción sin Histag en el vector pET17b con resistencia a ampicilina.

Expresión

La expresión de todas las proteínas recombinantes fue realizada en la cepa BL21(DE3) de *E. coli*. Las células quimiocompetentes se transformaron con 1 a 5 μL del plásmido correspondiente por shock térmico y fueron esparcidas en placas con medio Luria-Bertani-Agar (LB agar) suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina o 100 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina e incubadas durante toda la noche ("ON" del inglés over night, 16 a 18 h) a 37 °C. Para la expresión se picó una colonia de la placa en 10 mL de LB con antibiótico y se incubó ON a 37 °C y con 200 rpm de agitación orbital. Al día siguiente, se realizó el escalado con un inóculo 1:100 en 1 L de LB con antibiótico en un matraz de 5 L (relación líquido-volumen 1:5). El cultivo se dejó crecer por aproximadamente 3 h, a 37 °C y 200 rpm, hasta llegar a la fase de crecimiento exponencial ($\text{OD}_{600\text{nm}}$ 0.6-0.8). En ese momento se indujo la expresión de la proteína mediante el agregado de 0.5 mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 20 °C ON, 200 rpm. Luego de la expresión, el cultivo fue centrifugado a 6000xg por 30 min a 4 °C y el pellet bacteriano se pesó y almacenó a -80 °C hasta el momento de la purificación.

Purificación HsPrx2

El pellet fue descongelado y resuspendido en amortiguador de lisis agregando 1-5 mL por g. Las bacterias resuspendidas se sonicaron con pulsos de 40% de amplitud (Macrotip) de 1 segundo cada 3, durante 6 min, tres ciclos o hasta que el lisado perdiera viscosidad. Luego se centrifugó a 17000xg durante 30 min a 4 °C para separar la fracción insoluble (bacterias sin lisar, ADN, restos de membranas, etc) de la soluble (sobrenadante) donde está la proteína de interés. Luego de separar el sobrenadante, se filtra con un filtro de 0.45 μm .

El primer paso de purificación es una cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) con una columna Ni^{2+} Sepharose HisTrap (Cytiva) de 1 mL, la cual se equilibra con 10 volúmenes de amortiguador de unión IMAC en el cromatógrafo FPLC ÄKTA Prime plus (GE Healthcare). Luego se procedió a sembrar la columna con el sobrenadante filtrado utilizando el sistema SuperLoop (Cytiva) a un flujo de 0.5 mL/min y una vez cargada la muestra, se subió el flujo a 1 mL/min y se lavó con 10 volúmenes de amortiguador unión IMAC. Posteriormente se lavó con una concentración de 60 mM imidazol y por último se eluyó la proteína con 250 mM imidazol. Para remover la Histag, se incubó el eluido con 2 mg TEVp, 0.5 mM EDTA y 1 mM DTT y se dializó contra el amortiguador de unión más 0.5 mM EDTA y 1 mM DTT a 4 °C ON, para quitar el exceso de imidazol. En una segunda IMAC, se hace pasar la mezcla de corte con TEVp y HsPrx2 por la columna, donde se separa la HsPrx2 cortada (sin Histag) del remanente sin cortar y la TEVp (tiene Histag). El último paso de purificación consiste en una cromatografía de exclusión molecular (SEC) con una columna Superdex 200 16/600 (GE Healthcare), equilibrada con amortiguador de almacenamiento. La muestra que salió de la fracción no unida de la segunda IMAC, se concentró hasta un volumen de 1-2 mL, se redujo 30 min con 10 mM DTT y se inyectó en la columna a un flujo de 1 mL/min. Se recolectó el pico correspondiente a la proteína, se concentró la muestra hasta aproximadamente 120 μM y se almacenó a -80 °C hasta su uso. Todas las fracciones colectadas fueron sometidas a SDS-PAGE (12% acrilamida) para corroborar la presencia y grado

de pureza de la proteína a lo largo del proceso de purificación. La proteína purificada fue analizada por espectrometría de masa para verificar el corte de la Histag.

Purificación HsPrx1

La lisis del pellet bacteriano fue realizada en el respectivo amortiguador de lisis y posterior sonicado, de forma análoga a HsPrx2. Una vez obtenido el lisado, se lo trató con sulfato de streptomina (1% concentración final) a 4 °C ON, para precipitar ácidos nucleicos. Luego, el lisado de centrifugó y filtró al igual que para HsPrx2. En el primer paso de purificación se realizó un intercambio aniónico en una columna HiPrep DEAE FF 16/10 (GE Helthcare) equilibrada con amortiguador DEAE. Luego de cargar la columna con el sobrenadante, se colecta la HsPrx1 en la fracción no unida debido a que a pH 8.8 la proteína sigue teniendo una carga global positiva. Por último, se procedió a juntar las fracciones que contienen HsPrx1 y se realizó una SEC de la misma forma que para el último paso de purificación de HsPrx2 (mismos amortiguadores inclusive). Todas las fracciones colectadas fueron sometidas a SDS-PAGE (12% acrilamida) para corroborar la presencia y grado de pureza de la proteína a lo largo del proceso de purificación. La proteína se almacenó en amortiguador de almacenamiento a una concentración de 440 µM a -80 °C.

2.1.2. Procedimientos específicos

Cromatografía de exclusión molecular (SEC) analítica

La cromatografía se realizó en un equipo HPLC Agilent 1260 con una columna Superdex 200 5/150 GL (Cytiva). Previo a los experimentos, se realizó una curva de calibración de la columna con distintos estándares de peso molecular: tiroglobulina (660 kDa), ferritina (440 kDa), aldolasa (160 kDa), conalbúmina (76 kDa) y ribonucleasa (13.7 kDa), a 1 mg/mL cada una (**Anexo 5.1.1**). Las corridas se llevaron a cabo en amortiguador PBS con un flujo de 0.4 mL/min a temperatura ambiente (22-25 °C). Las muestras se inyectaron en un volumen de 100 µL con un loop de 300 µL. En cada corrida, se registró la emisión de fluorescencia a 340 nm utilizando una excitación de 280 nm (también se registraron las señales de Abs a 280 y 210 nm). La sensibilidad del tubo fotomultiplicador (PMT) se ajustó para diferentes concentraciones de proteínas. Todos los cromatogramas fueron normalizados utilizando el valor de la mayor intensidad de emisión, a menos que se especifique lo contrario. La fracción de decámero (F_{DEC}) para cada concentración inicial de Prx se calculó a partir de los cromatogramas sin normalizar, considerando el área bajo la curva (ABC) para el pico del decámero (tiempo de elución = 3.8 min), el del dímero ($t = 5.2$ min) y su suma (**Ec. 2.1**).

$$F_{DEC} = \frac{ABC_{decámero}}{ABC_{decámero} + AB_{dímero}} \quad \text{Ec. 2.1}$$

Para experimentos donde aparecieron más de dos picos, se realizó un ajuste del cromatograma a picos gaussianos para determinar el ABC. El análisis de la fracción de las especies de interés se hizo de forma análoga a **Ec. 2.1**, donde se agregó la/s nueva/s especie/s sumando en el

denominador. En forma general, cuando se quiso reportar la fracción de otra especie que no fuera el decámero, se sustituyó esta última por la especie de interés en el numerador de **Ec. 2.1**.

Espectros de emisión de fluorescencia

Los espectros de emisión se registraron en un rango de 300 a 500 nm utilizando el espectrofluorómetro ChronosFD (ISS). Los registros se hicieron en PBS suplementado con 1 mM de DTT, a 25 °C, usando una longitud de onda de excitación (λ_{ex}) de 280 nm. Se utilizaron rendijas de 8 y 16 nm en los caminos de excitación y emisión, respectivamente. Las muestras se prepararon fuera de la cubeta y se dejaron estabilizar a temperatura ambiente durante 25 min. Adicionalmente, cada muestra fue incubada durante 5 min dentro del portacubetas termostatzado antes de realizar las mediciones. El centro de masa del espectro (CM) fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$CM = \frac{\sum_i IF_i \lambda_i}{\sum_i IF_i} \quad \text{Ec. 2.2}$$

donde IF y λ representan la intensidad de fluorescencia y la longitud de onda, respectivamente.

Análisis de τ con fasores

Marco teórico

La fluorescencia intrínseca de proteínas está predominantemente influida por el residuo aromático triptófano (Trp, W), cuya emisión puede variar significativamente según el entorno molecular en el que se encuentre^{183,184}. Factores como la accesibilidad al solvente y la interacción con ciertos aminoácidos pueden alterar la longitud de onda máxima de emisión, el rendimiento cuántico y el tiempo de vida de emisión (τ) por lo que la fluorescencia del Trp ha demostrado ser una herramienta útil para investigar cambios estructurales y químicos en proteínas^{43,185}. Sin ir muy lejos, la fluorescencia de Trp fue fundamental para determinar parámetros cinéticos de la reacción de Prx con H₂O₂ como se mencionó en la introducción. Es por esto que la fluorescencia intrínseca de proteínas representa una aproximación interesante para estudiar propiedades biofísicas de proteínas, como la oligomerización, sin la necesidad de tener que marcar la proteína con fluoróforos sintéticos.

Entre las técnicas de fluorescencia intrínseca de proteínas disponibles para estudiar asociaciones proteicas, la fluorescencia resuelta en el tiempo ha sido la menos explorada. Una de las razones es la naturaleza compleja del decaimiento de la emisión del Trp, que incluso libre en solución exhibe más de un τ debido a sus distintos modos de relajación¹⁸⁶. En consecuencia, su τ no puede ajustarse a un solo término exponencial, incluso en proteínas que poseen un único Trp^{184,187–189}. A esto se le suma la naturaleza dinámica de las proteínas, que exploran distintos estados conformacionales en la superficie de energía potencial de su configuración nativa, donde la diversidad conformacional es sensada por el Trp, resultando en una distribución de valores de τ .

Existen dos formas de medir τ : realizando medidas en dependencia (o dominio) del tiempo o de la frecuencia. Las primeras medidas consisten en irradiar la muestra con un pulso breve de luz y

registrar la intensidad de la emisión en función del tiempo, obteniéndose un perfil de decaimiento exponencial (**Figura 2.1A**). Si el perfil es monoexponencial y si τ es largo comparado con la duración del pulso de excitación, el valor de τ puede determinarse directamente del ajuste de la curva.

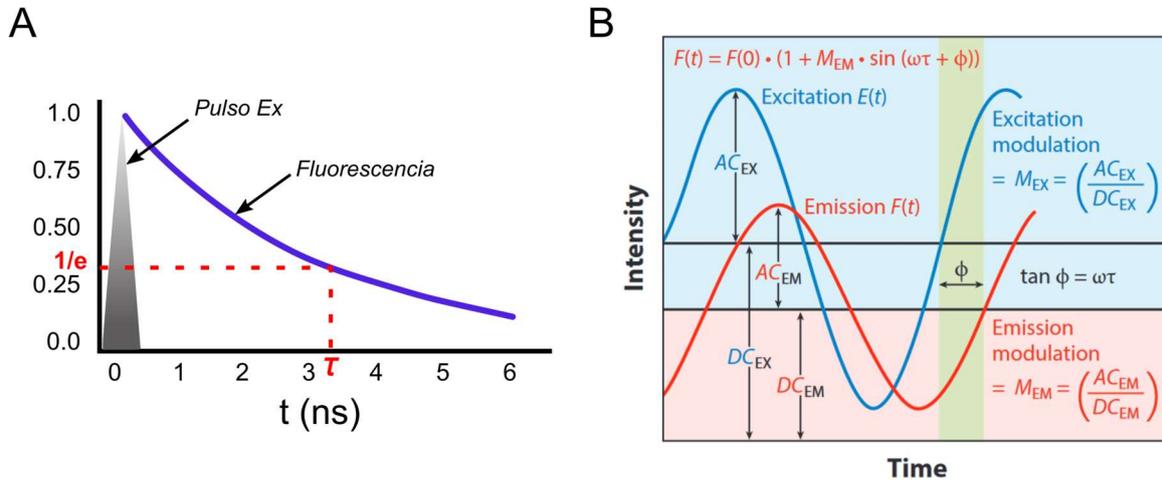


Figura 2.1. Métodos para medir τ . **A.** Medidas en el dominio del tiempo. El triángulo gris representa el pulso de excitación (Ex). **B.** Medidas en el dominio de frecuencia. $E(t)$ y $F(t)$ son la excitación y la emisión moduladas en el tiempo, $F(0)$ es la intensidad a tiempo 0. AC es la amplitud que alterna en la onda (hacia arriba y abajo en los nodos) y DC es el valor promedio de la señal a lo largo del tiempo. Extraído de Malacrida et al¹⁹⁰.

En las medidas en el dominio de frecuencia, se utiliza una fuente de luz continua (como un láser o un LED) cuya intensidad se modula de forma sinusoidal a alta frecuencia para irradiar la muestra. Los fluoróforos irradiados de esta forma persisten en el estado excitado, dando lugar a una emisión modulada que va a estar desfasada con respecto a la luz de excitación (**Figura 2.1B**). En estas medidas se puede determinar al valor de τ a partir del desfase de la siguiente forma:

$$\tan \varphi = \omega \tau \quad \text{Ec. 2.3}$$

donde ω es la frecuencia angular de la modulación de luz y φ el desfase. Además, la relación entre las amplitudes de ambas ondas (modulación relativa, M , **Ec. 2.4**) también presenta relación con τ (**Ec. 2.5**):

$$M = \frac{M_{EM}}{M_{EX}} = \frac{AC_{EM}/DC_{EM}}{AC_{EX}/DC_{EX}} \quad \text{Ec. 2.4}$$

$$M = \frac{1}{\sqrt{1+(\omega\tau)^2}} \quad \text{Ec. 2.5}$$

Entonces, usando la **Ec. 2.3** se puede determinar un τ de la fase (τ_φ), definido por el arco tangente de φ , mientras que con la **Ec. 2.5** se puede obtener un τ de la modulación relativa (τ_M), calculado a partir del cambio relativo en la modulación de la señal de emisión de fluorescencia (M_{EM}) con respecto a la de excitación (M_{EX}). Ambos valores son idénticos cuando se trata de un fluoróforo con decaimiento monoexponencial, pero difieren entre sí para multiexponenciales¹⁹⁰.

En el año 1981, uno de los creadores de las bases del estudio de la bioquímica mediante la fluorescencia, Gregorio Weber, introdujo una nueva metodología para analizar τ en sistemas de múltiples componentes¹⁹¹. En su trabajo, Weber desarrolló el análisis de fasores (vectores de fase) para determinar valores de τ y contribuciones relativas a la intensidad de fluorescencia de los distintos componentes de un sistema heterogéneo a distintas frecuencias. En este trabajo, se definieron las ecuaciones para determinar la parte real, G , y la parte imaginaria, S , de la transformada de Fourier de las medidas en el dominio de frecuencia:

$$G = M \cos \varphi \quad \text{Ec. 2.6}$$

$$S = M \sin \varphi \quad \text{Ec. 2.7}$$

donde M es la modulación relativa y φ el desfase. Los valores de G y S representan coordenadas en un plano complejo (componente real e imaginario), de manera análoga a lo que serían x e y en coordenadas cartesianas. Con G y S se construye el gráfico de fasores (**Figura 2.2**), que es un nuevo espacio de análisis, donde el álgebra de vectores es utilizada para entender y explicar los detalles del sistema a estudiar.

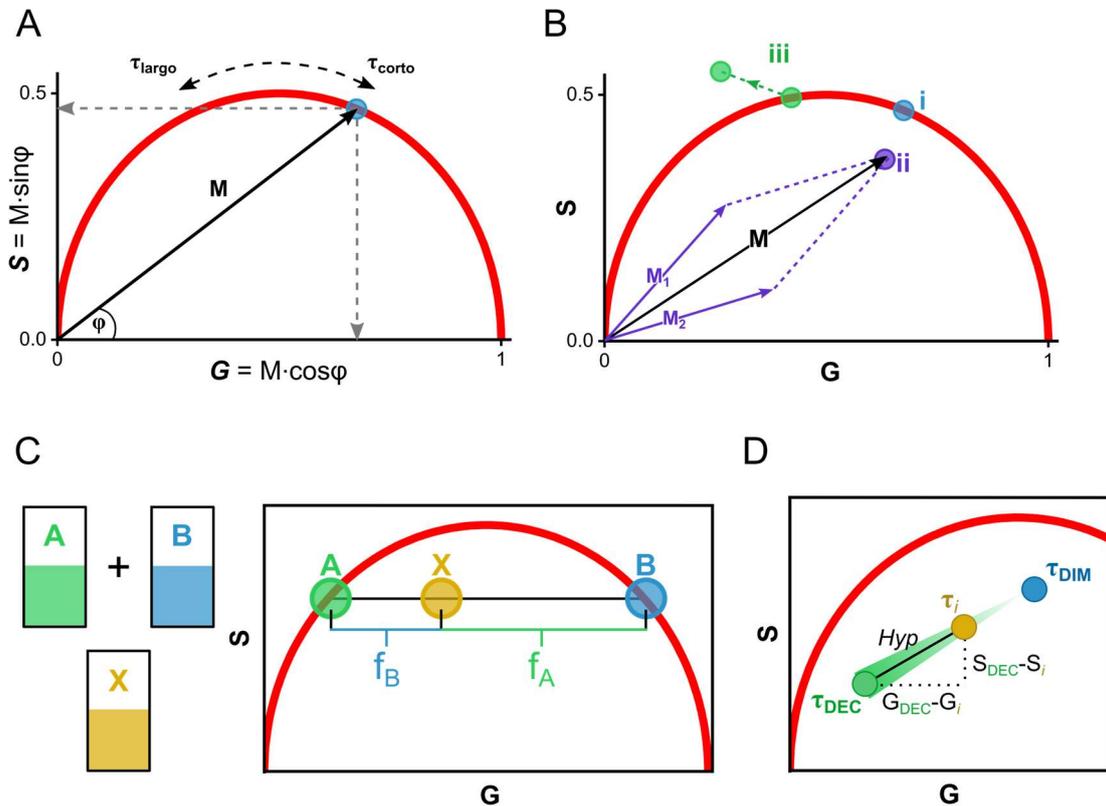


Figura 2.2. Gráfico de fasores para datos de τ . **A.** Gráfico de fasores para un decaimiento monoexponencial. Se representa el vector M que corresponde a los valores de G y S para un decaimiento monoexponencial (punto celeste), que se ubica sobre el semicírculo universal (línea roja). **B.** Escenarios posibles para un fasor: sobre, dentro o fuera del semicírculo universal (i, ii, iii, respectivamente). En ii, el fasor M que corresponde a un decaimiento multiexponencial, resulta de la suma de sus componentes M_1 y M_2 . **C.** Ley de adición de fasores y cálculo de la fracción de los fluoróforos (A y B) en una mezcla de ambos (X). **D.** Esquema del cálculo de la distancia entre puntos de fasores para el equilibrio decámero-dímero. El triángulo verde representa la cantidad de DEC a lo largo del segmento DEC-DIM.

Un componente clave del espacio de fasores, es el semicírculo universal, definido por David M. Jameson et al¹⁹². Este semicírculo representa la ubicación de cualquier decaimiento monoexponencial independientemente de τ y la frecuencia de luz modulada y está basado en la representación geométrica de un vector (fasor) de módulo M , que nace en el origen y tiene un ángulo φ con respecto al eje G (**Figura 2.2A**). El punto final de este vector (G, S) está restringido al semicírculo universal de radio 0.5, centrado en (0.5, 0.0). En el semicírculo, los valores de τ van de menor a mayor de forma antihoraria, desde (1, 0) a (0, 0).

El método de fasores tiene la ventaja de que no necesita adoptar un modelo a la hora de visualizar los resultados y tampoco hay necesidad de realizar un ajuste para obtener los datos (como en el caso de los ajustes a valores de τ discretos o a distribuciones). Un fasor puede encontrarse en 3 escenarios posibles dentro del gráfico: sobre, dentro o fuera del semicírculo universal (**Figura 2.2B**). El primer escenario corresponde a un fluoróforo con decaimiento monoexponencial y es el más simple de todos. En el segundo, el punto final del fasor queda dentro del semicírculo y sucede en el caso de una emisión heterogénea (multiexponencial), donde el fasor va a ser la suma de todos los componentes del sistema multiexponencial según las siguientes ecuaciones:

$$G = \sum f_i M_i \cos \varphi_i \quad \text{Ec. 2.8}$$

$$S = \sum f_i M_i \sin \varphi_i \quad \text{Ec. 2.9}$$

donde f_i es la contribución fraccional a la intensidad total de fluorescencia del componente i . Dicho de otra forma, el fasor M es la combinación lineal de cada uno de sus componentes (**ii**, **Figura 2.2B**). Esta es una de las propiedades más interesantes de este tipo de análisis, ya que toda la complejidad del τ de una muestra queda resumida en un fasor. Este escenario es el que esperamos tener siempre que trabajamos con proteínas y el hecho de poder independizarse de la complejidad de τ (salteándonos el ajuste) permite experimentalmente seguir distintos procesos simplemente observando el cambio en la posición del fasor. Otra característica notable que surge de las ecuaciones **2.8** y **2.9**, es que el análisis de fasores permite calcular la concentración relativa de una mezcla de distintos componentes (**Figura 2.2C**). A esto también se la llama “ley de adición de fasores”, que sostiene que las contribuciones relativas de dos o más fasores a un punto entre ellos (mezcla) es inversamente proporcional a las distancias entre el punto intermedio y los puntos de los fasores correspondientes. En otras palabras, sabiendo las posiciones individuales de un fluoróforo A y otro B, podemos calcular la fracción molar de cada uno en su mezcla. Para este cálculo es importante tener en cuenta los rendimientos cuánticos y ϵ . En el caso más simple, tenemos una mezcla de fluoróforos A y B, cuyo fasor (X) está ubicado en algún lugar dentro de la línea que conecta A con B. La distancia entre X y A o B, va a ser inversamente proporcional a la cantidad de A o B en la mezcla.

En el último escenario, el fasor queda por fuera del semicírculo universal, lo que corresponde a situaciones donde hay un retraso en la emisión debido a reacciones en el estado excitado (**iii**, **Figura 2.2B**). Algunos ejemplos incluyen relajación dipolar, emisión del aceptor durante el proceso de FRET y formación de excímeros¹⁹⁰.

Cálculo de la fracción de decámero

Para calcular F_{DEC} de Prx planteamos que el decámero y el dímero son especies fluorescentes distintas, con τ característicos (multiexponenciales ambos) y las principales responsables de la intensidad de fluorescencia. Al considerar los fasores del decámero y el dímero de la misma forma que A y B (**Figura 2.2D**) donde todos los puntos que se ubican sobre la recta que los conecta son distintas fracciones de ambas formas oligoméricas, podemos calcular F_{DEC} :

$$F_{DEC} = 1 - \frac{\sqrt{(G_{DEC}-G_i)^2+(S_{DEC}-S_i)^2}}{\sqrt{(G_{DEC}-G_{DIM})^2+(S_{DEC}-S_{DIM})^2}} \quad \text{Ec. 2.10}$$

donde (G_{DEC}, S_{DEC}) corresponde al faser de la concentración más alta de Prx que representa exclusivamente el decámero ($F_{DEC} = 1$), (G_{DIM}, S_{DIM}) es el punto que define el extremo del segmento de línea que representa exclusivamente al dímero ($F_{DEC} = 0$), y (G_i, S_i) representa los fasores de la mezcla entre ambos. Las distancias entre los puntos se calcularon restando las coordenadas de los extremos de una hipotenusa y aplicando el teorema de Pitágoras (**Figura 2.2D**). Al estar siempre calculando la distancia con respecto al punto del decámero, es necesario restarle el valor del cociente a 1 debido a la proporcionalidad inversa entre la distancia y la fracción molar.

Medidas de τ

Las mediciones de τ se realizaron en el dominio de frecuencia con el espectrofluorómetro ISS ChronosFD. La fuente de luz fue un LED de 284 nm, modulado por sintetizadores de frecuencia en un rango de 10 a 200 MHz¹⁹³. Se utilizó un filtro de paso de banda de 280 nm en el camino de excitación. La emisión de fluorescencia se registró a través de un filtro de paso largo WG320 (320 nm). Se utilizó N-acetil-L-triptofanamida (NATA) como referencia ($\tau = 2.8$ ns a 25 °C), cuyos valores de Abs 280nm estuvieron entre 0.15 y 0.18. A una frecuencia de 10 MHz, las intensidades de la muestra y la referencia se igualaron utilizando filtros de densidad neutra en la trayectoria de excitación y/o emisión. Es importante que a esta frecuencia las intensidades estuvieran entre 2000 y 3000 cuentas, para que el detector no se sature a 200 MHz. Es importante aclarar que el equipo mide referencia y muestra a cada frecuencia, girando la posición del portacubetas. Las mediciones se realizaron en PBS y se suplementó con 1 mM de DTT en los casos donde se quiso mantener la proteína reducida. Dado que la reducción de Prx con DTT es lenta, las muestras se prepararon fuera de la cubeta y se dejaron a temperatura ambiente durante 25 min. Además, cada muestra fue incubada durante 5 min dentro del portacubetas termostatzado antes de la medición. El tiempo de registro de las medidas fue de 3 s.

Las mediciones absolutas de τ se realizaron con polarizadores de excitación colocados verticalmente y los de emisión en el "ángulo mágico" (54.7°). El ajuste de los datos a distintos tiempos de decaimiento, se realizó con el software del equipo (Vinci).

Para las medidas de cinética se le indicó al equipo que realizara una medida continua de la muestra durante el tiempo deseado a una frecuencia elegida en el rango mencionado anteriormente. En el momento en el que el equipo dejó de medir la referencia (es lo primero que hace) y antes de que cambiara a la posición de la cubeta con la muestra, se puso en pausa la

medida, se agregó el reactivo, se mezcló rápidamente y se reanudó la medida. Para reacciones más lentas, se configuró el equipo para que haga distintas iteraciones en el lapso de tiempo que se quiso medir. En esta configuración, el equipo mide la referencia y la muestra en cada iteración.

Análisis de fasores espectrales

Al igual que para los datos de τ , también es posible realizar la transformada de Fourier de los espectros de emisión y analizarlos por el método de fasores utilizando las mismas reglas. Para obtener los valores de G y S de un espectro de emisión se utilizan las siguientes ecuaciones:

$$G = \frac{\sum_i IF_i \cos \frac{2\pi n(\lambda_i - \lambda_0)}{L}}{\sum_i IF_i} \quad \text{Ec. 2.11}$$

$$S = \frac{\sum_i IF_i \sin \frac{2\pi (\lambda_i - \lambda_0)}{L}}{\sum_i IF_i} \quad \text{Ec. 2.12}$$

donde λ_0 es el valor de la menor longitud de onda del espectro, L es el largo del espectro y n es el valor del armónico; en este caso se usó el primer armónico por lo que $n = 1$. El gráfico de fasores espectrales tiene forma de círculo (por el término $2\pi n$) centrado en el origen y de radio 0.5 (**Figura 2.3**). Los fasores continúan saliendo del origen de coordenadas, pero a diferencia de τ , no existe el semicírculo universal. Cada fador va a tener su respectiva fase (φ) y módulo (M):

$$\varphi = \tan^{-1} \left(\frac{S}{G} \right) \quad \text{Ec. 2.13}$$

$$M = \sqrt{S^2 + G^2} \quad \text{Ec. 2.14}$$

La posición angular del fador se relaciona con el centro de masa del espectro de emisión, de forma tal que un aumento en la fase implica el movimiento del espectro hacia el rojo (**Figura 2.3**). El módulo del fador, se relaciona con el ancho del espectro a la mitad de su máximo, cuanto menor sea el módulo más ancho será el espectro de emisión.

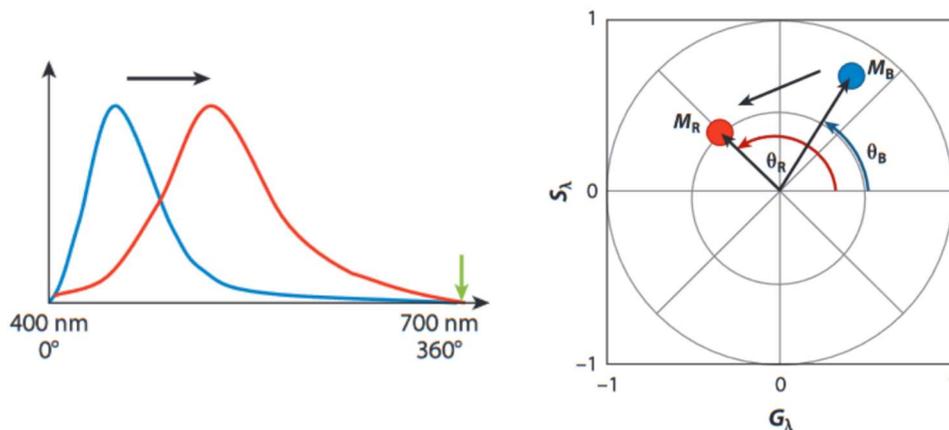


Figura 2.3. Fasores espectrales. A la izquierda se muestran dos espectros de emisión y se señala con la flecha negra el cambio de uno respecto al otro. La flecha verde indica hasta donde se toma el espectro para realizar la transformada de fasores (Ec. 2.11, 2.12). A la derecha se muestra el gráfico de fasores espectrales de los espectros de la izquierda, la misma flecha negra indica la dirección del cambio (de M_B a M_R). El aumento de la fase en M_R indica el corrimiento hacia el rojo y la disminución en el largo del fador (módulo) el ensanchamiento del espectro. Extraído de Malacrida et al¹⁹⁰

Cinética de oxidación con H₂O₂

La reacción de oxidación de *HsPrx1* y *HsPrx2* con H₂O₂ se siguió mediante el cambio en la emisión de fluorescencia en un equipo de flujo detenido (stopped-flow, Applied Photophysics SX20) a una λ_{exc} de 280 nm y con filtros de emisión de pase de luz a partir de 320 nm (LP320) o de pase de banda de 360 nm (U360). En los experimentos de dependencia de la velocidad con el NaCl se utilizó amortiguador TMA con una concentración inicial de NaCl de 0.05 y 0.03 M NaCl para *HsPrx1* y *HsPrx2* respectivamente. En los experimentos con urea, se utilizó el amortiguador de almacenamiento y concentraciones de 4 y 0.25 μM de *HsPrx1* y *HsPrx2*. En una de las dos jeringas del equipo se colocaron los reactivos reducidos (Prx) y en la otra el H₂O₂ en amortiguador correspondiente y con la concentración deseada de NaCl o urea en ambas jeringas. Para cebar el sistema de ductos que conducen a la celda de medición/mezclado se realizaron 5 disparos y se realizaron de 10 a 15 repeticiones por corrida (réplicas técnicas).

Modelos de ajuste de datos

Disociación concertada

La disociación del decámero de Prx a 5 dímeros puede ser descrita por la siguiente ecuación de equilibrio:



$$K_D = \frac{[\text{dímero}]^5}{[\text{decámero}]} \quad \text{Ec. 2.16}$$

Donde K_D es la constante de disociación. También podemos escribir F_{DEC} en función de la concentración del dímero de Prx de la siguiente forma:

$$F_{\text{DEC}} = \frac{5[\text{decámero}]}{5[\text{decámero}] + [\text{dímero}]} \quad \text{Ec. 2.17}$$

A partir del equilibrio de disociación (**Ec. 2.16**) podemos definir a la concentración del decámero en función de la del dímero:

$$[\text{decámero}] = \frac{[\text{dímero}]^5}{K_D} \quad \text{Ec. 2.18}$$

Si sustituimos la concentración del decámero de la **Ec. 2.18** en la **Ec. 2.17** y aplicamos álgebra simple, podemos obtener la siguiente ecuación para calcular F_{DEC} en función de la concentración del dímero y K_D :

$$F_{\text{DEC}} = \frac{[\text{dímero}]^4}{[\text{dímero}]^4 + \frac{1}{5}K_D} \quad \text{Ec. 2.19}$$

No obstante, debido a que la K_D de este equilibrio tiene unidades de M^4 , planteamos que reportar un valor de $C_{0.5}$ sería más útil. Este valor remite a una concentración de Prx donde los monómeros están equitativamente distribuidos entre dímeros y decámeros.

Este valor se puede despejar de la **Ec. 2.19** dada la relación entre dímeros y decámeros:

$$C_{0.5} = \sqrt[4]{\frac{K_D}{5}} \quad \text{Ec. 2.20}$$

Este es el modelo más simple esperado para este proceso de disociación, ya que no contempla la existencia de especies intermedias entre decámeros y dímeros, ni las posibles distintas velocidades de asociación y disociación en cada paso.

Modelo tipo Hill

El modelo anterior fue muy útil para ajustar los datos de fasores *HsPrx1* reducida. Para las versiones oxidadas a disulfuro de las proteínas y para *HsPrx2* reducida este no funcionó. Por eso tuvimos que utilizar otro modelo que nos permitiera obtener un valor similar al $C_{0.5}$ para poder comparar entre las distintas condiciones de forma simple, sin adentrarnos en la complejidad de determinar constantes de asociación/disociación microscópicas para los pasos individuales del equilibrio de oligomerización. En esos casos ajustamos las curvas de F_{DEC} vs concentración de Prx ([Prx]) con la siguiente ecuación tipo Hill:

$$y = Amp * \frac{[x]^n}{K_{0.5}^n + [x]^n} \quad \text{Ec. 2.21}$$

donde y es F_{DEC} , x es [Prx], Amp es la amplitud de la curva en el eje de las ordenadas, $K_{0.5}$ (equivalente a $C_{0.5}$) es el centro de la sigmoide y n es la pendiente de la curva (cooperatividad).

Ajustes exponenciales

Los cursos temporales de la cinética de reducción de Prx con DTT seguida por fasores fueron ajustados a una función monoexponencial con la siguiente forma:

$$y = A_i e^{(-k_{Obs} * x)} + C \quad \text{Ec. 2.22}$$

donde y es la fracción de Prx reducida, A_i es el valor inicial en y , x es el tiempo, C es la fracción de Prx reducida al final de la reacción y k_{Obs} es la constante cinética observada de primer orden.

Para el ajuste de la cinética preestacionaria de oxidación de Prx en stopped-flow, se realizó un ajuste biexponencial según la siguiente expresión:

$$y = A_1 e^{(-k_{Obs1} * x)} + A_2 e^{(-k_{Obs2} * x)} + C \quad \text{Ec. 2.23}$$

donde y es la emisión de fluorescencia, x es el tiempo, A_1 y k_{Obs1} , A_2 y k_{Obs2} son las amplitudes y constantes de velocidad de cada exponencial y C es el valor de emisión al final de la reacción.

2.2. Resultados y discusión

La primera parte de los resultados (2.2.1. a 2.2.4.) consiste en el desarrollo de la metodología de fasores en conjunto con SEC para estudiar la oligomerización de Prx. Este trabajo se centró en *HsPrx1* en su forma reducida y culminó en la publicación del método en el artículo: "Fluorescence Lifetime Phasor Analysis of the Decamer-Dimer Equilibrium of Human Peroxiredoxin 1"¹⁹⁴. El resto de los resultados aún no han sido publicados.

2.2.1. Dependencia de las propiedades de fluorescencia de *HsPrx1* con la concentración

Una de las formas de estudiar asociación y disociación de proteínas es seguir el proceso variando la concentración. En el caso de Prx, suponemos que a concentraciones altas observaremos principalmente decámeros y que a medida que diluimos la muestra comenzaremos a notar su disminución y un aumento en la cantidad de dímeros. En primer lugar, estudiamos las propiedades de fluorescencia de *HsPrx1* para determinar cuál de ellas era más sensible a los cambios en la concentración de la proteína.

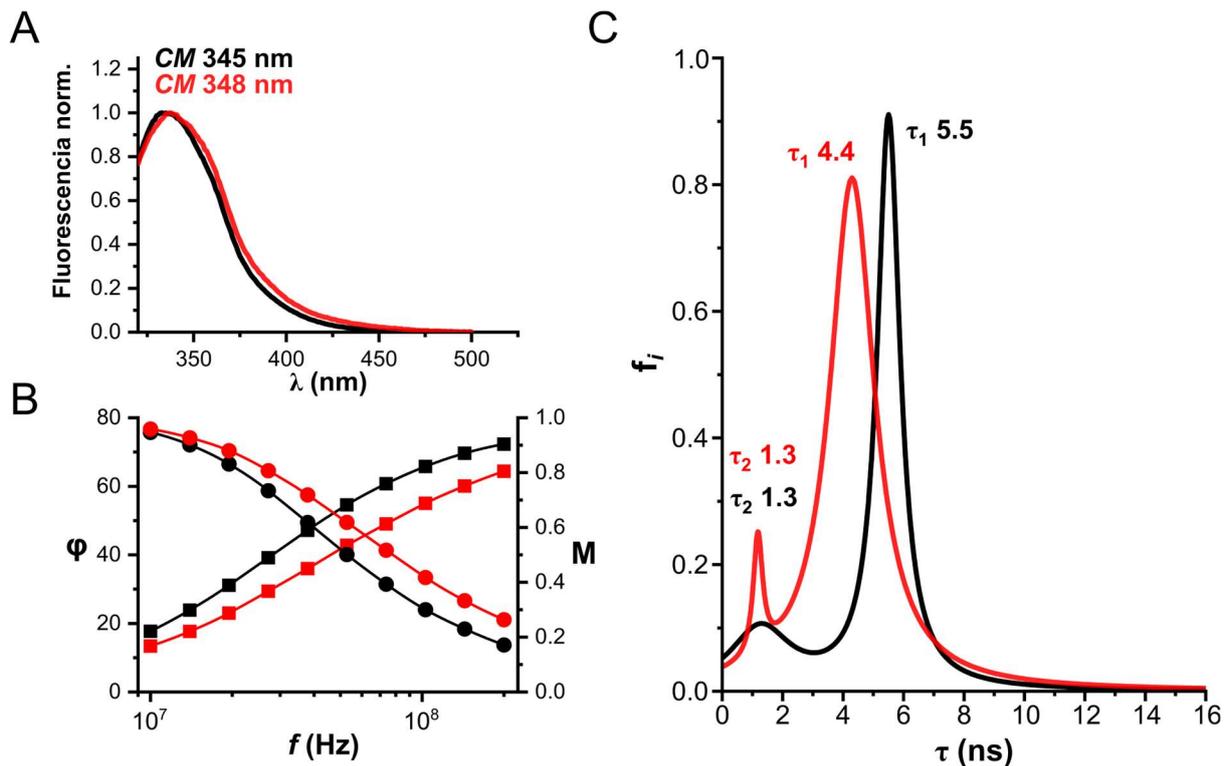


Figura 2.4. Las propiedades de fluorescencia de *HsPrx1* dependen de su concentración. Los trazos negros y rojos corresponden a 20 μM y 0.5 μM respectivamente. **A.** Espectros de emisión con λ_{ex} 280 nm; arriba de los espectros se indican los valores del centro de masa (CM). **B.** Gráfico de fase (cuadrados) y modulación (círculos) obtenido a partir de mediciones de τ en el dominio de frecuencia a diferentes frecuencias de modulación de la luz. **C.** Distribuciones de Lorentz obtenidas del ajuste de τ .

Los espectros de emisión de fluorescencia y τ de *HsPrx1* se midieron a 20 μM y 0.5 μM (Figura 2.4). A partir de los espectros de emisión normalizados y sus centros de masa, podemos observar

una diferencia entre las dos concentraciones analizadas: un desplazamiento hacia el rojo de 3 nm en la emisión a 0.5 μM en comparación con 20 μM (**Figura 2.4A**). Este desplazamiento hacia el rojo puede estar preliminarmente relacionado con un cambio en el entorno de los residuos de triptófano como resultado de la disociación de decámeros a dímeros.

Las determinaciones de τ en el dominio de frecuencia (**Figura 2.4B**) resultaron en la presencia de dos componentes (τ_1 y τ_2), después de ajustar los resultados a una distribución de Lorentz (**Figura 2.4C**). Este modelo de ajuste fue elegido debido a su bajo valor de χ^2 (~ 0.46) en comparación con otros modelos (discreto ~ 2.53 y Gaussiano ~ 1.1). Se observó una disminución en el valor del componente principal τ_1 de 5.5 a 4.4 ns y en la contribución a la intensidad de fluorescencia (f_i) al diluir la proteína, mientras que el segundo componente (τ_2) permaneció igual (**Figura 2.4C**), sin embargo, aumentó su f_i . Además, la forma de las distribuciones fue diferente en cada caso ya que se observó un cambio en sus anchos, que se relaciona con la movilidad conformacional alrededor del fluoróforo (W87 y 177)^{185,188}. En el caso de 0.5 μM , la distribución de τ_1 se ensanchó mientras que la de τ_2 se volvió más fina con respecto a 20 μM . La forma más intuitiva de relacionar anchos de distribuciones de τ con la dinámica conformacional de proteínas, es suponer que el aumento en el ancho se relaciona con un aumento en las conformaciones accesibles. No obstante, también se puede plantear lo opuesto para situaciones donde hay un aumento en la libertad conformacional (desnaturalización), donde se puede argumentar que el incremento en las conformaciones accesibles lleva a una disminución del ancho de la distribución¹⁸⁵. En este caso podríamos decir que, si cada distribución representa la dinámica de dos regiones distintas de *HsPrx1* (debido a que W87 y W177 están alejados espacialmente), las mismas cambian de forma opuesta al diluir la proteína. En suma, es claro que hay un cambio en el τ al diluir la proteína que parece ser más pronunciado que el observado en los espectros de emisión.

2.2.2. Estudio de la disociación de *HsPrx1* por el análisis de τ mediante fasores

Como suele ocurrir en proteínas, el decaimiento de la fluorescencia intrínseca de *HsPrx1* es complejo y, aunque se observó una diferencia significativa en los τ de Trp en las dos concentraciones analizadas, el ajuste no proporciona una manera fácil de estudiar asociaciones proteicas. Incluso, la interpretación de la forma de las distribuciones es extremadamente difícil y hasta puede llegar a ser contraintuitiva, como quedó en evidencia en lo discutido. En cambio, el enfoque de fasores tiene la ventaja de que compila toda la complejidad de τ en un solo punto y simplifica el análisis, a la vez que permite realizar cuantificaciones¹⁹⁵. Es por eso que usamos el método de fasores para estudiar cuantitativamente el equilibrio decámero-dímero de *HsPrx1*.

El valor de τ fue claramente sensible a los cambios en la concentración de *HsPrx1*, por lo que el equilibrio oligomérico fue más fácil de abordar utilizando fasores (**Figura 2.5**). Diferentes concentraciones de proteína provocaron cambios en la vida media y en los puntos de fasores. Se realizó un barrido logarítmico de frecuencias en un rango de 10 a 200 MHz para todas las concentraciones de proteína, con el fin de encontrar una frecuencia en la que los puntos se

distribuyeran de manera óptima a lo largo de una recta (**Figura 2.5A**). Elegimos 103 MHz como la frecuencia que mejor cumplió con nuestro criterio y utilizamos estos datos para el análisis.

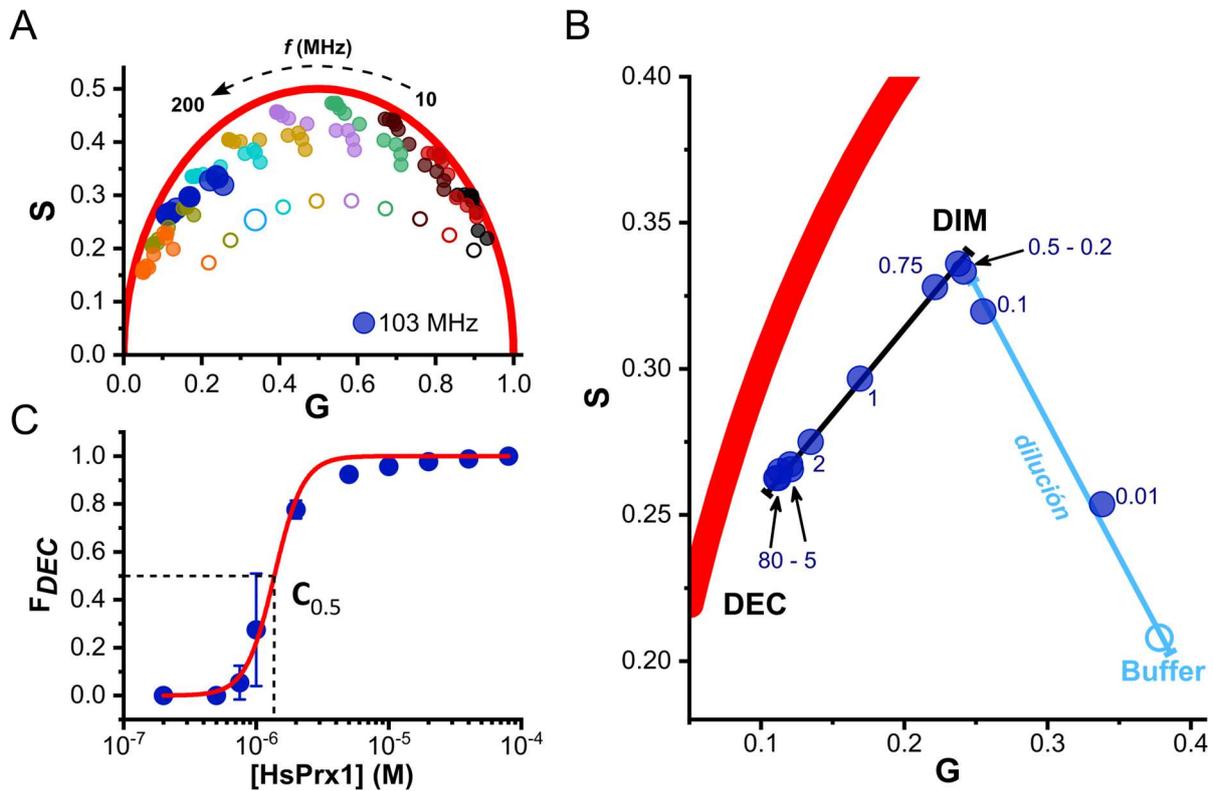


Figura 2.5. Disociación de *HsPrx1* seguida por fasores. **A.** Se realizaron medidas de τ en el dominio de frecuencia (10–200 MHz) a diferentes concentraciones de *HsPrx1* (80-0.01 μM) y se convirtieron en puntos de fasores. Los colores representan diferentes frecuencias y la multiplicidad de puntos representa las distintas concentraciones de proteína. Los puntos vacíos corresponden a los fasores de la señal del amortiguador. **B.** Fasores obtenidos a 103 MHz. La línea negra conecta los puntos obtenidos a altas (80 μM) y bajas (0.2 μM) concentraciones de *HsPrx1*. La dilución de *HsPrx1* llevó a la pérdida de señal y al desplazamiento de los fasores hacia la fluorescencia del buffer (línea y punto celeste). Los números indican la concentración (μM) en cada punto. **C.** Ajuste de los datos a un modelo de disociación de decámero a dímero. La fracción de decámero (F_{DEC}) se calculó a partir de las coordenadas de los fasores utilizando la Ec. 2.10 y se graficó contra la concentración de proteína; luego se ajustó al modelo de la Ec. 2.19. Los datos se representan como el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

La **Figura 2.5** muestra los datos obtenidos y describe, paso a paso, cómo se construye la curva de disociación utilizando el análisis de fasores. La línea negra en la **Figura 2.5B** representa la trayectoria de oligomerización, desde decámeros (extremo izquierdo) hasta dímeros (extremo derecho) a altas y bajas concentraciones de *HsPrx1*, respectivamente. La acumulación de puntos en ambos extremos de la trayectoria nos ayudó a definir regiones específicas para cada especie oligomérica. Detectamos que desde 80 hasta 5 μM los puntos de fasores estaban muy cercanos entre sí, por lo tanto, definimos 80 μM como el punto de inicio que representa exclusivamente al decámero de *HsPrx1*. En el extremo opuesto, los puntos de fasores de 0.5 a 0.2 μM demostraron el mismo comportamiento, y definimos 0.2 μM como el punto final, que representa exclusivamente al dímero. La línea recta que conecta los puntos de fasores sugiere que la presencia de oligómeros intermedios es escasa, debido a que serían nuevas especies fluorescente que quedarían fuera de la recta¹⁹⁶. Este comportamiento, refleja una interconversión rápida entre

decámeros y dímeros, o, que los intermediarios no son lo suficientemente estables para ser detectados.

Habiendo definido la trayectoria de disociación, calculamos F_{DEC} para todas las concentraciones analizadas entre 80 μM y 0.2 μM de *HsPrx1* utilizando la **Ec. 2.10**. Al graficar F_{DEC} contra la concentración de *HsPrx1*, construimos la curva de disociación (**Figura 2.5C**) y realizamos el ajuste a nuestro modelo (**Ec. 2.19**). A partir del ajuste, obtuvimos una K_D de $(1.1 \pm 0.2) \times 10^{-24} \text{ M}^4$ ($R^2 = 0.99$) y con la **Ec. 2.20** calculamos un valor de $C_{0.5}$ de $1.36 \pm 0.24 \mu\text{M}$.

También observamos la presencia de una segunda trayectoria en el gráfico de fasores que consistió en el desplazamiento de los puntos de baja concentración desde la zona del dímero hacia el faser del amortiguador (línea celeste, **Figura 2.5B**). Atribuimos este fenómeno a la dilución de nuestra muestra y no a ninguna otra transición oligomérica (de dímero a monómero), por lo que los puntos de fasores que cayeron en este nuevo segmento (0.1 y 0.01 μM) no se consideraron para la curva de disociación. A estas concentraciones de proteína, a medida que disminuye la fluorescencia la contribución relativa de la señal de fondo al total comienza a aumentar, desplazando los fasores desde la región del dímero hacia el buffer. Observamos el mismo comportamiento diluyendo el fluoróforo NATA (**Anexo 5.1.2**). Cabe destacar que esta situación se observa con frecuencia en estudios de FLIM en células^{190,195}, las cuales pueden presentar una señal basal significativa. Destacamos la importancia de poder identificar el proceso de dilución de la señal en estos experimentos donde diluimos la muestra, porque sabemos que como mínimo esperamos dos trayectorias: una correspondiente al cambio oligomérico y otra a la disminución de la señal. Otra cuestión, es que cuanto más cercano a 180° sea el ángulo entre las dos trayectorias, más difícil será saber dónde termina la de interés (disociación, etc), lo que puede llegar a dificultar el cálculo de la fracción del fluoróforo. Si bien es posible corregir la contribución de la señal de fondo, no logramos llegar a una expresión aritmética definitiva para hacerlo.

2.2.3. Estudio de la disociación de *HsPrx1* por fasores espectrales

A pesar de la pequeña diferencia observada en los espectros de emisión de *HsPrx1* a altas y bajas concentraciones (**Figura 2.4A**), intentamos extraer información sobre el equilibrio de oligomerización a partir de datos espectrales. Con este propósito, transformamos los espectros de las diferentes concentraciones de *HsPrx1* al espacio de fasores espectrales (**Ec. 2.11, 2.12**). A diferencia del *CM*, los fasores espectrales ofrecen una manera simplificada y cuantitativa para analizar los datos de espectros de emisión, muy similar a lo realizado con los datos de τ . El análisis de los espectros de emisión mediante fasores espectrales nos permitió identificar decámeros y dímeros de *HsPrx1*, separados a lo largo de una recta, a distintas concentraciones (**Figura 2.6B, 2.6C**). Dado que nos encontramos en el espacio de fasores, utilizamos el mismo análisis que realizamos con los datos de τ (**Ec. 2.10**) y calculamos F_{DEC} para las diferentes concentraciones. A partir de la curva de disociación (**Figura 2.6D**), obtuvimos valores de K_D y $C_{0.5}$ de $(4.5 \pm 2.3) \times 10^{-24} \text{ M}^4$ ($R^2 = 0.89$) y $1.95 \pm 0.99 \mu\text{M}$, respectivamente. Aunque la similitud con el experimento de τ es alta, el rango dinámico para decámeros y dímeros es mucho más pequeño en los fasores espectrales y los puntos cercanos a la transición presentan un error mayor.

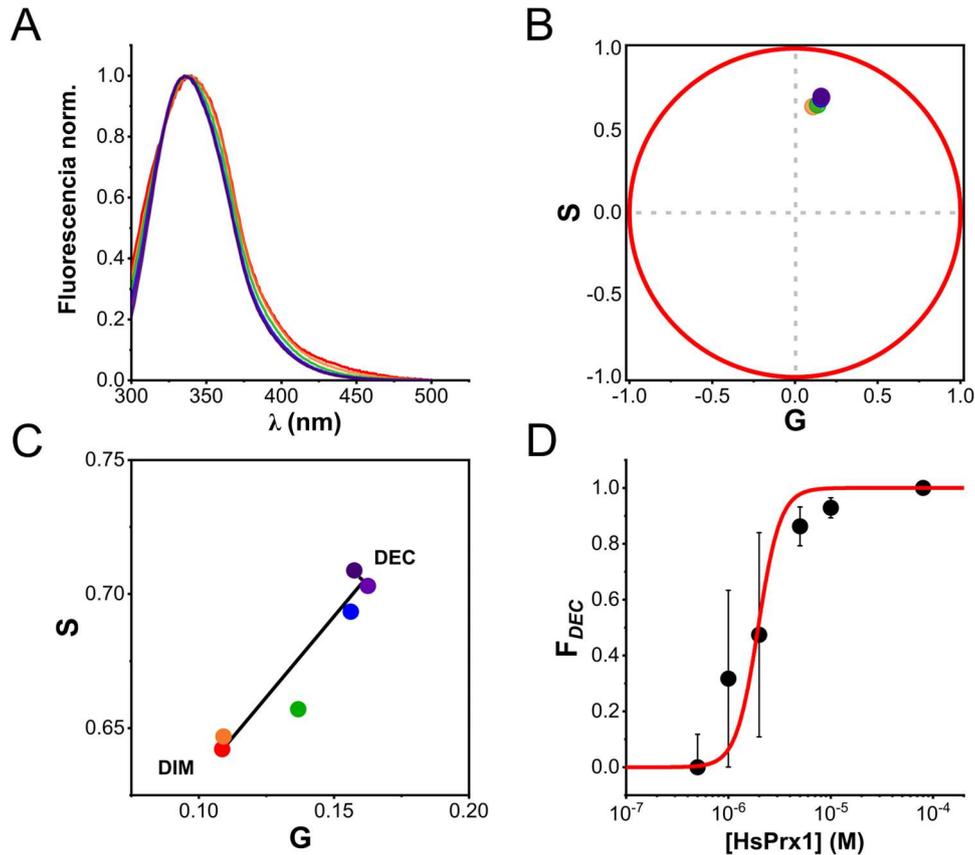


Figura 2.6. Disociación de *HsPrx1* seguida por fasores espectrales. **A.** Espectros de emisión de *HsPrx1* normalizados ($\lambda_{exc} = 280$ nm) a diferentes concentraciones (de rojo a violeta oscuro: 0.5, 1, 2, 5, 10 y 80 μM). **B.** Gráfico de fasores espectrales de los espectros de emisión en **A**. **C.** Fasores para cada espectro de emisión (ampliación de **B**). La transición de decámero a dímero se representa mediante la línea negra. **D.** Gráfico de F_{DEC} en función de la concentración de *HsPrx1* y ajuste al modelo de disociación (Ec. 2.19). Los datos se representan como el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

2.2.4. Validación de los resultados por SEC

Para validar los resultados obtenidos mediante fasores se utilizó la cromatografía de exclusión molecular (SEC). La SEC es un método clásico para estudiar la estructura cuaternaria de proteínas, donde las diferentes formas oligoméricas se separan en función de su radio hidrodinámico. Sin embargo, si la disociación es relativamente rápida y la concentración de proteína es baja, la proteína se diluye aun más durante la cromatografía y puede cambiar su estado oligomérico, ya que el equilibrio es alterado durante la corrida. Por lo tanto, SEC debe considerarse una aproximación que podría proporcionar una subestimación del $C_{0.5}$. Para minimizar la dilución en la medida de lo posible, se utilizó una columna pequeña (volumen muerto = 1.07 mL) y se inyectó 100 μL de proteína a la concentración deseada. Para mejorar la detección de pequeñas cantidades de proteína, la elución se siguió mediante fluorescencia, lo que permitió la detección de 0.3 pmoles de proteína (3 nM inyectados).

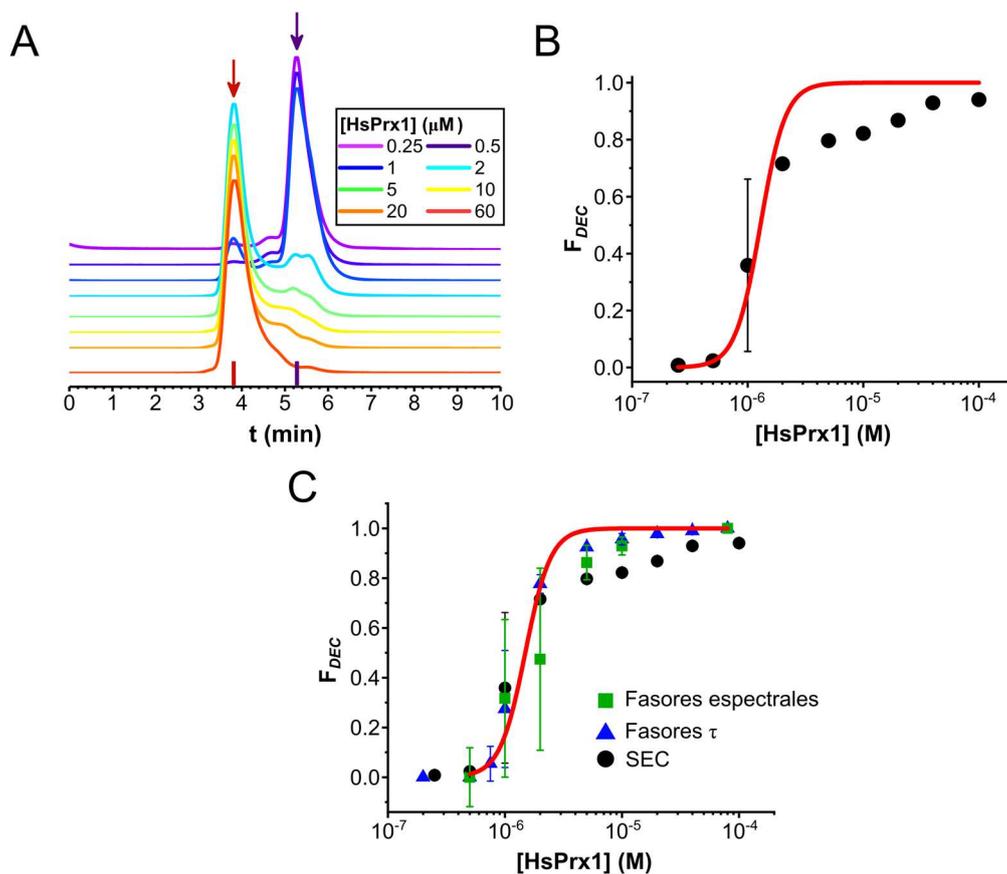


Figura 2.7. Disociación de *HsPrx1* estudiada por SEC. **A.** Cromatogramas obtenidos a diferentes concentraciones iniciales de *HsPrx1*, el decámero aparece a 3.8 min (flecha roja) y el dímero a 5.2 min (flecha violeta). **B.** Curva de disociación de F_{DEC} calculada a partir del área bajo la curva (Ec. 2.1) en función de la concentración de proteína. **C.** Comparación de las curvas de disociación obtenidas a partir de las tres técnicas. Los datos se representan como el promedio \pm desviación estándar de dos experimentos independientes (B).

A altas concentraciones de *HsPrx1*, apareció un pico a 3.8 min, correspondiente a una masa de 270 kDa, consistente con la masa esperada para el decámero (220 kDa), mientras que, a bajas concentraciones el pico principal se desplazó a 5.2 min correspondiente a una masa de 42 kDa, consistente con el dímero (44 kDa) (Figura 2.7A). La curva de disociación se construyó con los valores de F_{DEC} calculados a partir de las áreas de los picos (Ec. 2.1) en función de la concentración de *HsPrx1*. Los resultados de SEC mostraron un K_D de $(8.6 \pm 4.6) \times 10^{-25} M^4$ y un valor de $C_{0.5}$ de $1.28 \pm 0.68 \mu M$ (Figura 2.7B). Sin embargo, los datos de SEC no ajustaron muy bien al modelo ($R^2 = 0.89$), como se ve particularmente en concentraciones superiores a 2 μM . Este resultado podría explicarse por el hecho de que en SEC la concentración de proteína no es constante a lo largo de la corrida, por lo tanto, la dilución de la proteína durante la cromatografía favorece la disociación. A pesar de esto, los resultados de SEC validan la estimación inicial obtenida en los experimentos previos de fluorescencia, ya que demuestra de manera inequívoca que a 20 μM y 0.5 μM las especies predominantes son el decámero y el dímero, respectivamente. Además, estos datos respaldan la conclusión de que los cambios observados en las propiedades fluorescentes están relacionados con los cambios en la estructura cuaternaria.

2.2.5. Dinámica de oligomerización de *HsPrx1* y *HsPrx2* en estado reducido y oxidado

Usando el mismo enfoque, estudiamos el equilibrio oligomérico de *HsPrx2* en su estado ditiol y de *HsPrx1* y *HsPrx2* en su estado disulfuro. Por eso retomamos los resultados de fasores y SEC de *HsPrx1* reducida, pero, cambiamos el modelo de análisis (Ec. 2.21) para poder comparar entre todas las condiciones y entre proteínas. Como se vio en los resultados anteriores, la transición de dímeros a decámeros en *HsPrx1* es un proceso que ocurre en un rango estrecho de concentraciones (0.5 a 3 μM) y con una pendiente pronunciada ($n = 1.5$), lo que refleja un proceso altamente cooperativo (Figura 2.8B).

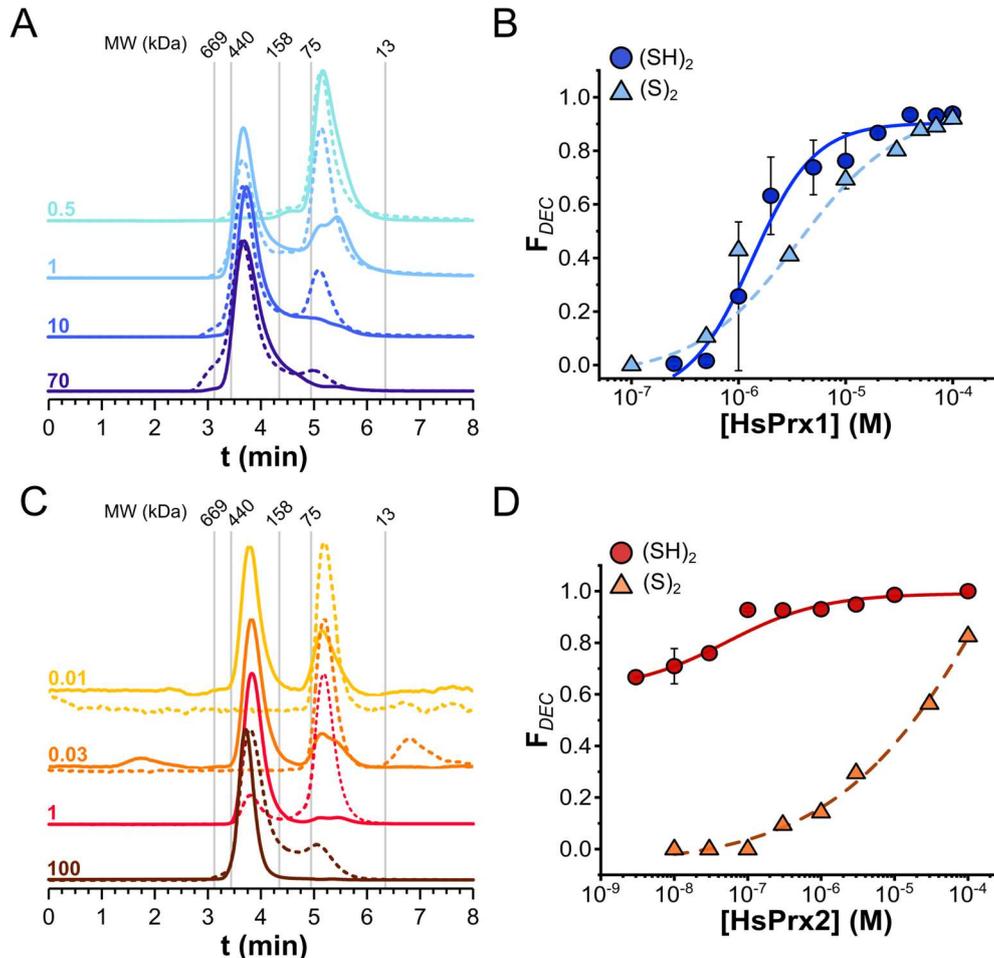


Figura 2.8. Disociación de *HsPrx1* y *HsPrx2* en sus formas ditiol y disulfuro (SEC). Cromatogramas de *HsPrx1* (A) o *HsPrx2* (C) en estado ditiol (línea continua) o disulfuro (línea discontinua) a diferentes concentraciones (μM). El decámero y el dímero eluyen a los 3.8 y 5.2 min, respectivamente. Las líneas verticales grises representan los tiempos de retención correspondientes a las proteínas utilizadas para calibrar la columna: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), aldolasa (158 kDa), conalbúmina (75 kDa) y ribonucleasa (13.7 kDa). Las curvas de disociación de *HsPrx1* y *HsPrx2* en estado ditiol y disulfuro (B y D) se graficaron como la fracción de decámero vs. la concentración de proteína. Las líneas representan los mejores ajustes a la Ec. 2.21.

HsPrx1 disulfuro, presenta una fracción de decámeros menor que *HsPrx1* reducida a las mismas concentraciones de proteína (Figura 2.8A) y la transición ocurre en un rango más amplio de concentraciones (Figura 2.8B). Esto resulta en un desplazamiento del $K_{0.5}$ (centro de la sigmoide) de 0.8 μM (para *HsPrx1* reducida) a 4.7 μM , así como en el valor de n , que pasa de 1.5 a 0.9,

indicando la pérdida de la cooperatividad del proceso de oligomerización cuando la enzima está completamente en su forma disulfuro.

Por otro lado, *HsPrx2* muestra un comportamiento completamente diferente. La proteína en estado ditiol eluye mayoritariamente como decámero a lo largo del rango de concentraciones analizado y el pico correspondiente al dímero comienza a aumentar solo a concentraciones por debajo de 0.2 μM (**Figura 2.8C**). La curva de disociación tiene un $K_{0.5}$ de 0.08 μM y describe un proceso no cooperativo ($n = 0.6$), donde la fracción de decámero disminuye solo un 30 % en un rango de concentración de 5 órdenes de magnitud (**Figura 2.8D**). Curiosamente, no observamos más cambios en la cantidad relativa de decámero por debajo de 0.01 μM . Sin embargo, en el estado disulfuro el equilibrio se desplaza hacia los dímeros, con un $K_{0.5}$ de 14.4 μM y un valor de n de 0.6. Como se muestra en los cromatogramas de la **Figura 2.8D**, el dímero es la especie predominante hasta concentraciones cercanas a 10 μM . El resumen de los valores se puede observar en la **Tabla 2.1**.

Para complementar estos resultados, empleamos la metodología de fasores con la finalidad de obtener resultados a concentraciones de proteína constante y con un grado mayor de detalle e información. En este caso, se obtuvieron resultados muy similares a los de SEC para *HsPrx1* reducida y oxidada, con $K_{0.5}$ de 1.38 y 7.82 μM , y $n = 3.5$ y 1.5, respectivamente (**Figura 2.9B**). Curiosamente, las trayectorias de los fasores de ambos estados se superponen y ocurren de manera similar de izquierda a derecha (de altas a bajas concentraciones), donde el área alrededor del final de la transición es similar para las formas reducida y oxidada (**Figura 2.9A**). No obstante, los decámeros oxidados y reducidos están bastante distantes, lo que hace que la transición sea mucho más corta para el estado disulfuro. A partir de los datos de SEC (**Figura 2.8D**), sabemos que *HsPrx2* reducida no se disocia completamente en dímeros, lo que significa que no se observarán fasores que representen exclusivamente esa forma oligomérica en estas condiciones experimentales.

A primera vista (**Figura 2.9C**), los fasores de *HsPrx2* en estado ditiol se acumulan a altas concentraciones de proteína en la región del decámero y luego comienzan a moverse hacia la derecha en una línea bastante recta que termina directamente en el amortiguador, lo que indica que la muestra simplemente se está diluyendo. Si observamos más de cerca, vemos que la trayectoria está compuesta por dos rectas: una que va de la región del decámero hasta el fador de 0.1 μM y otra que va desde el último hacia el amortiguador. Inicialmente pensamos que el fador de 0.1 μM podría corresponder al del dímero, sin embargo, los datos de SEC indican que también hay decámero a esas concentraciones. Para corroborar que esta primera trayectoria correspondiera a la disociación, añadimos un punto con 2 M de urea ya que se ha demostrado que esta concentración de desnaturizante conduce a la disociación del decámero¹⁰⁵. De hecho, este punto se alinea bien con el del decámero al inicio de la trayectoria, indicando así la dirección de la disociación y explicando por qué los fasores se mueven en esa dirección hasta cambiar de rumbo por la disminución de la señal.

A pesar de no poder calcular la fracción de decámeros para *HsPrx2* en estado ditiol, estos resultados muestran que esta isoforma se disocia hasta cierto punto y que la proporción decámero-dímero no parece cambiar por debajo de 0.1 μM . Para la forma disulfuro, se observa una transición mucho más corta (**Figura 2.9C**) y pudimos calcular la fracción del decámero obteniendo un $K_{0.5}$ de 12 μM y un $n = 1.5$ (**Figura 2.9D**). El resumen de los valores se puede observar en la **Tabla 2.1**.

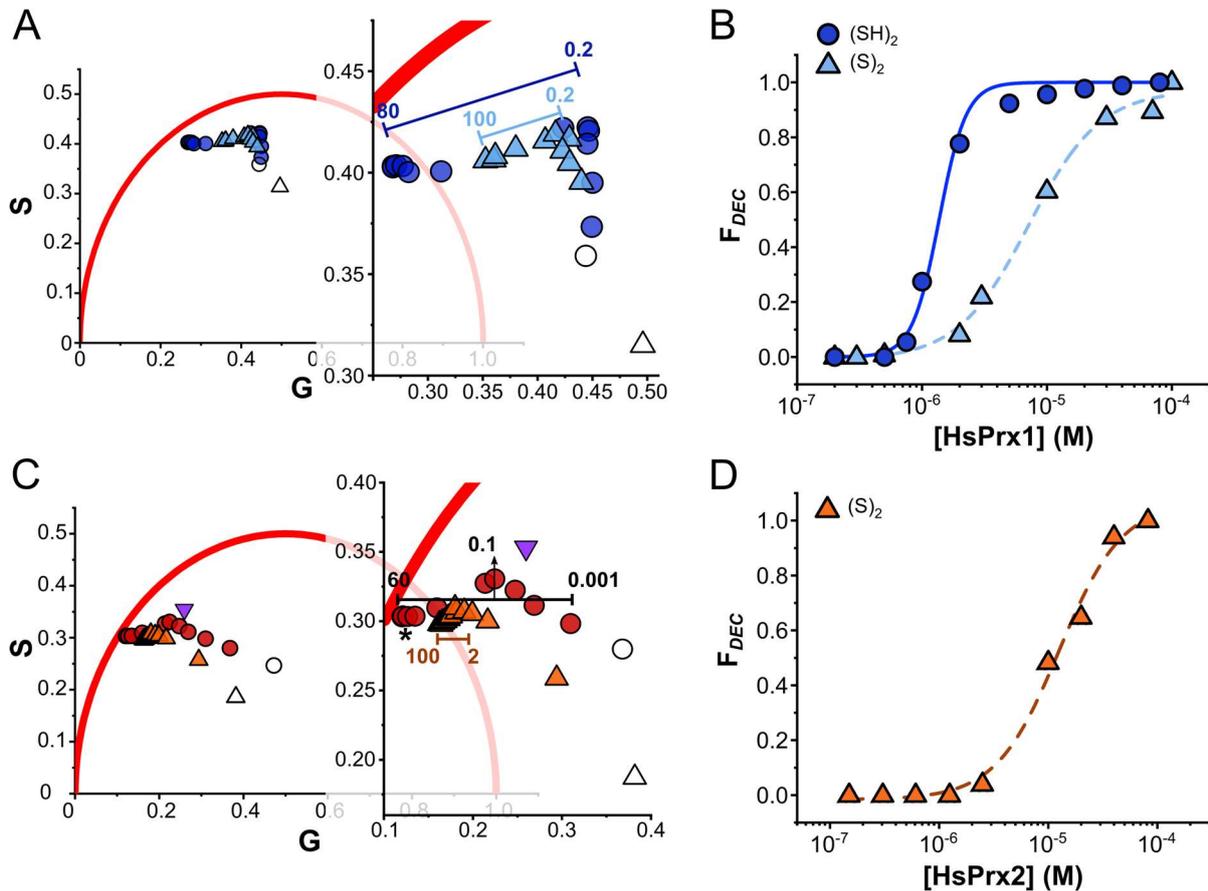


Figura 2.9. Disociación de *HsPrx1* y *HsPrx2* en sus formas ditiol y disulfuro (fasores). **A.** Gráfico de fasores de *HsPrx1* en estado ditiol (círculos azules) y disulfuro (triángulos celestes) a 52.8 MHz. A la derecha se muestra un acercamiento de las trayectorias: las líneas sólidas azul y celeste representan la trayectoria desde 80 a 0.2 μM y de 100 a 0.2 μM de *HsPrx1*, reducida y oxidada respectivamente. Los símbolos abiertos representan el fador del buffer (lo mismo en C). **B.** F_{DEC} calculada a partir de A, a diferentes concentraciones de *HsPrx1*. Las líneas sólida y discontinua representan el ajuste de los datos experimentales usando Ec. 2.21. **C.** Gráfico de fasores de *HsPrx2* reducida y en estado disulfuro (círculos rojos y triángulos naranjas) a 73.6 MHz. Las líneas sólidas negra y marrón representan las trayectorias dentro del rango de concentración indicado (μM). El triángulo púrpura representa *HsPrx2* 1.2 μM ditiol en 2 M de urea. El asterisco indica 3 μM *HsPrx2* en la trayectoria. **D.** F_{DEC} de *HsPrx2* oxidada en función de la concentración de proteína (calculada a partir de C). La línea discontinua es el resultado del ajuste usando la Ec. 2.21.

Tabla 2.1. Valores de $K_{0.5}$ y n obtenidos por SEC (Figura 2.8) y fasores (Figura 2.9) para *HsPrx1* y *HsPrx2* reducidas y oxidadas a disulfuro. Nd. No determinado.

	SEC		Fasores	
	$K_{0.5}$ (μM)	n	$K_{0.5}$ (μM)	n
<i>HsPrx1</i>(SH)₂	0.8	1.5	1.38	3.5
<i>HsPrx1</i>(S)₂	4.7	0.9	7.82	1.5
<i>HsPrx2</i>(SH)₂	0.08	0.6	Nd.	Nd.
<i>HsPrx2</i>(S)₂	14.4	0.6	12	1.5

Una observación interesante, es que a la concentración más alta donde se esperan exclusivamente decámeros, los puntos de fasores de *HsPrx1* y *HsPrx2* no coinciden con los del estado reducido a pesar de compartir la misma trayectoria (Figura 2.9A, 2.9C). Aunque ambas Prx son principalmente decámeros a esas concentraciones, los fasores de los decámeros oxidados están más cerca del fador del dímero que del decámero en estado reducido. En este sentido, la herramienta de fasores nos permite diferenciar entre decámeros reducidos y oxidados, debido a la ubicación de los Trp en estas Prx. Los Trp responsables de la fluorescencia de *HsPrx1* son W87 en la interfaz tipo A y W177 en el C_R loop del sitio activo (Figura 1.19 y Anexo 5.1.3). Por lo tanto, podemos plantear la hipótesis de que W87 detecta cambios estructurales en la interfaz de decamerización y W177 en el sitio activo, aunque estos cambios pueden estar correlacionados. A altas concentraciones de proteína, la emisión de W87 estaría detectando la oligomerización adecuada, mientras que W177 permanece bloqueado en el estado LU, resultando en una distribución distinta de τ y, por ende, en un fador diferente.

Una cuestión intrigante de la dinámica de oligomerización de *HsPrx1* y *HsPrx2*, es que sean tan distintas a pesar de ser proteínas con tan alta similitud. Si comparamos sus secuencias aminoacídicas en un alineamiento (Anexo 5.1.3), observamos que 6 de las 42 posiciones que son diferentes entre ellas están ubicados en las regiones de interfaz de oligomerización (II, III y IV). Entonces, por más que explicar las diferencias en base a esas 6 posiciones sea tentador, es imposible descartar que residuos distintos en otras ubicaciones puedan contribuir a la estabilidad del decámero de Prx. Aspectos como la estabilidad del sitio activo, también podrían estar contribuyendo a las diferencias observadas, dado que las regiones I y, en menor medida, II sufren cambios estructurales en la forma LU⁵². En definitiva, no sabemos con precisión cuanto pueden influir diferencias estructurales a mayor distancia o efectos globales (como la diferencia en el pI) sobre la interfaz de oligomerización. Seguramente varias de estas diferencias están correlacionadas y en su conjunto explican los resultados observados.

Estudios previos de RMN de magic angle spinning (MAS) en *Saccharomyces cerevisiae* Tsa¹⁹⁴ han demostrado que el enlace disulfuro causa frustración estructural en el sitio activo y cerca de la interfase tipo A. Aquí observamos que esta frustración afecta negativamente la dinámica de oligomerización en solución, resultando en una mayor proporción de dímeros y una pérdida de cooperatividad del proceso de asociación. Sin embargo, el decámero de *HsPrx1* demostró ser más tolerante a esta frustración, ya que el cambio en el $K_{0.5}$ entre los estados reducido y oxidado

permanece en el mismo orden de magnitud de concentración de proteína (**Tabla 2.1**). Esto podría deberse a que el decámero de *HsPrx1* sea más lábil. Por otro lado, la formación del enlace disulfuro intersubunidad desestabiliza profundamente la estructura del decámero de *HsPrx2*, resultando en un cambio mayor en $K_{0.5}$ de 0.08 a 14 μM y obteniendo exclusivamente dímeros a concentraciones de proteína inferiores a 2 μM .

2.2.6. Cinética de la transición de dímeros oxidados a decámeros reducidos

La metodología de fasores nos permitió definir una trayectoria para la transición decámero-dímero de *HsPrx1* y *HsPrx2* en sus estados ditiol y disulfuro (**Figura 2.9**). Con esta información, evaluamos la dinámica de la transición de dímeros oxidados a decámeros reducidos siguiendo el cambio de los fasores a lo largo del tiempo utilizando 2 mM de DTT como agente reductor. Para ambas proteínas, obtuvimos cursos temporales de fasores donde los puntos se desplazaron a lo largo de una recta desde el fador del dímero oxidado al del decámero reducido (**Figura 2.10A**).

Usando la **Ec. 2.10**, calculamos la fracción de Prx reducida (en lugar de la fracción de decámeros) a lo largo del tiempo y obtuvimos una cinética exponencial con constantes de velocidad observadas de 0.068 y 1.1 min^{-1} para *HsPrx1* y *HsPrx2* respectivamente (**Figura 2.10B**). Estos resultados sugieren que la reducción y/o ensamblaje de dímeros en decámeros es 16 veces más rápida para *HsPrx2*. Resultó inesperado observar una diferencia tan grande, ya que el DTT es un reductor de disulfuros inespecífico y los enlaces disulfuro son esencialmente los mismos en ambas proteínas.

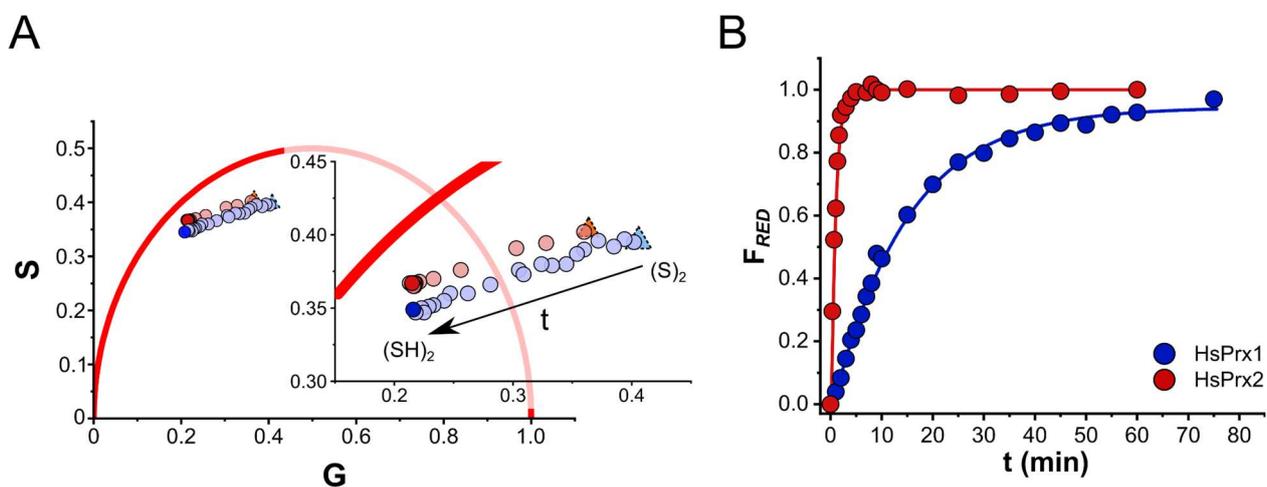


Figura 2.10. Cinética de la transición de dímeros oxidados a decámeros reducidos. **A.** Curso temporal de fasores para la reducción de 10 μM de *HsPrx1* (círculos azules) y 3 μM de *HsPrx2* (círculos rojos) oxidadas, con 2 mM de DTT a 75 y 58 MHz respectivamente. Los triángulos y los círculos más oscuros indican los puntos inicial y final de la trayectoria. **B.** Fracción reducida de *HsPrx1* y *HsPrx2* a lo largo del tiempo; las líneas representan el ajuste exponencial de los datos (**Ec. 2.22**).

Esta observación sugiere que existe una diferencia cinética en la reasociación de los dímeros reducidos. De todas formas, no podemos descartar que el efecto observado se deba al tipo de reductor utilizado, por lo que habría que realizar el experimento con distintas concentraciones de

DTT. Teniendo en cuenta que la reasociación es independiente de la velocidad de reducción del disulfuro, no deberíamos ver un aumento en la constante de velocidad conforme aumentemos [DTT].

En el caso de que la diferencia observada se debiera exclusivamente a una reasociación más lenta para los dímeros de *HsPrx1*, esto podría representar un nuevo freno en el ciclo catalítico de AhpC/Prx1, que repercutiría en el consumo de H₂O₂ y en las funciones de señalización.

2.2.7. Formación de decámeros mixtos entre *HsPrx1* y *HsPrx2*

A pesar de presentar diferencias, *HsPrx1* y *HsPrx2* tienen un 75% de identidad de secuencia en su interfase de decamerización. Por lo tanto, quisimos saber si tanto los dímeros de *HsPrx1* como los de *HsPrx2* podrían coexistir dentro de un mismo decámero. Para probar esta hipótesis, se realizaron análisis de SEC y fasores con diferentes mezclas de las proteínas reducidas a concentraciones específicas (**Figura 2.11**). Los resultados de SEC muestran que cuando se mezclan 0.5 μM de *HsPrx1* (dímero) y 0.5 o 1 μM de *HsPrx2* (decámero), el pico del dímero desaparece y el área del pico del decámero aumenta (**Figura 2.11A, 2.11B**). Sin embargo, cuando *HsPrx1* se mezcla con *HsPrx2* a una concentración donde la última empieza a mostrar una menor proporción de decámeros (0.2 μM), los cromatogramas de las proteínas por separado no se pueden distinguir del cromatograma de la mezcla.

Además, los resultados de los fasores apoyan la hipótesis. En el gráfico de fasores, todas las combinaciones de dos fluoróforos que no interaccionen deben caer dentro de una línea que los conecta. Sin embargo, la mezcla de ambas Prx generó un punto fuera de la línea (**Figura 2.11C**), lo que significa que se trata de una especie fluorescente cuya vida media no es una combinación de las de las dos proteínas por separado. Este fenómeno ya se ha observado antes en estudios de interacciones proteína-proteína¹⁹⁶.

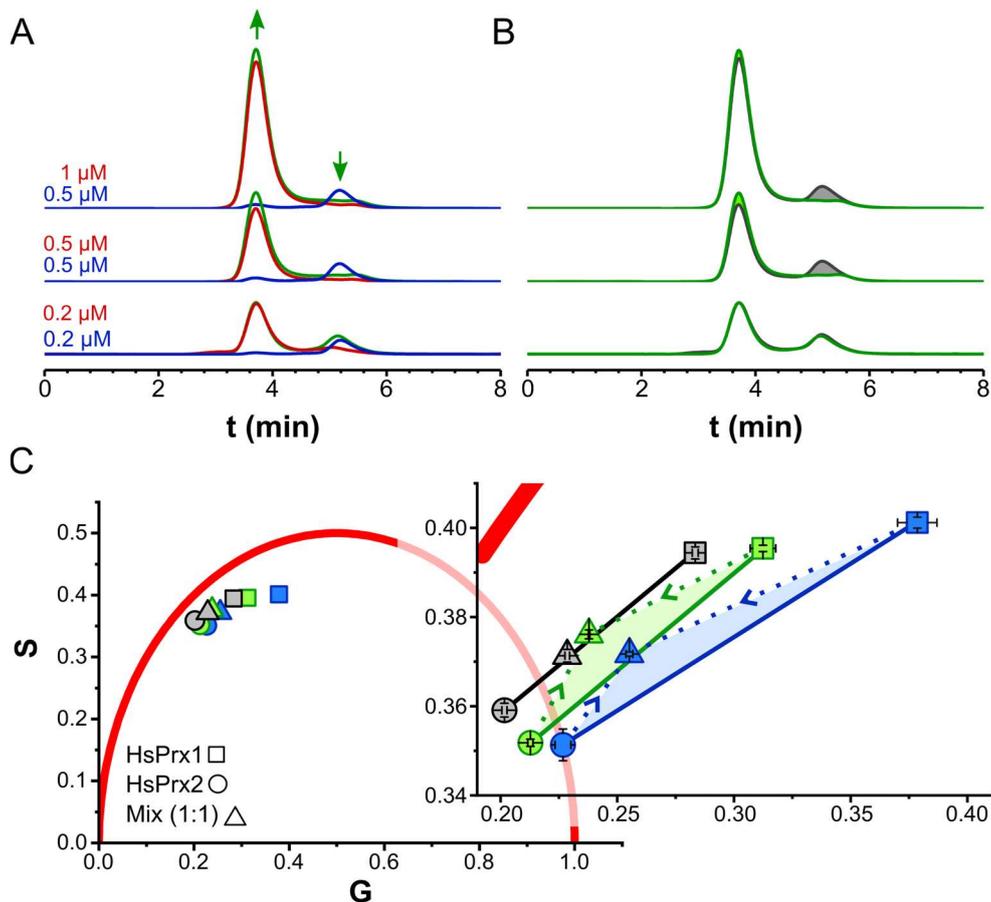


Figura 2.11. Formación de decámeros híbridos entre *HsPrx1* y *HsPrx2*. **A.** Cromatogramas de SEC de las mezclas de *HsPrx1* y *HsPrx2*. Las líneas rojas, azules y verdes representan *HsPrx2*, *HsPrx1* y su mezcla, respectivamente. Las flechas verdes señalan la dirección del cambio en los picos al mezclar ambas proteínas. **B.** Comparación entre la mezcla (verde) y la suma algebraica de los cromatogramas de *HsPrx1* y *HsPrx2* (gris). **C.** Gráfico de fasores de *HsPrx1* y *HsPrx2* reducidas y su mezcla 1:1, en concentraciones de 0.5 (azul), 1 (verde) y 2 μM (negro) cada una. Las líneas representan las barras de error en G y S para 5 repeticiones.

En nuestro caso, los resultados de fasores sugieren que *HsPrx1* y *HsPrx2* pueden interactuar entre sí en las concentraciones utilizadas en el análisis de SEC. Curiosamente, la mezcla de 2 μM no mostró el mismo comportamiento, ya que cayó dentro de la línea que conecta los fasores de las proteínas aisladas, lo que indica que la interacción no se ve favorecida. Estas observaciones permiten plantear que la probabilidad de encontrar decámeros híbridos puede depender del estado del equilibrio oligomérico de cada proteína. A 2 μM, ambas proteínas reducidas existen predominantemente como decámeros ($K_{0.5}$ de 1.3 y 0.08 μM para *HsPrx1* y *HsPrx2*, respectivamente), por lo que la probabilidad de formación de decámeros híbridos es baja. Sin embargo, cuando se mezclan ambas proteínas a 0.2 μM, donde su equilibrio oligomérico es más dinámico, tampoco se observan decámeros híbridos, probablemente porque no son lo suficientemente estables como para ser detectados.

2.2.8. Formación de decámeros covalentes en *HsPrx1*

A diferencia de *HsPrx2*, *HsPrx1* tiene un residuo de cisteína adicional (C83) ubicado en la interfase entre dímeros en el decámero (misma posición que T82 en *HsPrx2*, **Anexo 5.1.3**), cuya oxidación podría generar un decámero estabilizado por enlaces disulfuro. Por eso, decidimos analizar la distribución de especies oligoméricas durante la reacción entre *HsPrx1* oxidada ($1 \mu\text{M}$) y un exceso de $500 \mu\text{M}$ de H_2O_2 (**Figura 2.12**). En la **Figura 2.12A** se observa la acumulación de una especie con el peso molecular correspondiente a un tetrámero entre los picos de decámeros y dímeros. Notamos que los tetrámeros comienzan a acumularse en el tiempo, mientras que la cantidad de dímero disminuye (**Figura 2.12B**). Estos resultados sugieren que la oxidación de la C83 lleva a la formación de un enlace disulfuro entre dímeros formando un tetrámero covalente. A pesar de que la reacción es muy lenta (constante de velocidad observada $5.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) y no llegó a completitud en el tiempo ensayado, estos datos apoyan la hipótesis de que los residuos de C83 pueden formar enlaces disulfuro en la interfase de oligomerización.

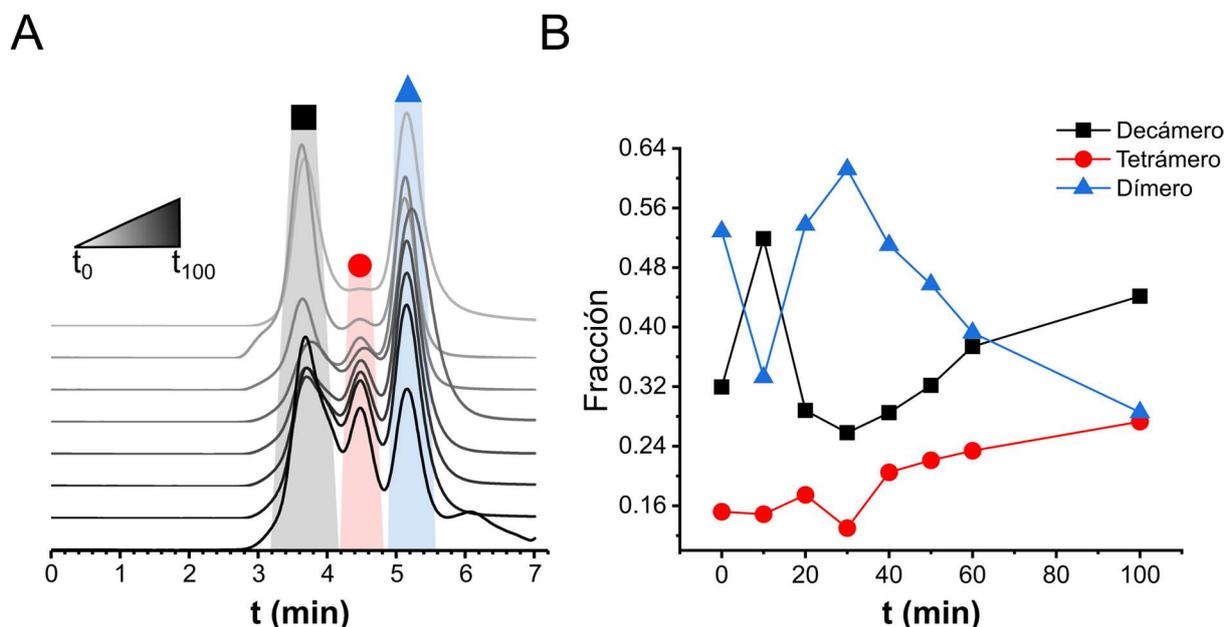


Figura 2.12. Reacción del disulfuro de *HsPrx1* con H_2O_2 seguida por SEC. A. Cromatogramas obtenidos de 0 a 60 min cada 10 min y a los 100 min, representados en escala de grises. El cuadrado, círculo y triángulo representan las regiones del cromatograma correspondientes a decámeros, tetrámeros y dímeros de *HsPrx1*. **B.** Determinación de la fracción de cada especie (**Ec. 2.1**) en función del tiempo, las áreas de cada especie fueron obtenida a partir del ajuste a múltiples picos gaussianos del cromatograma.

La naturaleza covalente del tetrámero fue puesta a prueba realizando una dilución de la mezcla de reacción de 1 a $0.05 \mu\text{M}$ *HsPrx1* luego de los 100 min. En el cromatograma de esta muestra, cambiaron las fracciones relativas de decámeros y dímeros debido a la dilución (aumentó el pico del dímero). Sin embargo, la fracción del tetrámero permaneció igual, lo que da indicios de que se trata de una especie covalente (**Anexo 5.1.4**).

2.2.9. Efecto del NaCl y la urea en la oligomerización

Como se mencionó en el capítulo de introducción, la naturaleza del equilibrio entre decámeros y dímeros es difícil de predecir entre miembros de la familia AhpC/Prx1, principalmente porque es una propiedad que depende de varias regiones de la proteína que están conectadas dinámicamente a nivel estructural. Lo mismo sucede con el efecto de ciertos factores sobre este equilibrio (fuerza iónica (μ), pH, temperatura, etc.), que para la misma condición puede ser opuesto en miembros distintos de la familia. Con el fin de estudiar la naturaleza fisicoquímica del equilibrio de oligomerización y puntualmente encontrar condiciones que pudieran favorecer una forma oligomérica con respecto a la otra, realizamos experimentos de fasores en presencia de concentraciones crecientes de NaCl y urea para *HsPrx1* y *HsPrx2* respectivamente (**Figura 2.13**).

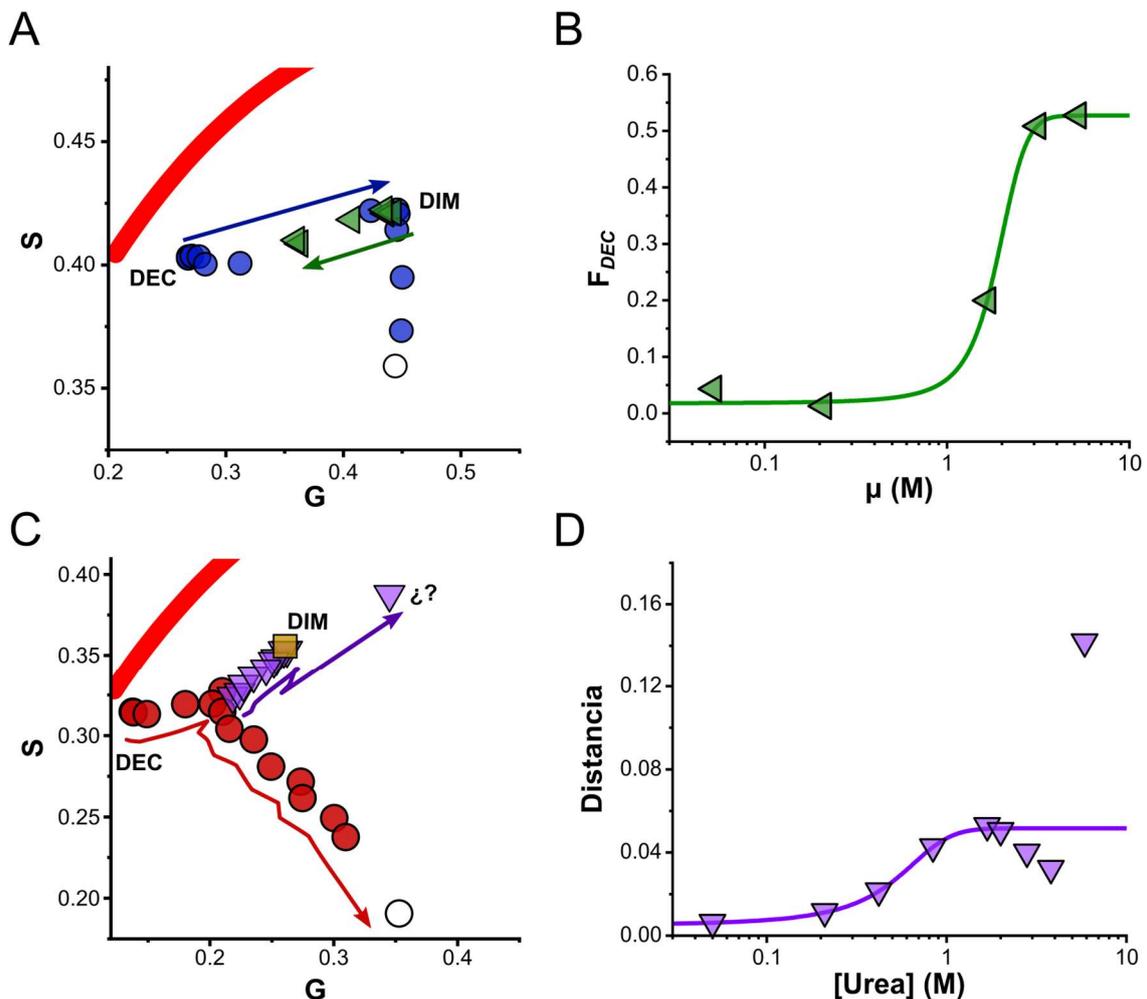


Figura 2.13. Efecto de la fuerza iónica y urea en la oligomerización de *HsPrx1* y *HsPrx2*. **A.** Gráfico de fasores (52.8 MHz) de las trayectorias decámero-dímero a distintas concentraciones de *HsPrx1* (igual que en **Figura 2.9A**, círculos azules, flecha azul) y de 1 μ M *HsPrx1* a concentraciones crecientes de NaCl (triángulos y flecha verde), expresada como fuerza iónica (μ). **B.** F_{DEC} vs. μ ajustado con la **Ec. 2.21** para obtener el centro de la transición. **C.** Gráfico de fasores (73.6 MHz) de las trayectorias decámero-dímero a distintas concentraciones de *HsPrx2* (20 a 0.01 μ M, círculos y flecha roja) y de 1.2 μ M *HsPrx2* a concentraciones crecientes de urea (triángulos y flecha violeta), Los signos de interrogación señalan una especie que sale de la tendencia en 5.85 M urea. El cuadrado amarillo representa 3 μ M *HsPrx2* oxidada. **D.** Gráfico de la distancia acumulada entre puntos en función de la concentración de urea. Se realizó el mismo ajuste que en **B** hasta 2 M.

Planteamos que conociendo las trayectorias de disociación y partiendo de una posición del equilibrio a una concentración de Prx determinada, podríamos evaluar el efecto de estos factores en la oligomerización.

En el caso de *HsPrx1*, observamos que a una concentración de 1 μM (debajo del $C_{0.5}$) a medida que se aumentó μ los puntos comenzaron a moverse hacia la región del decámero sobre la misma recta que para los experimentos de disociación (**Figura 2.13A**). Tomando la distancia entre puntos a valores de μ crecientes y dividiéndola entre la distancia total de la trayectoria de dímeros a decámeros, obtuvimos un perfil sigmoide de F_{DEC} en función de μ , cuyo centro se ubicó en 1.9 M. Este resultado sugiere que el aumento en la polaridad del medio estabiliza la estructura del decámero de *HsPrx1*, algo que se espera a nivel general para interacciones hidrofóbicas, que son el tipo de interacción principal entre dímeros de ambas Prx. No obstante, μ puede estar actuando también a nivel de la electrostática, ya que al pH del experimento (pH 7.4) *HsPrx1* tiene una carga neta positiva (pI 8.3). Quizás la presencia de contraiones Cl^- alivian la repulsión electrostática entre subunidades y de esa forma estabilizan al decámero. Otra cuestión a atender es que el aumento de la fracción del decámero se detuvo a la mitad de la trayectoria, esto puede deberse a diferencias en el rendimiento cuántico o a que la contribución al total de la emisión no sea la misma. De todos modos, sería necesario realizar SEC para corroborar que a ese valor de μ haya sólo decámeros.

Partiendo del antecedente que muestra la disociación de *HsPrx2* en condiciones “suaves” de desnaturalización con urea¹⁰⁵, quisimos evaluar el efecto de este agente. En primera instancia la motivación fue encontrar el fador del dímero de *HsPrx2*. El experimento se realizó incubando 1.2 μM de proteína en soluciones con distintas concentraciones de urea (0 a 5.85 M) y se observó el movimiento de los puntos alejándose de la región del decámero y deteniéndose alrededor de 2 M de urea (**Figura 2.13C**). A concentraciones mayores, los puntos se siguieron desplazando de forma más errática hasta llegar a una región más lejana en 5.85 M. Basándonos en el antecedente, podemos plantear que el primer desplazamiento tiene su final en el dímero, mientras que el segundo podría ser el monómero o algún estado desnaturalizado. El hecho de que el final del primer desplazamiento coincida con el fador del dímero oxidado (corroborado por SEC), afianza el planteo inicial. Al graficar la distancia entre los puntos a distintas concentraciones de urea (**Figura 2.13D**), se obtuvo un perfil de dos fases: el primero de forma sigmoide centrado en 0.5 M y el segundo de mayor desplazamiento sin una forma clara. Otra observación a destacar es que la trayectoria de la urea parece ser la continuación de la de disociación.

2.2.10. Oxidación de *HsPrx1* y *HsPrx2* en presencia de NaCl y urea

La relación entre la oligomerización de AhpC/Prx1 y sus funciones peroxidasa y de señalización, es un tema persistente en el campo. Inclusive al día de hoy, abordar esta cuestión sigue siendo un gran desafío. De los resultados anteriores, pudimos generar condiciones experimentales que sospechamos pueden “empujar” el equilibrio hacia decámeros (alta μ) o dímeros (urea), sin tener que introducir mutaciones en la estructura de la proteína. Aprovechando esto, procedimos a evaluar la cinética de los dos primeros pasos del ciclo catalítico (formación C_PSOH y C_P-C_R) para ambas Prx en presencia de NaCl y urea, usando H_2O_2 como oxidante (**Figura 2.14**).

Los experimentos se realizaron en el equipo de stopped-flow, siguiendo los cambios de fluorescencia correspondientes a la oxidación por H_2O_2 . Para ambas Prx se espera el mismo patrón: una bajada rápida de la señal correspondiente a la formación de C_PSOH (k_{Obs1}), seguida de una subida más lenta que refleja el proceso de resolución (formación de C_P-C_R , k_{Obs2})^{41,42,44,86,197}. La diferencia principal entre *HsPrx1* y *HsPrx2* está en la subida, con valores de k_{Obs2} de 12 y 0.25 s^{-1} respectivamente⁴². El efecto del NaCl resultó ser similar para ambas proteínas, ya que se observó una disminución sistemática en los dos parámetros conforme se aumentó la concentración (**Figura 2.14 A-B; E-F**). No obstante, el enlentecimiento no fue parejo para k_{Obs1} y k_{Obs2} en las dos Prx. En *HsPrx1* la disminución de k_{Obs1} llegó a una “saturación” a 2.5 M NaCl a un 49.4% de su valor inicial, mientras que para k_{Obs2} , la disminución fue de 93.3%. En *HsPrx2*, notamos que a baja μ (0.03 M NaCl) obtuvimos un valor de k_{Obs2} del doble de lo que se espera en amortiguadores como PBS (0.15 M NaCl aprox.). La saturación de la disminución de k_{Obs2} se vio a concentraciones de NaCl inferiores a las observadas para *HsPrx1* (0.5 M), con valores que representan 25% (teniendo en cuenta el valor a baja μ) y 40% (μ de PBS) del inicial. En cambio, k_{Obs1} mostró el mismo perfil disminuyendo a 45.7% del valor inicial, pero, a 0.5 M NaCl. El efecto de la urea sobre la constante de velocidad fue más parejo para ambas Prx, observándose una disminución de k_{Obs1} y un aumento de k_{Obs2} a concentraciones crecientes (**Figura 2.14 C-D; G-H**). En *HsPrx1*, k_{Obs1} disminuyó un 34% a una concentración 1M de urea, mientras que k_{Obs2} aumentó 10 veces su valor inicial a 2 M. Para *HsPrx2*, se observó que a 2 M urea k_{Obs1} disminuyó aproximadamente a un 20% (**Anexo 5.1.5**), mientras que k_{Obs2} también aumentó 10 veces.

Si suponemos que el aumento de μ por NaCl y la urea tienen el mismo efecto para las dos Prx, esperamos que se establezca el decámero a altas concentraciones de NaCl y desestabilizarlo en presencia de urea. Además, teniendo en cuenta que hay una supuesta relación entre el equilibrio conformacional (FF-LU) y el oligomérico, podríamos plantear un escenario que justifique el cambio en la cinética observada. El cambio más grande se vio en la velocidad de resolución, que es un proceso que requiere de un rearrreglo conformacional importante que de por sí genera frustración estructural e inestabilidad en el decámero (**Figura 2.8, 2.9**). Forzar la estructura del decámero reduce la libertad conformacional y de esta forma disminuye k_{Obs2} . En cambio, la urea induce el efecto contrario, hace a la proteína más lábil, desplaza el equilibrio hacia dímeros y aumenta la probabilidad de la transición FF-LU conduciendo al aumento en k_{Obs2} observado.

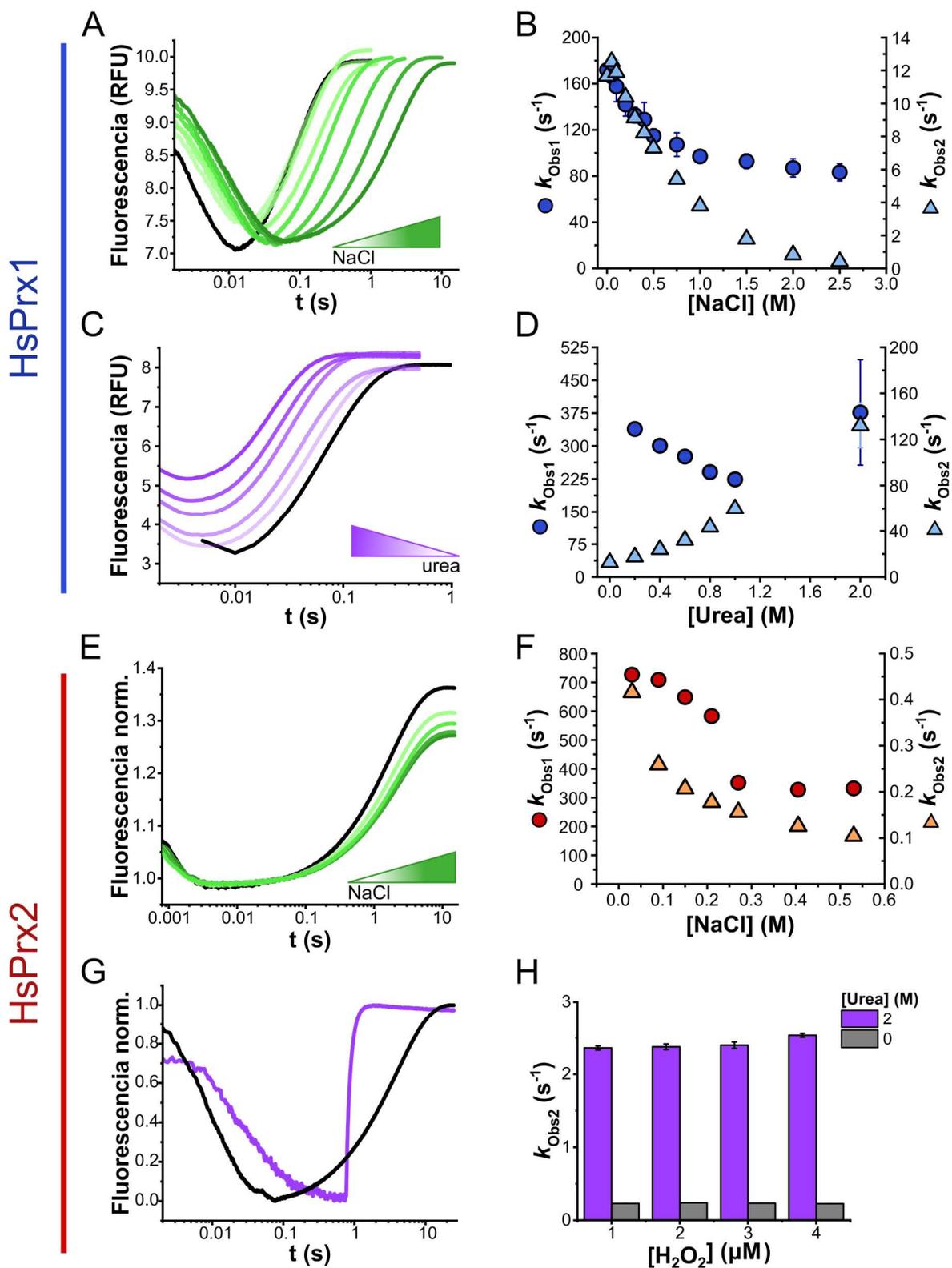


Figura 2.14. Efecto de la fuerza iónica y urea en la oxidación de *HsPrx1* y *HsPrx2* por H₂O₂. **A.** Cursos temporales de fluorescencia (λ_{Ex} 280 nm) de la oxidación de *HsPrx1* 0.5 μ M con 2 μ M H₂O₂ en presencia de NaCl. El trazo negro es la condición de menor concentración (0.05 M NaCl). **B.** Gráfico de k_{Obs1} y k_{Obs2} obtenidas del ajuste biexponencial (Ec. 2.23) de los cursos temporales de **A**, en función de la concentración de NaCl. En **C** y **D**, se muestran los cursos temporales de la oxidación de *HsPrx1* 4 μ M con 4 μ M H₂O₂ y k_{Obs1} y k_{Obs2} en función de la [Urea], respectivamente. El trazo negro indica el control sin urea. **E.** Cursos temporales de la oxidación de *HsPrx2* 0.25 μ M con 5 μ M H₂O₂ a distintas [NaCl]. El trazo negro fue obtenido a 0.03 M NaCl. De estos cursos temporales se obtuvieron las k_{Obs} graficadas en **F**. **G.** Cursos temporales de oxidación de *HsPrx2* 0.25 μ M en ausencia (negro) o presencia (violeta) de 2M urea. **H.** k_{Obs2} a distintas concentraciones de H₂O₂ en las mismas condiciones que **G**. Los datos se representan como el promedio \pm desviación estándar de 10 o 15 repeticiones técnicas.

No obstante, la disminución de k_{Obs1} en ambos casos sugiere que cualquiera de las dos condiciones va en detrimento de la reacción química y/o de la estructura nativa del sitio activo (FF). En definitiva, el carácter pleiotrópico del NaCl y la urea, hace difícil poder vincular definitivamente los cambios vistos en la cinética con los de la oligomerización.

2.3. Conclusiones

Desde los inicios en la investigación en Prx, la estabilidad relativa de los dímeros y decámeros en las AhpC/Prx1 mostró ser dependiente del estado redox con la reducción favoreciendo al decámero y la oxidación al dímero. Esto también llevó a la suposición de que los estados FF y LU están relacionados con los decámeros y dímeros, respectivamente. Sin embargo, esto está lejos de ser la norma entre miembros de la familia, ya que el vínculo entre dinámica estructural de sitio activo y de oligomerización puede llegar a ser muy diverso. En este trabajo, nuestro objetivo fue desarrollar la metodología de fasores en conjunto con SEC para obtener información detallada de la dinámica de oligomerización de *HsPrx1* y *HsPrx2*. Con fasores, pudimos utilizar los residuos de triptófano conservados en *HsPrx1* (W87, 177) y *HsPrx2* (W86, 176) como sondas para evaluar su equilibrio de oligomerización en distintas condiciones. El análisis en paralelo con SEC validó los resultados observados por fasores, mostrando que en efecto estábamos explorando diferentes fracciones de decámeros en las condiciones ensayadas.

Para *HsPrx1* se determinaron valores de $C_{0.5}$ y $K_{0.5}$ de la transición decámero-dímero en sus estados reducido y oxidado, dentro del rango micromolar (1.38 – 7.82 μM). En cambio, *HsPrx2* no se disoció completamente a menos que estuviera oxidada o sometida a condiciones de desnaturalización suave (urea 2 M), lo que sugiere que forma decámeros altamente estables. Por otro lado, la formación del enlace disulfuro en el sitio activo desestabilizó la estructura del decámero, desplazando el equilibrio hacia dímeros. En esta situación el efecto fue mayor para *HsPrx2*, lo que destacó su baja tolerancia a la frustración conformacional, en contraposición con *HsPrx1*, que se vio menos afectada. Además, las diferencias en la cinética de reducción y reensamblaje del decámero entre ambas Prx, genera la hipótesis de que existan diferencias cinéticas en la reestructuración del sitio activo, siendo este proceso considerablemente más rápido para *HsPrx2*.

La similitud entre interfases de decamerización de *HsPrx1* y *HsPrx2* a nivel de secuencia y su carga opuesta a pH fisiológico (pI teóricos 8.3 y 5.7), son buenos motivos para pensar que decámeros con dímeros de ambas proteínas puedan llegar a formarse. Utilizando fasores y SEC pudimos detectar estos decámeros mixtos in vitro. La existencia de estas especies representa una nueva capa de complejidad en la función y el mecanismo de Prx, ya que puede modificar la actividad peroxidasa y habilitar nuevas interacciones en complejos de señalización. El próximo desafío está en encontrar decámeros mixtos en células y descubrir si tienen una función específica.

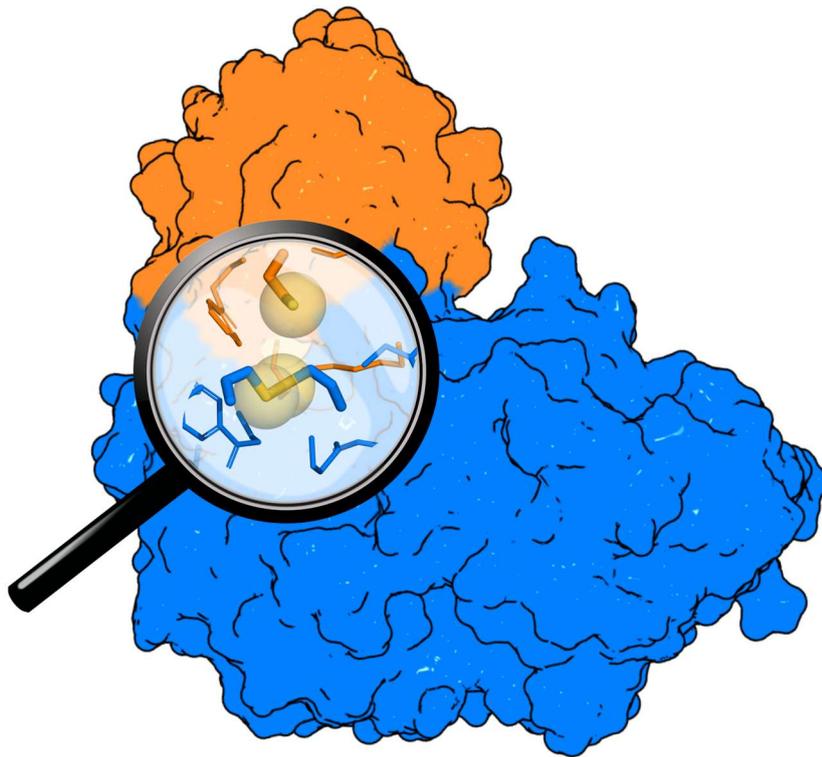
Los cambios en la cinética de oxidación de *HsPrx1* y *HsPrx2* observados a distintas concentraciones de NaCl y urea, apoyan la hipótesis de que el equilibrio oligomérico está íntimamente relacionado con el equilibrio conformacional del sitio activo de AhpC/Prx1 y, por lo tanto, también su reactividad con H_2O_2 y velocidad de resolución. En este sentido, encontramos condiciones experimentales donde podemos manipular la velocidad del paso de oxidación de estas Prx y cambiar el equilibrio oligomérico independientemente de la concentración de proteína.

En general, las AhpC/Prx1 son bastante abundantes dentro de las células¹³, con concentraciones en el rango de decenas de micromolar¹⁹⁸ y mayormente reducidas en condiciones de estado estacionario. Trasladando esto a *HsPrx1* y *HsPrx2* y teniendo en cuenta sus valores de $C_{0.5}$ y $K_{0.5}$, es seguro suponer que se encuentran mayoritariamente como decámeros. Sin embargo, la reacción con H_2O_2 y la formación del disulfuro desestabilizan momentáneamente la estructura del decámero, promoviendo la disociación, cuya magnitud va a depender del grado de oxidación y la disponibilidad de equivalentes de reducción. Asimismo, la gran inestabilidad estructural introducida por el enlace disulfuro puede dismantelar interacciones entre el decámero y los posibles interactores, permitiendo que el H_2O_2 pueda señalizar a través de Prx sin causar una modificación oxidativa en el blanco. A la vista de los resultados, esto sería más relevante en *HsPrx2*.

Además, la interacción con blancos de señalización y estructuras subcelulares también puede modificar el estado oligomérico localmente en las ubicaciones celulares donde se establezcan. Teóricamente, es interesante plantear que va a existir una población de Prx con una configuración estructural y, por lo tanto, una reactividad diferente, adaptada específicamente a los requerimientos de los complejos de señalización en los que participe. Por último, la hipotética reasociación más lenta de *HsPrx1* abre una nueva ventana temporal donde el dímero, apenas sea reducido, podría interactuar con otras proteínas blanco o formar parte de decámeros híbridos con *HsPrx2*.

Capítulo 3

Estudio cinético y estructural de la reducción de Prx por Trx



Prefacio

En la primera década después del reporte que definió a las Prx como peroxidases, algunos investigadores las caracterizaron como limitadas en comparación con otras peroxidases^{199,200}, mientras que otros autores las hallaron extremadamente rápidas^{38,40,43}. Paradójicamente, ambas opiniones eran correctas. En términos de su reacción con H₂O₂ y otros peróxidos, algunas Prx son excepcionalmente reactivas con constantes de velocidad ($k_{\text{H}_2\text{O}_2}$) cercanas al límite de difusión. Sin embargo, al considerar el ciclo catalítico entero las Prx presentan valores relativamente bajos. Uno de los ejemplos más extremos es el de *HsPrx2*, cuya reacción con H₂O₂ es muy rápida ($k_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y su ciclo catalítico relativamente lento ($k_{\text{cat}} \leq 0.2 \text{ s}^{-1}$).

De las reacciones del ciclo catalítico del grupo AhpC/Prx1, la oxidación (reacción 1, **Figura 1.11**) ha recibido la mayor atención, ya que los miembros de esta familia reaccionan con H₂O₂ extremadamente rápido. Por otro lado, el interés en la reacción de resolución ha aumentado últimamente, tras hallarse que puede ser muy lenta y actuar como un freno interno en el consumo catalítico de hidroperóxidos. Si el ciclo catalítico se detiene antes de formar un disulfuro, esto habilitaría a C_PSOH a reaccionar con blancos en vías de señalización¹⁷⁰, sufrir reacciones de reducción adicionales⁷² o, como se propuso originalmente, favorecer la sobreoxidación de C_P hacia formas inactivas de la enzima²⁸.

En cambio, la reducción mediada por Trx, o alguna tiol-disulfuro oxidoreductasa similar, ha recibido menos atención. En parte se puede explicar porque es un paso de mayor complejidad, ya que implica la formación de un complejo entre dos proteínas y dos reacciones químicas de intercambio tiol-disulfuro consecutivas, acompañado de cambios conformacionales y de asociación y disociación. Al igual que para la resolución, la reducción del disulfuro C_P-C_R también podría representar un paso limitante en la velocidad del ciclo catalítico. Tanto C_PSOH como C_P-C_R son formas oxidadas de Prx candidatas para transferir los equivalentes de oxidación del H₂O₂ en eventos de señalización¹⁵⁹ y dependiendo de cual fuera el paso limitante del ciclo (resolución o reducción), observaríamos la acumulación de una u otra. Dado que los grupos ácido sulfénico y disulfuro tienen reactividades diferentes, y que la vida media de estas formas oxidadas puede variar entre proteínas, conocer la velocidad de reducción es otra pieza necesaria para comprender cómo cada Prx puede funcionar como centro de señalización redox.

El trabajo de este capítulo se centró en estudiar la reacción de reducción del disulfuro de *HsPrx1* y *HsPrx2* (*HsPrx1*(S)₂, *HsPrx2*(S)₂) con distintas Trx, para caracterizar la cinética del proceso y profundizar en las interacciones proteicas y cómo éstas aceleran las reacciones químicas de este paso. También hicimos énfasis en la implicancia de los cambios en la estructura terciaria y cuaternaria en la cinética de esta parte del ciclo catalítico, donde la aplicación de técnicas computacionales fue clave. Estos resultados culminaron en la publicación titulada "Kinetic and structural assessment of the reduction of human 2-Cys peroxiredoxins by thioredoxins"²⁰¹. Por último, se evaluaron caminos de reducción adicionales dependientes de GSH.

3.1. Metodología

3.1.1. Procedimientos generales

Amortiguadores de uso general

Se utilizaron los amortiguadores definidos en el capítulo 2: TMA (pH 6.9-7.1) y amortiguador de almacenamiento (pH 7.4) que en esta sección será nombrado como PBS2.

Amortiguadores de purificación de proteínas

Para *EcTrx1*, amortiguador de resuspensión: 20 mM Tris, 2.5 mM EDTA, 20% Sacarosa, pH 7.4; amortiguador pos-shock: 100 mM, Tris pH 7.4; amortiguador unión DEAE: 10 mM Tris pH 7.4; amortiguador elución DEAE: 10 mM Tris, 1 M NaCl, pH 7.4; amortiguador SEC: 100 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4. En la purificación de *HsTrx1* se usó amortiguador unión IMAC: 50 mM NaPi, 300 mM NaCl, 0.1 mM DTPA, 20 mM imidazol, pH 8; amortiguador elución IMAC: amortiguador de unión más 480 mM imidazol (500 mM final), pH 8; amortiguador de lisis: unión IMAC suplementado con 1 mM PMSF, 1 mg/mL lisozima de huevo de gallina, 10 mM de MgCl₂ y 0.6 U/mL de DNAsa.

Presencia de H₂O₂ en las soluciones de trabajo

La excepcional reactividad de las Prx con el H₂O₂ es algo naturalmente muy útil a nivel fisiológico, pero fue una verdadera pesadilla a la hora de trabajar en la cinética de reducción de estas enzimas sin el sistema catalítico completo (Trx-TR-NADPH). Las bajas concentraciones de H₂O₂ en los amortiguadores (estimamos < μM) alcanzaron para entorpecer los experimentos de reducción. El origen del H₂O₂ en las soluciones, puede venir de la presencia de trazas de algunos metales de transición en las sales con las que se preparan los amortiguadores (a pesar de incorporar quelantes de metales como DTPA), que podrían reducir parcialmente el O₂ disuelto y generar H₂O₂. Sin embargo, también vimos que el agua (tanto agua desionizada como destilada) ya traía H₂O₂. La concentración de H₂O₂ puede aumentar cuando se agregan reactivos con grupos RSH en los amortiguadores (DTT, GSH, **Figura 3.1B**), posiblemente por mecanismos de oxidación de tioles por un electrón, que pueden generar ROS como O₂^{•-} y H₂O₂ (ver sección **1.2.2**).

Una de las maneras de mantener el H₂O₂ al mínimo es agregar catalasa (en nuestro caso fue de origen bovino, sugerimos 1 μM), que puede remover el H₂O₂ sin la necesidad de ningún cosustrato. En este caso hay que tener la precaución de realizar los controles necesarios ya que puede interferir en el ensayo (absorbancia del grupo hemo, interacciones que generen artefactos, etc). Otra variante más cara, es el uso de esferas de agarosa con catalasa bovina inmovilizada (Sigma C9284). Las mismas vienen en amortiguador sulfato de amonio pH 5.5, por lo que es necesario realizar lavados y centrifugaciones (1000 rpm por 3 min) para equilibrarlas en el amortiguador de interés. En nuestro caso, usamos un volumen de catalasa inmovilizada 1000 veces menor al del amortiguador preparado. Luego de equilibrarlas, se agregaron al amortiguador y éste se incubó a 4 °C con agitación, ON. Al día siguiente se filtra el amortiguador con filtros de 0.22 o 0.45 μm, para separarlo de las esferas.

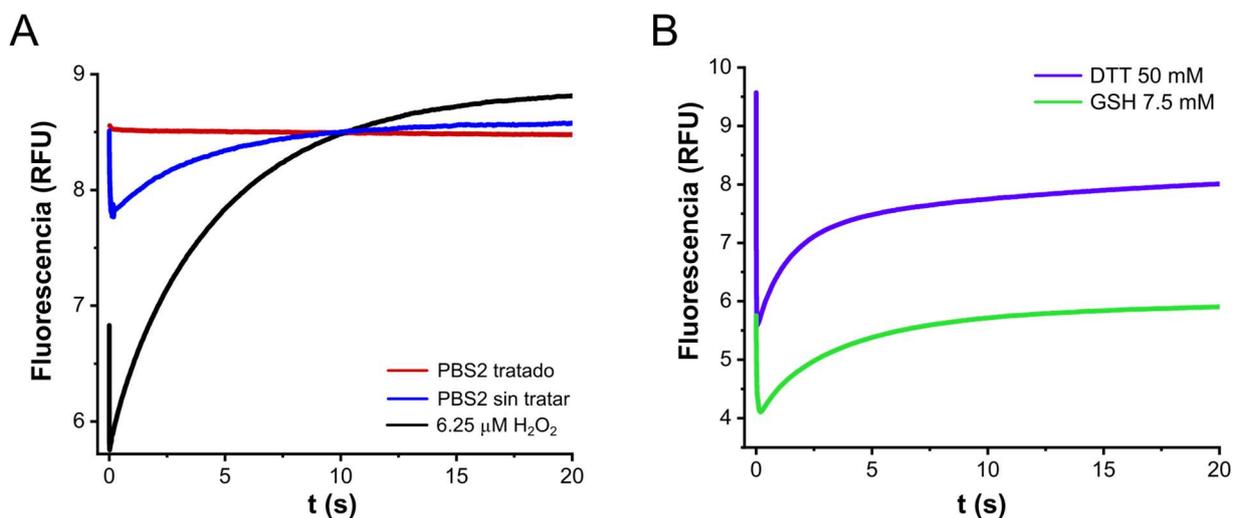


Figura 3.1. Detección de H₂O₂ en amortiguadores usando HsPrx2. **A.** Evaluación del tratamiento del amortiguador PBS2 con catalasa inmovilizada (λ_{exc} 280nm, λ_{em} > 320nm, LP320). [HsPrx2] 1 μ M. **B.** Reacción de 0.5 μ M HsPrx2 con H₂O₂ generado de PBS2 tratado, suplementado con DTT o GSH. Los cursos temporales representan el promedio de 10 repeticiones.

Para detectar la presencia de H₂O₂ utilizamos el cambio en la señal de fluorescencia intrínseca de HsPrx2, por su sensibilidad y rango dinámico amplio. Como se mencionó en capítulos anteriores, la señal consiste en una bajada seguida de una subida de la emisión de fluorescencia. De esta forma evaluamos la presencia de H₂O₂ haciendo reaccionar las soluciones con HsPrx2 reducida. Al evaluar el resultado, notamos que había menos peróxido después de tratar el amortiguador mediante este protocolo (**Figura 3.1A**), sin embargo, no siempre se logró la misma disminución de H₂O₂. La otra opción, más barata y sencilla, es incubar el amortiguador con resinas quelantes de metales (Chellex 100), o, aumentar la concentración del quelante (DTPA, etc.). No llegamos a medir la eficacia de estas últimas opciones.

Preparación de proteínas

Tanto para la reducción, como para la oxidación estequiométrica y la cuantificación de tioles proteicos y H₂O₂, se procedió de la misma manera que en el capítulo 2. Se agregó un paso adicional de desalado con PD-10 luego de la oxidación estequiométrica de Prx, para remover el posible exceso de H₂O₂. La concentración de proteínas fue determinada mediante espectrofotometría UV a partir de los coeficientes de extinción molar a 280 nm (ϵ_{280}) calculados según la secuencia aminoacídica en la plataforma web ProtParam: HsPrx1, 18500 M⁻¹ cm⁻¹; HsPrx2, 21500 M⁻¹ cm⁻¹; HsTrx1, 7000 M⁻¹ cm⁻¹; HsTrx2, 7000 M⁻¹ cm⁻¹; EcTrx, 14000 M⁻¹ cm⁻¹; TbTrx, 29450 M⁻¹ cm⁻¹; EhTrx212, 12950 M⁻¹ cm⁻¹.

Expresión y purificación de proteínas

Todo lo relacionado a la expresión y purificación de HsPrx1 y HsPrx2 fue detallado en la sección de materiales y métodos del capítulo 2. Para este capítulo, se suman los protocolos de expresión y purificación de HsTrx1, HsTrx2 y EcTrx. Todas las purificaciones fueron realizadas en el cromatógrafo FPLC ÄKTA Prime plus (GE Healthcare).

Vectores

Contamos con construcciones para las tres Trx en los vectores pET9a-*EcTrx*, pET15b-*HsTrx1* y pQE30-*HsTrx2*, con resistencia a los antibióticos kanamicina (*EcTrx*) y ampicilina (*HsTrx1* y *HsTrx2*). Salvo pET9a-*EcTrx*, los otros dos vectores de *HsTrx1* y *HsTrx2* poseen una Histag en el C y N-terminal de la secuencia aminoacídica, respectivamente, y no presentan un sitio de corte para removerla.

Expresión

La expresión de todas las proteínas recombinantes fue realizada en la cepa BL21(DE3) de *E.coli*. Las células quimiocompetentes se transformaron con 1 a 5 μ L del plásmido correspondiente por shock térmico y fueron esparcidas en placas con medio Luria-Bertani-Agar (LB agar) suplementado con 50 μ g/mL de kanamicina o 100 a 200 μ g/mL ampicilina e incubadas ON. Para la expresión se picó una colonia de la placa en 10 mL de LB con antibiótico y se incubó ON a 37 °C y con 200 rpm de agitación orbital. Al día siguiente, se realizó el escalado con un inóculo 1:100 en 1 litro de LB, o medio auto inductor (ZYM-5052²⁰²) para *EcTrx*, con antibiótico en un matraz de 5 L (relación líquido-volumen 1:5). El cultivo se dejó crecer por aproximadamente 3 horas, a 37 °C y 200 rpm, hasta llegar a la fase de crecimiento exponencial (OD_{600nm} 0.6-0.8). Para *HsTrx1* y *HsTrx2*, la inducción se realizó con 1 mM IPTG a 37 °C durante 4 horas y 220 rpm. En el caso del medio ZYM-5052 (*EcTrx*) solo se cambió la incubación a 20 °C, 200 rpm, ON. Luego de la expresión, los cultivos fueron centrifugados a 6000xg por 30 min a 4 °C y el pellet bacteriano se pesó y almacenó a -80 °C hasta el momento de la purificación.

Purificación EcTrx

El pellet bacteriano se resuspendió en amortiguador de resuspensión (1-5 mL por g de pellet) hasta obtener una suspensión homogénea que se centrifugó a 5000xg, 4 °C, 20 min. Se descartó el sobrenadante y se realizó un shock osmótico (para liberar la proteína del espacio periplásmico) con un volumen equivalente a 1-2 mL por g de pellet de agua desionizada (MiliQ) fría (4 °C). Luego de homogenizar la solución, se incubó por una hora en hielo. Al cumplirse el tiempo, se centrifugó a 6000xg, 4 °C, 30 min y se preservó el sobrenadante (contiene la proteína) al cual se le agregó 10% del amortiguador pos-shock. El primer paso de purificación fue un intercambio aniónico en una columna HiPrep DEAE FF 16/10 (GE Healthcare) equilibrada con amortiguador de unión DEAE. El sobrenadante se filtró (0.22-0.43 μ m) y se cargó en la columna con el sistema Superloop (Cytiva). La columna se lavó con el mismo amortiguador hasta estabilizar el registro de Abs 280 nm y luego se hizo un gradiente de 60 mL hasta 100 % de amortiguador elución DEAE. Las fracciones de interés se trataron con 10 mM DTT y se dializaron contra amortiguador SEC a 4 °C ON para remover el exceso de NaCl. La proteína dializada se concentró y luego se inyectó en una columna Superdex 75 10/300 (GE Healthcare) previamente equilibrada en amortiguador SEC. Dado el peso molecular de *EcTrx* (11.9 kDa), la proteína eluyó en el volumen total de la columna. Se recolectó el pico, se cuantificó y se almacenó a -20 °C. Todas las fracciones colectadas fueron sometidas a SDS-PAGE (12% acrilamida) para corroborar la presencia y grado de pureza de la proteína a lo largo del proceso de purificación.

Purificación HsTrx1

Las bacterias se resuspendieron en amortiguador de lisis (1-5 mL por g de pellet) hasta lograr una suspensión homogénea y se sonicó, centrifugó y filtró de forma análoga a la purificación de HsPrx2. La IMAC se realizó igual que para HsPrx2, con la excepción de la elución, que fue en escalones de 200 y 500 mM imidazol. Las fracciones de interés se dializaron contra PBS2 y concentraron para inyectar en la misma columna de SEC que EcTrx equilibrada en el PBS2. Se recolectó el pico correspondiente a la proteína, se cuantificó y se almacenó a -20 °C. Todas las fracciones colectadas fueron sometidas a SDS-PAGE (12% acrilamida) para corroborar la presencia y grado de pureza de la proteína a lo largo del proceso de purificación.

Purificación HsTrx2

HsTrx2 fue purificada mediante IMAC de forma análoga a lo descrito en⁴¹. Todas las fracciones colectadas fueron sometidas a SDS-PAGE (12% acrilamida) para corroborar la presencia y grado de pureza de la proteína a lo largo del proceso de purificación.

3.1.2. Procedimientos específicos

Cinética química

Para la determinación de la constante cinética de segundo orden, que refleja un proceso bimolecular de reacción entre reactivos A y B, se tiene la siguiente expresión de la ley de velocidad:

$$v = k_2[A]^1[B]^1 \quad \text{Ec. 3.1}$$

donde v es la velocidad de la reacción en unidades de $M s^{-1}$ y k_2 es la constante cinética de segundo orden para el proceso, porque la suma de los órdenes de reacción para cada reactivo (exponentes) es igual a dos, con unidades de $M^{-1} s^{-1}$. La forma que empleamos para obtener k_2 para las reacciones que estudiamos, fue trabajar en condiciones de pseudo primer orden, en las que uno de los dos reactivos se encuentra en exceso con respecto al otro (al menos 5:1). En estas condiciones, suponemos que la concentración del reactivo en exceso se mantiene constante y que solo la del reactivo en defecto cambia durante el curso temporal. En el caso de ser B el reactivo en defecto, podemos simplificar la **Ec. 3.1** (**Ec. 3.2**), reduciendo los términos k_2 y $[B]$ en una constante de velocidad de pseudo primer orden, aparente, u , observada k_{obs} (**Ec. 3.3**) en unidades de s^{-1} .

$$v = k_{obs}[B] \quad \text{Ec. 3.2}$$

$$k_{obs} = k_2[A] \quad \text{Ec. 3.3}$$

Al determinar los valores de k_{obs} de los ajustes de los cursos temporales a distintas concentraciones de B , se realiza un gráfico de k_{obs} vs. $[B]$ a partir del cual se obtiene una recta, cuya pendiente es k_2 . Las reacciones cuya k_{obs} no varíe en función del reactivo en exceso son de orden 0 en el mismo.

Reducción de Prx con TCEP

La reacción de 0.5 μM de *HsPrx1* o *HsPrx2* en su forma disulfuro (*HsPrx1(S)*₂ y *HsPrx2(S)*₂) con TCEP en exceso (5-35 mM) se siguió por fluorescencia de Trp (stopped-flow, λ_{ex} 280nm, λ_{em} > 320nm, LP320) en PBS2 tratado con catalasa inmovilizada. El clorhidrato de TCEP fue previamente neutralizado con 4 equivalentes de Tris o NaOH, para prevenir cambios de pH. Los cursos temporales obtenidos mostraron un perfil exponencial ascendente seguido de un descenso lineal y fueron ajustados con la siguiente ecuación para obtener las constantes de pseudo primer orden:

$$y = Ae^{(-k_{\text{Obs}}*x)} + b * x + C \quad \text{Ec. 3.4}$$

donde y es la emisión de fluorescencia, x es el tiempo, A y k_{Obs} son la amplitud de la exponencial y la constante de velocidad de pseudo primer orden, b es la pendiente de la función lineal y C es el valor de emisión a tiempo infinito. Los valores de k_{Obs} se graficaron en función de [TCEP] para obtener la constante de segundo orden.

Reducción de Prx con DTT

Se estudió la reacción de reducción de 1 μM *HsPrx1(S)*₂ y 0.5 μM *HsPrx2(S)*₂ con distintas concentraciones de DTT por fluorescencia de Trp al igual que con TCEP. Para el caso de *HsPrx2*, se utilizó PBS2 sin tratar, tratado con catalasa inmovilizada y en presencia de 0.5 μM catalasa bovina. Los cursos temporales obtenidos fueron complejos y solo se pudieron ajustar en los casos de PBS2 tratado y sin tratar. Se observó un descenso doble exponencial de fluorescencia seguido de un ascenso prolongado. El descenso fue ajustado con la siguiente expresión:

$$y = A_1e^{(-k_{\text{Obs1}}*x)} + A_2e^{(-k_{\text{Obs2}} *x)} + C \quad \text{Ec. 3.5}$$

donde y es la emisión de fluorescencia, x es el tiempo, A_1 y k_{Obs1} , A_2 y k_{Obs2} son las amplitudes y constantes de velocidad de cada exponencial y C es el valor de emisión al final de la reacción. Ambas constantes se graficaron en función de [DTT] para obtener la constante de segundo orden. En cambio, el perfil obtenido para *HsPrx1* fue muy similar al observado en la reducción con TCEP, sin embargo, los cursos temporales presentaron un decaimiento exponencial adicional antes del descenso lineal, por lo que también fueron ajustados con la **Ec. 3.5**.

Reducción de Prx con GSH

Nos centramos en estudiar la reducción de *CpSOH* con GSH en competencia cinética con la resolución (reacciones 2 y 3, **Figura 1.11**). Estos experimentos se realizaron en el stopped-flow, monitoreando emisión de fluorescencia de *HsPrx2* en PBS2 tratado, con la misma configuración que para TCEP y DTT. Se preparó una solución stock de GSH 15 mM, equilibrada con un equivalente de Tris (pH final 7.36) y suplementada con 0.4 U/mL de GR y el equivalente a 1% GSH de NADPH para eliminar el GSSG. En una jeringa se colocó *HsPrx2* 0.5 μM y distintas concentraciones de GSH (0.2-5mM, concentraciones en celda) y en la otra *H₂O₂* (5 μM en celda). Al competir el GSH con la resolución, esperábamos un cambio en la constante observada para la resolución (subida de fluorescencia) conforme aumentamos [GSH]. Se obtuvieron perfiles característicos de oxidación de *HsPrx2* (descenso seguido de ascenso exponencial), que fueron

ajustados con la **Ec. 3.5**. De graficar la k_{Obs} correspondiente a la subida (resolución) vs. [GSH] se espera una recta, cuya pendiente es el valor de la constante de segundo orden para la reducción de C_PSOH por GSH y su ordenada en el origen es la constante de velocidad de resolución.

Reducción de Prx con Trx

Se estudió la reacción entre $HsPrx1(S)_2$ y $HsPrx2(S)_2$ con tres Trx: $HsTrx1$, $HsTrx2$ y $EcTrx$. $HsTrx1$ es la reductora fisiológica de ambas Prx ya que se encuentra en el citosol, mientras que $HsTrx2$ se ubica en la mitocondria y $EcTrx$ es de origen procariota. El motivo principal de usar tres Trx distintas fue buscar diferencias cinéticas relacionadas con la variabilidad estructural de $HsTrx2$ y $EcTrx$ con respecto a $HsTrx1$. En otras palabras, en lugar de trabajar con mutantes de $HsTrx1$ aprovechar las diferencias con respecto a otras Trx con las cuales contábamos en el laboratorio. Por otro lado, al ser el sistema $EcTrx-EcTR-NADPH$ muy utilizado para determinar actividad peroxidasa de estas Prx, también es conveniente la comparativa.

En primera instancia intentamos determinar las constantes de segundo orden para la reducción de $HsPrx1(S)_2$ y $HsPrx2(S)_2$ con Trx (previamente reducidas, $Trx(SH)_2$), con el mismo procedimiento de fluorescencia aplicado para el estudio de la reacción con TCEP. Los experimentos fueron diseñados para obtener Prx reducida y que la proteína permanezca en este estado durante los cursos temporales; de lo contrario, la señal de los procesos de oxidación y resolución se superpondrían con la de reducción. A pesar de tomar las precauciones necesarias para mantener los niveles de H_2O_2 al mínimo (PBS2 o TMA tratados), los cursos temporales obtenidos fueron poco reproducibles y difíciles de analizar. Esto se explica porque incluso concentraciones mínimas de H_2O_2 alcanzaron para distorsionar la señal al solapar reducción con los otros dos procesos. Además, los cambios de fluorescencia de Prx y Trx, oxidada a reducida y reducida a oxidada, van en sentidos opuestos, lo que disminuye el rango dinámico de la señal.

Para poder superar las dificultades mencionadas, desarrollamos una metodología en la que en lugar de intentar deshacernos del H_2O_2 , los utilizamos a nuestro favor para seguir la reacción. La reacción se llevó a cabo en el stopped-flow, monitoreando la fluorescencia de Trp con λ_{exc} 280 nm y emisión con filtros LP320 o U360. El equipo mezcló una jeringa que contenía $HsPrx2(S)_2$ (0 – 6 μM después de la mezcla) y H_2O_2 (1 μM después de la mezcla) con otra jeringa que contenía Trx reducida (0.2 μM después de la mezcla). Ambas soluciones en PBS2. Bajo estas condiciones (**Figura 3.2**), la Prx pasa por la siguiente serie de reacciones:

- $Prx(S)_2$ reacciona con Trx para dar Prx reducida (reacción 3, **Figura 3.2A**).
- Prx reducida reacciona con H_2O_2 y forma C_PSOH (reacción 1, **Figura 3.2A**).
- Se vuelve a formar el disulfuro C_P-C_R (reacción 2, **Figura 3.2A**).

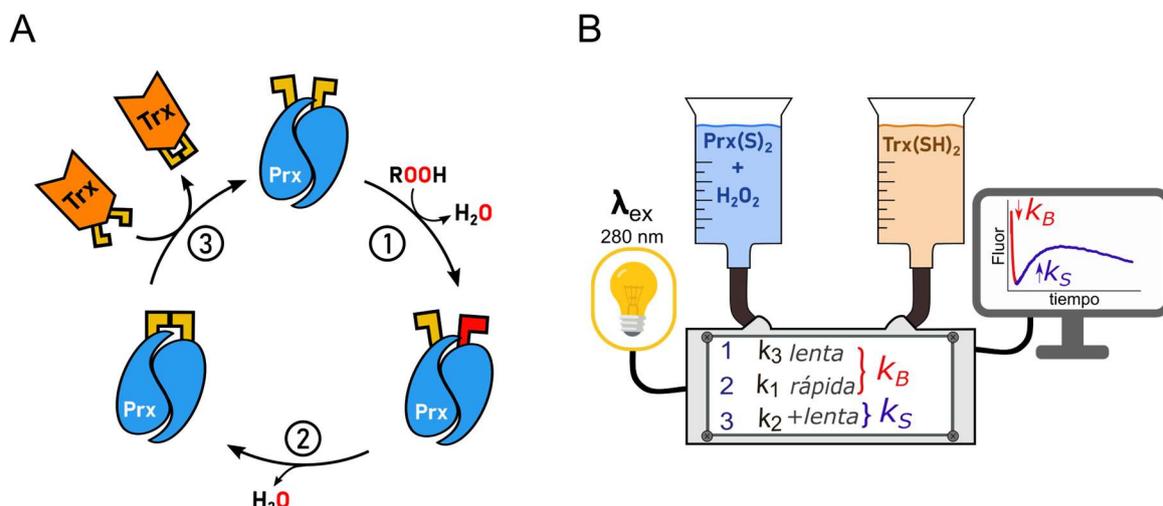


Figura 3.2. Estrategia experimental para estudiar la reacción de reducción de Prx2(S)₂ por Trx. **A.** Esquema de las tres reacciones que suceden cuando se mezcla el contenido de las jeringas en la celda de medición del stopped-flow. **B.** Representación esquemática de la metodología desarrollada. El rectángulo representa la celda de medición y se indica el orden en que sucede cada reacción del esquema **A** al mezclar el contenido de las dos jeringas. La señal de fluorescencia observada se coloreó según las reacciones responsables de los cambios. k_B : constante de la bajada; k_S : constante de la subida.

Este método aprovecha varias características de la cinética y fluorescencia de *HsPrx2*: primero, la reacción 1 es extremadamente rápida, con una k_{obs} esperada $\geq 100 \text{ s}^{-1}$ con $1 \mu\text{M}$ de H_2O_2 . Segundo, la reacción 2 es bastante lenta, con una k_{obs} esperada de 0.2 s^{-1} bajo las condiciones experimentales. Finalmente, la mayor parte del cambio en la emisión de fluorescencia ocurre en la reacción 1 (disminución) o en la reacción 2 (aumento). Por lo tanto, los únicos cambios detectables en la fluorescencia ocurren durante la formación y el consumo del ácido sulfénico, ya que ambas Prx presentan espectros de emisión y rendimientos cuánticos muy similares entre sus formas $\text{Prx}(\text{S})_2$ y $\text{Prx}(\text{SH})_2$ (**Anexo 5.1.6**), que son los estados iniciales y finales en cualquier experimento de reducción.

El curso temporal de fluorescencia para la reducción en estas nuevas condiciones, presentó el patrón bifásico esperado en la oxidación de *HsPrx2* y otras proteínas de la familia Prx^{41,42,44,86,197}. Sin embargo, dado que la reacción 1 es mucho más rápida que la reacción 3, lo que se observa como la disminución de fluorescencia por la formación de C_pSOH , es en realidad ese paso, pero limitado por la velocidad de la reacción previa (k_3). Esto da como resultado una constante de velocidad aparente (k_B , **Figura 3.2B**) mucho más lenta que la esperada para la reacción 1, como se presentará en la sección de resultados. La subida de fluorescencia (k_S , **Figura 3.2B**) sigue siendo el paso de resolución. Para ajustar los cursos temporales, se usó una ecuación de dos términos exponenciales y uno lineal ($b \cdot x$), debido a que la subida exponencial estuvo seguida de un descenso lineal (**Ec. 3.6**).

$$y = A_1 e^{-k_{obs1} \cdot x} + A_2 e^{-k_{obs2} \cdot x} + b \cdot x + C \quad \text{Ec. 3.6}$$

Para relacionarlo con el esquema (**Figura 3.2B**), k_{obs1} y k_{obs2} serían k_B y k_S respectivamente. Para los experimentos donde se evaluó la dependencia de la reacción con el pH, se utilizó TMA como amortiguador.

Este enfoque se probó para *HsPrx1* utilizando Trx como reactivo en exceso. La reacción 2 es mucho más rápida en el caso de *HsPrx1* (12.9 s^{-1})⁴², por lo tanto, se necesitaron grandes concentraciones de Trx para que la acumulación de ácido sulfénico (a través de las reacciones 3 y 1, **Figura 3.2A**) fuera más rápida que su consumo mediante la reacción 3. Basándonos en los resultados obtenidos para *HsPrx2* y asumiendo constantes de velocidad similares con Trx, los experimentos se realizaron mezclando *HsPrx1(S)*₂ (5 μM después de la mezcla) y un exceso de H_2O_2 , con Trx(SH)_2 (40 – 150 μM después de la mezcla). Después de los primeros intentos, hallamos que se podían tener resultados aceptables a concentraciones menores de *HsPrx1* y Trx en los ensayos finales. Las soluciones se prepararon en TMA. Los parámetros cinéticos se obtuvieron utilizando la **Ec. 3.6**.

Reducción y transición conformacional de LU a FF

Para explorar la posible influencia del reductor en la cinética de la transición conformacional LU \rightarrow FF, realizamos experimentos en el stopped-flow en modo secuencial (**Figura 3.3**), donde hay un compartimento previo a la celda de medición donde se mezclan los contenidos de dos jeringas. Luego, esa primera mezcla es “empujada” hacia la celda con amortiguador presente en otra jeringa. Finalmente, la pre-mezcla se combina con el contenido de una cuarta jeringa que tiene el reactivo de la segunda reacción química (en nuestro caso H_2O_2). En esta modalidad, el equipo permite dejar la primera mezcla durante el tiempo que uno desee, hasta enviarla finalmente a la celda para medir.

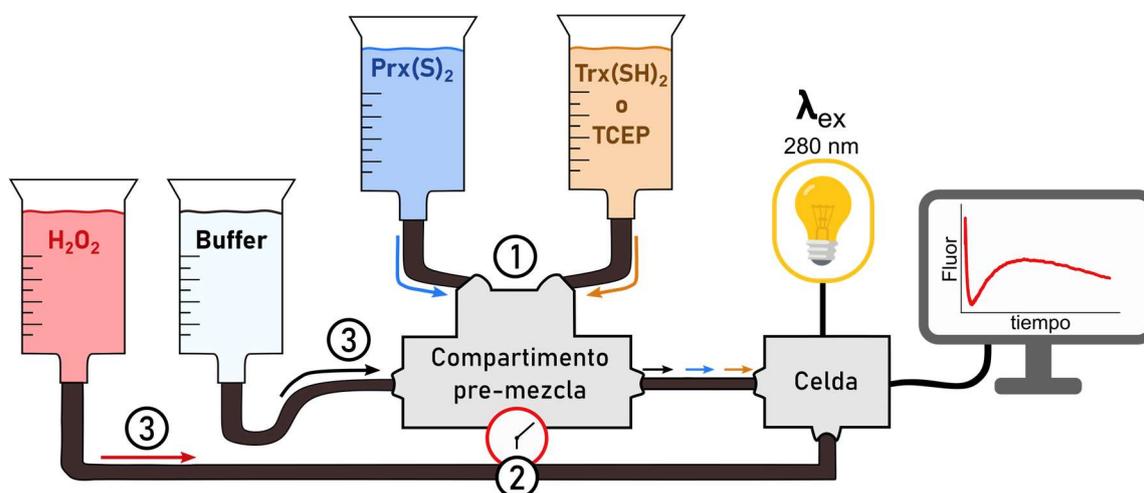


Figura 3.3. Esquema del método de mezclado secuencial. En el primer paso (1) se mezclan los reactivos para que la reacción de reducción ocurra en el compartimento de pre-mezcla. La reacción de reducción se deja proceder durante un tiempo de espera (2) y se evalúa la constante de oxidación de Prx (3) a distintos tiempos. En el último paso, el equipo empuja la pre mezcla al mismo tiempo que inyecta H_2O_2 en la celda.

Después de la primera mezcla (paso 1, **Figura 3.3**), se deja que 0.8 μM de *HsPrx2(S)*₂ reaccione con 1 μM de *HsTrx1(SH)*₂ o 65 mM de TCEP durante un tiempo preestablecido, entre 2 y 80 segundos (paso 2, **Figura 3.3**). Luego, la mezcla resultante se combina con 1 μM de H_2O_2 (paso 3, **Figura 3.3**) y se mide la constante de velocidad de la oxidación (reacción 1, **Figura 3.2A**). La concentración de peróxido en la jeringa fue 2 μM y la concentración de *HsPrx2* final en celda fue

0.4 μM . Las concentraciones de los reductores se eligieron de modo que la reacción ocurriera a velocidades similares en ambos casos y que tuviera una vida media < 2 s.

Determinación de pK_A de Trx

Los valores de pK_A de las cisteínas nucleofílicas (C32, C_N) de *HsTrx1*, *HsTrx2* y *EcTrx* fueron medidos y comparados con los obtenidos de la literatura. Las determinaciones se hicieron siguiendo el cambio en la constante de velocidad de reducción de 4,4-DTDPy mediante Abs 324 nm en el stopped-flow. En una jeringa se colocó 4,4-DTDPy 50 μM en agua (25 μM en la mezcla) y en la otra, 1.7 mL de $\text{Trx}(\text{SH})_2$ 5 μM (2.5 μM) en TMA 2x. El pH se varió en la jeringa de Trx, mediante el agregado de ácido acético (0-100 μL , stock 0.6 M) o Tris (0-20 μL 1.2 M) y se completó con agua hasta llegar a 1.8 mL. El pH se midió fuera de las jeringas, mezclando 200 μL de cada solución. Los cursos temporales se ajustaron a una función monoexponencial como la de la **Ec. 3.7**.

$$y = Ae^{(-k_{\text{Obs}}*x)} + C \quad \text{Ec. 3.7}$$

Donde y es la Abs 324 nm, A es la amplitud de la exponencial en y , x es el tiempo y C es la Abs al final de la reacción. Los valores de k_{Obs} se graficaron en función del pH y fueron ajustados a una función de dos pK_A para *HsTrx1*:

$$y = \frac{a1}{1 + \frac{K_{a1}}{[H^+]} + \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H^+]^2}} + \frac{a2}{\frac{[H^+]}{K_{a1}} + 1 + \frac{K_{a2}}{[H^+]}} + \frac{a3}{\frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}} + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + 1} \quad \text{Ec. 3.8}$$

donde y es k_{Obs} ; $a1$, $a2$ y $a3$ son las constantes de velocidad aparentes para los estados diprótico, monoprótico y aprótico involucrados en el equilibrio y K_{a1} y K_{a2} son las constantes de disociación ácida. En el caso de *HsTrx2* y *EcTrx*, se usó un ajuste a un solo valor de pK_A , con la siguiente función sigmoide:

$$y = A \frac{[H^+] + K_a}{[H^+]} + B \frac{[H^+] + K_a}{K_a} \quad \text{Ec. 3.9}$$

donde y es k_{Obs} , A y B son los valores de constante de velocidad extrapolados a pH ácido y alcalino infinito, respectivamente.

3.1.3. Procedimientos computacionales

Docking proteína-proteína

Brevemente, el docking molecular tiene como objetivo modelar o predecir la estructura de un complejo (en este caso entre dos proteínas) a partir de sus componentes, cuya información estructural está disponible. En particular, el docking proteína-proteína se basa en algoritmos que tienen en cuenta la complementariedad geométrica y energética entre las superficies proteicas, para lo cual utilizan ecuaciones con términos que describen distintos tipos de interacciones (Van der Waals, EdH, iónicas). Estos algoritmos de docking emplean funciones de puntuación que tienen múltiples términos ponderados para describir la energética de la interacción. Esto permite filtrar los resultados y obtener los modelos de interacción (complejos proteicos) que mejor satisfacen sus criterios²⁰³. Existen distintos softwares disponibles para realizar estas predicciones, en este trabajo decimos utilizar la plataforma Haddock debido a que ha demostrado buenos resultados en estudios comparativos de herramientas de docking²⁰⁴.

Los complejos entre *HsPrx2* y las distintas Trx fueron generados usando Haddock 2.4^{205,206}. Las estructuras de *HsPrx2(S)*₂, *HsTrx1*, *HsTrx2* y *EcTrx*, fueron obtenidas del PDB (5IJT, 1TRV, 1UVZ, 1XOB respectivamente). Para 5IJT, decidimos quedarnos con la estructura del dímero mejor resuelto (cadenas E y F). En el caso de 1TRV, restituimos las mutaciones de Cys por Ser *in silico* y para 1UVZ regeneramos la forma reducida, también *in silico*, en PyMOL. Una de las ventajas de usar Haddock, es que uno puede introducir información y guiar el docking según resultados experimentales u otro tipo de datos (conocimiento sobre la reacción química en este caso). El protocolo de docking se realizó con los permisos de experto de la plataforma web y consistió en generar 5000 estructuras para el paso de “rigid body docking”, seguido de 10 rutinas de “rigid body energy minimization”, luego se redujo el universo a 400 estructuras para el paso de “semi-flexible refinement” (aquí se relajan los diedros de las cadenas laterales de los residuos) y por último se obvió el paso de “water refinement”, porque los complejos ya iban a ser sometidos a simulaciones en solvente explícito. Al protocolo se le agregó un archivo con restricciones de distancia (“unambiguous restraints”) para guiar al docking según algunas observaciones y análisis previos:

1. Dada la naturaleza química de las reacciones de intercambio tiol-disulfuro, C_N de Trx tiene que estar cerca del disulfuro de *HsPrx2* para obtener un complejo que refleje el contexto proteico y estructural de la reacción química (complejo reactivo). También entendemos que el azufre de C_R (C172), es el que va a recibir el ataque nucleofílico de C_N.
2. El análisis visual de complejos entre Trx y otras proteínas del PDB (**Anexo 5.2.1**), permitió hallar una similitud general en el modo en que Trx une al sustrato y es que el residuo en la posición 74 (*HsTrx1*) ubica al disulfuro sobre el surco de unión y cerca de C_N. Particularmente se dan interacciones tipo enlace de hidrógeno (EdH) entre la cadena principal del aminoácido 74 de Trx y una de las Cys del disulfuro en el sustrato (**Figura 3.4**).
3. Previo a realizar el docking con las proteínas completas, se hizo un docking peptídico entre un fragmento del C_R loop (H168-P178) y Trx, siguiendo el protocolo recomendado por los

desarrolladores de Haddock. A partir de este resultado, se obtuvieron las distancias para construir el archivo de las restricciones entre algunos átomos de los residuos de interés (Figura 3.4E).

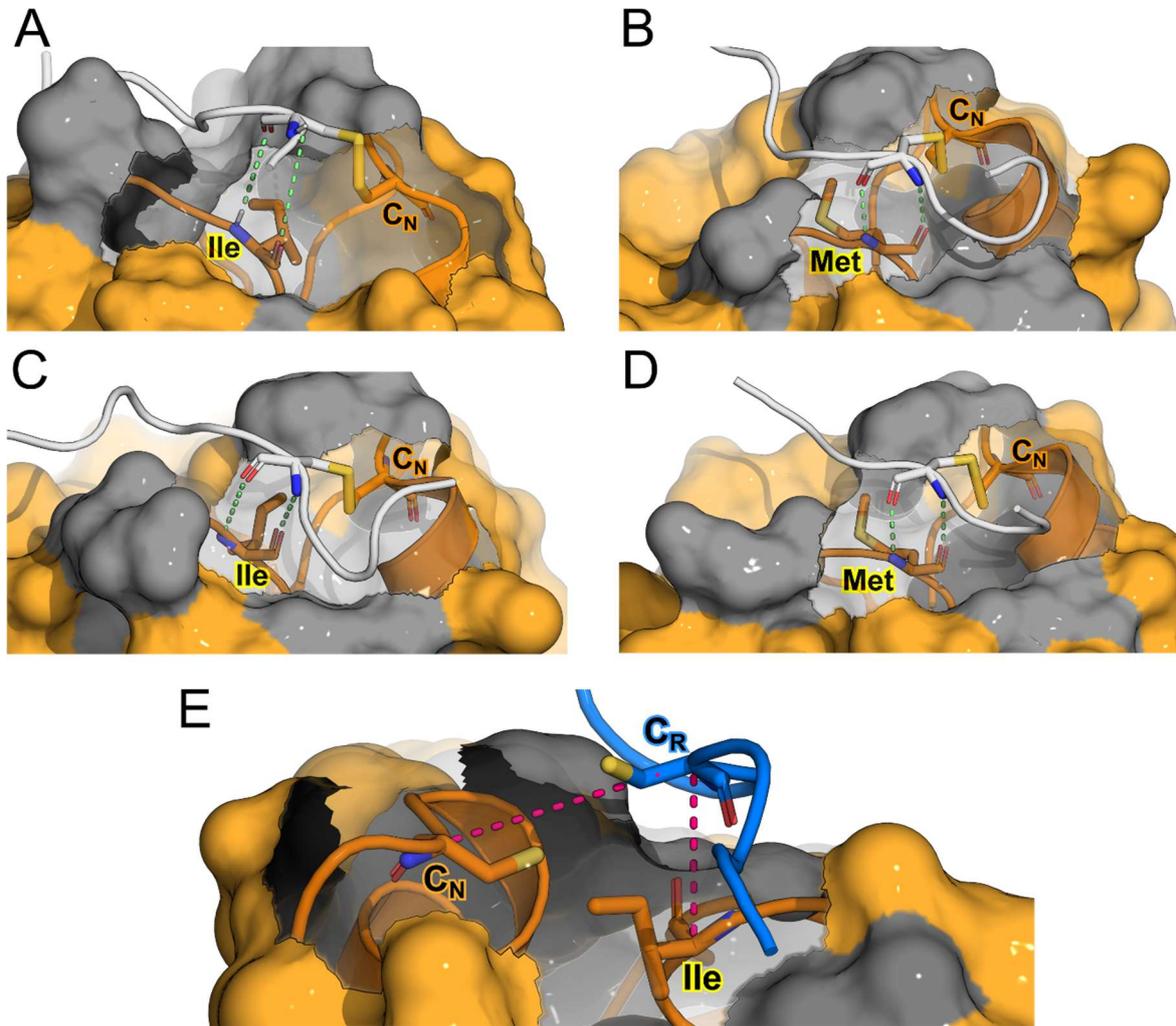


Figura 3.4. Información estructural para dirigir el docking *HsPrx2(S)*₂-Trx. De la A a la D, se muestran los distintos complejos entre Trx (naranja) y sustratos (blanco) a partir de los cuales se observó la interacción entre las cadenas principales del residuo en la posición 74 (numeración *HsTrx1*) y la Cys del disulfuro en el sustrato. En gris se coloreó la superficie del surco de unión, las líneas punteadas verdes resaltan la interacción a través de EdH, los residuos se representaron como varillas. E. Resultado del docking peptídico entre una porción del C_R loop (azul) de *HsPrx2* y *EcTrx*. La línea punteada magenta representa la distancia entre C α . Códigos PDB, A: 2IPA, B: 3PIN, C: 2O8V y D: 4LL4.

En el archivo de restricciones, se fijó una distancia de 4 ± 0.5 Å entre los átomos de azufre de C172 y C32 y de 7 ± 0.8 Å para sus carbonos α (C α). Por último, se marcó una distancia de 5 ± 0.4 Å entre los C α de *HsPrx2* C172 y M74 (*HsTrx1*), V74 (*HsTrx2*) e I75 (*EcTrx*). La selección de los mejores complejos para usar en las simulaciones, se realizó en función del Z-score (score de Haddock), la orientación de C_N con respecto al disulfuro y complementariedad electrostática general. En la práctica y con estas restricciones, las soluciones de docking (complejos obtenidos) no fueron mayores a dos y cumplieron con los criterios impuestos con muy buenos Z-score.

Simulaciones de dinámica molecular

Las Trx y los complejos Prx2-Trx se sometieron a simulaciones de dinámica molecular clásica (DM) en solvente explícito. Realizamos dos conjuntos de simulaciones: uno con C_N en su forma tiol y otro como tiolato (C_NS⁻). Los sistemas se embebieron en una caja octaédrica de agua TIP3P, utilizando una distancia mínima de 14 Å desde la superficie del complejo hasta el borde de la caja. Los parámetros de las proteínas se generaron con el campo de fuerza Amber parm14SB²⁰⁷, y también se parametrizó C_NS⁻ con base en parámetros desarrollados recientemente para el tiolato, que mejoran la descripción de la solvatación²⁰⁸. Todas las simulaciones se llevaron a cabo con el módulo pmemd del paquete AMBER18²⁰⁹, bajo condiciones periódicas de contorno, utilizando un corte de 10 Å y el método “particle mesh Ewald” para tratar las interacciones electrostáticas. Las longitudes de los enlaces de hidrógeno se mantuvieron en su distancia de equilibrio mediante el algoritmo SHAKE. La temperatura y la presión se controlaron utilizando un termostato y un barostato de Langevin, según lo implementado en el programa AMBER18. Cada sistema se minimizó en 1000 pasos (10 con descenso más pronunciado y el resto con gradiente conjugado). Posteriormente, se calentó el sistema de 0 a 300 K durante 20 ps a presión constante (con un termostato de Berendsen), que luego se equilibró a 1 bar. Finalmente, se realizaron simulaciones de DM de producción de 500 ns de duración para todos los sistemas de trabajo. Dado que tuvimos como objetivo trabajar con los complejos en una conformación reactiva (C_N cerca del disulfuro de HsPrx2), establecimos una restricción de distancia entre los átomos de azufre de C_N de Trx y C_R de HsPrx2, ya que en ausencia de esta restricción las simulaciones mostraron distribuciones de distancias entre Cys donde la conformación reactiva apareció poco representada. Por esto, aplicamos un potencial externo sobre la distancia mencionada, de forma tal que fue nulo entre 0 y 5 Å y aumentó parabólicamente a partir de 5 Å actuando como un potencial tipo “muro” con un valor constante de 100 kcal/mol. Vale la pena recalcar que esto no es un potencial armónico, no hay modificación de la energía del sistema a valores inferiores a 5 Å.

La visualización de la trayectorias se realizó en el programa VMD²¹⁰ y los análisis primarios (distancias, ángulos, diedros, RMSD, RMSF, etc) se realizaron usando el paquete de herramientas de AMBER, AmberTools²¹¹. Una lista con todos los sistemas simulados se puede ver en **Anexo 5.2.3**.

Estimaciones de energía libre de unión de los complejos

Las estimaciones de energía libre de unión ($\Delta G_{\text{Unión}}$) se obtuvieron dentro del esquema MM-GBSA²¹². Vale la pena destacar, que el objetivo de estas estimaciones fue evaluar en forma comparativa las energías de interacción en cada sistema simulado teniendo en cuenta que los valores obtenidos no pueden ser comparados con determinaciones experimentales²¹³.

Para cada estimación de energía y su descomposición por residuo, se utilizaron conjuntos de 1000 “fotos” de simulación. La lista de aminoácidos de las interfases en los complejos, se generó siguiendo el siguiente procedimiento:

1. Se seleccionaron visualmente los aminoácidos de la superficie de interacción entre $HsPrx2(S)_2$ y Trx, de forma de abarcar la mayor cantidad posible sin seleccionar la totalidad de los aminoácidos del complejo.
2. Este conjunto de residuos fueron parte del archivo de entrada de la herramienta “nativecontacts” del paquete cpptraj (Ambertools). La herramienta se aplicó sobre 1000 fotos y se anuló la opción de definir contactos nativos (para que funcione como la herramienta “contacts” de versiones pasadas de Ambertools). Se trabajó con la distancia “cut-off” por defecto (7 Å).
3. A los archivos de salida de la herramienta, se los analizó mediante un script de bash (**Anexo 5.2.2**) para generar la lista de los residuos con mayor número de contactos del lado de $HsPrx2(S)_2$ y Trx.

3.2. Resultados y discusión

Las bases conceptuales sobre las cuales se planificaron los experimentos y se apoya la discusión de los resultados de cinética, quedan plasmadas en la versión extendida del esquema del ciclo catalítico de AhpC/Prx1 de la **Figura 3.5**, donde se muestran algunos pasos que están implícitos en el esquema de la **Figura 1.11**. A lo largo de esta sección, las constantes cinéticas fueron nombradas según los pasos del esquema.

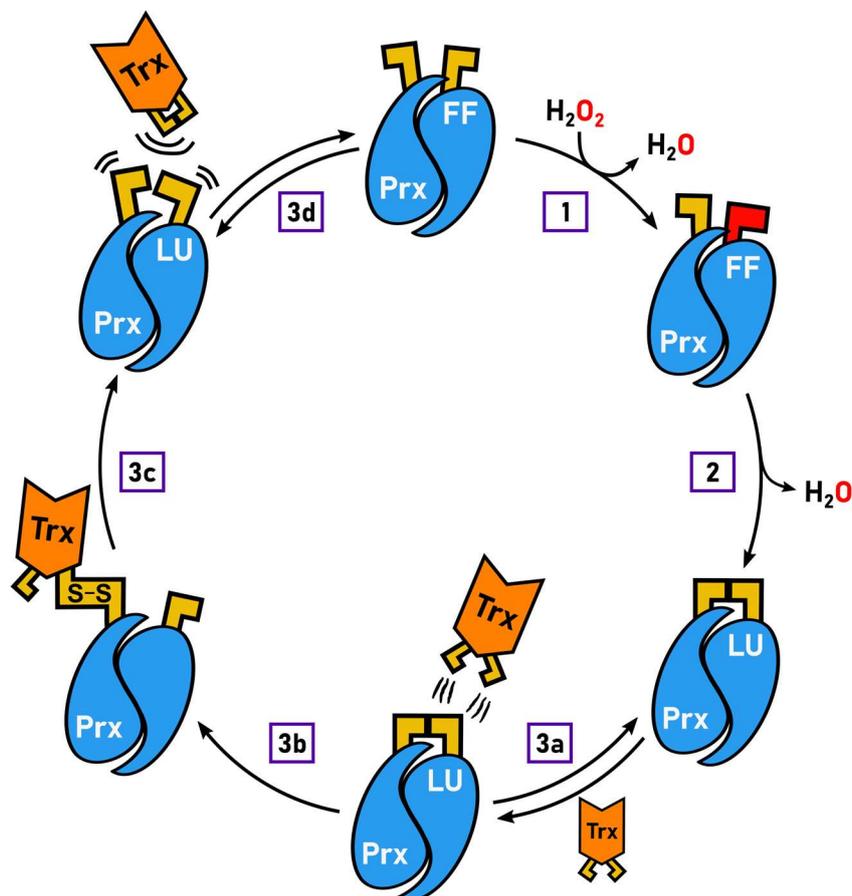


Figura 3.5. Versión extendida del ciclo catalítico de AhpC/Prx1. Los números indican la secuencia de reacciones. **1.** Oxidación por H_2O_2 . **2.** Resolución. **3.** Reducción por Trx subdividida en cuatro pasos: **3a.** Asociación no covalente Prx-Trx (formación del complejo); **3b.** Primer intercambio tiol-disulfuro; **3c.** Segundo intercambio tiol-disulfuro; **3d.** Disociación del complejo Prx-Trx.

3.2.1. Reducción de *HsPrx1* y *HsPrx2* por TCEP y DTT

La reducción de Prx por TCEP o DTT, se caracteriza por ser una reacción inespecífica, utilizada como procedimiento para obtener a las proteínas reducidas. Sin embargo, consideramos que valía la pena medir la velocidad de este proceso con el fin de asegurarnos que no existieran diferencias en la “reducibilidad” entre *HsPrx1* y *HsPrx2*. En el caso de la reducción con TCEP, ambas Prx mostraron cursos temporales de emisión de fluorescencia con una pequeña subida seguida de un descenso lineal prolongado (**Figura 3.6A**). Realizando los gráficos de k_{obs} en función de $[TCEP]$, notamos que la constante de velocidad de la subida de fluorescencia dependió linealmente de $[TCEP]$, lo que permitió obtener una constante de segundo orden para el proceso de 3.66 y $6.25 M^{-1} s^{-1}$ para *HsPrx1* y *HsPrx2* respectivamente (**Figura 3.6B**). El descenso prolongado

de la señal no varió en las concentraciones de TCEP ensayadas, fue observado en varios experimentos y lo atribuimos a un “photobleaching” lento del Trp.

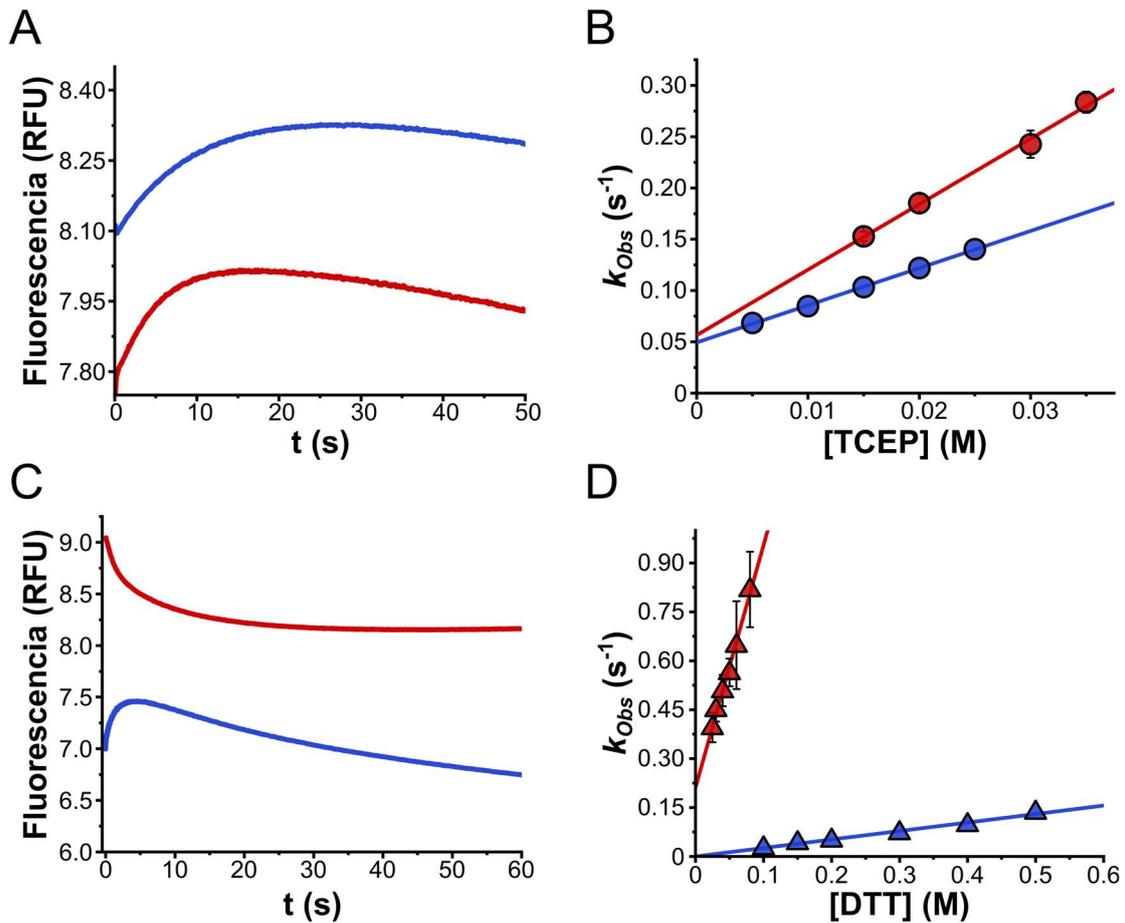


Figura 3.6. Reducción de *HsPrx1* y *HsPrx2* por TCEP y DTT. A. Cursos temporales de reducción de *HsPrx1* (azul) y *HsPrx2* (rojo) con 10 mM TCEP, pH 7.4. B. Gráfico de k_{Obs} vs [TCEP] para obtener las constantes de segundo orden. C. Cursos temporales de reducción de *HsPrx1* y *HsPrx2* con 100 y 80 mM DTT respectivamente. D. Gráfico de k_{Obs} vs [DTT]. Valores de k_{Obs} para *HsPrx1* y *HsPrx2* obtenidos a partir del ajuste de los cursos temporales con la Ec. 3.5. Las líneas de los cursos temporales son el promedio de 15 repeticiones. Las barras de error representan la desviación estándar.

Estudiar la reducción con DTT fue bastante más desafiante. En primer lugar, el cambio en la señal de fluorescencia fue totalmente distinto para las dos Prx. Mientras que *HsPrx1* exhibió cursos temporales similares a los de TCEP (breve aumento en la señal seguido de una bajada, esta vez exponencial en lugar de lineal), *HsPrx2* presentó un perfil diferente, que consiste en un descenso doble exponencial seguido de una subida muy lenta (**Figura 3.6C**). En este caso sospechamos que el H_2O_2 presente en el amortiguador y acentuado por la presencia de DTT podría ser el origen de la complejidad. Sin embargo, incluso tratando el amortiguador con catalasa inmovilizada y utilizando catalasa en solución, no pudimos lograr cursos temporales más simples de ajustar. Probablemente, el hecho de que el TCEP sea más rápido reaccionando con H_2O_2 y que no aumente su presencia en amortiguadores explica (en parte) el perfil observado. De los gráficos de k_{Obs} vs [DTT] obtuvimos constantes de reducción de 0.26 y 7.43 $M^{-1} s^{-1}$ para *HsPrx1* y *HsPrx2* respectivamente (**Figura 3.6D**). Esta diferencia de más de 20 veces entre ambas Prx es similar a la

observada en los experimentos de cinética con fasores en el capítulo anterior (**Figura 2.10**). Si calculamos constantes de pseudo primer orden (a partir de las de segundo orden) con la concentración usada en los ensayos de fasores para las dos Prx (2 mM DTT), obtenemos valores de 0.031 y 0.89 min⁻¹ para *HsPrx1* y *HsPrx2*, muy similares a los de fasores (0.068 y 1.1 min⁻¹).

El hecho de que la cinética con fasores haya dado un perfil mucho más simple (única exponencial), resalta nuevamente la ventaja del uso de esta metodología, ya que reduce la complejidad de la señal sin perder información. Vale la pena destacar la diferencia de un orden de magnitud en la constante de reducción de *HsPrx1*, entre TCEP y DTT. Es difícil encontrar una explicación para este comportamiento. Sin embargo, algo interesante es que también se ha observado en la reducción de otros disulfuros proteicos siguiendo cambios en la fluorescencia intrínseca²¹⁴.

3.2.2. Reducción de *HsPrx2* por GSH

Existen reportes previos de constantes de reducción de C_pSOH de *HsPrx2* por GSH a partir de mediciones de las formas glutationiladas de la enzima por espectrometría de masa⁷². No obstante, la resolución temporal de estos experimentos (mezclas manuales en vortex) y sus condiciones experimentales, hicieron que intentáramos determinar esa misma constante de velocidad siguiendo la señal de fluorescencia de *HsPrx2* en el stopped-flow. El experimento consistió en un ensayo de competencia cinética, donde la resolución y la reducción con GSH compiten por el consumo de C_pSOH (ver sección 3.1.2.). No llegamos a ver cambio alguno en la constante correspondiente a la resolución (k_{obs2}) para las concentraciones de GSH usadas (**Figura 3.7A, 3.7B**). Incluso, notamos que a medida que pasaba el tiempo y en las concentraciones de GSH más altas, tuvimos cada vez menos señal de fluorescencia (**Figura 3.7C**). Volviendo al tema del H₂O₂ en los amortiguadores y como su concentración aumenta en presencia de tioles, llegamos a la conclusión de que en la jeringa que colocamos *HsPrx2* reducida y GSH, la Prx se iba oxidando y/o glutationilando en los tiempos entre disparos, haciendo que cada vez hubiera menos Prx para reaccionar y por lo tanto menos señal.

A raíz de estas observaciones, concluimos que en el caso que se diera la reacción entre C_pSOH de *HsPrx2* y GSH, sería extremadamente lenta y no correspondería con los valores determinados en la literatura. Probablemente, la reducción del disulfuro de *HsPrx2* con GSH es más factible, sin embargo, no llegamos a determinarla en este trabajo.

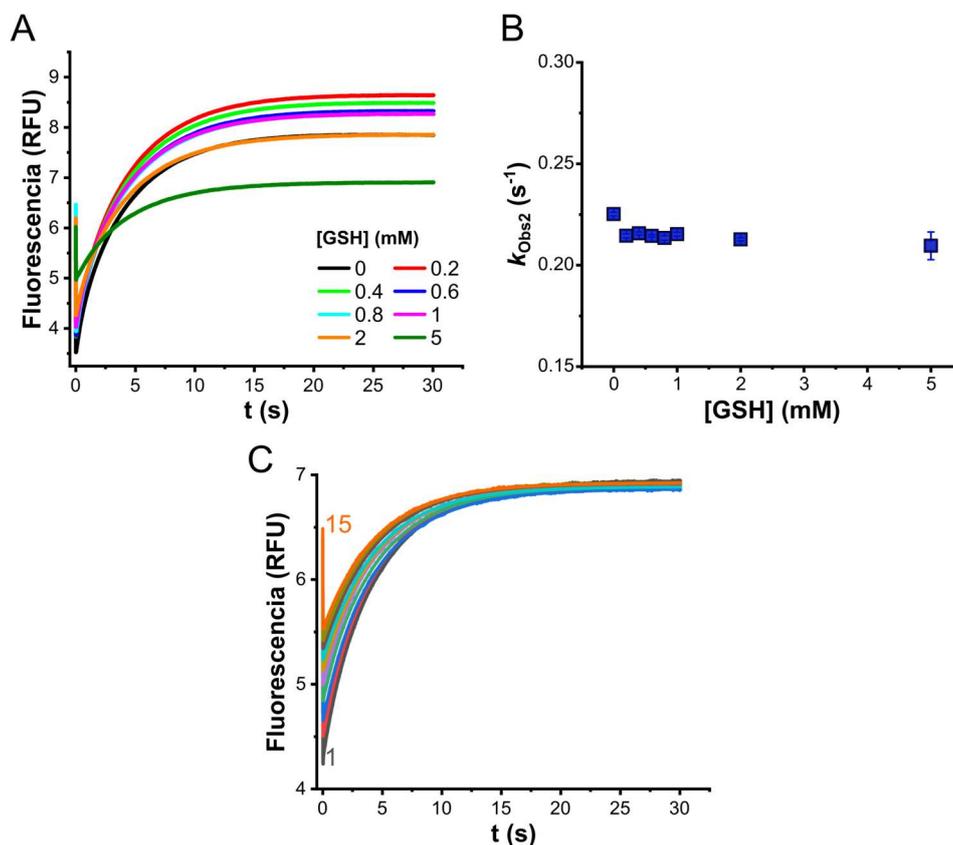


Figura 3.7. Reducción de *HsPrx2* C_pSOH por GSH. A. Cursos temporales del ensayo de competencia cinética de *HsPrx2* C_pSOH a distintas concentraciones de GSH. Los trazos son promedios de 15 repeticiones. B. Gráfico de k_{Obs2} (subida de señal de fluorescencia) vs [GSH]. Cada punto es el promedio \pm desviación estándar de 15 repeticiones C. Cursos temporales de *HsPrx2* 0.5 μ M más 8 mM GSH vs 5 μ M H₂O₂. Se numeraron la primera y la última corrida.

3.2.3. Reducción de *HsPrx1* y *HsPrx2* por Trx

Después de numerosos intentos infructuosos de monitorear la reacción mediante fluorescencia total de Trp al mezclar Prx y Trx bajo condiciones de pseudo primer orden, recurrimos al método descrito en la sección 3.1.2 (Figura 3.2). En resumen, la estrategia experimental consiste en hacer que el cambio más significativo en la señal de fluorescencia de Prx (formación de C_pSOH) esté limitado cinéticamente por el proceso que queremos evaluar, es decir, la reducción por Trx (Figura 3.2B). De esta forma, partimos de Prx(S)₂ y a medida que se va generando Prx(SH)₂, reacciona con el H₂O₂ y causa el descenso de la fluorescencia correspondiente a C_pSOH. En otras palabras, estamos usando al H₂O₂ como un revelador de la reacción. No obstante, hay que tener en mente que el segundo proceso que genera un cambio importante en la señal de Prx (subida de fluorescencia por resolución) va en contra del cambio inicial, por lo que es importante que el paso limitante de la velocidad sea más rápido que la resolución. Para *HsPrx2*, la reacción fue más fácil de seguir. Al comenzar con 1 μ M H₂O₂, la oxidación (paso 1) tendrá una constante de velocidad de pseudo primer orden ≥ 100 s⁻¹, mientras que la resolución (paso 2) es solo de 0.2 s⁻¹ (Figura 3.5). Por lo tanto, cualquier concentración de Prx y Trx que produzca una k_{Obs} menor a 100 y mayor a 0.2 s⁻¹, será al mismo tiempo limitante para la velocidad de formación de C_pSOH y más rápida que la resolución. De esta forma, el cambio en la fluorescencia puede llegar a ser observable.

Basándonos en informes previos⁴⁰, las constantes de velocidad del paso 3 que involucran Prx de mamíferos, están en el rango de $10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por lo que elegimos concentraciones en el rango bajo μM , con HsPrx2(S)_2 en exceso (2-7 μM) y Trx(SH)_2 en defecto (0.2 μM). Los cursos temporales mostraron el típico descenso (constante de la bajada, k_B) y posterior ascenso (constante de la subida, k_S) en la fluorescencia observado durante la formación de C_pSOH y resolución, seguido por una disminución lineal que también se observa incluso en ausencia de Trx (**Figura 3.8A**). Los parámetros cinéticos se obtuvieron ajustando los cursos temporales a la **Ec. 3.6**, obteniendo k_B y k_S . Al graficar k_B y k_S en función de $[\text{HsPrx2(S)}_2]$, se obtuvo de la pendiente del primer gráfico la constante de segundo orden para la reducción (**Figura 3.8B**) y de la ordenada en el origen del segundo el valor ya reportado para la resolución (**Figura 3.8C**). Por otro lado, la pendiente del final se mantuvo constante en todas las concentraciones de HsPrx2(S)_2 ensayadas. Los valores de las constantes y cuál paso del ciclo (**Figura 3.5**) representan se encuentran en la **Tabla 3.1**.

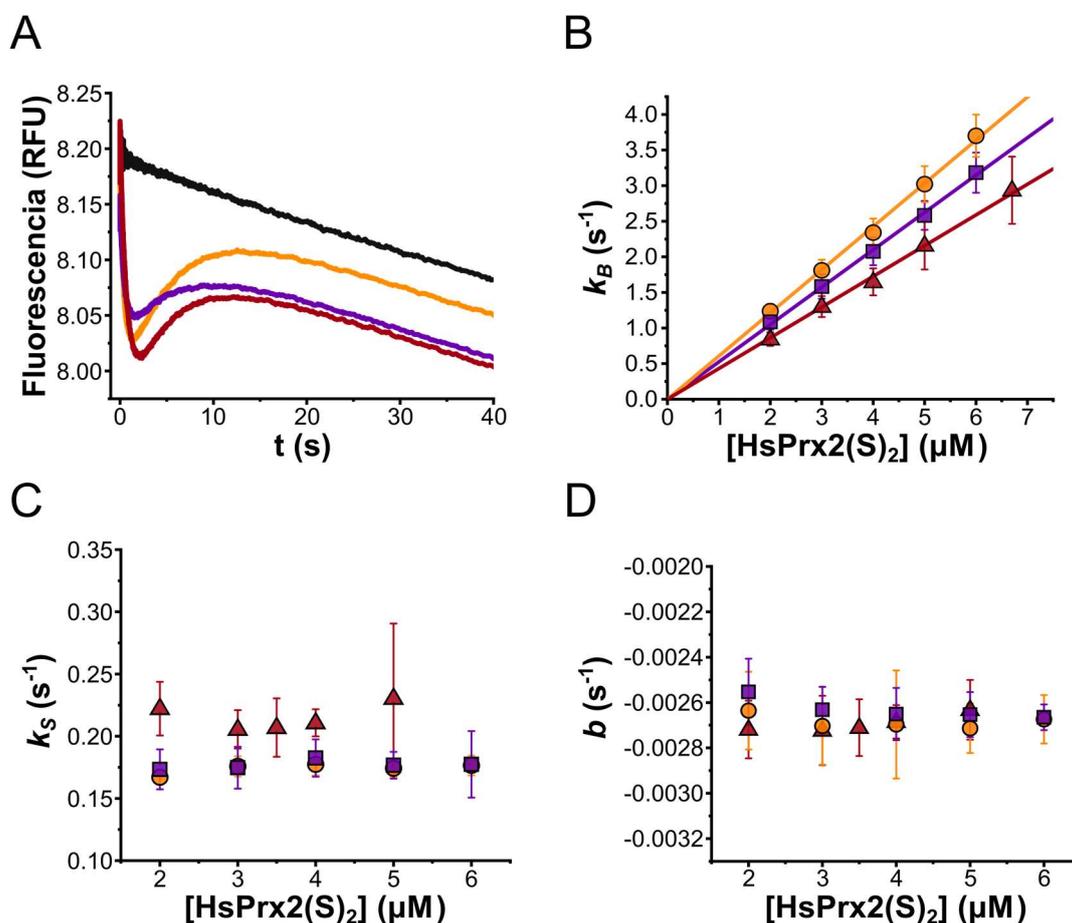


Figura 3.8. Reducción de HsPrx2 por Trx . A. Cursos temporales de la reducción de 4 μM de HsPrx2(S)_2 por 0.2 μM de Trx(SH)_2 en presencia de 1 μM de H_2O_2 . Las líneas representan promedios de diez corridas con *HsTrx1* (naranja, círculos), *HsTrx2* (magenta, cuadrados) o *EcTrx* (rojo, triángulos), y la línea negra es un control sin Trx. El mejor ajuste a la **Ec. 3.6** proporciona dos constantes de velocidad: una para la bajada de los cursos temporales (k_B , B) y otra para la parte ascendente (k_S , C); y una pendiente (b , D). En todos los casos, las barras de error representan la desviación estándar. Las pendientes del mejor ajuste del panel B y las intersecciones con el eje y del panel C están en la **Tabla 3.1**. Los puntos son el promedio \pm desviación estándar de 10 repeticiones.

En el caso de *HsPrx1*, la aplicación de la estrategia experimental fue más desafiante debido a que la velocidad de resolución es más rápida que para *HsPrx2* (12.9 s^{-1}). Si suponemos una constante de segundo orden de $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, la concentración de Trx necesaria para que la constante de velocidad de pseudo primer orden de la reacción 3 sea mayor que 12.9 s^{-1} es de $32 \text{ }\mu\text{M}$. Por lo tanto, realizamos los experimentos con $\text{Trx}(\text{SH})_2$ en exceso y en un rango de 5 a $190 \text{ }\mu\text{M}$, con $0.5 - 5 \text{ }\mu\text{M}$ de *HsPrx1*(S_2) y al menos $10 \text{ }\mu\text{M}$ de H_2O_2 . Al observar los cursos temporales, notamos un aumento inesperado en la fluorescencia durante los primeros 10 ms, seguido de un descenso más lento y marcado, una sección transitoria durante la cual el sistema está ciclando debido a los excesos de H_2O_2 y Trx, y un aumento final en la fluorescencia, que solo se observa después de que el H_2O_2 se agota (**Figura 3.9A**). Los parámetros cinéticos se obtuvieron ajustando la **Ec. 3.6** a los primeros 0.2 s (**Figura 3.9B**). Las dos constantes de velocidad obtenidas, denominadas k_S y k_B (análogamente a *HsPrx2*), se graficaron en función de la concentración de Trx, obteniendo líneas rectas en ambos casos (**Figuras 3.9C, 3.9D**).

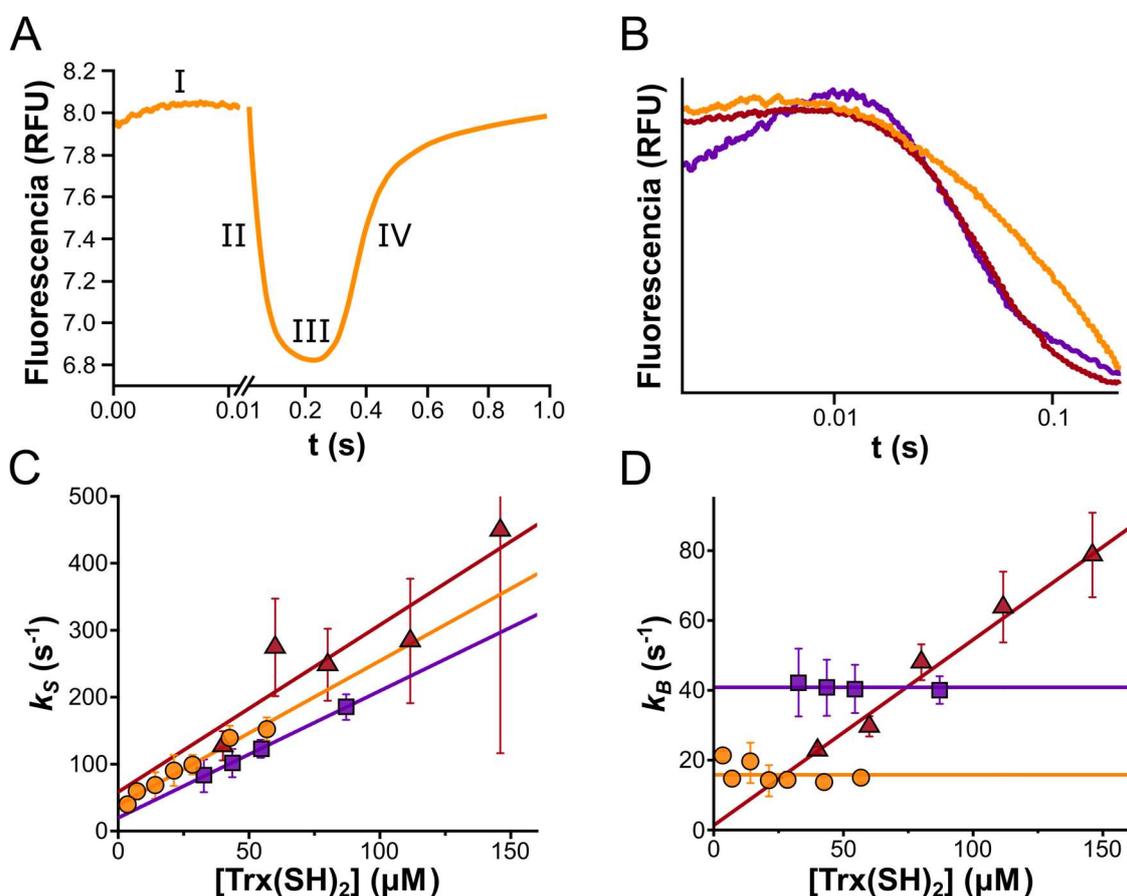


Figura 3.9. Reducción de *HsPrx1* por Trx. **A.** Curso temporal completo de la reacción entre $1.25 \text{ }\mu\text{M}$ de *HsPrx1*(S_2) más $5 \text{ }\mu\text{M}$ H_2O_2 y $68 \text{ }\mu\text{M}$ de *HsTrx1*. **I:** subida exponencial usada para obtener k_S ; **II:** bajada exponencial usada para obtener k_B ; **III:** ciclado del sistema hasta consumir el exceso de H_2O_2 ; **IV:** subida exponencial con $k_{\text{obs}} = 12.7 \text{ s}^{-1}$, consistente con el valor determinado para k_2 . Las líneas son el promedio de 15 repeticiones. **B.** Cursos temporales de reducción de $1.25 \text{ }\mu\text{M}$ de *HsPrx1*(S_2) más $5 \text{ }\mu\text{M}$ H_2O_2 con $45.6 \text{ }\mu\text{M}$ *HsTrx1* (naranja), $3.75 \text{ }\mu\text{M}$ de *HsPrx1*(S_2) más $7.5 \text{ }\mu\text{M}$ H_2O_2 con $54 \text{ }\mu\text{M}$ *HsTrx2* (violeta) y $5 \text{ }\mu\text{M}$ de *HsPrx1*(S_2) más $10 \text{ }\mu\text{M}$ H_2O_2 con $40 \text{ }\mu\text{M}$ *EcTrx* (rojo). **C.** Gráfico de k_S vs. [*HsTrx1*] (círculos naranjas), [*HsTrx2*] (cuadrados violetas) y [*EcTrx*] (triángulos rojos). Las líneas representan el ajuste y las pendientes se encuentran en la **Tabla 3.1**. **D.** Gráfico de k_B vs. [*HsTrx1*], [*HsTrx2*] y [*EcTrx*] (mismo código de formas que en **C**). Las pendientes horizontales (*HsTrx1* y *HsTrx2*) fueron forzadas a 0 para la regresión lineal. Los puntos de las figuras **C** y **D** son el promedio \pm desviación estándar para 15 (*HsTrx1*) 9 (*HsTrx2*) y 13 (*EcTrx*) repeticiones.

La interpretación de los parámetros cinéticos resultó más fácil para *HsPrx2*. Al graficar k_B vs. $[HsPrx2(S)_2]$, obtuvimos una recta que pasó por el origen de coordenadas (**Figura 3.8B**), típico de un proceso bimolecular que depende de la asociación de las dos moléculas para que la reacción ocurra. La constante de segundo orden que sale de esa pendiente puede ser la velocidad de asociación, k_{3a} , de Prx con Trx. Además, en el caso de que 3a (**Figura 3.5**) sea reversible y rápido en ambos sentidos (k_{3A} y k_{-3a}), 3b (**Figura 3.5**) puede aparentar ser un proceso bimolecular definido como la combinación entre la asociación y la formación del disulfuro mixto (k_{3ab}), por lo que la constante determinada también podría ser k_{3ab} . Esta hipótesis cobra sentido al asumir que se establece un equilibrio previo, donde $k_{-3a} > k_{3b}$, siendo k_{3ab} una constante de equilibrio previo ($^{ep}k_{3ab}$) que presenta una dependencia lineal con $[HsPrx2(S)_2]$. Para k_S , el hecho de no depender de $[HsPrx2(S)_2]$ y haber dado un valor casi idéntico al determinado para la resolución⁴², indica que se trata de k_2 . Podemos afirmar que para los resultados con *HsPrx2* el paso limitante de la velocidad fue la asociación, o, ésta junto a la formación del disulfuro mixto. Por lo tanto, el resto de los pasos (k_{3c} y k_{3d}) fueron más rápidos y no limitaron la velocidad en estas condiciones experimentales²¹⁵.

En cambio, para *HsPrx1* el panorama cinético fue un poco más complejo, seguramente porque los experimentos tuvieron que ser realizados a concentraciones de Trx mucho más altas. Para la reacción con las Trx humanas, el gráfico de k_S vs $[Trx(SH)_2]$ (**Figura 3.9C**) dio una recta con ordenada en el origen > 0 , mientras que los valores de k_B (bajada correspondiente a la formación de C_pSOH) demostraron ser independientes de la $[Trx(SH)_2]$ para *HsTrx1* y *HsTrx2* (**Figura 3.9D**). En estos casos, en el gráfico de la **Figura 3.9C** la pendiente sería la velocidad de asociación (k_{3a}) y la ordenada en el origen el paso inverso (k_{-3a}). El hecho de que k_B sea independiente al aumento en $[Trx(SH)_2]$ (**Figura 3.9D**), puede deberse a que exista una dependencia hiperbólica cuya parte ascendente haya quedado fuera del rango de concentraciones usado. Esto se explica si suponemos que se establece un escenario de estado estacionario, donde $k_{3a}[Trx(SH)_2] > k_{-3a} + k_{3b}$ y k_{3ab} sería una constante de estado estacionario ($^{ee}k_{3ab}$) de dependencia hiperbólica con $[Trx(SH)_2]$. También, podría ser que k_{3c} o k_{3d} (ambos independientes de $[Trx(SH)_2]$), al ser más lentos pudieran estar limitando la velocidad²¹⁵. Algo a destacar, es que el valor de la asíntota de la hipérbola es distinto para *HsTrx1* y *HsTrx2* (corte con eje y, **Figura 3.9D**), lo que sugiere que el proceso limitante de la velocidad depende de la Trx en cuestión. En la reacción de *HsPrx1* con *EcTrx*, tanto k_S como k_B mostraron una dependencia lineal con $[Trx(SH)_2]$, por lo que k_S es k_{3a} y k_B es $^{ep}k_{3ab}$.

También se evaluaron las reacciones de reducción de *HsPrx2(S)_2* con triparredoxina de *Trypanosoma brucei* (*TbTxn*) y tiorredoxina 212 de *Entamoeba histolytica* (*EhTrx212*), debido a sus sitios activos no canónicos WCPCP y WCKDC respectivamente. Los resultados se encuentran en la **Tabla 3.1** y los detalles experimentales en el (**Anexo 5.1.7**).

Tabla 3.1. Constantes de segundo orden determinadas para la reducción de PrxS₂ con Trx(SH)₂, TCEP y DTT. Valores obtenidos a partir de los gráficos de las **Figuras 3.6, 3.8, 3.9**. En paréntesis, se indica a qué paso del ciclo catalítico (**Figura 3.5**) corresponde cada constante. Nd. No determinado. El guion (-) indica que no hubo reacción.

<i>Reductor</i>	<i>HsPrx1</i>		<i>HsPrx2</i>	
	<i>k</i> (M ⁻¹ s ⁻¹)			
<i>TCEP</i>	3.66		6.25	
<i>DTT</i>	0.26		7.43	
<i>HsTrx1</i>	$k_S = 2.2 \pm 0.1 \times 10^6$ $k_B = 15.8 \text{ s}^{-1}$	(k_{3a}) (k_{3b}, k_{3c} o k_{3d})	$k_B = 6.1 \pm 0.2 \times 10^5$ (k_{3a} o $^{ep}k_{3ab}$) $k_S = 0.17 \text{ s}^{-1}$ (k_2)	
<i>HsTrx2</i>	$k_S = 1.9 \pm 0.02 \times 10^6$ $k_B = 40.9 \text{ s}^{-1}$	(k_{3a}) (k_{3b}, k_{3c} o k_{3d})	$k_B = 5.2 \pm 0.1 \times 10^5$ (k_{3a} o $^{ep}k_{3ab}$) $k_S = 0.17 \text{ s}^{-1}$ (k_2)	
<i>EcTrx</i>	$k_S = 2.5 \pm 0.6 \times 10^6$ $k_B = 5.3 \pm 0.6 \times 10^5$	(k_{3a}) ($^{ep}k_{3ab}$)	$k_B = 4.2 \pm 0.2 \times 10^5$ (k_{3a} o $^{ep}k_{3ab}$) $k_S = 0.21 \text{ s}^{-1}$ (k_2)	
<i>TbTxn</i>	Nd.		$k_B = 1.1 \pm 0.3 \times 10^5$ (k_{3a} o $^{ep}k_{3ab}$)	
<i>EhTrx212</i>	Nd.		-	

Como se planteó en el capítulo de introducción, la reacción de resolución puede considerarse como un freno que impide que la Prx consuma todo el H₂O₂ como lo harían otras peroxidasas. Esto significa que las Prx podrían detectar niveles mínimos de H₂O₂ y transmitir información para promover la señalización a través de sus formas oxidadas C_pSOH y C_p-C_R⁴¹. Cuando se realizó esa propuesta, aún no existía información detallada sobre las reacciones de reducción. Con las constantes de velocidad determinadas, podemos discutir con mayor profundidad el funcionamiento del ciclo catalítico con relación a la señalización. Primero, podemos preguntarnos en qué circunstancias cada uno de los tres pasos principales del ciclo catalítico (pasos 1, 2 y 3) se convierte en el paso limitante de la velocidad. La respuesta es más clara para *HsPrx2*, ya que su reacción de resolución es muy lenta ($k_2 = 0.2 \text{ s}^{-1}$) y considerando que k_1 y k_3 (para *HsTrx1*) son relativamente rápidas, concentraciones de H₂O₂ > 1.25 nM y *HsTrx1* > 325 nM son suficientes para que la resolución sea el paso limitante de la velocidad.

El caso de la *HsPrx1* es más complejo. La resolución es más rápida ($k_2 = 12.9 \text{ s}^{-1}$) y la reducción tiene un paso limitante que es de orden cero en *HsTrx1* (k_{3b}, k_{3c} o k_{3d}) con una constante de velocidad similar de 15.8 s^{-1} , lo que hace que el paso de reducción sea esencialmente independiente de [*HsTrx1*] y una [H₂O₂] > 120 nM sería suficiente para superar la resolución. Sin embargo, hay otra información que debe considerarse. Cuando el ciclo catalítico se mide utilizando la oxidación de NADPH a través de *EcTrx* y *EcTR* (ensayo acoplado), parece tener un número de recambio entre 2 y 4.8 s^{-1} ^{13,42}. Este sorprendentemente bajo k_{cat} debe surgir de un proceso aún no descrito que enlentece la catálisis. Teniendo en cuenta que los experimentos de reducción se realizaron con *HsPrx1* mayoritariamente en forma de decámeros (según los

resultados del capítulo 2, **Figura 2.8**), mientras que los de ensayo acoplado fueron realizados con 500 nM de *HsPrx1* (mayoritariamente dímeros), podemos plantear que los cambios en la oligomerización durante la catálisis podrían representar un nuevo tipo de freno.

3.2.3. Efecto del pH en la reducción de *HsPrx2* por Trx

Decidimos investigar el efecto del pH sobre el ataque nucleofílico de C_N al disulfuro de Prx, con el objetivo de evaluar cómo las interacciones proteína-proteína dentro del complejo Prx-Trx podrían llegar a cambiar el entorno de esa cisteína y puntualmente su pK_A . En este caso decidimos evaluar la reacción con *HsPrx2* debido a que es más fácil y menos costoso (en términos de Trx) que para *HsPrx1*. Los experimentos fueron realizados de la misma forma que para las determinaciones de las constantes de segundo orden, pero, en TMA, a concentraciones fijas de *HsPrx2*(S)₂ y Trx(SH)₂ y en un rango de pH de 4.5 a 8.5. Las constantes de velocidad aparentes obtenidas de la bajada de fluorescencia (k_B) fueron graficadas en función del pH, obteniendo un perfil tipo campana que se ajustó utilizando la Ec. 3.8 (**Figura 3.10**).

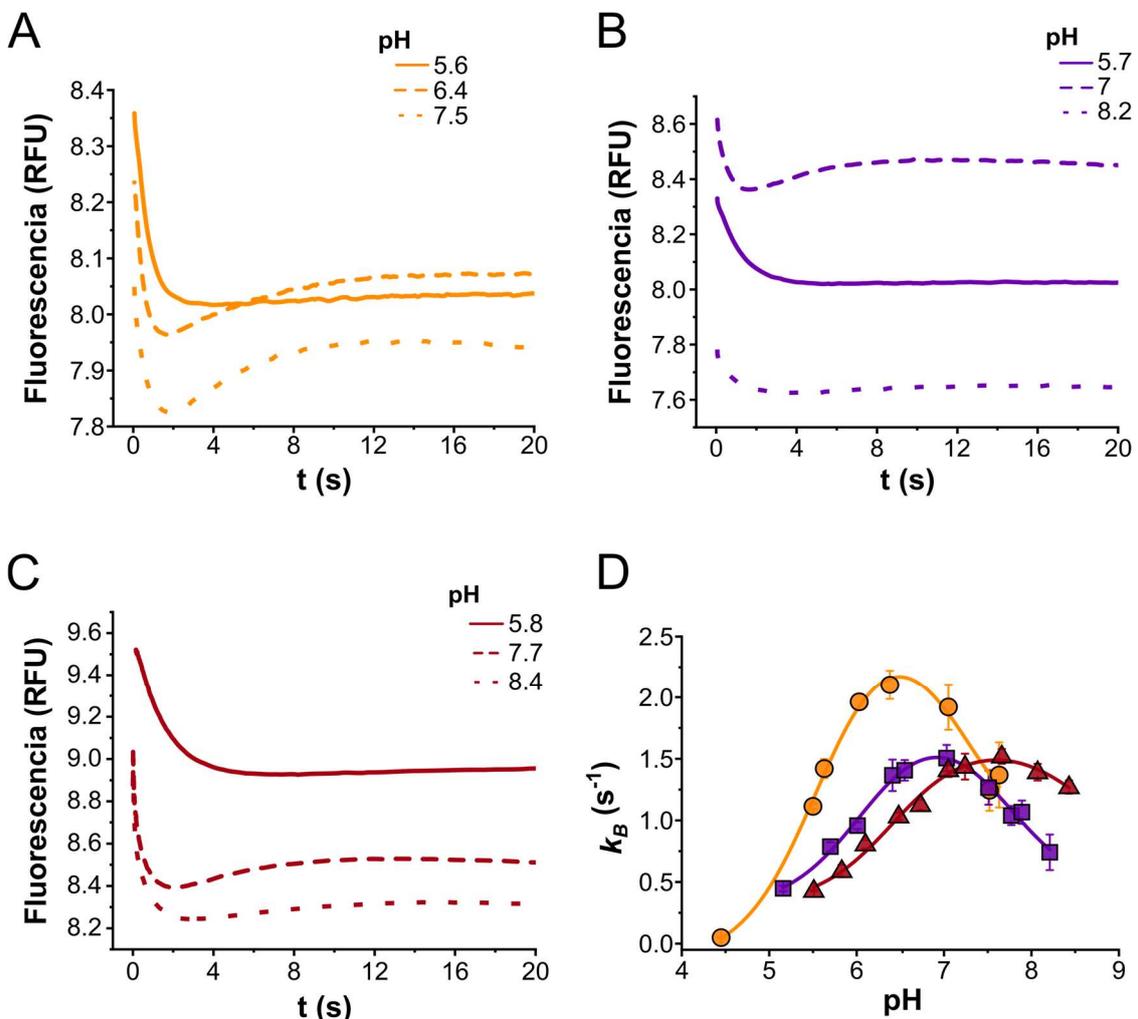


Figura 3.10. Reducción de *HsPrx2* por Trx en función del pH. A-C. Cursos temporales de reacción a distintos valores de pH, para *HsTrx1* (naranja), *HsTrx2* (violeta) y *EcTrx* (rojo). Los trazos son el promedio de 12 corridas. D. Constantes de velocidad (k_B) en función del pH (mismo código de colores y símbolos). Las líneas representan el ajuste a la Ec. 3.8. Los puntos son el promedio \pm desviación estándar de 12 repeticiones.

De los dos valores de pK_A obtenidos a partir del ajuste, decidimos quedarnos con el que corresponde a la parte ascendente de la curva (**Tabla 3.2**), ya que para un tiol nucleófilo se espera que la velocidad observada aumente a medida que el protón se disocia. En otras palabras, conforme aumenta la cantidad de tiolato de C_N disponible, más rápido irá la reacción.

Por otro lado, la parte descendente de la curva resulta inesperada para la reactividad de un tiol, ya que la velocidad debería llegar a un valor asintótico a pH infinito. Además, notamos que el valor del segundo pK_A es distinto para cada Trx. A raíz de estas observaciones, podemos plantear que el segundo punto de inflexión corresponde a la disociación de otro aminoácido en Trx y cerca de C_N , que repercute negativamente en la reactividad. Debido a que el método usado para medir la constante de reducción por Trx depende de que la reacción sea más lenta que la oxidación de Prx por H_2O_2 (k_1), realizamos un control midiendo la oxidación de *HsPrx2* en función del pH para asegurarnos de que la k_{Obs} de la oxidación fuera mayor que k_B . Dentro del rango de pH de trabajo, corroboramos que k_{Obs} es, al menos, 50 veces mayor que k_B (**Anexo 5.1.8**).

Para contrastar estos valores ante una situación en ausencia de interacción proteica, determinamos los valores de pK_A de C_N para cada Trx midiendo la reacción con 4,4-DTDPy en las mismas condiciones experimentales (TMA y rango de pH), siguiendo Abs 324 nm (ver sección **3.1.2**). Los perfiles de reacción en función del pH mostraron el aumento esperado en la k_{Obs} conforme se alcaliniza la solución (**Figura 3.11A-C**), con dos puntos de inflexión para *HsTrx1*, o, uno para *HsTrx2* y *EcTrx*, obtenidos a partir del ajuste con **Ec. 3.8** y **Ec. 3.9** respectivamente (**Tabla 3.2**). Al superponer los gráficos de constante de velocidad vs pH para *HsPrx2(S)*₂ y 4,4-DTDPy, notamos un corrimiento de aproximadamente una unidad de pK_A para C_N para todas las Trx (**Figura 3.11D**).

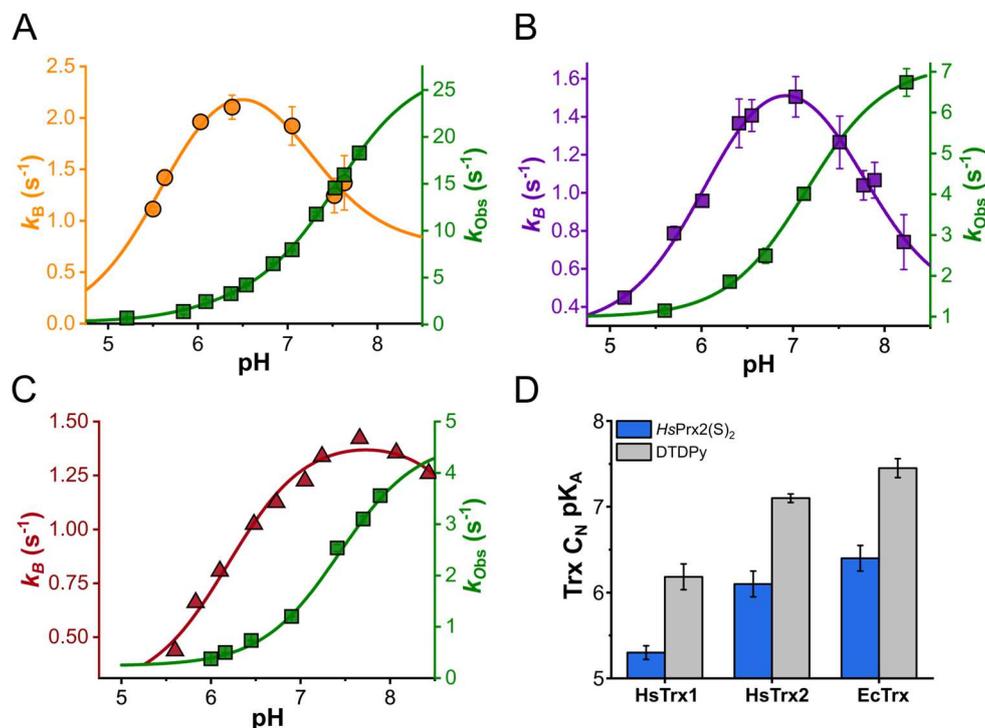


Figura 3.11. Comparación del efecto del pH entre *HsPrx2* y DTDPy. A-C. Gráficos de constante de velocidad (k_B para Trx con *HsPrx2* y k_{Obs} para Trx con DTDPy) vs. pH superpuestos, DTDPy (verde), *HsTrx1* (naranja), *HsTrx2* (violeta) y *EcTrx* (rojo). Los datos de Trx son los mismos de la **Figura 3.10**. Los puntos de 4,4-DTDPy son el promedio \pm desviación estándar de 15 repeticiones. D. Comparación de valores de pK_A de C_N , obtenidos de la fase ascendente de las curvas (primer pK_A del ajuste en el caso de **Ec. 3.8**). Los valores son el promedio \pm desviación estándar.

Tabla 3.2. Valores de pK_A de la cisteína nucleofílica de Trx determinados en este trabajo para las reacciones con *HsPrx2* y 4,4-DTDPy y reportados en la literatura. Ne: este valor no se encontró reportado.

<i>Trx</i>	pK_A		
	<i>HsPrx2</i>	4,4-DTDPy	Literatura
<i>HsTrx1</i>	5.3 ± 0.18	6.1 ± 0.14 7.6 ± 0.14	6.3^{216}
<i>HsTrx2</i>	5.9 ± 0.24	7.1 ± 0.05	Ne.
<i>EcTrx</i>	6.2 ± 0.2	7.4 ± 0.11	6.7^{217} $7.2 - 7.5^{214}$ $7.1 - 7.4^{218}$ 6.5^{219} 7.1^{220}

A pesar de la notoria ganancia de acidez de C_N en el contexto de la reacción con *HsPrx2*, esta diferencia de aproximadamente una unidad en el pK_A no representa una contribución significativa a la cantidad de tiolato. Por ejemplo, a $pH = 7.4$, C_N de *HsTrx1* presenta un 95% según el $pK_A = 6.1$ determinado con 4,4-DTDPy, mientras que la interacción con *HsPrx2* reduce el pK_A a 5.3, lo que produce un 99% de tiolato. Esta diferencia del 4% probablemente se perdería dentro de la dispersión de los resultados experimentales. Por lo tanto, el cambio en el pK_A no explica el cambio en la reactividad, sin embargo, revela que la interacción Prx-Trx resulta en una modificación significativa del entorno de C_N en Trx.

3.2.4. Reducción y transición desde LU a FF

La formación del enlace disulfuro en Prx genera un importante rearrreglo conformacional que culmina con el sitio activo en el estado LU. No obstante, sabemos que el sitio activo tiene que estar en la conformación FF para poder reaccionar de forma rápida con H_2O_2 . Teniendo en cuenta esta plasticidad conformacional, se puede considerar como si las Prx tuvieran dos sitios activos diferentes: uno para Trx en la conformación LU y otro para los hidroperóxidos en la conformación FF. La velocidad de la transición LU-FF tras la reducción sigue siendo una incógnita, por lo que decidimos intentar medirla y verificar si Trx facilita el cambio conformacional. El experimento se realizó en el stopped-flow con la configuración de mezcla secuencial (ver sección 3.1.2.). En el primer paso, $\text{HsPrx2}(\text{S})_2$ se mezcló con un exceso de reductor (ya sea $\text{HsTrx1}(\text{SH})_2$ o TCEP). Después de un tiempo predefinido (tiempo de espera, 2-80 s), una segunda mezcla con un exceso de H_2O_2 (1 μM) empuja la mezcla de reducción al compartimento de la celda, donde se mide la emisión de fluorescencia correspondiente a la oxidación.

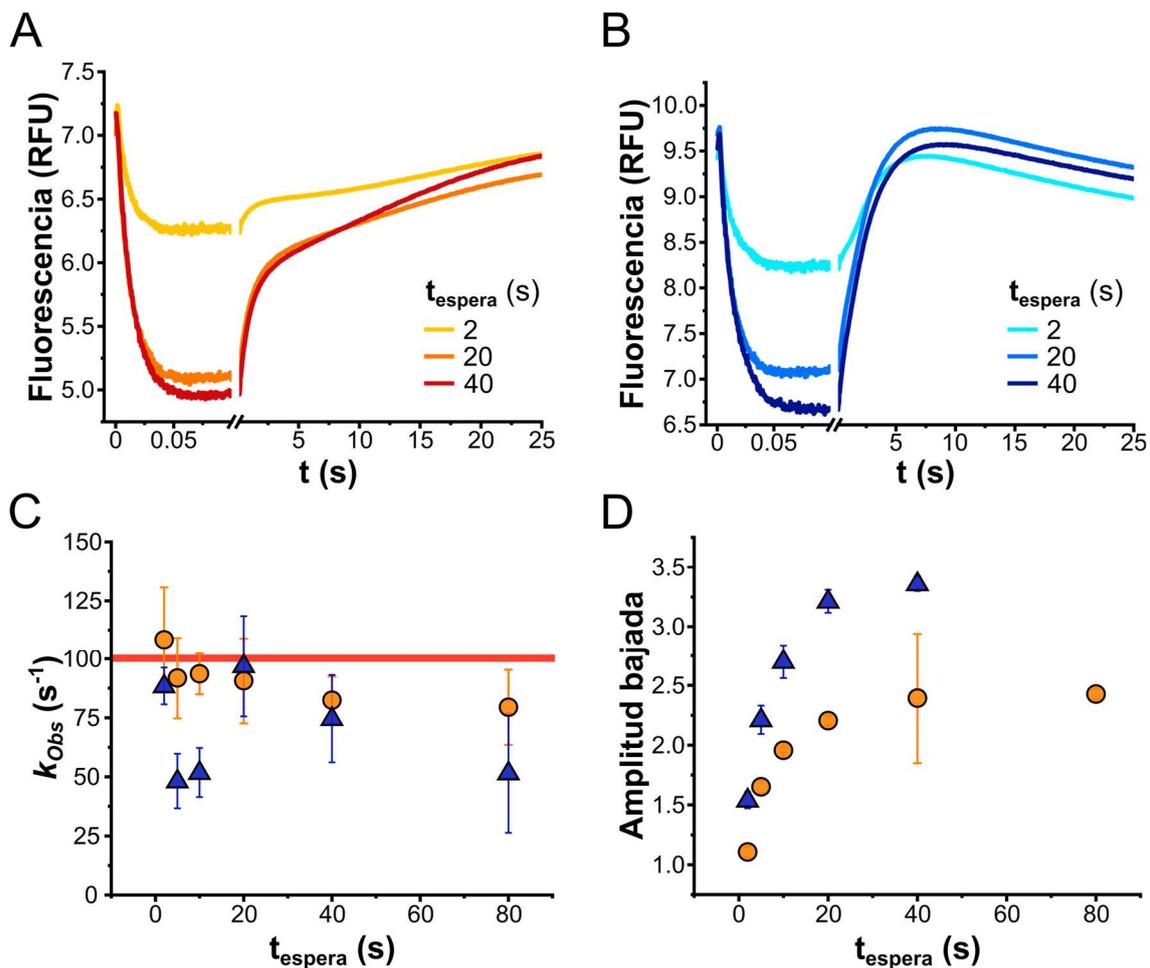


Figura 3.12. Transición LU-> FF de HsPrx2 luego de la reducción con HsTrx1 o TCEP. Cursos temporales de la oxidación de 0.4 μM HsPrx2 con 1 μM H_2O_2 , a distintos tiempos de espera luego de reaccionar con 1 μM HsTrx1 (A) o 65 mM TCEP (B). Los trazos son el promedio de 5 repeticiones. C. k_{Obs} de la bajada (formación $\text{C}_\text{P}\text{SOH}$, reacción 1, Figura 3.5) en función del tiempo de espera para HsTrx1 (círculos naranjas) y TCEP (triángulos azules). La línea roja marca el valor de k_{Obs} esperado para la concentración de H_2O_2 usada. D. Amplitud de la bajada en función del tiempo de espera, mismo código de símbolos y colores que para C. Los parámetros fueron obtenidos a partir del ajuste de la bajada de fluorescencia (Ec. 3.7) y son el promedio \pm desviación estándar de 5 repeticiones.

Particularmente, nos enfocamos en la caída de fluorescencia correspondiente al primer paso de reacción (reacción 1, **Figura 3.5**), ya que si ocurre con la constante aparente esperada para la concentración de H_2O_2 usada (para $1 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$, $k_{\text{Obs}} \geq 100 \text{ s}^{-1}$) confirmamos que la Prx está funcionando como cuando está previamente reducida. En todos los casos, la constante de velocidad observada coincidió con la obtenida con *HsPrx2* previamente reducida (**Figura 3.12C**), lo que implica que la transición LU-FF es más rápida que la reducción bajo las condiciones experimentales y que si Trx favorece la transición, esto no es observable en el marco temporal del experimento. Tampoco se vieron diferencias al comparar con TCEP, lo que da indicios de que la presencia de Trx, a priori, no tiene un rol en el replegado del sitio activo. Para algunos tiempos de espera (**Figura 3.12C**) obtuvimos valores de k_{Obs} más bajos de los esperados y notamos que esto tenía que ver con el tiempo que llevaba preparada la solución stock de H_2O_2 de $2 \mu\text{M}$ en agua. A raíz de esto, sospechamos que en estos casos el H_2O_2 se descompuso y la concentración en la celda de medición fue menor. Preparar la solución en la jeringa a partir de stocks de H_2O_2 más concentrados (5 mM) mejoró los resultados. Otra observación interesante tiene que ver con la amplitud de la bajada de fluorescencia (**Figura 3.12D**) que incrementa hasta ciertos tiempos de espera y después permanece constante. Esto tiene que ver con el avance de la reacción de reducción en el compartimiento de pre-mezcla, ya que cuanto más *HsPrx2* reducida haya, mayor será el cambio en la amplitud de la señal para la bajada de los cursos temporales (**Figura 3.12A, 3.12B**). Independientemente del avance en la reacción de reducción, los valores de k_{Obs} se mantuvieron constantes.

En teoría, el equilibrio conformacional FF-LU también podría ser un paso limitante de la velocidad en el ciclo de las *AhpC/Prx1*. Sin embargo, observamos que la renaturalización del sitio activo de *HsPrx2* al estado FF fue independiente de la presencia de *HsTrx1* y más rápido que la velocidad de reducción en nuestras condiciones experimentales. Esto va en favor de la noción de que la resolución es el paso limitante en el ciclo catalítico de *HsPrx2*.

3.2.5. Análisis inicial de la dinámica estructural de la interacción Prx-Trx

A la fecha, no se han reportado estructuras de complejos entre miembros de la subfamilia AhpC/Prx1 y Trx. Existe una sola estructura de *HsPrx2* en su forma de disulfuro⁵², mientras que la única estructura disponible de *HsPrx1(S)*₂ tiene una molécula de CHAPS unida al disulfuro y es una mutante (C83S)²²¹. Esto nos motivó a generar los complejos entre *HsPrx2(S)*₂ y *HsTrx1*, *HsTrx2* y *EcTrx* en su estado tiol reducido, utilizando docking proteína-proteína en la plataforma web HADDOCK2.4 (ver sección 3.1.3.). Inicialmente, intentamos realizar el docking “a ciegas”, pero no obtuvimos resultados razonables desde el punto de vista químico, ya que la Trx quedaba posicionada lejos del disulfuro de *HsPrx2* y su sitio activo fuera de la interfase de interacción esperada (**Anexo 5.1.9**). Por lo tanto, decidimos guiar el docking (utilizando los criterios descritos en 3.1.3.) para obtener un complejo reactivo, es decir, un complejo en el que probablemente ocurriría la reacción química. Posteriormente, realizamos simulaciones de dinámica molecular de 500 ns para cada complejo, con el objetivo de evaluar las características estructurales y dinámicas de la interacción Prx-Trx.

En los complejos obtenidos a partir del docking guiado, la Trx une en su surco al C_R Loop en la conformación LU y C_N se posiciona en el entorno de C_R del disulfuro desde un lado o desde arriba (de forma análoga a **Figura 3.4**), como fue dispuesto en el protocolo de docking. Lo interesante de este resultado, es que la hipótesis inicial de cómo podría ser el complejo representó soluciones de docking excelentes según los parámetros de puntuación de la plataforma (Z-score). Destacamos que la observación de complejos de Trx y otros sustratos en el PDB, fue clave para generar una orientación razonable entre Prx y Trx en los complejos (**Figura 3.4**). En esta orientación, la Trx “apoya” su sitio activo sobre la pequeña superficie hidrofóbica que rodea al disulfuro en Prx, la cual únicamente se encuentra accesible en el estado LU (**Figura 3.13**). Identificamos una superficie de interacción anfipática que comprende dos regiones: la región 1 consiste en un núcleo hidrofóbico que involucra C_N, el disulfuro de *HsPrx2* y otros residuos apolares; la región 2 contiene aminoácidos que establecen interacciones polares entre sí durante las simulaciones y se localiza alrededor de la región 1 en distintos puntos dependiendo del complejo (**Figura 3.13**). Algunas características de los complejos quedan resumidas en la **Tabla 3.3**.

Tabla 3.3. Características de los complejos *HsPrx2*-Trx generados por docking. *Datos obtenidos del servidor PDBsum. #Valores calculados a partir de 1000 fotos (n = 1000), el error representa el desvío estándar de la distribución normal de los datos.

Trx	*Área superficial (Å ²)	*Residuos en interfase	Z-score	#ΔG _{Unión} (kcal/mol)
<i>HsTrx1</i>	1021	14	-122 ± 6	-42.1 ± 6.2
<i>HsTrx2</i>	910	11	-106 ± 2	-41.7 ± 7.0
<i>EcTrx</i>	895	10	-103 ± 5	-32.9 ± 6.5

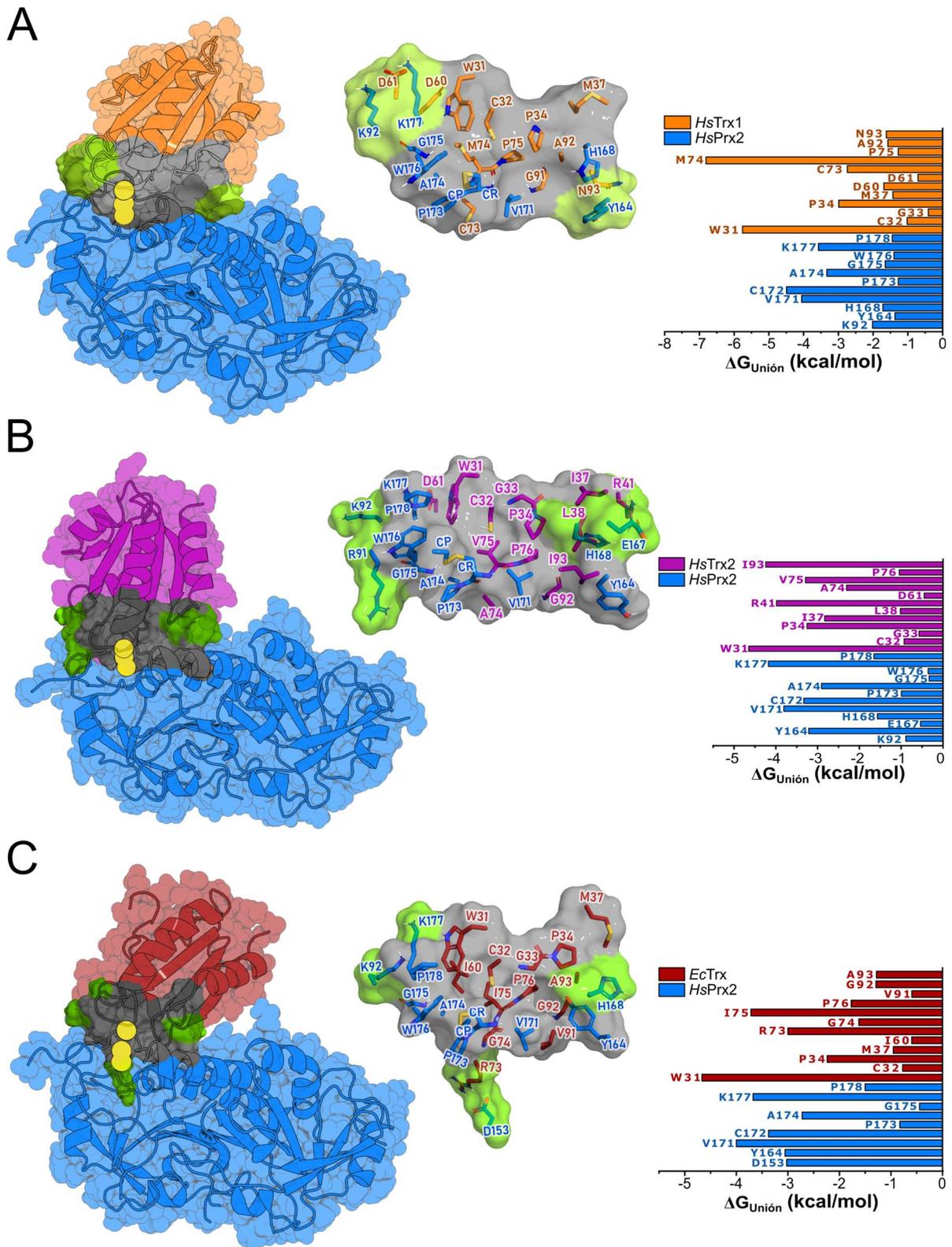


Figura 3.13. Complejos HsPrx2-Trx. Se muestran los complejos obtenidos a partir del docking para HsPrx2(S)₂ (azul) y HsTrx1 (naranja, **A**), HsTrx2 (violeta, **B**) y EcTrx (rojo, **C**), en representación “cartoon” y superficie transparente. Las cisteínas del disulfuro de HsPrx2 y C_N se indican como esferas amarillas. Dentro de esta representación, se destacan las regiones de interacción 1 (hidrofóbica, gris) y 2 (polares, verde). En la figura del medio de cada panel, se muestra un zoom de la interfase de interacción como superficie, coloreada según las regiones. Los aminoácidos relevantes se representaron como varillas y se colorearon según HsPrx2 y las Trx en cuestión. Al final de cada panel se muestra un gráfico de barras horizontales de la energía libre de unión, desglosada por residuo. Esta fue calculada utilizando la herramienta MMGBSA, aplicada sobre 1000 fotos (n = 1000) de las simulaciones de 500 ns.

Los cálculos de energía libre de unión ($\Delta G_{\text{Unión}}$) para los tres complejos dieron valores que repiten la tendencia de las constantes de velocidad determinadas, es decir, prácticamente idénticos para *HsTrx1* y *HsTrx2* y apenas inferior para *EcTrx* (**Tabla 3.3**). Luego de definir los residuos de la interfase (ver sección **3.1.3.**) a lo largo de la simulación, realizamos la descomposición de la $\Delta G_{\text{Unión}}$ por residuo para estimar la contribución de cada uno a la $\Delta G_{\text{Unión}}$ global e identificar su importancia en la estabilización del complejo (**Figura 3.13**). En la región 1, los residuos W31, P34, M37, C73, M74, P75, G91, A92 (*HsTrx1*) y V171, P173, A174, G175, W176 (*HsPrx2*) rodean al disulfuro y C_N de Trx, definiendo un núcleo de interacción hidrofóbico. Entre ellos, destacan M74 y C_R (C172) como los residuos más estabilizantes en *HsTrx1* y *HsPrx2* respectivamente. Lo mismo se observó con V74 e I75 en *HsTrx2* y *EcTrx*. Ambos residuos interactúan a través de enlaces de hidrógeno entre los átomos de nitrógeno amida y oxígeno del carbonilo de la cadena principal y orientan el disulfuro hacia el C_N , actuando como punto de anclaje. Esta fue la interacción que quedó definida en el docking y permaneció durante todo el tiempo simulado en todos los complejos (**Anexo 5.1.10**). En el caso de *HsTrx2*, el residuo I93 demostró contribuir más a la $\Delta G_{\text{Unión}}$ que V75 en la región 1. Algo a destacar es que los aminoácidos que más contribuyen a la $\Delta G_{\text{Unión}}$ dentro de la región 1, se encuentran en posiciones conservadas tanto en AhpC/Prx1 como en Trx. Particularmente, la secuencia HGEVCPAGWKP (**Anexo 5.1.10**), en Prx, y el sitio activo canónico WCGPC junto con el loop anterior a la *cis*-Pro (donde se encuentra M74 en *HsTrx1*) en Trx. El hecho de que aminoácidos conservados sean importantes para la estabilización/formación del complejo, sugiere que fueron seleccionados por mecanismos de coevolución, probablemente los de Prx en función de Trx.

La región 2 comprende aminoácidos que forman interacciones iónicas y/o polares entre sí, como D60, D61 y N93 en *HsTrx1*, y K92, Y164, H168 y K177 en Prx2. En este caso, D60 y D61 interactúan con K92 y K177 formando puentes salinos transitorios a lo largo de la simulación (**Anexo 5.1.10**), lo que dotó al complejo de una importante complementariedad electrostática. En el lado opuesto, N93 tiene interacciones de enlace de hidrógeno con H168 y Y164 (**Anexo 5.1.10**). No obstante, la región 2 varía en los complejos con *HsTrx2* y *EcTrx*, observándose otras interacciones iónicas y polares, como R41 (*HsTrx2*) con D167 (*HsPrx2*) y R72 (*EcTrx*) con D153 (*HsPrx2*) (**Anexo 5.1.10**).

3.2.6. Consecuencias energéticas y estructurales de las dinámicas con $C_N S^-$

El tiolato de C_N en Trx ($C_N S^-$) es la especie reactiva que ataca a $HsPrx(S)_2$ y genera el intermediario disulfuro mixto Prx-Trx (reacción 3b, **Figura 3.5**). Por lo tanto, $C_N S^-$ debe estar dentro del complejo para que ocurra la reacción. Para evaluar el efecto del estado de protonación de C_N , realizamos simulaciones de los tres complejos con C_N en forma de tiolato. La $\Delta G_{Unión}$ aumentó sistemáticamente en todos los complejos en comparación con los resultados obtenidos con la forma tiol, lo que significa que $C_N S^-$ tiene un efecto desestabilizador en la interacción Prx-Trx (**Figura 3.14A**).

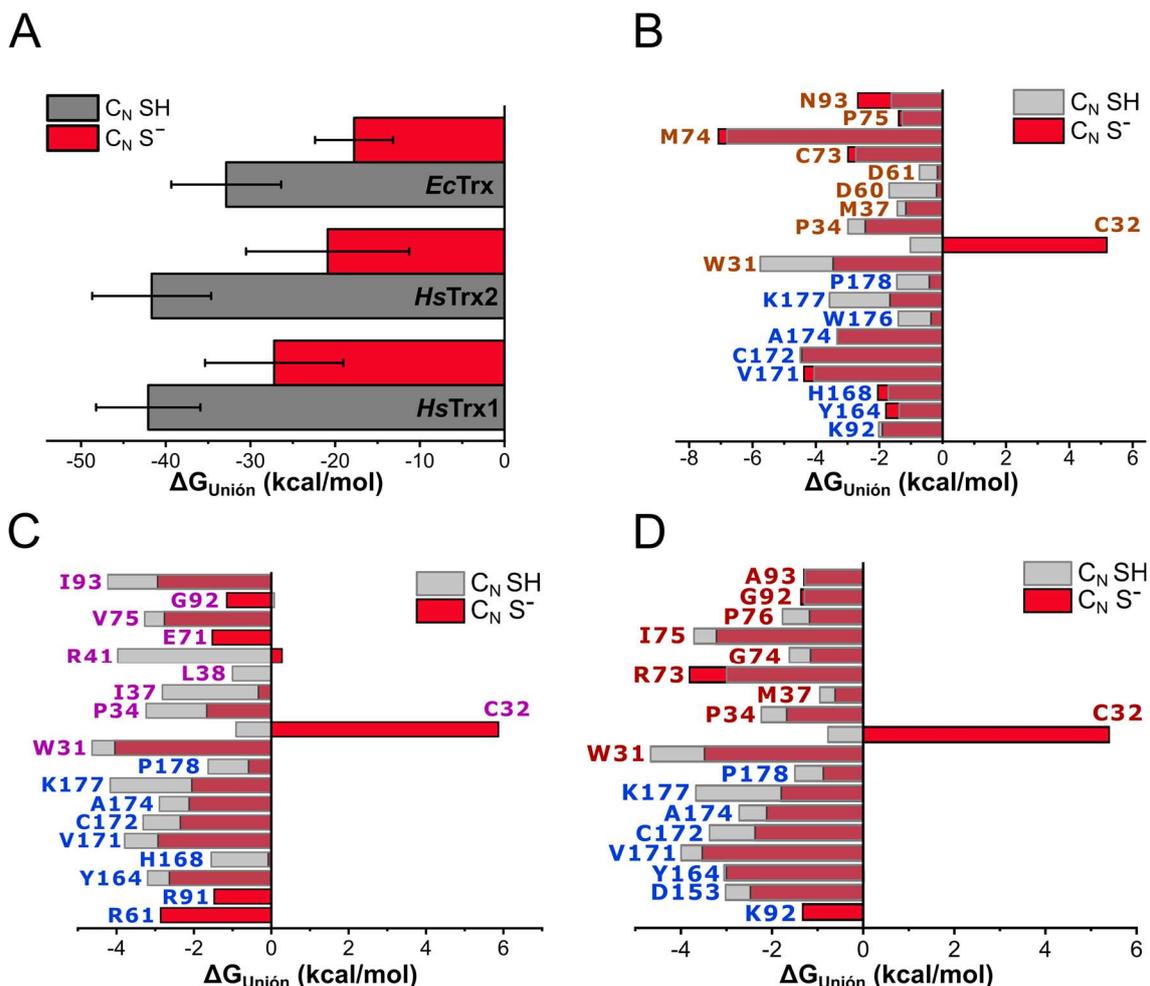


Figura 3.14. Efecto de $C_N S^-$ en la energética de la interacción Prx-Trx. A. Comparación de $\Delta G_{Unión}$ global de los complejos entre las formas tiol (gris) y tiolato (rojo) de C_N . La $\Delta G_{Unión}$ fue desglosada por residuo para los complejos con *HsTrx1* (B), *HsTrx2* (C) y *EcTrx* (D). Los resultados representan la media de la distribución normal de los datos (MM-GBSA, $n = 1000$) y las barras de error (A) el desvío estándar de la distribución.

Esto se confirmó mediante la descomposición de la $\Delta G_{Unión}$ por residuo, donde $C_N S^-$ (C32) incrementa la energía de unión aproximadamente a 5 kcal/mol (**Figura 3.14B-D**). Además, observamos que $C_N S^-$ interrumpe interacciones cercanas en la región 1 (por ejemplo, W31, P34, W176) y tiene un efecto pronunciado en residuos más lejanos en la región 2 (por ejemplo, D60, D61, K92, K177), para el caso del complejo con *HsTrx1*. Al examinar el entorno estructural, notamos que $C_N S^-$ promueve que W31 (Trp conservado de sitio activo) gire desde la región 1 hacia

la región 2, distorsionando las interacciones de D60 y D61 con K92 y K177. El cambio conformacional de W31 de un estado cerrado a uno abierto puede describirse mediante el cambio en el ángulo diedro formado por el carbonilo y los átomos de carbono α , β y γ (**Figura 3.15B**). Los valores alrededor de -50° representan la conformación cerrada, que es la principal región que explora W31 con C_N en forma de tior. Mientras que, en presencia de $C_N S^-$, W31 explora diferentes valores, específicamente 60° (conformación abierta), -50° y -80° (**Figura 3.15C**). A lo largo de la simulación, las fluctuaciones de los valores del diedro coincidieron con el perfil de $\Delta G_{Unión}$ global (**Figura 3.15A**), y observamos que la conformación cerrada se correlaciona con energías de unión más bajas, mientras que la abierta coincide con energías de unión más altas (**Figura 3.15C**).

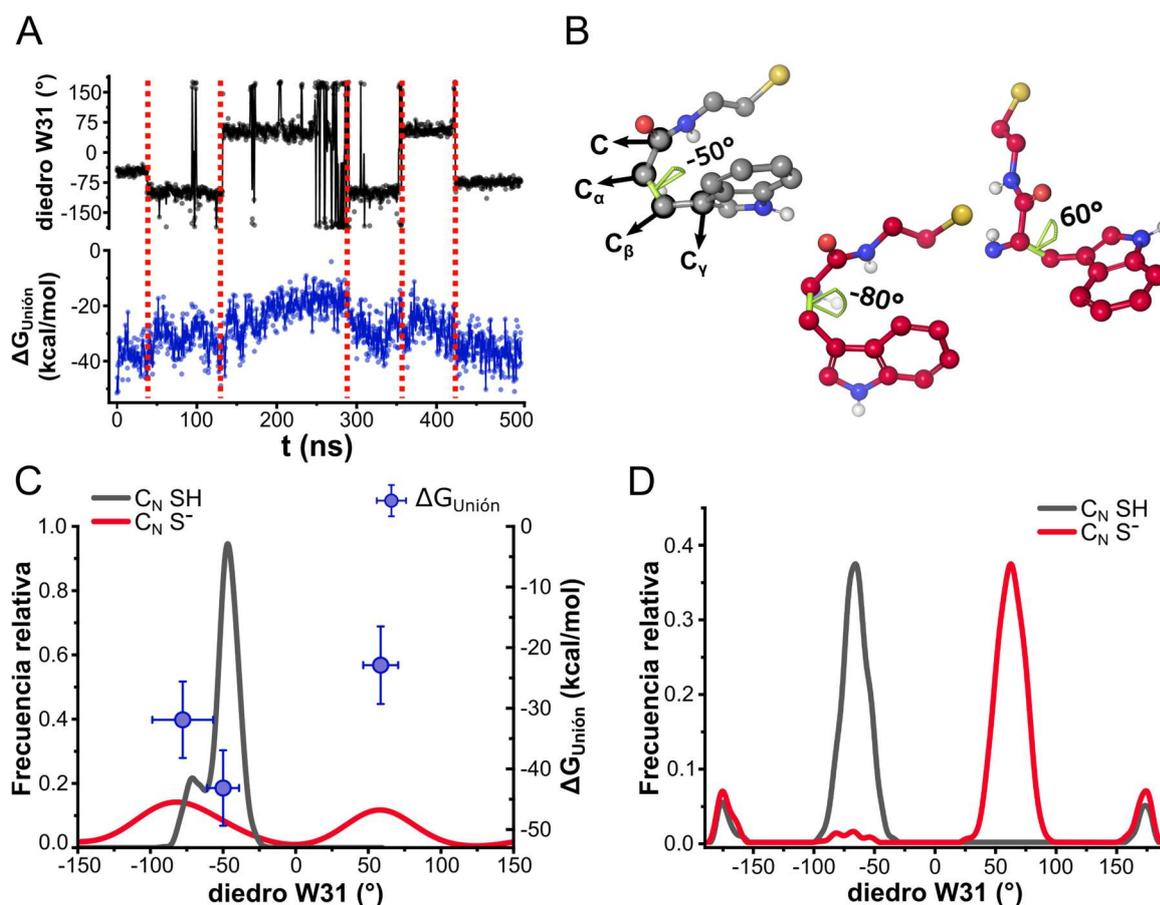


Figura 3.15. $C_N S^-$ induce un cambio conformacional en el W31 de Trx. **A.** Valores del diedro de W31 (negro) y $\Delta G_{Unión}$ (azul) a lo largo de la simulación de *HsPrx2-HsTrx1*. Las líneas rojas discontinuas indican la correspondencia temporal de los “saltos” en los valores. **B.** Representación de esferas y varillas de W31 y C32 en los distintos valores de diedro de W31, definido por los átomos señalados con flechas negras. El enlace pintado en verde representa el eje de rotación entre los dos planos. **C.** Frecuencia relativa del diedro C- C_α -C $_\beta$ -C $_\gamma$ a lo largo de las simulaciones del complejo *HsPrx2-HsTrx1* con $C_N SH$ (gris) y $C_N S^-$ (rojo). Los puntos azules representan la $\Delta G_{Unión}$ promedio para -50° , -80° y 60° . Las barras de error representan la desviación estándar de los valores para 300 fotos ($n = 300$) en cada región. Las curvas fueron construidas usando una distribución tipo Kernel-Smooth a partir de 1000 fotos ($n = 1000$) de la simulación. **D.** Frecuencia relativa del diedro C- C_α -C $_\beta$ -C $_\gamma$ a lo largo de las simulaciones de *HsTrx1* sola en sus formas $C_N SH$ (gris) y $C_N S^-$ (rojo). Las distribuciones se obtuvieron de la misma forma que en **C**.

Los cambios conformacionales del W31 también ocurrieron en las simulaciones de los complejos con *HsTrx2* y *EcTrx* (**Anexo 5.1.11**), lo que sugiere que es una propiedad independiente del complejo e inherente a Trx. Además, al simular *HsTrx1* aislada en las mismas condiciones (**Figura 3.15D**), también observamos el cambio conformacional de W31, aunque en esta condición las

distribuciones fueron más angostas que en el complejo con *HsPrx2*. Lo interesante de este cambio conformacional, es su dependencia con el estado de protonación de C_N . En todos los complejos en el estado tiol, W31 se posiciona a mitad de camino entre C_N y el disulfuro, actuando como barrera estérica (**Figura 3.16C**). Al desprotonarse C_N , W31 se hace a un lado y deja a $C_N S^-$ más accesible para reaccionar. Este mecanismo estérico, garantiza que C_N siempre se encuentre expuesta en su estado reactivo.

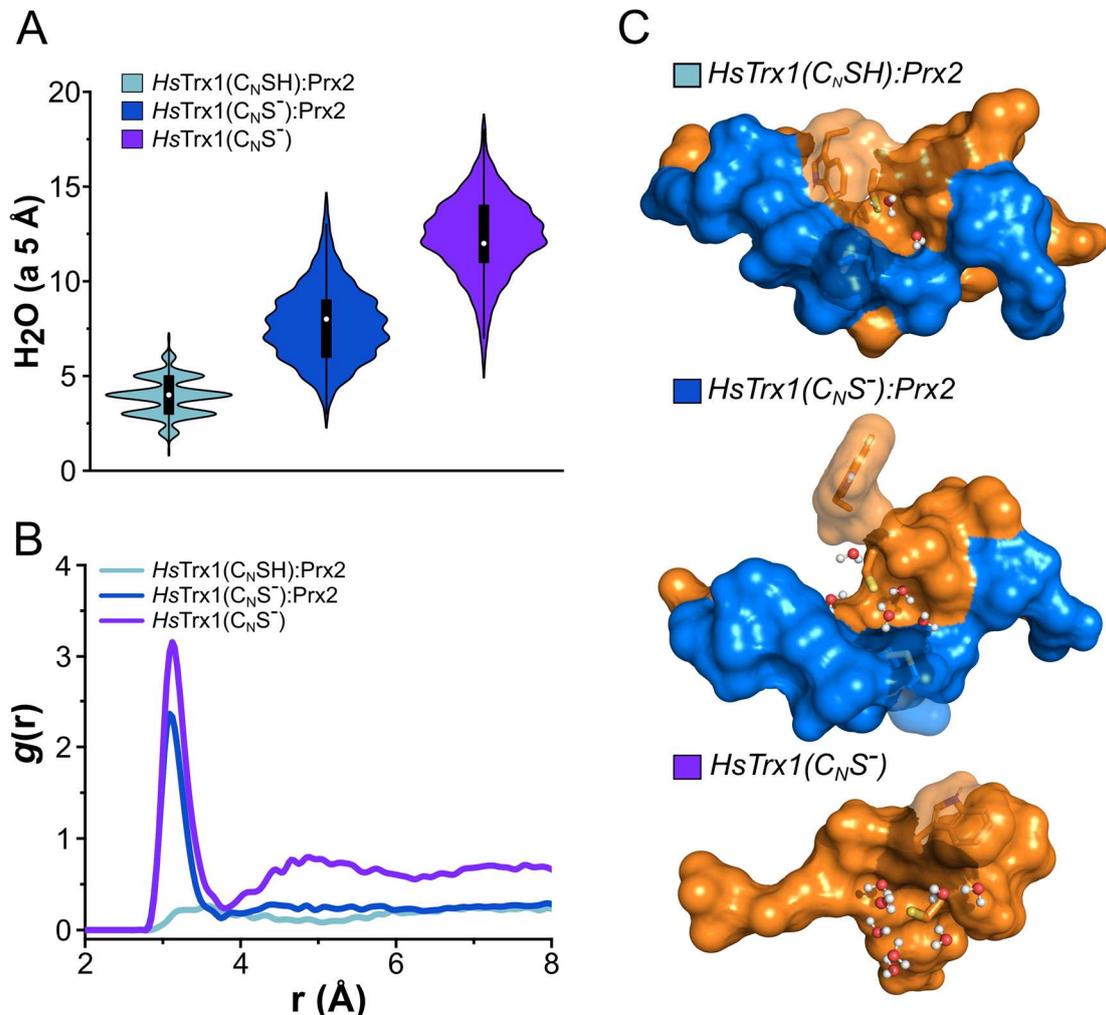


Figura 3.16. El complejo Prx-Trx cubre a $C_N S^-$ del solvente. **A.** Diagrama de violín de la distribución de moléculas de agua dentro de un radio de 5 Å del átomo de azufre de C_N durante el tiempo simulado. Se comparan las condiciones de $C_N SH$, $C_N S^-$ y $C_N S^-$ sin *HsPrx2*. **B.** Función de distribución radial ($g(r)$) de moléculas de agua alrededor del azufre de C_N para las tres condiciones. Los datos en **A** y **B** representan la distribución de valores obtenidos a partir de 1000 fotos ($n = 1000$) de cada simulación de 500 ns. **C.** Representación estructural de las moléculas de agua que rodean al azufre de C_N . W31, C_N y el disulfuro de *HsPrx2* se representan como varillas (detrás de la superficie transparente), mientras que las moléculas de agua se representan como esferas y varillas. Los colores de la superficie, naranja y azul, representan a *HsTrx1* y *HsPrx2*, respectivamente.

Por último, la carga negativa alrededor de $C_N S^-$ en el entorno hidrofóbico de la región 1, no solo produjo un aumento de $\Delta G_{Unión}$, sino que también introdujo moléculas de agua en la superficie de interacción (**Figura 3.16A**). Esto se pudo observar al comparar el tiol y el tiolato de *HsTrx1* C_N en el complejo con *HsPrx2*. Además, utilizando la simulación de *HsTrx1* sola, podemos comparar la solvatación de $C_N S^-$ en ausencia o presencia de la interfase proteica. La función de distribución radial de moléculas de agua alrededor del átomo de azufre de $C_N S^-$, deja en evidencia la

desolvatación del tiolato en presencia del complejo en comparación con *HsTrx1* aislada (**Figura 3.16B**). Teniendo en cuenta que las reacciones de intercambio tiol-disulfuro se ven favorecidas en entornos hidrofóbicos²²² y que la solvatación de tiolatos con solventes polares como el agua atenúa su reactividad²²³, podemos afirmar que la formación del complejo genera un entorno molecular donde la reacción catalizada por Trx se encuentra notablemente favorecida.

3.2.7. Simulaciones del disulfuro mixto C_N-C_R en el complejo *HsPrx2-HsTrx1*

Siguiendo con la secuencia del ciclo catalítico de la **Figura 3.5**, decidimos simular la especie que se forma luego del paso 3b, es decir, el disulfuro mixto entre Prx y Trx. Para generar la estructura de partida, elegimos una foto de las simulaciones del complejo *HsPrx2-HsTrx1* donde C_N estuviera particularmente cerca de C_R , de forma tal de poder crear el nuevo enlace entre cisteínas y romper el enlace disulfuro previo (C_P-C_R). Luego de generar esta estructura de partida y su respectiva topología, realizamos simulaciones de dinámica molecular clásicas de 500 ns, en las mismas condiciones que los otros complejos. En este sistema observamos que W31 vuelve a cambiar su conformación al estado cerrado (-50°) en presencia del disulfuro C_N-S-C_R (**Figura 3.17A**).

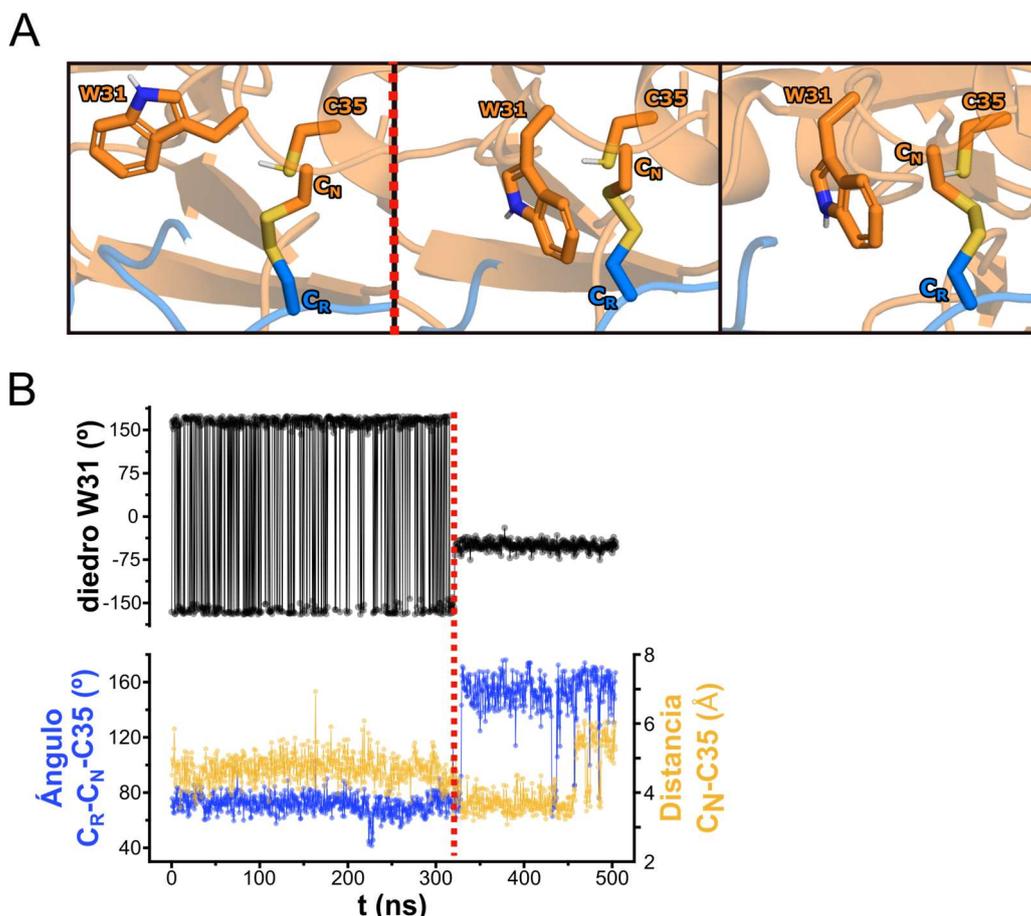


Figura 3.17. Simulación del disulfuro mixto C_N-C_R en el complejo *HsPrx2-HsTrx1*. **A.** Viñetas de las conformaciones relevantes de W31, C_N , C35 (naranja) y C_R (azul). Los residuos fueron representados como varillas. La estructura de *HsTrx1* (naranja) y *HsPrx2* (azul) se representó como “cartoon” en tono transparente. La línea punteada roja se corresponde al panel **B**. **B.** Gráficos del diedro de W31 (negro), ángulo entre los azufres de C_R-C_N-C35 (azul) y distancia C_N-C35 (amarillo) en función del tiempo de simulación. La línea roja punteada representa el momento en el que se cierra W31.

Este movimiento es acompañado de un cambio en la conformación del disulfuro mixto, que termina alineando sus azufres con el de la segunda Cys del sitio activo de *HsTrx1* (C35) y acerca el átomo de azufre de la última con el de C_N . Otro detalle interesante, es que W31 no visita la conformación de diedro de 60° como lo hace en las simulaciones de $C_N S^-$, sino que se encuentra rotando en valores de $\pm 180^\circ$ hasta alcanzar la posición cerrada (**Figura 3.17B**).

El movimiento de cierre del W31 parece ser clave para la reacción del segundo intercambio tiol-disulfuro, en donde C35 realiza un ataque nucleofílico sobre el disulfuro $C_R S-SC_N$ (reacción 3c, **Figura 3.5**). En primer lugar, genera una disposición espacial entre azufres muy similar a lo que se espera para los estados de transición de estas reacciones (estado de transición lineal) y, en segundo lugar, desplaza las moléculas de solvente que se puedan encontrar alrededor de los reactivos, generando un entorno hidrofóbico que aumenta la velocidad de este tipo de reacciones. La importancia del Trp del sitio activo de Trx en su catálisis, ha sido demostrada mediante mutaciones puntuales en distintos trabajos, en los que se observa que la actividad enzimática prácticamente se pierde²²⁴. Los resultados de estas simulaciones explican, en parte, por qué este residuo, que no participa directamente en la química de la reacción, es tan importante en el mecanismo catalítico. Para el primer intercambio tiol-disulfuro, el movimiento de apertura y cierre, expone a C_N cuando está lista para reaccionar ($C_N S^-$) y, para el segundo, posiciona los reactivos adecuadamente generando un entorno químico favorable para la reacción.

3.3. Conclusiones

Las reacciones tiol-disulfuro son lentas en ausencia de catálisis, y sus constantes de velocidad pueden predecirse para especies de bajo peso molecular. Los únicos datos necesarios son el pH, el pK_A de los tioles involucrados y la ecuación empírica para el intercambio tiol-disulfuro determinada por Szajewski et al³². Usando los valores de pK_A reportados en la literatura para *HsPrx2* (4.8 para C_P y 8.5 para C_R ⁴¹) y el valor determinado para C_N de *HsTrx1* con 4,4-DTDPy, se puede estimar una constante de velocidad (análoga a k_{3ab}) de aproximadamente $85 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7. No obstante, las constantes de velocidad obtenidas (**Tabla 3.1**) fueron más de tres órdenes de magnitud superiores a ese valor, lo que sugiere que existen factores adicionales responsables de esta diferencia. El estudio de la interacción Prx-Trx mediante docking y simulaciones de dinámica molecular, demostró que la presencia de residuos no cargados y apolares rodeando C_N (**Figura 3.13**) y el apantallamiento de $C_N S^-$ contra el solvente en el complejo (**Figura 3.16**), pueden ser los factores que expliquen el aumento de la velocidad. Otro factor adicional, proviene de las estimaciones de $\Delta G_{\text{Unión}}$, donde todos los residuos de la interfase estabilizan la interacción excepto $C_N S^-$ (**Figura 3.14**). Alternativamente, podemos plantear que la energía aportada por los residuos de la interfase es utilizada para “pagar” el costo energético de tener un tiolato inestable dentro del complejo para obtener $C_N S^-$ con una reactividad superior.

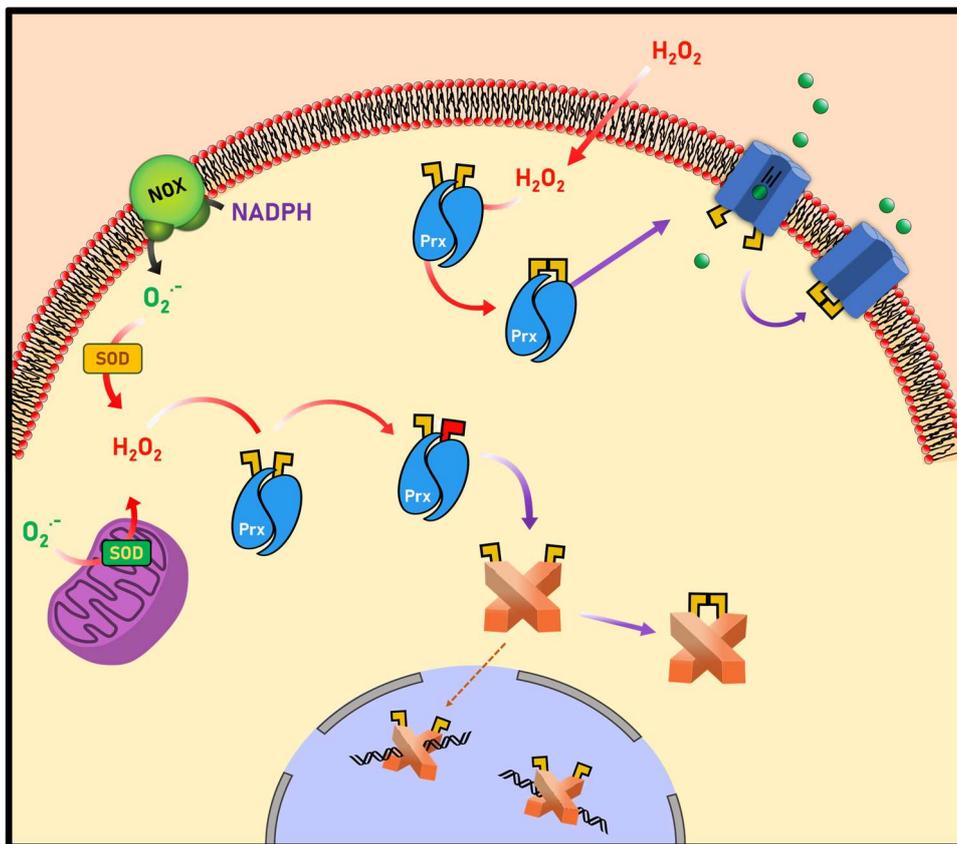
En el proceso de caracterización de la interacción Prx-Trx, encontramos aspectos interesantes del mecanismo de reacción de Trx. Los cambios conformacionales de W31 en las distintas etapas de la reacción (**Figura 3.15, 3.17**), destacan su rol como guía molecular de la catálisis.

Volviendo a la pregunta inicial, de si la reducción podría ser un paso limitante en el ciclo catalítico, podemos concluir que no para *HsPrx2* (la resolución es el paso más lento). En el caso de *HsPrx1*, el panorama es más complejo porque la velocidad de resolución está muy cerca del valor limitante de la velocidad en la reducción (que es independiente de [*HsTrx1*]). Con los valores de velocidad, tenemos un panorama cinético más claro para sostener que es más probable la transferencia de equivalentes de oxidación a través de $C_P SOH$ para *HsPrx2* que para *HsPrx1*. En cuanto a la posibilidad de que el disulfuro C_P-C_R sea el estado oxidado que reaccione con proteínas blanco de señalización (reductores alternativos), va a depender de cómo compita la proteína blanco con Trx. Una posibilidad es la formación de complejos entre Prx y proteínas blanco previo a la oxidación²²⁵, ya sea directamente con el reductor alternativo, o, a través de proteínas de soporte (scaffold) como en el caso ANXA2-STAT3-*HsPrx2*¹⁷⁵. Otra posibilidad radica en la disponibilidad de Trx reducida, que va a depender de que tan “ocupada” esté reduciendo otros sustratos y de los niveles de NADPH.

Por último, a partir de la caracterización estructural del complejo Prx-Trx, podemos extrapolar la información a complejos entre Prx en su estado disulfuro y reductores alternativos. Al igual que Trx, estos reductores seguramente deben tener una Cys que esté expuesta (o pueda exponerse) y rodeada por residuos hidrofóbicos.

Capítulo 4

Caracterización funcional de la señalización a través de Prx



Prefacio

La literatura está colmada de ejemplos que sugieren o destacan la participación de miembros de la familia AhpC/Prx1 en procesos fisiológicos. Sin embargo, aún nos encontramos muy lejos de saber exactamente cómo lo hacen. Los paradigmas de señalización a través de Prx discutidos en la introducción, son el marco conceptual que utilizan muchos investigadores a la hora de buscar el vínculo entre sus observaciones y cambios en los niveles o estado redox de estas peroxidasas. Lo cierto es que muy pocas de estas bases teóricas han sido sustentadas con resultados experimentales que tuvieran el detalle bioquímico necesario. Es por eso, que el estudio de fenómenos de señalización redox mediados por Prx y su integración con otras redes de señalización y/o procesos fisiológicos, es un campo de investigación muy prometedor.

En general, el trabajo de este capítulo consistió en la profundización del estudio de dos ejemplos donde *HsPrx1* y/o *HsPrx2*, pueden llegar a modificar el estado de oxidación de residuos de Cys en proteínas y potencialmente regular su función. El primer ejemplo es el de *HsANXA2*, que se ha vinculado con *HsPrx2* en el eje de señalización *HsSTAT3-HsPrx2* como proteína de soporte (scaffold), jugando un rol fundamental en la oxidación de *HsSTAT3* por H_2O_2 ^{174,175}. A pesar de que *HsPrx2* es la Prx asociada con este eje, no podemos descartar la participación de *HsPrx1*, debido a su alta similitud. Por eso, decidimos estudiar la interacción de las dos Prx con *HsANXA2* en presencia de H_2O_2 . *HsANXA2* pertenece a la familia de las Anexinas, que son proteínas de membrana encargadas de unir y fusionar membranas a nivel intracelular. Particularmente *HsANXA2* se une a los fosfolípidos de fosfatidilserina a través de iones calcio y presenta un residuo de Cys en una hélice N-terminal, que puede exponerse al solvente^{226,227}.

El segundo caso estudiado fue el de la oxidación de la enzima *HsCBS* por H_2O_2 y el rol de *HsPrx1* y *HsPrx2* en este proceso. La *HsCBS* es una de las 3 enzimas capaces de generar H_2S en humanos y se encuentra en el primer paso de la vía de transulfuración, donde se genera Cys a partir de homocisteína^{106,228}. Es una enzima compleja, presenta dos grupos prostéticos (hemo y piridoxal fosfato, tres dominios: intrínsecamente desordenado (función desconocida), catalítico y de regulación. Su estructura consiste en un dímero de aproximadamente 120 kDa que incluso puede formar polímeros fibrilares²²⁹. Presenta 11 Cys en su estructura primaria, tres de las cuales aparecen accesibles al solvente (C15, C272 y C275). C15 se encuentra en el dominio intrínsecamente desordenado y de ahí inferimos que puede llegar a ser accesible, mientras que la accesibilidad al solvente de C272 y C275 puede observarse en estructuras cristalográficas (PDB: 8S5L). Además, se sugiere que este par de Cys forman un disulfuro que puede llegar a tener un efecto regulador de la actividad²³⁰.

Esta parte del trabajo ocurrió en el marco de la pasantía que realicé en el centro de investigación alemán del cáncer (DKFZ, Heidelberg, Alemania) bajo la supervisión del Dr. Tobias P. Dick, en el laboratorio de regulación redox. Estudios previos de este grupo, sugieren que ambas Prx están involucradas en la oxidación de *HsCBS* por H_2O_2 , actuando como facilitadores del proceso¹⁷⁰. Además, otro grupo presentó resultados de espectrometría de masa que demuestran la interacción entre *HsCBS* y las dos Prx¹⁷². En base a estos antecedentes, nos propusimos investigar

si la oxidación de *HsCBS* es mediada por Prx y, en caso de ser así, evaluar si el proceso es específico para alguna de las dos. Por otro lado, decidimos evaluar la sensibilidad de *HsCBS* al H_2O_2 en comparación con Prx y explorar qué residuos de Cys están involucrados en la formación de especies oxidadas. El trabajo realizado para este par de ejemplos, generó resultados preliminares prometedores que allanan camino para el estudio de complejos de señalización redox entre Prx y proteínas blanco de señalización por H_2O_2 .

4.1. Metodología

4.1.1. Procedimientos generales

Amortiguadores de uso general

Se utilizaron los amortiguadores definidos en los capítulos 2 y 3: TMA (pH 6.9-7.1).

Amortiguadores de purificación de proteínas

Para la purificación de *HsANXA2* (IMAC) se utilizó amortiguador de unión IMAC: 50 mM Tris, 300 mM NaCl y 20 mM imidazol, pH 7.8; amortiguador de elución IMAC: amortiguador de unión más 480 mM imidazol (500 mM final), pH 7.8; amortiguador de lisis: amortiguador de unión suplementado con 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1 mg/mL lisozima de huevo de gallina, 5 mM de $MgCl_2$ y 0.6 U/mL de DNAsa.

Preparación de proteínas

Tanto para la reducción, como, para la oxidación estequiométrica y la cuantificación de tioles proteicos y H_2O_2 , se procedió de la misma manera que en los capítulo 2 y 3. Se agregó un paso adicional de desalado con PD-10 luego de la oxidación estequiométrica de Prx, para remover el posible exceso de H_2O_2 . La concentración de proteínas fue determinada mediante espectrofotometría UV a partir de los coeficientes de extinción molar a 280 nm (ϵ_{280}) calculados según la secuencia aminoacídica en la plataforma web ProtParam: *HsPrx1*, $18500 M^{-1} cm^{-1}$; *HsPrx2*, $21500 M^{-1} cm^{-1}$; *HsANXA2*, $33810 M^{-1} cm^{-1}$.

Expresión y purificación de proteínas

Para este capítulo se incorpora el protocolo de expresión y purificación de *HsANXA2*. Contamos con una construcción de *HsANXA2* en un vector pET28a, con resistencia a kanamicina, Histag y sitio de corte para TEVp. La expresión fue realizada en la cepa CodonPlus de *E.coli*. Las células quimiocompetentes se transformaron con 1 a 5 μL del plásmido correspondiente por shock térmico y fueron esparcidas en placas con medio Luria-Bertani-Agar (LB agar) suplementado con 50 $\mu g/mL$ de kanamicina y 30 $\mu g/mL$ de cloranfenicol e incubadas ON a 37 °C. Al otro día, se picaron una o dos colonias de la placa y se colocaron en 10 mL de medio LB suplementado con los mismos antibióticos y se incubó ON a 37 °C y 200 rpm. Al día siguiente, se realizó el escalado con un inóculo 1:100 en 1 L de LB suplementado únicamente con kanamicina 50 $\mu g/mL$ en un matraz de 5 L (relación líquido-volumen 1:5). El cultivo se dejó crecer por aproximadamente 3 h, a 37 °C y 200 rpm, hasta llegar a la fase de crecimiento exponencial (OD_{600nm} 0.6-0.8). En ese momento se indujo la expresión de la proteína mediante el agregado de 0.5 mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 20 °C ON, 200 rpm. Luego de la expresión, el cultivo fue centrifugado a 6000 g por 30 min a 4 °C y el pellet bacteriano se pesó y almacenó a -80 °C hasta el momento de la purificación.

El lisado filtrado se obtuvo de forma análoga a *HsPrx2* (ver sección 2.1.1.). La purificación consistió en una IMAC, en una columna Ni^{2+} Sepharosa HisTrap (Cytiva) de 1 mL, la cual se equilibra con 10

volúmenes de amortiguador de unión IMAC en el cromatógrafo FPLC ÄKTA Prime plus (GE Healthcare). Luego se procedió a sembrar la columna con el lisado filtrado utilizando el sistema SuperLoop (Cytiva) a un flujo de 0.5 mL/min y una vez cargada la muestra, se subió el flujo a 1 mL/min y se lavó con 10 volúmenes de amortiguador unión IMAC. Posteriormente se lavó con una concentración de 60 mM imidazol y por último se eluyó la proteína con 300 mM imidazol. El eluido fue dializado contra amortiguador de unión IMAC a 4 °C ON. La proteólisis con TEVp y la segunda IMAC se realizó de la misma forma que en la sección **2.1.1**. La proteína fue cuantificada por Abs 280 nm y almacenada a -20 °C. Todas las fracciones colectadas fueron sometidas a SDS-PAGE (12% acrilamida) para corroborar la presencia y grado de pureza de la proteína a lo largo del proceso de purificación.

Cultivo celular

Para los experimentos con células de mamífero se utilizó la línea celular HEK293 MSR, estas células expresan el receptor de macrófagos MSR lo que le confiere una mayor adhesión a la superficie de las botellas de cultivo. Las células fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de la mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina, en una estufa a 37 °C y 5% CO₂. Para levantar las células, se aspiró el medio y se lavaron con el mismo volumen de PBS, para luego incubarlas con 1/5 del volumen de medio de la solución Versene (Thermo Fisher) a temperatura ambiente. A continuación, se aspiró la solución y se agregó el mismo volumen de una solución de tripsina (Thermo Fisher), la cual se incubó 2 a 4 min en la estufa. Por último, se agregó DMEM nuevo, se resuspendieron las células y se las contó para realizar las diluciones o pasajes deseados.

Transfección transitoria

Las células fueron transfectadas con las construcciones de *HsCBS* salvaje y mutantes de Cys (C15A, C272A y C275A) con péptido de unión a estreptavidina (SBP) N- o C-terminal, en el vector pcDNA3.1(--) (8 construcciones en total). En el día 1, se levantaron las células de la botella de cultivo, se contaron y plaquearon en la placa deseada. En el día 2, se transfectó 1 µg de ADN cada 100000 células con Lipofectamine2000 (Thermo Fisher) en 1/10 del volumen del pocillo. La mezcla ADN-Lipofectamine se realizó en medio OptiMEM de la siguiente manera: el volumen de OptiMEM se dividió en dos, una mitad para mezclar con el ADN plasmídico (DNAmix) y la otra para mezclar con Lipofectamine2000 (LIPOmix) cuyo volumen es el doble de los µg de ADN necesarios por pocillo. La LIPOmix se vortexeó e incubó 5 min a temperatura ambiente. Luego se mezcló la LIPOmix con la DNAmix y se vortexeó e incubó de 20 a 30 min a temperatura ambiente. Por último, se agregó el volumen indicado de mezcla final (mezcla de transfección) en el pocillo o placa, se incubaron las células y se esperaron 8 h para cambiarles el medio. En el día 3, se realizó el experimento correspondiente. La transfección puede llegar a durar de 24 a 72 h, dependiendo de la proteína.

Knock down de *HsPrx1*

Para bajar los niveles de expresión de *HsPrx1* se utilizó una mezcla de ARN corto de interferencia (siRNA) presente en el laboratorio. Se usaron 250000 células por pocillo en una placa de 6 (2 mL por pocillo) con DMEM sin antibiótico. Se prepararon las mezclas de siRNA en OptiMEM con dharmafECT (en lugar de Lipofectamine2000) de forma análoga al protocolo de transfección transitoria. En este caso, se agregaron 200 µL de mezcla de knockdown por pocillo, donde el volumen de dharmafECT (Horizon Discovery) es 3 veces el de siRNA. Antes de plaquear las células, se agregó la mezcla de knock down en los pocillos. Las células se dejaron ON en la estufa y se le cambió el medio a uno con antibióticos al día siguiente. Se sembró un control con la mezcla siRNA scramble.

Bloqueo de tioles y lisis celular

Los grupos tiol fueron alquilados con una solución de N-etilmaleimida (NEM) 100 mM en PBS que se preservó en hielo antes de aplicar sobre las células. La solución de lisis consistió en 20 mM Tris, 190 mM NaCl, 10 mM NEM, 1% Tritón X-100 y cocktail de inhibición de proteasas (Roche), pH 7.6. Brevemente en placas de 6 pocillos, luego del tratamiento con H₂O₂ o control (PBS), se aspiró el medio y rápidamente se aplicó 500 µL de la solución de NEM 100 mM fría sobre las paredes del pocillo o la placa y se incubó de 5 a 10 min en hielo. Luego, se aspiró la solución de NEM, se agregaron 200 µL de la solución de lisis por pocillo y se incubaron las placas con agitación (por inclinación) a 4 °C de 20 a 30 min. Los lisados se recolectaron en tubos eppendorf y se centrifugaron a 16000xg por 10 min a 4 °C. Por último, se preservaron los sobrenadantes y se les agregó amortiguador de electroforesis con/sin DTT para almacenarlos a -20 °C hasta su análisis.

SDS-PAGE y western blot

Las muestras fueron corridas en geles de 10% de poliacrilamida, la corrida se realizó a 80 V para el concentrador y 120 V para el separador. La transferencia se realizó en membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0.45 µm previamente activadas en metanol puro, en amortiguador Towbin (25 mM Tris, 192 mM L-glicina, 10% metanol, pH 8.3), a 200 V y 2 °C durante 2 h. Las membranas se bloquearon con una solución de PBS con 5% BSA, 0.01% azida de sodio y 0.1% Tween20, durante 1 h a 4 °C con agitación. Luego, se removió la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo primario (1/1000) preparado en la misma solución, ON a 4 °C con agitación. Al día siguiente, se recuperó el anticuerpo primario y se lavó la membrana por 10 min con PBS-Tween20 0.1% a temperatura ambiente con agitación (esto se repitió 3 veces). A continuación, se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (1/10000, en solución de bloqueo) durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación. Luego, se descartó el anticuerpo secundario y se procedió a realizar 3 lavados con PBS-Tween20 0.1% como se describió anteriormente. Por último, se reveló en un equipo Odyssey XF (Li-Cor) por quimioluminiscencia, utilizando el kit SuperSignal West Femto (Thermo Fisher), con un tiempo de exposición de 30 s.

4.1.2. Procedimientos específicos

Cinética de oxidación de *HsANXA2* por SEC

La oxidación de 5 μM de *HsANXA2* por 500 μM H_2O_2 en ausencia/presencia de 5 mM CaCl_2 , fue seguida por SEC en un equipo HPLC Agilent 1260 con una columna Superdex 200 5/150 GL (Cytiva). Previo a los experimentos, se realizó una curva de calibración de la columna con distintos estándares de peso molecular: tiroglobulina (660 kDa), ferritina (440 kDa), aldolasa (160 kDa), conalbúmina (76 kDa) y ribonucleasa (13.7 kDa), a 1 mg/mL cada una (**Anexo 5.1.1**). Las corridas se llevaron a cabo en TMA, a un flujo de 0.4 mL/min a temperatura ambiente (22-25 °C). Las muestras se inyectaron en un volumen de 40 μL con un loop de 300 μL . En cada corrida se registró la emisión de fluorescencia a 320 nm utilizando una excitación de 280 nm (también se registraron las señales de Abs a 280 y 210 nm). Las fracciones relativas de monómeros y dímeros de *HsANXA2* (F_M o F_D), se calcularon a partir de los cromatogramas considerando el área bajo la curva (ABC) para el pico del monómero ($t = 5.4$ min) y el dímero ($t = 4.8$ min), según la siguiente ecuación:

$$F_M = \frac{ABC_{\text{monómero}}}{ABC_{\text{monómero}} + ABC_{\text{dímero}}}, F_D = 1 - F_M \quad \text{Ec. 4.1}$$

La fracción relativa de monómeros se ajustó a la siguiente función monoexponencial:

$$y = Ae^{(-k_{\text{Obs}}*x)} + C \quad \text{Ec. 4.2}$$

Donde y es F_M , A es la amplitud de la exponencial, x es el tiempo y C es F_M al final de la reacción.

SDS-PAGE de oxidación de *HsANXA2* por Prx

Se evaluó la capacidad de *HsPrx1* y *HsPrx2* de oxidar *HsANXA2* en presencia de H_2O_2 y la cinética de reacción de *HsANXA2* por *HsPrx2*(S)₂ mediante SDS-PAGE no reductora (sin β -ME). Para el primer caso, se inició la reacción en TMA mediante el agregado de Prx, *HsANXA2* y H_2O_2 en distintas concentraciones y orden. Se incluyeron controles de las proteínas completamente oxidadas y reducidas. Para la cinética de reacción entre *HsANXA2* y *HsPrx2*(S)₂, *HsANXA2* se redujo y *HsPrx2* se oxidó estequiométricamente previo a la reacción. En un volumen final de 300 μL , se hizo reaccionar 4 μM *HsPrx2*(S)₂ con 10 μM *HsANXA2* durante una hora, en presencia o ausencia de 10 mM CaCl_2 . A distintos tiempos (0, 5, 10, 20, 40 y 60 min), se tomó una alícuota de 20 μL de reacción que se agregó a una solución para detener la reacción, compuesta por iodoacetamida (IAM, 75 mM concentración final) y amortiguador de electroforesis. Las distintas fracciones fueron calentadas a 95 °C por 5 min antes de ser sembradas en geles de 12% de poliacrilamida. La tinción de los geles fue realizada con azul Coomassie coloidal. Las bandas de interés se cuantificaron por carril, mediante densitometría en el software ImageJ, y fueron normalizadas por el valor de la intensidad total del carril.

Estudio de la interacción *HsANXA2*-Prx por fasores

En el capítulo 2, observamos que es posible evidenciar la interacción entre proteínas a partir del análisis de τ por fasores (ver sección 2.2.7.). En esta oportunidad, realizamos el experimento con mezclas 1:1 (Prx:*HsANXA2*) a distintas concentraciones, en TMA suplementado con DTT a 25 °C.

Las mediciones de τ se realizaron en el dominio de frecuencia con el espectrofluorómetro ISS ChronosFD. La fuente de luz fue un LED de 284 nm, modulado por sintetizadores de frecuencia en un rango de 10 a 200 MHz. Se utilizó un filtro de paso de banda de 280 nm en el camino de excitación. La emisión de fluorescencia se registró a través de un filtro de paso largo WG320 (320 nm) y se utilizó N-acetil-L-triptofanamida (NATA) como referencia ($\tau = 2.8$ ns a 25 °C).

Docking proteína-proteína

Los complejos entre *HsPrx2* y *HsANXA2* fueron generados usando la plataforma Haddock 2.4^{205,206}. Las estructuras fueron obtenidas de la PDB (5IJT y 5LPU). El docking se realizó con los parámetros por defecto en la versión de avanzada de la plataforma, definiendo a la Cys N-terminal de *HsANXA2* (C9) y las Cys del disulfuro de *HsPrx2* como residuos activos de interfase. De los 5 grupos de estructuras obtenidas, nos quedamos con la que posicionó a C9 más cerca del disulfuro.

Oxidación de *HsCBS*-SBP en células HEK293 MSR

Para evaluar la oxidación de *HsCBS* se transfectaron células HEK293 MSR con el grupo de construcciones que presentan SBP en el extremo C-terminal. Las células se oxidaron con H₂O₂ en dos formatos: uno donde se realizaron tratamientos puntuales con concentraciones de H₂O₂ de 0 (PBS), 5, 20, 50, 100 y 200 μ M (concentración final en el medio) durante 30-40 s. Estos ensayos se realizaron para *HsCBSwt* y mutantes de Cys, en placas de 6 pocillos, donde se sembraron 250000 células por pocillo en el día 1, se transfectaron con los plásmidos correspondientes el día 2 y se trataron con H₂O₂ en el día 3.

La otra modalidad consistió en hacer cinética, empezando con el agregado de 60 μ M H₂O₂ y deteniendo la exposición a distintos tiempos a lo largo de 300 s. Este ensayo se realizó para *HsCBSwt*, en placas de 12 pocillos, donde se sembraron 125000 células por pocillo en el día 1, se transfectaron en el día 2 y se trataron con H₂O₂ en el día 3. En ambos casos, la exposición a H₂O₂ se detuvo de la forma descrita en "Bloqueo de tioles y lisis celular". Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y western blot. El análisis de las bandas obtenidas en el western blot fue realizado por densitometría con la herramienta ImageJ. Todas las bandas fueron normalizadas por la banda de β -tubulina (control de carga) en cada carril.

4.2. Resultados y discusión

4.2.1. Oxidación directa de *HsANXA2* con H_2O_2

Para poder tener una referencia de la reactividad de *HsANXA2*, decidimos oxidarla con un exceso de H_2O_2 400 μM y seguir la reacción por SEC (Figura 4.1A), ya que se ha reportado que *HsANXA2* forma homodímeros al oxidarse. A lo largo de las 2 h del experimento, observamos picos con tiempos de retención de 5.4 y 4.8 min, correspondientes al peso molecular esperado para el monómero y dímero de *HsANXA2*, 39 y 78 kDa, respectivamente.

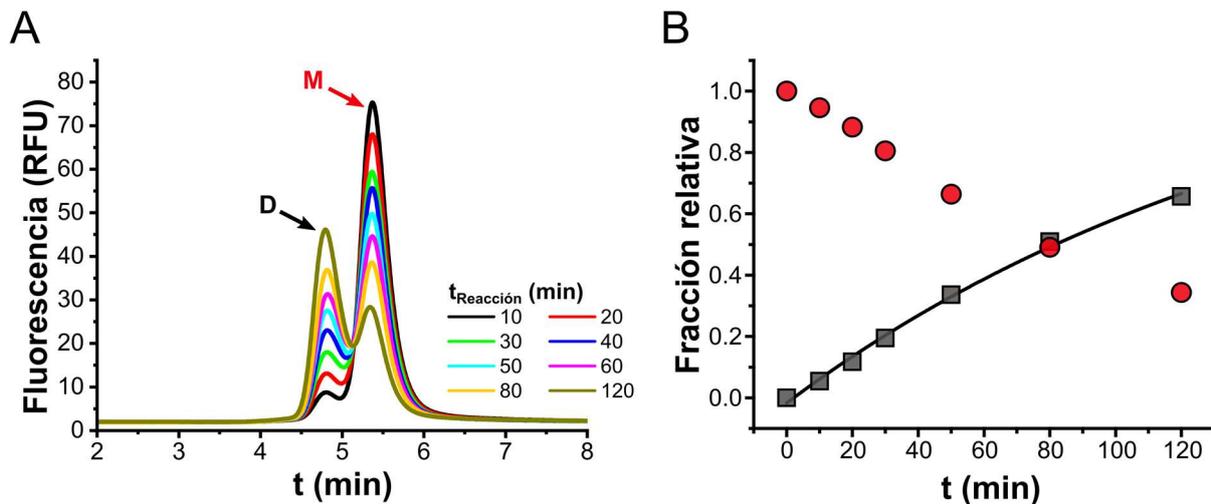


Figura 4.1. Oxidación de *HsANXA2* seguida por SEC. A. Cromatogramas de la reacción de 3 μM *HsANXA2* con 400 μM H_2O_2 a distintos tiempos. Las flechas señalan los picos correspondientes a monómeros (M, flecha roja) y dímeros (D, flecha negra). B. Gráfico de las fracciones relativas de monómeros (círculos rojos) y dímeros (cuadrados grises), calculadas a partir de los cromatogramas con la Ec. 4.1. La línea negra representa el ajuste exponencial de los datos (Ec. 4.2).

La reacción demostró ser bastante lenta; al ajustar los valores de F_M en función del tiempo se obtuvo una k_{Obs} de 0.36 min^{-1} y una vida media de 1.9 min. Estos resultados sugieren que la oxidación de *HsANXA2* directamente con H_2O_2 sería un evento casi imposible en condiciones fisiológicas, si se tiene en cuenta la concentración de H_2O_2 , la lentitud de la reacción y la competencia con múltiples potenciales reductores de H_2O_2 .

Teniendo en cuenta la estructura cristalográfica 5LPU, C9 en el N-terminal de *HsANXA2* es la única de las 4 Cys que parece exponerse al solvente. Además, las medidas de tioles con DTDPy arrojan como resultado un solo tiol por proteína. Por lo tanto, podemos sugerir que el dímero de *HsANXA2* se forma a través de enlace disulfuro entre C9 de las hélices N-terminal de dos monómeros. La formación de dímeros oxidados, abre la posibilidad de mecanismos alternativos de anexas, y/o fusionar membranas, independientes de la formación del heterotetrámero con S100A²²⁶.

4.2.2. Oxidación de *HsANXA2* con H_2O_2 a través de *HsPrx1* y *HsPrx2*

Del resultado anterior obtuvimos la noción de que la oxidación de *HsANXA2* con H_2O_2 es extremadamente lenta y que ocurriría a concentraciones de H_2O_2 inalcanzables a nivel celular e incompatibles con la viabilidad de células eucariotas. No obstante, si *HsANXA2* es capaz de formar complejos de señalización con Prx, entonces la oxidación y señalización podrían ocurrir a concentraciones fisiológicas de H_2O_2 (nM). Para evaluar la oxidación desde H_2O_2 a *HsANXA2* a través de Prx, realizamos ensayos de reactividad en distintas condiciones y con distintas concentraciones de proteínas (previamente reducidas) en presencia de H_2O_2 , mediante SDS-PAGE no reductora (**Figura 4.2**). Realizamos los experimentos con *HsPrx1* y *HsPrx2*, para poder distinguir si la transducción de la señal de H_2O_2 a *HsANXA2* es específica para una de las Prx. En el caso de *HsPrx2*, notamos que las mezclas *HsPrx2-HsANXA2-H₂O₂* (carril 4, **Figura 4.2A**), *HsPrx2-H₂O₂-HsANXA2* (carril 5, **Figura 4.2A**) y *HsANXA2-H₂O₂-HsPrx2* (carril 6, **Figura 4.2A**) generaron bandas de un peso molecular aparente de 60 y 100 kDa, donde la primera corresponde con un disulfuro mixto entre *HsANXA2* y *HsPrx2*, mientras que el origen de la segunda es más difícil de explicar. Podría tratarse de un dímero de *HsPrx2* oxidada donde uno de los dos disulfuros reaccionó con *HsANXA2*, o, de dos monómeros de *HsANXA2* unidos por enlace disulfuro con un monómero de *HsPrx2*. Las bandas fueron sometidas a análisis de espectrometría de masa, donde se comprobó la presencia de ambas proteínas. Sin embargo, no se pudieron identificar péptidos correspondientes al enlace disulfuro mixto. El hecho de haber tenido el mismo patrón de bandas en los carriles 4 al 6, descarta que en estas condiciones experimentales sea necesario un complejo previo entre *HsPrx2* y *HsANXA2* para que esta se oxide. Incluso, sugiere que probablemente C_PSOH no sea la especie oxidada de Prx con la que *HsANXA2* reaccione. En el caso de que C_PSOH fuera la especie que reacciona con C9, únicamente hubiéramos observado disulfuros mixtos en las situaciones de los carriles 4 y quizás el 6. En el carril 5, el orden del agregado de los reactivos postula al disulfuro C_P-C_R como sustrato de *HsANXA2*. Además, el agregado de 3 veces más *HsPrx2* en la mezcla *HsPrx2-HsANXA2-H₂O₂* hizo que se intensificara la banda de 60 kDa (carril 7, **Figura 4.2A**), lo que deja en evidencia que hay una dependencia de la reacción con la concentración de *HsPrx2(S)₂*.

Por otro lado, en el caso de *HsPrx1* no detectamos bandas de 60 y 100 kDa (**Figura 4.2B**), por lo que sospechamos que no hay reacción entre ambas proteínas en estas condiciones experimentales.

Para corroborar la hipótesis de que el disulfuro de *HsPrx2* (*HsPrx2(S)₂*) es la especie con la que reacciona *HsANXA2*, realizamos experimentos de cinética deteniendo la reacción a distintos tiempos (**Figura 4.2C**). Decidimos realizar el experimento en ausencia y presencia de 10 mM de $CaCl_2$, con el fin de recrear la situación en la que *HsANXA2* se encuentra lista para interactuar con los fosfolípidos de la membrana plasmática, ya que se ha reportado que esta asociación induce cambios conformacionales en la proteína que quizás pudieran aumentar la reactividad o la interacción con *HsPrx2*.

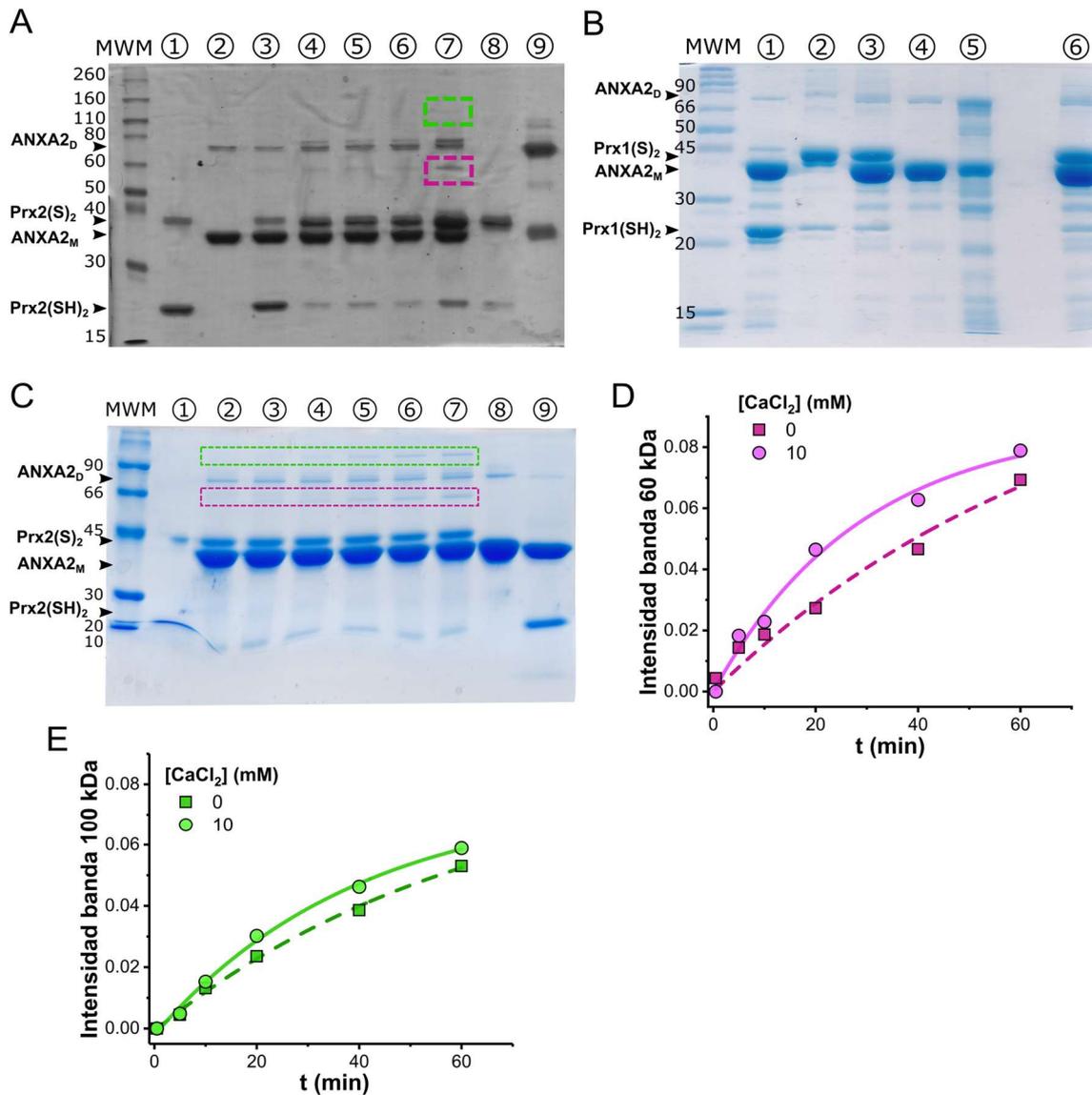


Figura 4.2. Análisis de la reacción entre HsANXA2 y Prx por electroforesis. **A.** SDS-PAGE de HsANXA2 y HsPrx2: **1.** HsPrx2 reducida (3 μ M). **2.** HsANXA2 (3 μ M). **3.** HsPrx2 + HsANXA2 (ambas 3 μ M). **4.** HsPrx2 + HsANXA2 + H₂O₂ (7.4 μ M). **5.** HsPrx2 + H₂O₂ + HsANXA2. **6.** HsANXA2 + H₂O₂ + HsPrx2. **7.** HsPrx2 (9 μ M) + HsANXA2 + H₂O₂. **8.** HsPrx2 + H₂O₂. **9.** HsANXA2 + H₂O₂ (2.4 mM). **B.** SDS-PAGE de HsANXA2 y HsPrx1: **1.** HsPrx1 (12.1 μ M) + HsANXA2 (11.5 μ M). **2.** HsPrx1 + H₂O₂ (36 μ M). **3.** HsPrx1 + H₂O₂ + HsANXA2. **4.** HsANXA2 + H₂O₂. **5.** HsANXA2 + H₂O₂ (2.4 mM). **6.** HsANXA2 + HsPrx1 + H₂O₂. **C.** Gel de reacción entre 4 μ M HsPrx2(S)₂ y 10 μ M HsANXA2: **1.** HsPrx2(S)₂ vs EcTrx. **2-7.** 0.5, 5, 10, 20, 40, 60 min. **8.** HsANXA2 reducida (10 μ M). **9.** 60 min + 100 mM DTT. Los recuadros verdes y violetas indican las regiones de las bandas de 100 y 60 kDa respectivamente. Análisis de densitometría de la banda de 60 kDa (**D**) y 100 kDa (**E**), en ausencia/presencia de 10 mM CaCl₂. Los trazos de colores representan el ajuste de los datos (**Ec. 4.2**). Los datos son resultado de un experimento. ANXA2_M y ANXA2_D, monómero y dímero de HsANXA2.

En esta oportunidad, volvimos a observar la aparición de las bandas de 60 y 100 kDa, entonces, cuantificamos su intensidad a lo largo de la reacción para poder determinar una constante de velocidad aparente al graficar la intensidad en función del tiempo (**Figura 4.2D, 4.2E**). De los cursos temporales obtuvimos valores de k_{obs} de 0.014 y 0.035 min^{-1} para la banda de 60 kDa, y, 0.016 y 0.025 min^{-1} para la banda de 100 kDa (en ausencia y presencia de 10 mM CaCl₂ respectivamente). Se observó un pequeño aumento de la velocidad en presencia de calcio, sin embargo, harían falta repeticiones para afianzar la observación. Si estimamos constantes de

segundo orden para la oxidación de *HsANXA2* con H_2O_2 y HsPrx2(S)_2 a partir de las k_{obs} , obtenemos constantes aproximadas de 15 y $60 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente, sugiriendo que la oxidación a través de HsPrx2(S)_2 es más rápida que la reacción directa con H_2O_2 .

4.2.3. Estudio de la interacción *HsANXA2*-Prx

Con el objetivo de obtener información sobre la interacción entre *HsANXA2* y estas Prx, decidimos utilizar el método de fasores para evaluar la asociación entre proteínas por fluorescencia intrínseca. Realizamos mezclas equimolares de *HsANXA2* y *HsPrx1* o *HsPrx2*, en su estado reducido a distintas concentraciones y las comparamos con los puntos de fasores correspondientes a las proteínas solas (**Figura 4.3**). En estos experimentos, la formación del complejo se manifiesta cuando el punto de faser correspondiente a la mezcla de las proteínas queda fuera de la línea recta que conecta los puntos de las proteínas aisladas.

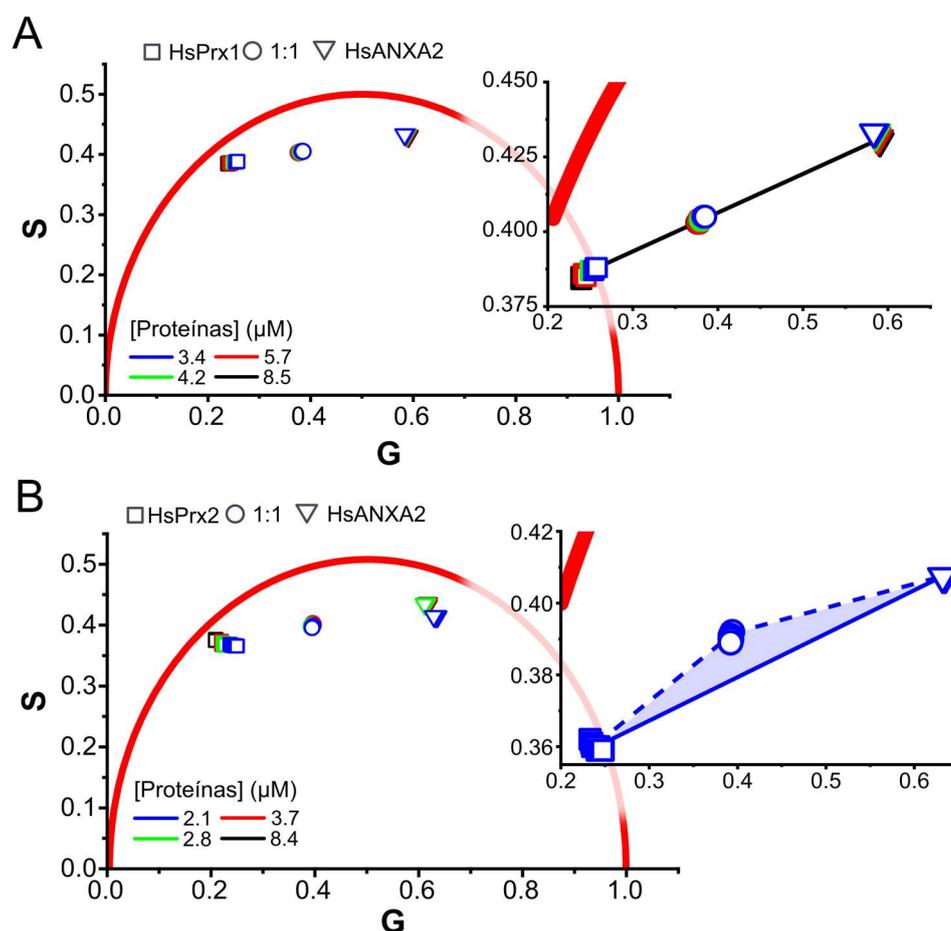


Figura 4.3. Estudio de la interacción *HsANXA2*-Prx. Gráficos de fasores para *HsPrx1*-*HsANXA2* (A) y *HsPrx2*-*HsANXA2* (B), de las proteínas aisladas y su mezcla equimolar (1:1), a distintas concentraciones. En cada inserto la línea sólida indica la trayectoria esperada para la mezcla de fluoróforos, la línea segmentada indica la trayectoria esperada al generarse una nueva especie fluorescente. Los datos son el resultado de 5 repeticiones.

Para *HsPrx1*-*HsANXA2*, observamos que ambas proteínas no parecen interactuar. Las mezclas 1:1 (**Figura 4.3A**) quedan alineadas con respecto a los puntos de las proteínas aisladas, por lo que se trataría de una mezcla de fluoróforos y no de la formación de un complejo con un nuevo valor

de τ . En el caso de *HsPrx2-HsANXA2*, observamos que la mezcla 1:1 a 2.1 μM se mantiene por fuera de la trayectoria esperada para la combinación de fluoróforos (**Figura 4.3B**). Esto representa la aparición de una nueva especie con un τ distinto al de las proteínas por separado, por lo que queda en evidencia la interacción entre ambas.

Para comenzar a caracterizar la interacción a nivel estructural, decidimos hacer docking proteína-proteína y así generar modelos del complejo *HsPrx2-HsANXA2*. Partimos de la estructura de *HsPrx2* en su forma disulfuro (PDB: 5IJT) y *HsANXA2* (PDB: 5LPU) con su hélice N-terminal expuesta, de manera tal, que C9 se encuentre accesible para entrar en contacto con el disulfuro. Para realizar el docking utilizamos Haddock2.4, definiendo como residuos activos en la interfase a las Cys del disulfuro C_P-C_R y C9 y dejando el resto de la configuración como se encuentra por defecto. La mejor solución de docking posicionó la hélice N-terminal de *HsANXA2* sobre el parche hidrofóbico de *HsPrx2* donde se encuentra su disulfuro (**Figura 4.4**). No obstante, Cys9 se encuentra bastante lejos como para reaccionar con el disulfuro. De todas formas, notamos que este complejo cumple con ciertas características que se vieron en la interacción Prx-Trx, ya que C9 está expuesta y presenta residuos hidrofóbicos en su cercanía (Leu, Iso y Val), que son compatibles para posicionarse entorno al disulfuro.

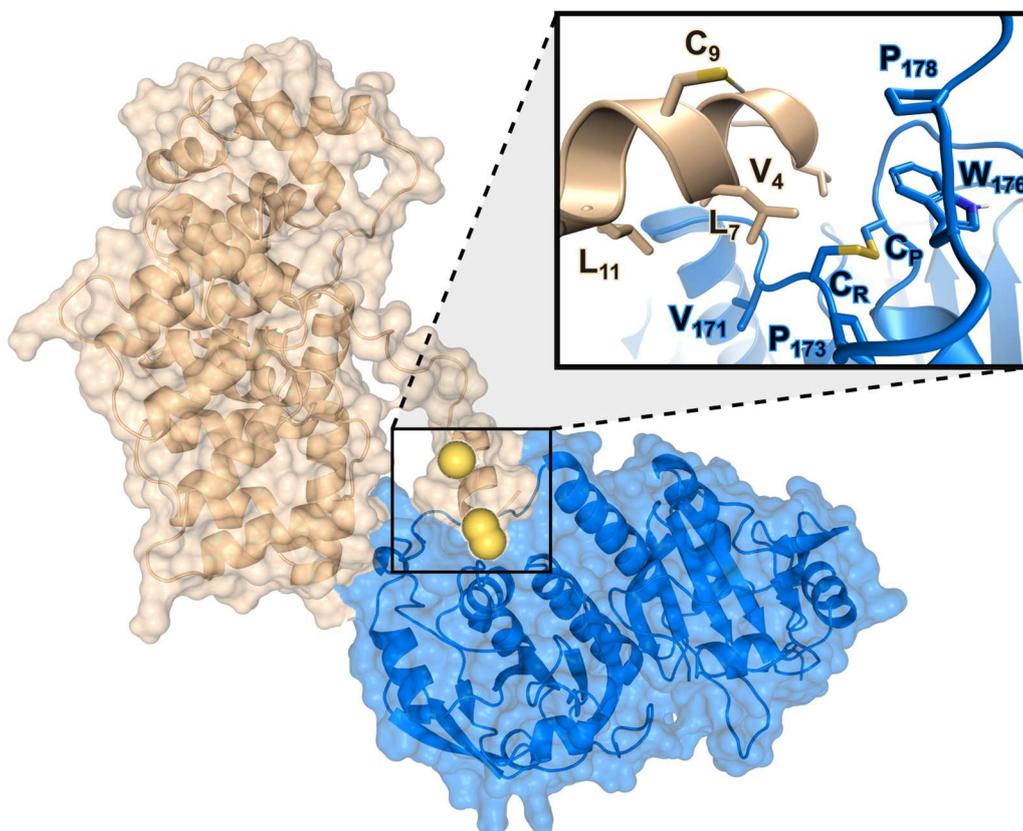


Figura 4.4. Modelo del complejo *HsPrx2-HsANXA2*. En azul se representa *HsPrx2* y en color marrón claro *HsANXA2*, los azufres de C9 y el disulfuro de *HsPrx2* se muestran como esferas amarillas. En el acercamiento de la parte superior derecha, se ve como la porción alifática de la hélice N-terminal de *HsANXA2* (leucina, isoleucina y valina) se posiciona sobre la región del disulfuro de *HsPrx2*. Los residuos se representaron como varillas.

4.2.4. Estudio de la oxidación de *HsCBS* con H_2O_2 en células HEK293

Como se discutió en la introducción, a partir del trabajo de Stöcker¹⁷⁰ surge el antecedente de que *HsCBS* es sensible a estímulos en bolo de H_2O_2 a nivel celular, generando formas disulfuro capaces de ser reducidas por Trx. En mi estadía de investigación, en el mismo laboratorio donde surgió el antecedente, uno de los objetivos fue profundizar el estudio de la oxidación de *HsCBS* al exponer células HEK293 MSR a H_2O_2 de distintas formas. Trabajamos con células transfectadas con plásmidos que presentan *HsCBS* con SBP en sus extremos N o C-terminal, para la proteína salvaje (wild type, wt) y para mutantes de Cys expuestas al solvente (según la visualización de la estructura tridimensional), C15A, C272A y C275A. Se trabajó con las proteínas fusionadas a SBP, porque el sistema de detección por western blot funcionó mejor con el anticuerpo contra SBP que con el de *HsCBS*. Además, inicialmente se pretendieron realizar experimentos de coprecipitación con estreptavidina inmovilizada, los cuales no tuvieron éxito.

En primera instancia, evaluamos la eficacia de la transfección de las distintas construcciones. El análisis de SDS-PAGE y western blot de los lisados de las células transfectadas, reveló que todas las construcciones se expresan con niveles similares entre sí (**Anexo 5.1.12**). Se identificó la banda correspondiente al monómero de *HsCBS* fusionado con SBP (64.8 kDa) y otras bandas de menor peso molecular (entre 50 y 25 kDa) que podrían representar formas escindidas por proteasas en el interior celular. Para no tener que hacer el doble de experimentos, elegimos trabajar con las construcciones que presentan SBP en el C-terminal debido a que *HsCBS* tiene una región intrínsecamente desordenada en su extremo N-terminal, de función desconocida. Quisimos evitar problemas de posibles restricciones conformacionales inducidas por la presencia de SBP que pudieran alterar la función de ese dominio.

Procedimos a evaluar la oxidación de *HsCBS*-SBP wt exponiendo las células a distintas concentraciones de H_2O_2 durante 40 s. En los resultados de western blot (**Figura 4.5A**), se puede identificar que la mayor parte de *HsCBS*-SBP permaneció como monómero, mientras que aparecieron bandas de mayor peso molecular que representan el dímero (banda 130 kDa) y tetrameros o disulfuros mixtos con otras proteínas (banda 250 kDa). El hecho de que estas bandas desaparezcan cuando se trataron las muestras con DTT, sugiere que se forman a través de enlaces disulfuro. También observamos que la intensidad de estas bandas aumentó conforme mayor fue la concentración de H_2O_2 a la que se expusieron las células (**Figura 4.5B**). Además, realizamos western blot para *HsPrx2* y usamos el cociente entre las bandas correspondientes al disulfuro (44 kDa) y al monómero (22 kDa) como indicador de oxidación (entrada de H_2O_2) dentro de las células. Al comparar la oxidación de *HsCBS*-SBP y *HsPrx2*, notamos que la banda de 130 kDa se correlaciona bien con el grado de oxidación de *HsPrx2* ante la misma exposición a H_2O_2 (**Figura 4.5C**). A priori, uno esperaría que *HsCBS* fuera menos sensible, es decir, que la banda correspondiente a la proteína oxidada apareciera a concentraciones de H_2O_2 más altas que en el caso de *HsPrx2*. Teniendo en cuenta que los tioles de Prx son de los más sensibles a H_2O_2 en el interior celular, el hecho de que la oxidación de *HsCBS* ocurra en paralelo sugiere que quizás algunas de sus Cys expuestas presentan una reactividad aumentada, o, que existe una oxidación rápida entre *HsCBS* por *HsPrx2* y/o *HsPrx1*.

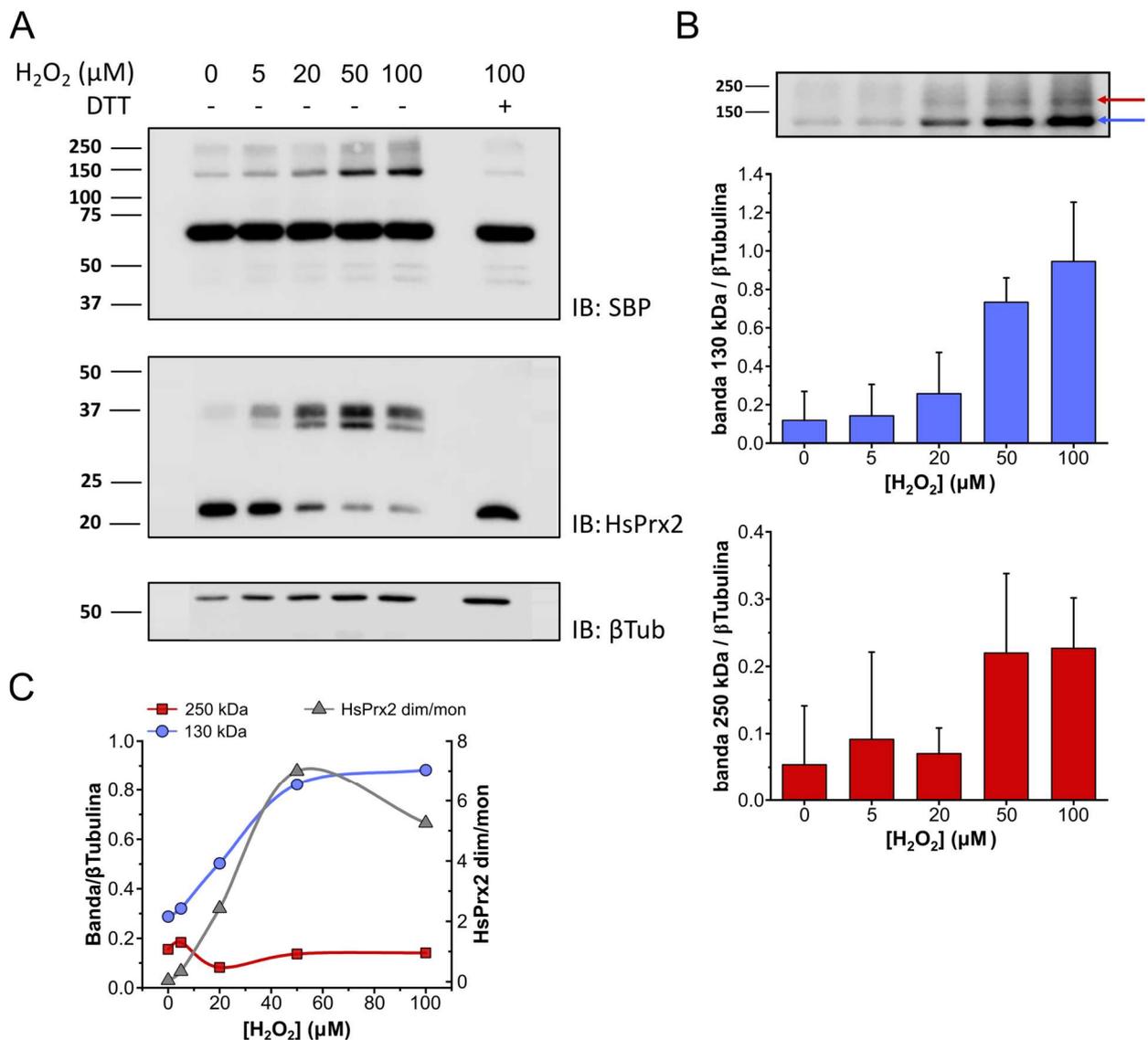


Figura 4.5. Oxidación de *HsCBSwt*-SBP en células HEK293. **A.** Western blot de la oxidación de células HEK293 a distintas concentraciones de H₂O₂. Abajo a la derecha de cada cuadrante se indica el anticuerpo primario utilizado (IB: inmunoblot). A la izquierda de los cuadrantes se indica el peso molecular (kDa). **B.** Análisis por densitometría de las bandas de *HsCBS*-SBP luego del tratamiento con H₂O₂. La región de alto peso molecular de la membrana se muestra en el cuadrante superior, donde se destacan las bandas de 130 kDa (azul) y de la región de 250 kDa (rojo). Los gráficos de columnas muestran los valores de intensidad de las bandas normalizados por β -tubulina, para las distintas concentraciones de H₂O₂. Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes. **C.** Gráfico de intensidad de las bandas de 130 y 250 kDa y cociente entre las bandas del dímero y el monómero de *HsPrx2*, para el experimento que se muestra en **A**. Los trazos representan la tendencia de los puntos (sin modelo de ajuste).

Para obtener información de cómo evoluciona la oxidación en el tiempo, realizamos experimentos de cinética, exponiendo las células a H₂O₂ y deteniendo la reacción a distintos tiempos (**Figura 4.6**). La información obtenida a tiempos más cortos (0, 10, 20 y 30 s) destacan nuevamente la sensibilidad de *HsCBS* ante la presencia de H₂O₂ (**Figura 4.6A**). Al instante de agregar H₂O₂, se obtuvo la intensidad máxima de la banda de 130 kDa, la cual desciende y se estabiliza luego de los 60 s de exposición. En cambio, la banda de 250 kDa tuvo una cinética de aumento bastante más lenta, llegando a un máximo de intensidad a los 100 s, el cual se mantiene constante durante 100 s para luego descender con un perfil similar a la banda del dímero de

HsPrx2. Por último, *HsPrx2* se oxida instantáneamente, permaneciendo estable hasta los 200 s, cuando comienza a recuperarse por el sistema Trx-TR-NADPH (**Figura 4.6B**).

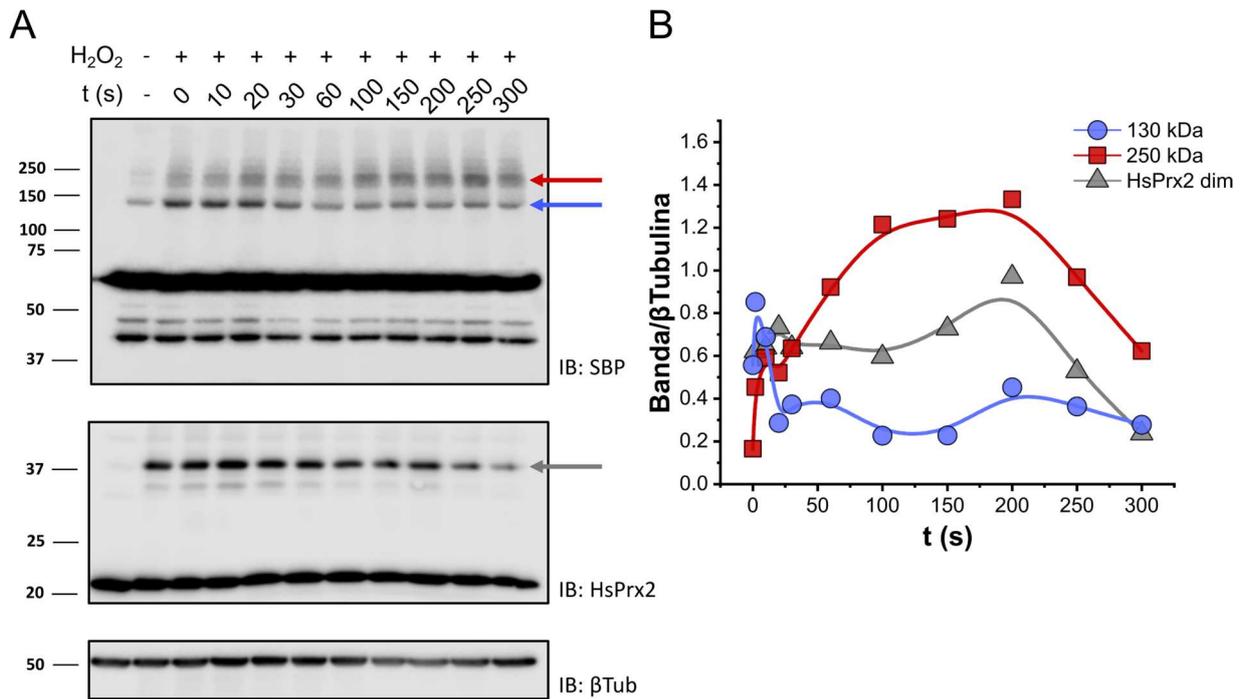


Figura 4.6. Cinética de oxidación de *HsCBSwt*-SBP en células HEK293. **A.** Western blot representativo de un experimento de exposición de células HEK293 a 60 μ M H₂O₂ detenida a distintos tiempos. Abajo a la derecha de cada cuadrante se indica el anticuerpo primario utilizado (IB: inmunoblot). A la izquierda de los cuadrantes se indica el peso molecular (kDa). Las flechas señalan las regiones correspondientes a las bandas de 250 kDa (rojo), 130 kDa (azul) y el dímero de *HsPrx2* (gris). **B.** Intensidad de las bandas señaladas en **A** en función del tiempo. Los trazos representan la tendencia de los puntos (sin modelo de ajuste).

Un aspecto interesante de este resultado es el aparente desfase temporal entre la formación del supuesto dímero disulfuro de *HsCBS*-SBP (banda 130 kDa) y las formas de mayor peso molecular (banda 250 kDa). Podemos plantear un escenario donde los dímeros sean precursores de tetrámeros (u otras formas oxidadas mediante enlaces disulfuros) y estos últimos comiencen a reducirse antes que los primeros. Esto último se puede explicar por diferencias de especificidad del sistema Trx, o, por formación de complejos con otras proteínas que expongan/oculden el disulfuro.

4.2.5. Efecto de mutantes de Cys en la oxidación de *HsCBS* por H_2O_2

Para obtener más información de cuáles Cys son responsables de la formación de las especies oxidadas de *HsCBS*-SBP, realizamos los mismos experimentos que en la **Figura 4.5**, pero, con mutantes de Cys a Ala de las Cys expuestas al solvente (C15A, C272A, C275A) y las comparamos con los resultados obtenidos para *HsCBS*wt. En estos experimentos, seguimos el aumento en la intensidad de las bandas de 130 y 250 kDa para las proteínas wt y mutantes de Cys, luego de exponer las células a distintas concentraciones de H_2O_2 (**Figura 4.7**).

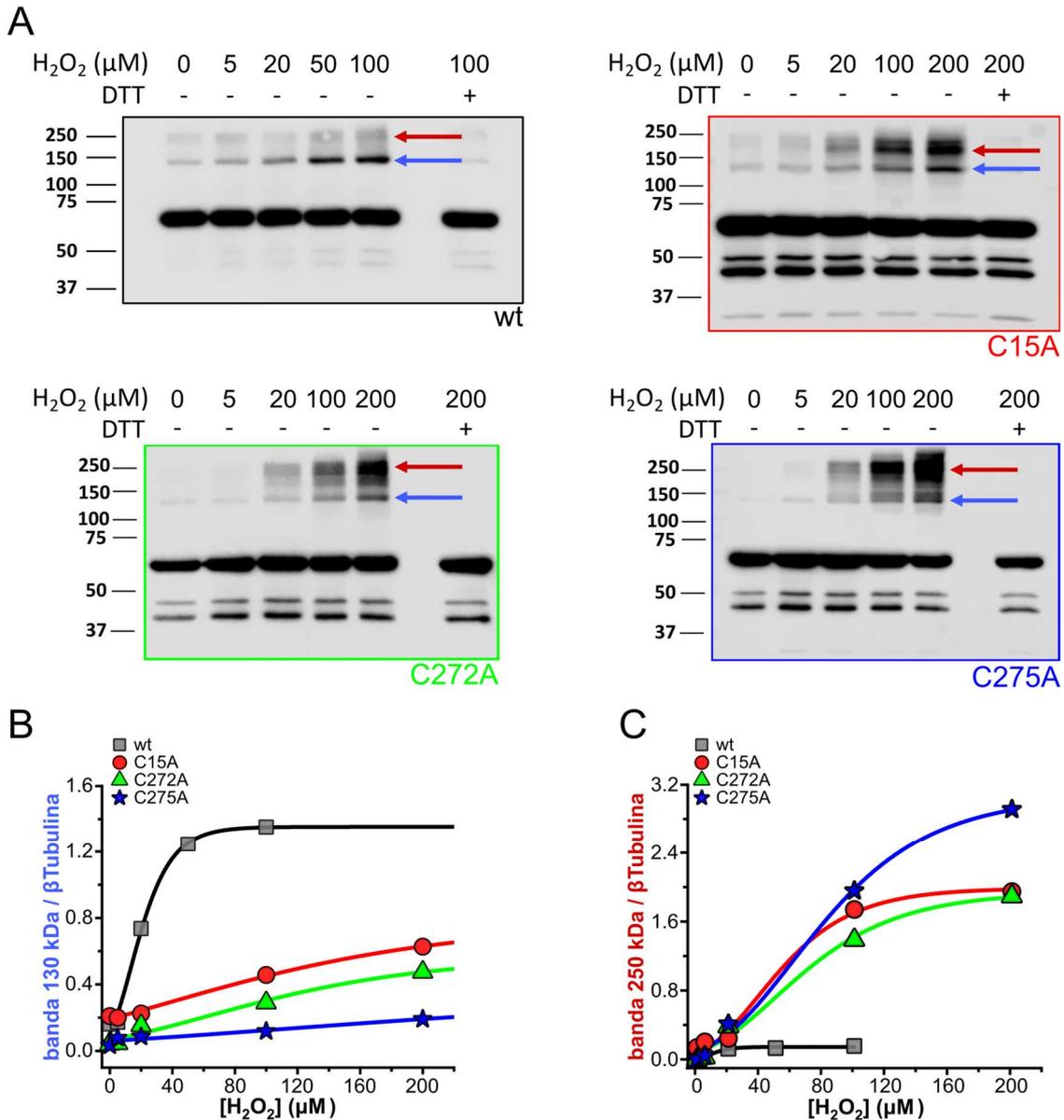


Figura 4.7. Cinética de oxidación de *HsCBS*-SBP wt y mutantes de Cys. **A.** Western blot contra SBP para la oxidación de células HEK293 MSR transfectadas con *HsCBS*-SBP wt (negro), C15A (rojo), C272A (verde) y C275A (azul). Las flechas dentro de los blots señalan las regiones correspondientes a las bandas de 250 kDa (rojo) y 130 kDa (azul). Intensidad de las bandas de 130 kDa (**B**) y 250 kDa (**C**) en función de la concentración de H_2O_2 a la cual se expusieron las células, para *HsCBS*-SBP wt y mutantes de Cys. Cada experimento fue realizado una vez. Los trazos representan la tendencia de los puntos (sin modelo de ajuste).

Al comparar las mutantes de Cys con la wt, se ve un sistemático descenso en la intensidad de la banda de 130 kDa (**Figura 4.7B**) y un aumento en la intensidad de la banda de 250 kDa (**Figura 4.7C**) para todas las mutantes de Cys en comparación con la wt. También se nota una acumulación de bandas por debajo y por arriba de la de 250 kDa, particularmente en la mutante C275A. C272 y C275, son los residuos de Cys que se encuentran próximos en una hélice y pueden formar un enlace disulfuro entre sí. La presencia de múltiples bandas en la región de 250 kDa de C275A, sugiere que, al no poder formar el disulfuro intramolecular, C272 puede estar formando disulfuros mixtos con otras proteínas, con la misma *HsCBS-SBP* C275, o, con *HsCBS* endógena. La presencia de *HsCBS* endógena, no nos permite discernir bien cuáles de estas Cys son responsables de la formación de dímeros y tetrámeros oxidados de *HsCBS-SBP*, debido a que puede llegar a compensar el efecto de la mutación, o generar un patrón de bandas más complejo. De todas formas, los resultados muestran que las 3 Cys parecen estar involucradas en el proceso de oxidación de *HsCBS-SBP* con H_2O_2 .

4.2.6. Dependencia de *HsPrx1* y *HsPrx2* en la oxidación de *HsCBS* por H_2O_2

Finalmente, para evaluar si las Prx de este trabajo tienen alguna participación en el proceso de oxidación de *HsCBS*, decidimos realizar los experimentos en ausencia, o, con niveles bajos de Prx. Para eso, trabajamos con células HEK293 MSR knock out (KO) para *HsPrx2*, que se encontraban disponibles en el laboratorio. Estas células presentaron una morfología y crecimiento muy similar a las células wt. Las células fueron transfectadas con *HsCBS*-SBP wt y se sometieron al tratamiento con distintas concentraciones de H_2O_2 durante 40 s, al igual que en los experimentos anteriores (Figura 4.8).

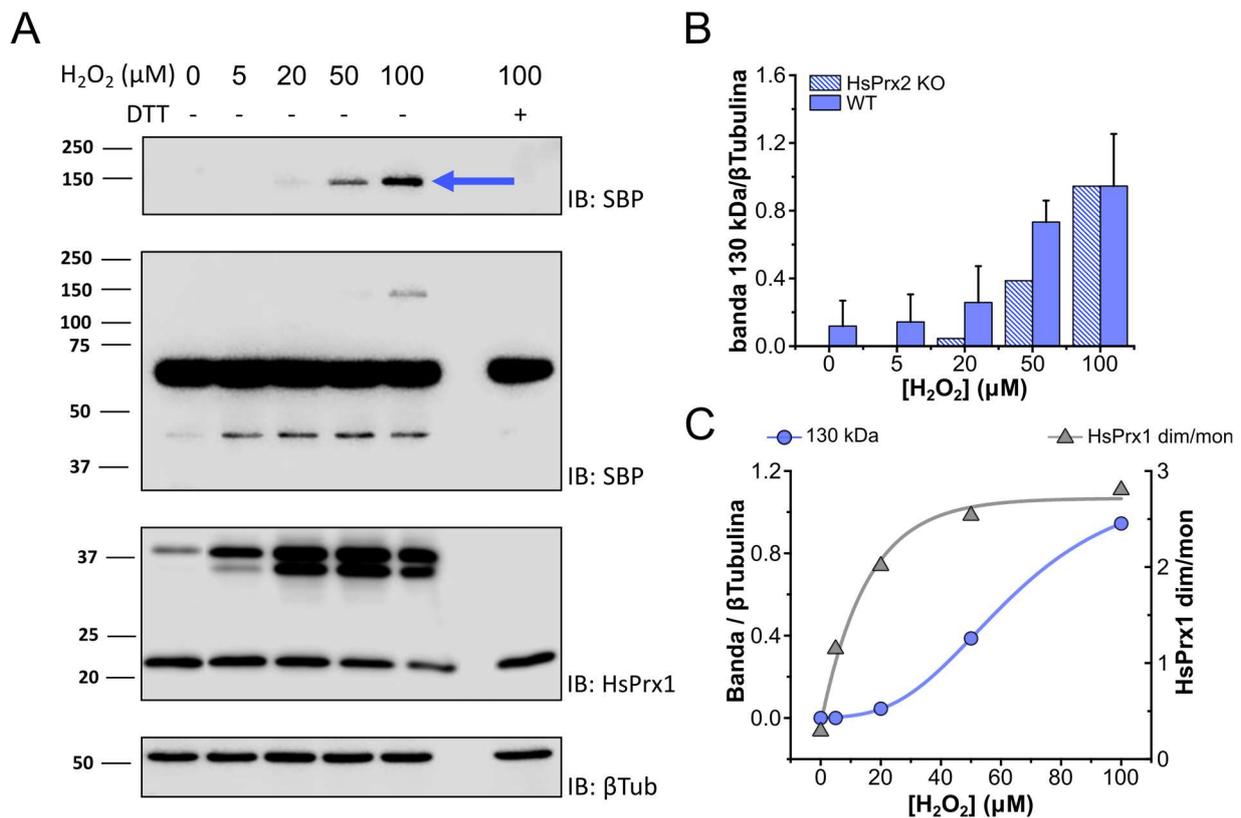


Figura 4.8. Oxidación de *HsCBS*-SBP wt en HEK293 *HsPrx2* KO. **A.** Western blot de la oxidación de células HEK293 *HsPrx2* KO a distintas concentraciones de H_2O_2 . Abajo a la derecha de cada cuadrante se indica el anticuerpo primario utilizado (IB: inmunoblot). A la izquierda de los cuadrantes se indica el peso molecular (kDa). El primer cuadrante (de arriba hacia abajo), es el revelado de la membrana cortada en la región de mayor peso molecular (100-250 kDa) con 120 s de exposición. Los resultados corresponden a un solo experimento. **B.** Intensidad de la banda de 130 kDa a distintas concentraciones de H_2O_2 para las células wt y *HsPrx2* KO. Los resultados de las células wt son los mismos que en la Figura 4.5B. **C.** Gráfico de intensidad de la banda de 130 kDa y cociente entre las bandas del dímero y el monómero de *HsPrx1* en función de la concentración de H_2O_2 . Los trazos representan la tendencia de los puntos (sin modelo de ajuste).

Ante la falta de *HsPrx2*, el perfil de la oxidación de *HsCBS*-SBP cambió considerablemente. Primero, vimos que se forma menos dímero de *HsCBS*-SBP al comparar con las células wt (Figura 4.8B). Incluso, se necesitó exponer más tiempo la membrana de western blot para poder obtener señal como para cuantificar. Además, no se observaron bandas de peso molecular superiores a la de 130 kDa, lo que sugiere que la oxidación mediada por *HsPrx1* no permite la formación de especies oxidadas de mayor peso molecular (tetrámeros, etc.). También podemos plantear la hipótesis de que quizás algunas de las bandas de la región de 250 kDa observadas en las células wt correspondían a disulfuros mixtos entre *HsPrx2* y *HsCBS*-SBP. Por otro lado, el hecho de que el

grado de oxidación de *HsPrx1* no se corresponda bien con el de *HsCBS-SBP* (a diferencia de lo que ocurría con *HsPrx2*), propone que la oxidación es menos eficiente que con *HsPrx2* (**Figura 4.8C**).

Para evaluar si la oxidación de *HsCBS-SBP* depende de Prx, realizamos un knock down de *HsPrx1* en las células *HsPrx2* KO mediante ARN de interferencia (siRNA) y volvimos a someter a las células a distintas concentraciones de H_2O_2 (**Figura 4.9**). Es importante mencionar que el tratamiento de las células *HsPrx2* KO con siRNA para *HsPrx1*, dificultó bastante la viabilidad celular y redujo su confluencia a la hora de realizar el experimento.

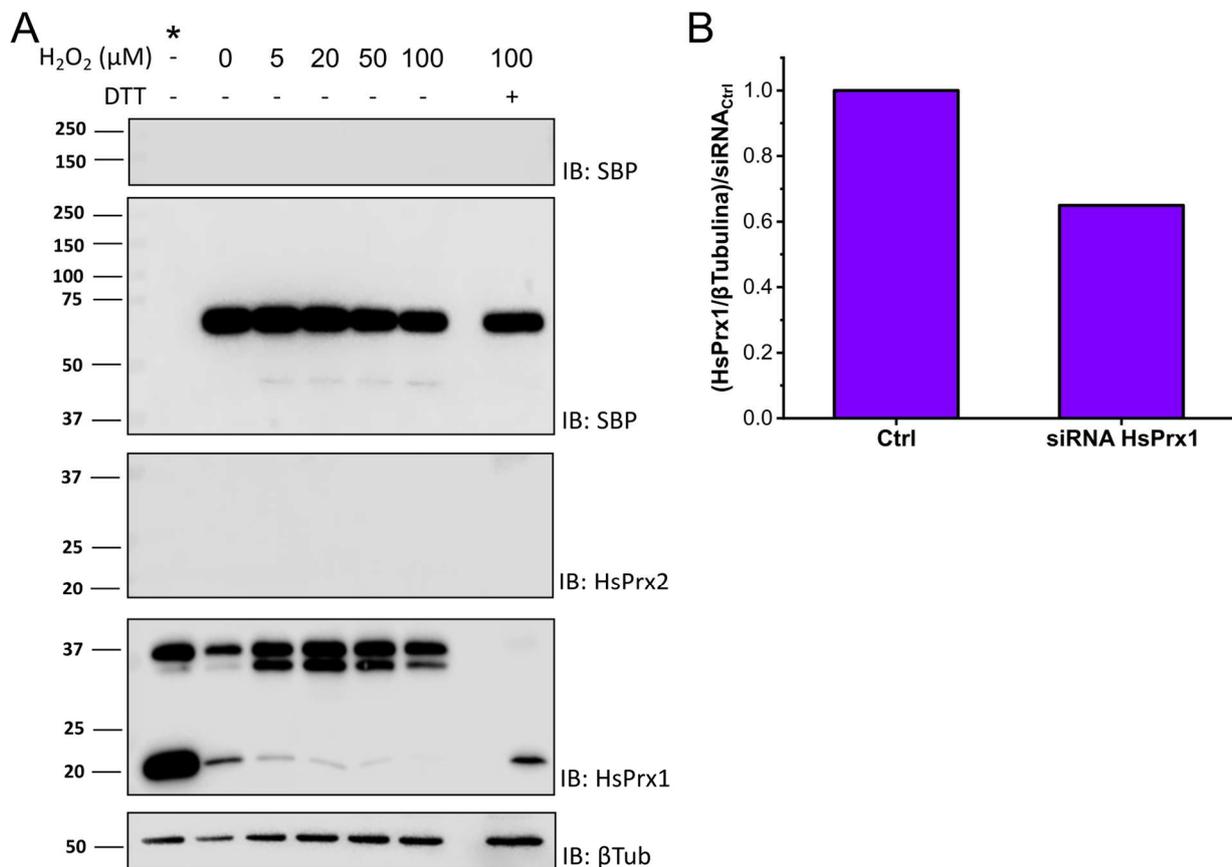


Figura 4.9. Cinética de oxidación de *HsCBS-SBP* wt en HEK293 *HsPrx2* KO knock down para *HsPrx1*. **A.** Western blot de la oxidación de células HEK293 *HsPrx2* KO, luego de la atenuación de la expresión de *HsPrx1*. El carril con el asterisco (*) es el del control de knock down. Abajo a la derecha de cada cuadrante se indica el anticuerpo primario utilizado (IB: inmunoblot). A la izquierda de los cuadrantes se indica el peso molecular (kDa). El primer cuadrante (de arriba hacia abajo), es el revelado de la membrana cortada en la región de mayor peso molecular (100-250 kDa) con 120 s de exposición. Los resultados corresponden a un solo experimento. **B.** Cuantificación relativa de *HsPrx1* total entre el control de knock down y las células tratadas con siRNA para *HsPrx1* en ausencia de H_2O_2 .

Por eso, el experimento se realizó 48 horas después de la transfección, para comenzar con las células en mejor estado y mayor cantidad. Como resultado obtuvimos que, una atenuación de los niveles de expresión de *HsPrx1* del 40 % (**Figura 4.9B**), alcanzó para que no se observara señal de *HsCBS-SBP* oxidada en ninguna de las concentraciones de H_2O_2 a las que las células fueron expuestas (**Figura 4.9A**). Esta observación sugiere que *HsCBS* solo puede oxidarse con H_2O_2 en presencia de *HsPrx2* y *HsPrx1*. Por otro lado, la dependencia de la oxidación con *HsPrx2* parece ser bastante más importante que con *HsPrx1*, lo que sugiere una cierta especificidad por la primera. En la **Figura 4.8C**, se ve que a pesar de encontrarse casi toda oxidada, *HsPrx1* no es capaz

de influir en la oxidación de *HsCBS*-SBP como lo hace *HsPrx2* (**Figura 4.5C**). En este caso, es interesante manejar la posibilidad de que la diferencia esté en la velocidad de resolución de cada Prx. Quizás, la forma de Prx que transfiere los equivalentes de oxidación desde el H_2O_2 a *HsCBS* es *C_pSOH*. Por lo tanto, la vida media del *C_pSOH* de *HsPrx1* es demasiado corta como para poder oxidar el tiol en *HsCBS* de forma eficiente. En cambio, una velocidad de resolución casi 100 veces más lenta en *HsPrx2*, puede generar una ventana temporal suficiente como para garantizar la oxidación de *HsCBS* en los complejos con *HsPrx2*.

4.4. Conclusiones

Inicialmente, *HsANXA2* fue propuesta como proteína de soporte necesaria para mediar la interacción y/o formación del complejo de señalización redox entre *HsPrx2* y *HsSTAT3*, que genera formas oxidadas de la última, impidiendo su traslocación al núcleo. Sin embargo, nuestros resultados prueban que no solo existe interacción entre *HsPrx2* y *HsANXA2*, sino que también reaccionan. En este caso, es el disulfuro de *HsPrx2* la forma oxidada que transfiere los equivalentes de oxidación del H_2O_2 a *HsANXA2*. Si bien la reacción es relativamente lenta en nuestras condiciones experimentales, no podemos descartar que dentro de la célula existan otros factores que aceleren la reacción a tiempos compatibles con eventos de señalización. Podría ser que la asociación a la membrana desencadene cambios conformacionales en *HsANXA2*, que le confieran una mayor reactividad o la posibilidad de formar un complejo reactivo particular. Más allá del eje *HsANXA2-HsPrx2-HsSTAT3*, la oxidación de *HsANXA2* dependiente de *HsPrx2* puede llevar a la formación de dímeros covalentes, que probablemente le permita realizar su función de conectar membranas de una forma alternativa. De ser así, este caso representaría un ejemplo donde la señalización a través de Prx modifica directamente una función proteica y destaca el rol del H_2O_2 en la dinámica de las membranas celulares y/o transporte vesicular.

HsCBS es una de las tres enzimas responsables de la producción endógena de H_2S en células de mamíferos, es el primer paso de la vía de transulfuración para la síntesis de Cys y su sustrato, homocisteína, es un metabolito de la vía de síntesis de Met en el ciclo de transmetilación. Por lo tanto, la posibilidad de que *HsCBS* pueda regularse por H_2O_2 a través de Prx, es extremadamente interesante para la temática de señalización redox. No sólo porque representa un vínculo entre el metabolismo de H_2O_2 y H_2S , sino porque también relaciona al H_2O_2 con la síntesis de Cys y posteriormente GSH, ambos componentes claves del sistema antioxidante dependiente de tioles. Además, si los cambios en la actividad de *HsCBS* pueden repercutir en el ciclo de transmetilación, podemos plantear que esta enzima puede llegar a ser el vínculo entre niveles de oxidantes (H_2O_2 en este caso) y perfil de metilación celular, más específicamente, cambios epigenéticos.

De todas formas, tanto, el caso de *HsANXA2*, como el de *HsCBS*, demuestran el grado de integración de información que hay detrás de los procesos fisiológicos. En estos ejemplos, vimos cómo la información de los niveles de H_2O_2 se encuentra integrada a la función de proteínas que no se relacionan directamente con el metabolismo de especies oxidantes. No obstante, sigue siendo extremadamente complejo entender cómo y en qué medida se integra esta información. Principalmente, porque es difícil hallar un modelo y una condición que demuestren de forma clara los mecanismos de regulación dependientes de H_2O_2 , ya que en muchos casos los efectos pueden llegar a ser muy sutiles. Afortunadamente, el hecho de que la señalización ocurra a través de Prx, nos brinda una herramienta para poder explorar estos sistemas.

Conclusión general y perspectivas

Llegando al final de este trabajo, es interesante repasar cómo fue la evolución de la investigación en Prx a 30 años de ser definidas en la bioquímica. En los comienzos, se destacaron por estar involucradas en una amplia gama de procesos biológicos en organismos desde bacterias hasta mamíferos. Prácticamente en paralelo, se describió su habilidad de reducir hidroperóxidos de forma independiente de cofactores y mediante residuos de Cys. Más tarde, se destacó su excepcional reactividad con H_2O_2 y su ciclo catalítico relativamente lento en comparación con otras peroxidases. En los últimos 15 años, empezaron a ser introducidas como las proteínas encargadas del consumo de H_2O_2 a nivel celular y como componentes fundamentales de la regulación redox y paradigmas de señalización, a partir de múltiples trabajos donde las hallaron interactuando con otras proteínas y catalizando su oxidación. Por último, en varias ocasiones durante todos estos años, e incluso antes de ser definidas como Prx, se observó la complejidad de su estructura cuaternaria que siempre resultó difícil de asociar con el resto de sus funciones. Por lo tanto, estos 30 años de investigación en Prx, no sólo aportaron conocimiento de nicho, sino que también sirvieron de base empírica para comenzar a racionalizar el rol del H_2O_2 y su metabolismo en la fisiología de los organismos aerobios.

En este trabajo de tesis profundizamos y retomamos algunos aspectos del ciclo catalítico y la oligomerización de *HsPrx1* y *HsPrx2*, desde la óptica de su rol como transductores de la señal del H_2O_2 . Del estudio cinético y estructural de la reducción por Trx, observamos que la reducción del disulfuro es rápida y eficiente gracias a interacciones proteicas que generan un contexto fisicoquímico adecuado para la reacción, en el que residuos de Cys (C_N en este caso) aumentan su reactividad. Esto sugiere que sería necesaria la formación de un complejo previo entre la Prx y la proteína blanco de señalización (con o sin proteína adaptadora) para que la transferencia de equivalentes de oxidación a través del disulfuro sea posible.

Del estudio de la interacción entre *HsPrx2* y Trx, es interesante tomar la observación del cambio en el entorno de C_N e introducirla en el contexto de interacciones entre Prx y proteínas blanco de señalización. Residuos de Cys de estas proteínas, podrían aumentar su reactividad al interactuar con Prx y hacer que la reacción con C_PSOH o C_P-C_R sea posible y al mismo tiempo específica, garantizando que el mensaje del H_2O_2 llegue al destinatario correcto. Por otra parte, el hecho de que la interacción Prx-Trx sea transitoria (de relativa baja afinidad) es conveniente tanto para las funciones de señalización como para las de consumo de H_2O_2 . En el primer caso, permitiría amplificar la señal y, en el segundo, impediría que la Prx quede "atrapada" en interacciones con otras proteínas.

En el estudio de la dinámica de oligomerización y vínculo con la actividad peroxidasa, retomamos el desafío de entender el detalle de la transición de dímeros a decámeros en función del estado redox del sitio activo. Aquí observamos que el equilibrio de oligomerización es otra propiedad que diferencian a unas Prx de otras, incluso entre isoformas tan similares como *HsPrx1* y *HsPrx2*.

Además, los cambios conformacionales de Prx mediados por su oxidación tienen efectos distintos sobre el equilibrio. Trasladando esto a la señalización, las diferencias en la dinámica de oligomerización podrían habilitar distintos tipos de interacciones entre Prx y proteínas blanco que podrían colapsar dependiendo de la cantidad de Prx oxidada, en una modalidad de señalización independiente de reacciones redox entre Prx y el blanco. Por otro lado, notamos una clara susceptibilidad del mecanismo catalítico de Prx a factores que alteran su estructura cuaternaria, por lo tanto, podemos plantear el escenario en el que complejos entre Prx y otras proteínas puedan tener un efecto modulador de su ciclo catalítico acorde a las necesidades de señalización.

Como es costumbre en el trabajo de investigación, al finalizar tenemos más preguntas para responder que al comenzar. En cuanto al capítulo 2, algunos pendientes tienen que ver con realizar experimentos para profundizar sobre el efecto del pH, fuerza iónica, temperatura y agentes desnaturalizantes en el equilibrio de oligomerización y reactividad con H_2O_2 para ambas Prx. Principalmente con el objetivo de realizar una caracterización fisicoquímica detallada de la interfaz de decamerización y esclarecer el vínculo oligomerización-equilibrio FF-LU-reactividad. Al mismo tiempo, consideramos relevante realizar experimentos de dicroísmo circular en estas condiciones para ver el estado de la estructura terciaria y secundaria. También sería interesante incluir el uso de mutantes de Prx exclusivamente díméricas para complementar estos resultados. Por otro lado, surgen nuevas preguntas, por ejemplo: teniendo en cuenta que parte de la mitad N-terminal de sitio activo se encuentra en la interfase entre dímeros dentro del decámero ¿Es la estructura del decámero lo que le da cooperatividad a Prx? En este sentido, habría que idear experimentos para medir cooperatividad en Prx y evaluar la hipótesis en condiciones que desafíen o estabilicen la estructura del decámero, al igual que se hizo con la urea y el NaCl. Otro aspecto a investigar, es el efecto que tiene la dinámica de oligomerización en la reducción de Prx, ya sea por Trx u otros sistemas reductores (Grx/GSH, blancos de señalización, etc).

Teniendo en cuenta el capítulo 3, consideramos que sería interesante realizar estudios computacionales más avanzados para cada paso del ciclo de la **Figura 3.5**. Dentro de estos estudios podríamos realizar métodos híbridos de mecánica cuántica y molecular (QM/MM) y cálculos de perfiles de energía libre, para obtener un mayor detalle de la energética de cada paso. También resulta interesante seguir investigando sobre el rol de W31 de Trx en su actividad, que además hace destacar otra cuestión, que es la importancia o efecto de la presencia de un residuo de Trp espacialmente cercano a uno de Cys en la reactividad de tioles proteicos. Además, dado el grado de conservación en los residuos involucrados en la formación de los complejos Prx-Trx, sería interesante realizar estudios de coevolución para poder obtener mayor información sobre el desarrollo evolutivo de esta interacción. Otras tareas que deja este capítulo son el estudio de la reducción de *HsPrx1* y *HsPrx2* en su forma disulfuro con GSH, Grx y GSH/Grx, como para completar la caracterización cinética de la reducción de estas Prx por los sistemas dependientes de GR.

Por último, el capítulo 4 es el que deja más cuestiones por explorar. En primer lugar, consideramos pertinente evaluar el efecto de la oxidación de *HsANXA2* directamente por H_2O_2 y a través de *HsPrx2*, en su función de agregar membranas. Para comenzar, planteamos realizar experimentos

de agregación de liposomas siguiendo el aumento en la dispersión de luz, en presencia/ausencia de Ca^{2+} , H_2O_2 y *HsPrx2/HsPrx1*. Además, planeamos realizar experimentos de entrecruzamiento químico entre *HsANXA2* y *HsPrx1* y *HsPrx2* seguido de una caracterización por espectrometría de masa, para elucidar la interfase de interacción entre proteínas. En cuanto al rol de Prx en la oxidación de *HsCBS*, planteamos confirmar la interacción *HsCBS-HsPrx* realizando experimentos de co-precipitación acoplados a SDS-PAGE, western blot y espectrometría de masa. También quedó pendiente caracterizar las formas oxidadas de *HsCBS*, hallar las Cys involucradas de forma clara y evaluar las consecuencias de la oxidación en la actividad CBS, haciendo énfasis en la producción de H_2S .

Bibliografía

1. Harris, J. R. Some negative contrast staining features of a protein from erythrocyte ghosts. *J. Mol. Biol.* **46**, 329–335 (1969).
2. Kim, K., Kim, I. H., Lee, K. Y., Rhee, S. G. & Stadtman, E. R. The isolation and purification of a specific “protector” protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. *J. Biol. Chem.* **263**, 4704–4711 (1988).
3. Jacobson, F. S., Morgan, R. W., Christman, M. F. & Ames, B. N. An Alkyl Hydroperoxide Reductase from *Salmonella typhimurium* Involved in the Defense of DNA against Oxidative Damage. *J. Biol. Chem.* **264**, 1488–1496 (1989).
4. Tohru, Y., Yasuhisa, M., Shunji, N. & Masuo, O. Cloning of a housekeeping-type gene (MER5) preferentially expressed in murine erythroleukemia cells. *Gene* **80**, 337–343 (1989).
5. Plishker, G. A., White, P. H. & Cadman, E. D. Involvement of a cytoplasmic protein in calcium-dependent potassium efflux in red blood cells. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **251**, C535–C540 (1986).
6. Moore, R. B., Mankad, M. V., Shriver, S. K., Mankad, V. N. & Plishker, G. A. Reconstitution of Ca²⁺-dependent K⁺ transport in erythrocyte membrane vesicles requires a cytoplasmic protein. *J. Biol. Chem.* **266**, 18964–18968 (1991).
7. Shau, H., Gupta, R. K. & Golub, S. H. Identification of a Natural Killer Enhancing Factor (NKEF) from Human Erythroid Cells. *Cell. Immunol.* **147**, 1–11 (1993).
8. Ishii, T. *et al.* Cloning and characterization of a 23-kDa stress-induced mouse peritoneal macrophage protein. *J. Biol. Chem.* **268**, 18633–18636 (1993).
9. Chae, H. Z., Chung, S. J. & Rhee, S. G. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* **269**, 27670–27678 (1994).
10. Rhee, S. G. & Chae, H. Z. Thioredoxin Peroxidase and Peroxiredoxin Family. *Mol. Cells* **4**, 137–142 (1994).
11. Schröder, E., Willis, A. C. & Ponting, C. P. Porcine natural-killer-enhancing factor-B: oligomerisation and identification as a calpain substrate in vitro. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1383**, 279–291 (1998).
12. Iwahara, S. *et al.* Purification, Characterization, and Cloning of a Heme-Binding Protein (23 kDa) in Rat Liver Cytosol. (1995).
13. Chae, H. Z., Kim, H. J., Kang, S. W. & Rhee, S. G. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **45**, 101–112 (1999).
14. SJR - International Science Ranking.
https://www.scimagojr.com/countryrank.php?area=1300&min=0&min_type=itp.
15. Villar, S. F., Ferrer-Sueta, G. & Denicola, A. The multifaceted nature of peroxiredoxins in chemical biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **76**, 102355 (2023).
16. Eklund, H., Gleason, F. K. & Holmgren, A. Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **11**, 13–28 (1991).

17. Atkinson, H. J. & Babbitt, P. C. An Atlas of the Thioredoxin Fold Class Reveals the Complexity of Function-Enabling Adaptations. *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000541 (2009).
18. Copley, S. D., Novak, W. R. P. & Babbitt, P. C. Divergence of Function in the Thioredoxin Fold Suprafamily: Evidence for Evolution of Peroxiredoxins from a Thioredoxin-like Ancestor. *Biochemistry* **43**, 13981–13995 (2004).
19. Fabianek, R. A., Hofer, T. & Thöny-Meyer, L. Characterization of the Escherichia coli CcmH protein reveals new insights into the redox pathway required for cytochrome c maturation. *Arch. Microbiol.* **171**, 92–100 (1999).
20. Loferer, H., Bott, M. & Hennecke, H. Bradyrhizobium japonicum TlpA, a novel membrane-anchored thioredoxin-like protein involved in the biogenesis of cytochrome aa3 and development of symbiosis. *EMBO J.* **12**, 3373–3383 (1993).
21. Karplus, P. A. & Hall, A. Structural Survey of the Peroxiredoxins. in *Peroxiredoxin Systems* (eds. Flohé, L. & Harris, J. R.) vol. 44 41–60 (Springer Netherlands, Dordrecht, 2007).
22. Noguera-Mazon, V., Krimm, I., Walker, O. & Lancelin, J.-M. Protein–protein interactions within peroxiredoxin systems. *Photosynth. Res.* **89**, 277–290 (2006).
23. Hofmann, B., Hecht, H.-J. & Flohé, L. Peroxiredoxins. *Biol. Chem.* **383**, (2002).
24. Nelson, K. J. *et al.* Analysis of the peroxiredoxin family: Using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **79**, 947–964 (2011).
25. Verdoucq, L., Vignols, F., Jacquot, J.-P., Chartier, Y. & Meyer, Y. In Vivo Characterization of a Thioredoxin h Target Protein Defines a New Peroxiredoxin Family. *J. Biol. Chem.* **274**, 19714–19722 (1999).
26. PREX Database. <https://csb.wfu.edu/prex/>.
27. Hall, A., Nelson, K., Poole, L. B. & Karplus, P. A. Structure-based Insights into the Catalytic Power and Conformational Dexterity of Peroxiredoxins. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 795–815 (2011).
28. Wood, Z. A., Poole, L. B. & Karplus, P. A. Peroxiredoxin Evolution and the Regulation of Hydrogen Peroxide Signaling. *Science* **300**, 650–653 (2003).
29. Hall, A., Karplus, P. A. & Poole, L. B. Typical 2-Cys peroxiredoxins – structures, mechanisms and functions. *FEBS J.* **276**, 2469–2477 (2009).
30. Search: peroxiredoxin - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/search/peroxiredoxin>.
31. Ferrer-Sueta, G. *et al.* Factors Affecting Protein Thiol Reactivity and Specificity in Peroxide Reduction. *Chem. Res. Toxicol.* **24**, 434–450 (2011).
32. Szajewski, R. P. & Whitesides, G. M. Rate constants and equilibrium constants for thiol-disulfide interchange reactions involving oxidized glutathione. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 2011–2026 (1980).
33. Nagy, P. *et al.* Model for the Exceptional Reactivity of Peroxiredoxins 2 and 3 with Hydrogen Peroxide. *J. Biol. Chem.* **286**, 18048–18055 (2011).
34. Oláh, J., van Bergen, L., De Proft, F. & Roos, G. How does the protein environment optimize the thermodynamics of thiol sulfenylation? Insights from model systems to QM/MM calculations on human 2-Cys peroxiredoxin. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **33**, 584–596 (2015).

35. König, J. *et al.* Reaction Mechanism of Plant 2-Cys Peroxiredoxin. *J. Biol. Chem.* **278**, 24409–24420 (2003).
36. 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).
37. Parsonage, D. *et al.* Analysis of the Link between Enzymatic Activity and Oligomeric State in AhpC, a Bacterial Peroxiredoxin. *Biochemistry* **44**, 10583–10592 (2005).
38. Peskin, A. V. *et al.* The High Reactivity of Peroxiredoxin 2 with H₂O₂ Is Not Reflected in Its Reaction with Other Oxidants and Thiol Reagents. *J. Biol. Chem.* **282**, 11885–11892 (2007).
39. Ogusucu, R., Rettori, D., Munhoz, D. C., Soares Netto, L. E. & Augusto, O. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxyntirite: Rate constants by competitive kinetics. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 326–334 (2007).
40. Manta, B. *et al.* The peroxidase and peroxyntirite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. *Arch. Biochem. Biophys.* **484**, 146–154 (2009).
41. Portillo-Ledesma, S. *et al.* Differential Kinetics of Two-Cysteine Peroxiredoxin Disulfide Formation Reveal a Novel Model for Peroxide Sensing. *Biochemistry* **57**, 3416–3424 (2018).
42. Dalla Rizza, J., Randall, L. M., Santos, J., Ferrer-Sueta, G. & Denicola, A. Differential parameters between cytosolic 2-Cys peroxiredoxins, PRDX1 and PRDX2. *Protein Sci.* **28**, 191–201 (2019).
43. Trujillo, M. *et al.* Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: Taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **467**, 95–106 (2007).
44. Parsonage, D. *et al.* Dissecting Peroxiredoxin Catalysis: Separating Binding, Peroxidation, and Resolution for a Bacterial AhpC. *Biochemistry* **54**, 1567–1575 (2015).
45. Zeida, A. *et al.* Catalysis of Peroxide Reduction by Fast Reacting Protein Thiols: Focus Review. *Chem. Rev.* **119**, 10829–10855 (2019).
46. Dixon, S. J. *et al.* Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell* **149**, 1060–1072 (2012).
47. Cardozo, G. *et al.* Mitochondrial Peroxiredoxin 3 Is Rapidly Oxidized and Hyperoxidized by Fatty Acid Hydroperoxides. *Antioxidants* **12**, 408 (2023).
48. Wood, Z. A., Schröder, E., Robin Harris, J. & Poole, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 32–40 (2003).
49. Peskin, A. V. *et al.* Hyperoxidation of Peroxiredoxins 2 and 3. *J. Biol. Chem.* **288**, 14170–14177 (2013).
50. Haynes, A. C., Qian, J., Reisz, J. A., Furdui, C. M. & Lowther, W. T. Molecular Basis for the Resistance of Human Mitochondrial 2-Cys Peroxiredoxin 3 to Hyperoxidation. *J. Biol. Chem.* **288**, 29714–29723 (2013).
51. Cao, Z., Tavender, T. J., Roszak, A. W., Cogdell, R. J. & Bulleid, N. J. Crystal Structure of Reduced and of Oxidized Peroxiredoxin IV Enzyme Reveals a Stable Oxidized Decamer and a Non-disulfide-bonded Intermediate in the Catalytic Cycle. *J. Biol. Chem.* **286**, 42257–42266 (2011).
52. Bolduc, J. A. *et al.* Novel hyperoxidation resistance motifs in 2-Cys peroxiredoxins. *J. Biol. Chem.* **293**, 11901–11912 (2018).
53. Schröder, E. *et al.* Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7Å resolution. *Structure* **8**, 605–615 (2000).

54. Peskin, A. V. *et al.* Modifying the resolving cysteine affects the structure and hydrogen peroxide reactivity of peroxiredoxin 2. *J. Biol. Chem.* **296**, 100494 (2021).
55. Estelle, A. B. *et al.* Native state fluctuations in a peroxiredoxin active site match motions needed for catalysis. *Structure* **30**, 278-288.e3 (2022).
56. Kriznik, A. *et al.* Dynamics of a Key Conformational Transition in the Mechanism of Peroxiredoxin Sulfinylation. *ACS Catal.* **10**, 3326–3339 (2020).
57. Ådén, J. *et al.* Extraordinary μ s–ms backbone dynamics in *Arabidopsis thaliana* peroxiredoxin Q. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1814**, 1880–1890 (2011).
58. Perkins, A. *et al.* The Sensitive Balance between the Fully Folded and Locally Unfolded Conformations of a Model Peroxiredoxin. *Biochemistry* **52**, 8708–8721 (2013).
59. Holmgren, A. THIOREDOXIN. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 237–271 (1985).
60. Holmgren, A. & Lu, J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 120–124 (2010).
61. Holmgren, A. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J. Biol. Chem.* **254**, 9627–9632 (1979).
62. Holmgren, A. Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* **3**, 239–243 (1995).
63. Wiita, A. P. *et al.* Probing the chemistry of thioredoxin catalysis with force. *Nature* **450**, 124–127 (2007).
64. Qiu, W. *et al.* Dissection of complex protein dynamics in human thioredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 5366–5371 (2007).
65. Arnér, E. S. J. Focus on mammalian thioredoxin reductases — Important selenoproteins with versatile functions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1790**, 495–526 (2009).
66. Holmgren, A. & Bjornstedt, M. [21] Thioredoxin and thioredoxin reductase. in *Methods in Enzymology* vol. 252 199–208 (Elsevier, 1995).
67. Sandalova, T., Zhong, L., Lindqvist, Y., Holmgren, A. & Schneider, G. Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: Implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 9533–9538 (2001).
68. Poynton, R. A. *et al.* Kinetic analysis of structural influences on the susceptibility of peroxiredoxins 2 and 3 to hyperoxidation. *Biochem. J.* **473**, 411–421 (2016).
69. Biteau, B., Labarre, J. & Toledano, M. B. ATP-dependent reduction of cysteine–sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* **425**, 980–984 (2003).
70. Jönsson, T. J., Johnson, L. C. & Lowther, W. T. Structure of the sulphiredoxin–peroxiredoxin complex reveals an essential repair embrace. *Nature* **451**, 98–101 (2008).
71. Forshaw, T. E. *et al.* Specificity of Human Sulphiredoxin for Reductant and Peroxiredoxin Oligomeric State. *Antioxidants* **10**, 946 (2021).
72. Peskin, A. V. *et al.* Glutathionylation of the Active Site Cysteines of Peroxiredoxin 2 and Recycling by Glutaredoxin. *J. Biol. Chem.* **291**, 3053–3062 (2016).
73. Hanschmann, E.-M. Both Thioredoxin 2 and Glutaredoxin 2 Contribute to the Reduction of the Mitochondrial 2-Cys Peroxiredoxin Prx3*. **285**, (2010).

74. Nelson, K. J. *et al.* Experimentally Dissecting the Origins of Peroxiredoxin Catalysis. *Antioxid. Redox Signal.* **28**, 521–536 (2018).
75. Randall, L. M. *et al.* Unraveling the effects of peroxiredoxin 2 nitration; role of C-terminal tyrosine 193. *Free Radic. Biol. Med.* **141**, 492–501 (2019).
76. Sayed, A. A. & Williams, D. L. Biochemical Characterization of 2-Cys Peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **279**, 26159–26166 (2004).
77. Koo, K. H. *et al.* Regulation of Thioredoxin Peroxidase Activity by C-terminal Truncation. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**, 312–318 (2002).
78. Wang, X., Wang, L., Wang, X., Sun, F. & Wang, C. Structural insights into the peroxidase activity and inactivation of human peroxiredoxin 4. *Biochem. J.* **441**, 113–118 (2012).
79. Randall, L. M. *et al.* Nitration Transforms a Sensitive Peroxiredoxin 2 into a More Active and Robust Peroxidase. *J. Biol. Chem.* **289**, 15536–15543 (2014).
80. Salsbury, F. R., Yuan, Y., Knaggs, M. H., Poole, L. B. & Fetrow, J. S. Structural and Electrostatic Asymmetry at the Active Site in Typical and Atypical Peroxiredoxin Dimers. *J. Phys. Chem. B* **116**, 6832–6843 (2012).
81. Peskin, A. V. *et al.* Intra-dimer cooperativity between the active site cysteines during the oxidation of peroxiredoxin 2. *Free Radic. Biol. Med.* **158**, 115–125 (2020).
82. Wood, Z. A., Poole, L. B., Hantgan, R. R. & Karplus, P. A. Dimers to Doughnuts: Redox-Sensitive Oligomerization of 2-Cysteine Peroxiredoxins. *Biochemistry* **41**, 5493–5504 (2002).
83. Loberg, M. A. *et al.* Aromatic Residues at the Dimer–Dimer Interface in the Peroxiredoxin Tsa1 Facilitate Decamer Formation and Biological Function. *Chem. Res. Toxicol.* **32**, 474–483 (2019).
84. Himiyama, T. & Nakamura, T. Disassembly of the ring-type decameric structure of peroxiredoxin from *Aeropyrum pernix* K1 by amino acid mutation. *Protein Sci.* **29**, 1138–1147 (2020).
85. Pastor-Flores, D., Talwar, D., Pedre, B. & Dick, T. P. Real-time monitoring of peroxiredoxin oligomerization dynamics in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 16313–16323 (2020).
86. Tairum, C. A. *et al.* Catalytic Thr or Ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms. *Sci. Rep.* **6**, 33133 (2016).
87. Radjainia, M. *et al.* Cryo-Electron Microscopy Structure of Human Peroxiredoxin-3 Filament Reveals the Assembly of a Putative Chaperone. *Structure* **23**, 912–920 (2015).
88. Phillips, A. J. *et al.* Peroxiredoxin is a Versatile Self-Assembling Tecton for Protein Nanotechnology. *Biomacromolecules* **15**, 1871–1881 (2014).
89. Meissner, U., Schröder, E., Scheffler, D., Martin, A. G. & Harris, J. R. Formation, TEM study and 3D reconstruction of the human erythrocyte peroxiredoxin-2 dodecahedral higher-order assembly. *Micron* **38**, 29–39 (2007).
90. Saccoccia, F. *et al.* Moonlighting by Different Stressors: Crystal Structure of the Chaperone Species of a 2-Cys Peroxiredoxin. *Structure* **20**, 429–439 (2012).
91. Troussicot, L., Burmann, B. M. & Molin, M. Structural determinants of multimerization and dissociation in 2-Cys peroxiredoxin chaperone function. *Structure* **29**, 640–654 (2021).
92. Jang, H. H. *et al.* Two Enzymes in One: Two Yeast Peroxiredoxins Display Oxidative Stress-Dependent Switching from a Peroxidase to a Molecular Chaperone Function. (2004).

93. Hanzén, S. *et al.* Lifespan Control by Redox-Dependent Recruitment of Chaperones to Misfolded Proteins. *Cell* **166**, 140–151 (2016).
94. Troussicot, L., Vallet, A., Molin, M., Burmann, B. M. & Schanda, P. Disulfide-Bond-Induced Structural Frustration and Dynamic Disorder in a Peroxiredoxin from MAS NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **145**, 10700–10711 (2023).
95. Cao, Z., Bhella, D. & Lindsay, J. G. Reconstitution of the Mitochondrial PrxIII Antioxidant Defence Pathway: General Properties and Factors Affecting PrxIII Activity and Oligomeric State. *J. Mol. Biol.* **372**, 1022–1033 (2007).
96. Randall, L. *et al.* Structural changes upon peroxynitrite-mediated nitration of peroxiredoxin 2; nitrated Prx2 resembles its disulfide-oxidized form. *Arch. Biochem. Biophys.* **590**, 101–108 (2016).
97. Kim, S. Y. *et al.* Oligomerization and chaperone activity of a plant 2-Cys peroxiredoxin in response to oxidative stress. *Plant Sci.* **177**, 227–232 (2009).
98. Kamariah, N., Eisenhaber, B., Eisenhaber, F. & Grüber, G. Active site CP-loop dynamics modulate substrate binding, catalysis, oligomerization, stability, over-oxidation and recycling of 2-Cys Peroxiredoxins. *Free Radic. Biol. Med.* **118**, 59–70 (2018).
99. Yewdall, N. A. *et al.* Quaternary structure influences the peroxidase activity of peroxiredoxin 3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **497**, 558–563 (2018).
100. Conroy, F. *et al.* Engineering peroxiredoxin 3 to facilitate control over self-assembly. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **512**, 263–268 (2019).
101. Kitano, K., Niimura, Y., Nishiyama, Y. & Miki, K. Stimulation of Peroxidase Activity by Decamerization Related to Ionic Strength: AhpC Protein from *Amphibacillus xylanus*. *J. Biochem. (Tokyo)* **126**, 313–319 (1999).
102. Chauhan, R. & Mande, S. C. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv alkyl hydroperoxidase AhpC points to the importance of ionic interactions in oligomerization and activity. (2001).
103. Matsumura, T. *et al.* Dimer-Oligomer Interconversion of Wild-type and Mutant Rat 2-Cys Peroxiredoxin. *J. Biol. Chem.* **283**, 284–293 (2008).
104. Morais, M. A. B. *et al.* How pH Modulates the Dimer-Decamer Interconversion of 2-Cys Peroxiredoxins from the Prx1 Subfamily. *J. Biol. Chem.* **290**, 8582–8590 (2015).
105. Kristensen, P., Rasmussen, D. E. & Kristensen, B. I. Properties of Thiol-Specific Anti-oxidant Protein or Calpromotin in Solution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**, 127–131 (1999).
106. Filipovic, M. R., Zivanovic, J., Alvarez, B. & Banerjee, R. Chemical Biology of H₂S Signaling through Persulfidation. *Chem. Rev.* **118**, 1253–1337 (2018).
107. Gochlerner, G. B. Free oxygen and evolutionary progress. *J. Theor. Biol.* **75**, 467–486 (1978).
108. Turrens, J. F. Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain. *Biosci. Rep.* **17**, 3–8 (1997).
109. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain.
110. Sies, H., Berndt, C. & Jones, D. P. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 715–748 (2017).
111. Brookes, P. S. Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: An odd couple. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 12–23 (2005).
112. Fridovich, I. The Biology of Oxygen Radicals.

113. Fridovich, I. SUPEROXIDE RADICAL AND SUPEROXIDE DISMUTASES.
114. Sies, H. Oxidative Stress: Introductory remarks. in *Oxidative Stress* vol. 1 1–7 (Academic Press, INC, London, 1985).
115. Sies, H. What is Oxidative Stress? in *Oxidative Stress and Vascular Disease* (ed. Keaney, J. F.) 1–8 (Springer US, Boston, MA, 2000). doi:10.1007/978-1-4615-4649-8_1.
116. Abate, C., Patel, L., Rauscher, F. J. & Curran, T. Redox Regulation of Fos and Jun DNA-Binding Activity in Vitro. *Science* **249**, 1157–1161 (1990).
117. Klotz, L.-O. *et al.* Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol.* **6**, 51–72 (2015).
118. Corcoran, A. & Cotter, T. G. Redox regulation of protein kinases. *FEBS J.* **280**, 1944–1965 (2013).
119. Davies, M. J. Protein oxidation and peroxidation. *Biochem. J.* **473**, 805–825 (2016).
120. D’Aur eaux, B. & Toledano, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 813–824 (2007).
121. Czech, M. P., Lawrence, J. C. & Lynn, W. S. Evidence for the Involvement of Sulfhydryl Oxidation in the Regulation of Fat Cell Hexose Transport by Insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71**, 4173–4177 (1974).
122. Buchanan, B. B. & Balmer, Y. REDOX REGULATION: A Broadening Horizon. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**, 187–220 (2005).
123. Mieyal, J. J. & Chock, P. B. Posttranslational Modification of Cysteine in Redox Signaling and Oxidative Stress: Focus on S-Glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 471–475 (2012).
124. Bindoli, A. & Rigobello, M. P. Principles in Redox Signaling: From Chemistry to Functional Significance. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 1557–1593 (2013).
125. Forman, H. J., Maiorino, M. & Ursini, F. Signaling Functions of Reactive Oxygen Species. *Biochemistry* **49**, 835–842 (2010).
126. Winterbourn, C. C. The Biological Chemistry of Hydrogen Peroxide. in *Methods in Enzymology* vol. 528 3–25 (Elsevier, 2013).
127. Forman, H. J., Torres, M. & Fukuto, J. Redox Signaling. *Mol. Cell. Biochem.* **234/235**, 49–62 (2002).
128. Orrico, F. *et al.* Hydrogen peroxide diffusion across the red blood cell membrane occurs mainly by simple diffusion through the lipid fraction. *Free Radic. Biol. Med.* **226**, 389–396 (2025).
129. Henzler, T. & Steudle, E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. *J. Exp. Bot.* **51**, 2053–2066 (2000).
130. Bienert, G. P. *et al.* Specific Aquaporins Facilitate the Diffusion of Hydrogen Peroxide across Membranes *. *J. Biol. Chem.* **282**, 1183–1192 (2007).
131. Duve, C. D., Fell, H. B. & Brachet, J. The peroxisome: a new cytoplasmic organelle. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **173**, 71–83 (1997).
132. Boveris, A., Oshino, N. & Chance, B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **128**, 617–630 (1972).
133. Totter, J. R., De Dugros, E. C. & Riveiro, C. The Use of Chemiluminescent Compounds as Possible Indicators of Radical Production during Xanthine Oxidase Action. *J. Biol. Chem.* **235**, 1839–1842 (1960).
134. Goncalves, R. L. S., Quinlan, C. L., Perevoshchikova, I. V., Hey-Mogensen, M. & Brand, M. D. Sites of Superoxide and Hydrogen Peroxide Production by Muscle Mitochondria Assessed ex Vivo under Conditions Mimicking Rest and Exercise *. *J. Biol. Chem.* **290**, 209–227 (2015).

135. Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**, 1–13 (2009).
136. Starkov, A. A. *et al.* Mitochondrial α -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex Generates Reactive Oxygen Species. *J. Neurosci.* **24**, 7779–7788 (2004).
137. Bedard, K. & Krause, K.-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **87**, 245–313 (2007).
138. Sies, H. Role of Metabolic H₂O₂ Generation. *J. Biol. Chem.* **289**, 8735–8741 (2014).
139. Oka, O. B. V. & Bulleid, N. J. Forming disulfides in the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1833**, 2425–2429 (2013).
140. Schrader, M. & Fahimi, H. D. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1763**, 1755–1766 (2006).
141. Fujiki, Y. & Bassik, M. C. A New Paradigm in Catalase Research. *Trends Cell Biol.* **31**, 148–151 (2021).
142. Radi, R. *et al.* Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **266**, 22028–22034 (1991).
143. Chelikani, P., Fita, I. & Loewen, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **61**, 192–208 (2004).
144. Aebi, H. Catalase. in *Methods of Enzymatic Analysis (Second Edition)* (ed. Bergmeyer, H. U.) 673–684 (Academic Press, 1974). doi:10.1016/B978-0-12-091302-2.50032-3.
145. Switala, J. & Loewen, P. C. Diversity of properties among catalases. *Arch. Biochem. Biophys.* **401**, 145–154 (2002).
146. Kirkman, H. N. & Gaetani, G. F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 44–50 (2007).
147. Toppo, S., Vanin, S., Bosello, V. & Tosatto, S. C. E. Evolutionary and Structural Insights Into the Multifaceted Glutathione Peroxidase (Gpx) Superfamily. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1501–1514 (2008).
148. Flohé, L., Toppo, S., Cozza, G. & Ursini, F. A Comparison of Thiol Peroxidase Mechanisms. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 763–780 (2011).
149. Flohé, L. & Brigelius-Flohé, R. Selenoproteins of the glutathione system. in *Selenium* (ed. Hatfield, D. L.) 157–178 (Springer US, Boston, MA, 2001). doi:10.1007/978-1-4615-1609-5_14.
150. Winterbourn, C. C. & Hampton, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 549–561 (2008).
151. Barton, J. P., Packer, J. E. & Sims, R. J. Kinetics of the reaction of hydrogen peroxide with cysteine and cysteamine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1547–1549 (1973) doi:10.1039/P29730001547.
152. Poole, L. B., Karplus, P. A. & Claiborne, A. Protein Sulfenic Acids in Redox Signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **44**, 325–347 (2004).
153. Wardman, P. & von Sonntag, C. [3] Kinetic factors that control the fate of thiyl radicals in cells. in *Methods in Enzymology* vol. 251 31–45 (Academic Press, 1995).
154. Winterbourn, C. C. Superoxide as an intracellular radical sink. *Free Radic. Biol. Med.* **14**, 85–90 (1993).
155. Winterbourn, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 278–286 (2008).
156. Jones, D. P. & Sies, H. The Redox Code. *Antioxid. Redox Signal.* **23**, 734–746 (2015).

157. Toledano, M. B., Planson, A.-G. & Delaunay-Moisan, A. Reining in H₂O₂ for Safe Signaling. *Cell* **140**, 454–456 (2010).
158. Adimora, N. J., Jones, D. P. & Kemp, M. L. A Model of Redox Kinetics Implicates the Thiol Proteome in Cellular Hydrogen Peroxide Responses. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 731–743 (2010).
159. Stöcker, S., Van Laer, K., Mijuskovic, A. & Dick, T. P. The Conundrum of Hydrogen Peroxide Signaling and the Emerging Role of Peroxiredoxins as Redox Relay Hubs. *Antioxid. Redox Signal.* **28**, 558–573 (2018).
160. Denu, J. M. & Tanner, K. G. Specific and Reversible Inactivation of Protein Tyrosine Phosphatases by Hydrogen Peroxide: Evidence for a Sulfenic Acid Intermediate and Implications for Redox Regulation. *Biochemistry* **37**, 5633–5642 (1998).
161. Travasso, R. D. M., Sampaio Dos Aidos, F., Bayani, A., Abranches, P. & Salvador, A. Localized redox relays as a privileged mode of cytoplasmic hydrogen peroxide signaling. *Redox Biol.* **12**, 233–245 (2017).
162. Antunes, F. & Brito, P. M. Quantitative biology of hydrogen peroxide signaling. *Redox Biol.* **13**, 1–7 (2017).
163. Woo, H. A. *et al.* Inactivation of Peroxiredoxin I by Phosphorylation Allows Localized H₂O₂ Accumulation for Cell Signaling. *Cell* **140**, 517–528 (2010).
164. Chang, T.-S. *et al.* Regulation of Peroxiredoxin I Activity by Cdc2-mediated Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **277**, 25370–25376 (2002).
165. Flohé, L. Changing Paradigms in Thiology. in *Methods in Enzymology* vol. 473 1–39 (Elsevier, 2010).
166. Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.-B., Vinh, J. & Toledano, M. B. A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* **111**, 471–481 (2002).
167. Veal, E. A., Ross, S. J., Malakasi, P., Peacock, E. & Morgan, B. A. Ybp1 Is Required for the Hydrogen Peroxide-induced Oxidation of the Yap1 Transcription Factor. *J. Biol. Chem.* **278**, 30896–30904 (2003).
168. Veal, E. A. *et al.* A 2-Cys Peroxiredoxin Regulates Peroxide-Induced Oxidation and Activation of a Stress-Activated MAP Kinase. *Mol. Cell* **15**, 129–139 (2004).
169. Antunes, F. & Salvador, A. How Gradients and Microdomains Determine H₂O₂ Redox Signaling. in *Peroxiporins* 5–20 (CRC Press, Boca Raton, 2023). doi:10.1201/9781003160649-2.
170. Stöcker, S., Maurer, M., Ruppert, T. & Dick, T. P. A role for 2-Cys peroxiredoxins in facilitating cytosolic protein thiol oxidation. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 148–155 (2018).
171. Fomenko, D. E. *et al.* Thiol peroxidases mediate specific genome-wide regulation of gene expression in response to hydrogen peroxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 2729–2734 (2011).
172. Van Dam, L. *et al.* The Human 2-Cys Peroxiredoxins form Widespread, Cysteine-Dependent- and Isoform-Specific Protein-Protein Interactions. *Antioxidants* **10**, 627 (2021).
173. Jarvis, R. M., Hughes, S. M. & Ledgerwood, E. C. Peroxiredoxin 1 functions as a signal peroxidase to receive, transduce, and transmit peroxide signals in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 1522–1530 (2012).
174. Sobotta, M. C. *et al.* Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 64–70 (2015).
175. Talwar, D., Messens, J. & Dick, T. P. A role for annexin A2 in scaffolding the peroxiredoxin 2–STAT3 redox relay complex. *Nat. Commun.* **11**, 4512 (2020).

176. Tachibana, T. *et al.* A Major Peroxiredoxin-induced Activation of Yap1 Transcription Factor Is Mediated by Reduction-sensitive Disulfide Bonds and Reveals a Low Level of Transcriptional Activation *. *J. Biol. Chem.* **284**, 4464–4472 (2009).
177. Irokawa, H. *et al.* Redox-dependent Regulation of Gluconeogenesis by a Novel Mechanism Mediated by a Peroxidatic Cysteine of Peroxiredoxin. *Sci. Rep.* **6**, 33536 (2016).
178. Barranco-Medina, S., Kakorin, S., Lázaro, J. J. & Dietz, K.-J. Thermodynamics of the Dimer–Decamer Transition of Reduced Human and Plant 2-Cys Peroxiredoxin. *Biochemistry* **47**, 7196–7204 (2008).
179. Liebthal, M., Kushwah, M. S., Kukura, P. & Dietz, K.-J. Single molecule mass photometry reveals the dynamic oligomerization of human and plant peroxiredoxins. *iScience* **24**, 103258 (2021).
180. Riener, C. K., Kada, G. & Gruber, H. J. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, 266–276 (2002).
181. Hansen, R. E., Østergaard, H., Nørgaard, P. & Winther, J. R. Quantification of protein thiols and dithiols in the picomolar range using sodium borohydride and 4,4'-dithiodipyridine. *Anal. Biochem.* **363**, 77–82 (2007).
182. Nelson, D. P. & Kiesow, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25° C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal. Biochem.* **49**, 474–478 (1972).
183. Chen, Y. & Barkley, M. D. Toward Understanding Tryptophan Fluorescence in Proteins. *Biochemistry* **37**, 9976–9982 (1998).
184. Ross, J. A. & Jameson, D. M. Time-resolved methods in biophysics. 8. Frequency domain fluorometry: applications to intrinsic protein fluorescence. *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 1301–1312 (2008).
185. Gratton, E. *et al.* Fluorescence lifetime distribution of folded and unfolded proteins. *Int. J. Quantum Chem.* **42**, 1479–1489 (1992).
186. Albani, J. R. Origin of Tryptophan Fluorescence Lifetimes Part 1. Fluorescence Lifetimes Origin of Tryptophan Free in Solution. *J. Fluoresc.* **24**, 93–104 (2014).
187. Beechem, J. M. & Brand, L. TIME-RESOLVED FLUORESCENCE OF PROTEINS. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 43–71 (1985).
188. Alcalá, J. R., Gratton, E. & Prendergast, F. G. Interpretation of fluorescence decays in proteins using continuous lifetime distributions. *Biophys. J.* **51**, 925–936 (1987).
189. Swaminathan, R., Krishnamoorthy, G. & Periasamy, N. Similarity of fluorescence lifetime distributions for single tryptophan proteins in the random coil state. *Biophys. J.* **67**, 2013–2023 (1994).
190. Malacrida, L., Ranjit, S., Jameson, D. M. & Gratton, E. The Phasor Plot: A Universal Circle to Advance Fluorescence Lifetime Analysis and Interpretation. *Annu. Rev. Biophys.* **50**, 575–593 (2021).
191. Weber, G. Resolution of the Fluorescence Lifetimes in a Heterogeneous System by Phase and Modulation Measurements.
192. Jameson, D. M., Gratton, E. & Hall, R. D. The Measurement and Analysis of Heterogeneous Emissions by Multifrequency Phase and Modulation Fluorometry. *Appl. Spectrosc. Rev.* **20**, 55–106 (1984).
193. Barbieri, B., Terpetschnig, E. & Jameson, D. M. Frequency-domain fluorescence spectroscopy using 280-nm and 300-nm light-emitting diodes: Measurement of proteins and protein-related fluorophores. *Anal. Biochem.* **344**, 298–300 (2005).

194. Villar, S. F. *et al.* Fluorescence Lifetime Phasor Analysis of the Decamer–Dimer Equilibrium of Human Peroxiredoxin 1. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 5260 (2022).
195. Ranjit, S., Malacrida, L., Jameson, D. M. & Gratton, E. Fit-free analysis of fluorescence lifetime imaging data using the phasor approach. *Nat. Protoc.* **13**, 1979–2004 (2018).
196. James, N. G., Ross, J. A., Štefl, M. & Jameson, D. M. Applications of phasor plots to in vitro protein studies. *Anal. Biochem.* **410**, 70–76 (2011).
197. Carvalho, L. A. C. *et al.* Urate hydroperoxide oxidizes human peroxiredoxin 1 and peroxiredoxin 2. *J. Biol. Chem.* **292**, 8705–8715 (2017).
198. Selvaggio, G., Coelho, P. M. B. M. & Salvador, A. Mapping the phenotypic repertoire of the cytoplasmic 2-Cys peroxiredoxin – Thioredoxin system. 1. Understanding commonalities and differences among cell types. *Redox Biol.* **15**, 297–315 (2018).
199. Activation of active-site cysteine residues in the peroxiredoxin-type trypanoxin peroxidase of *Crithidia fasciculata* - Montemartini - 1999 - European Journal of Biochemistry - Wiley Online Library. <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1432-1327.1999.00656.x>.
200. Flohé, L. *et al.* Trypanoxin Peroxidase of *Leishmania donovani*: Molecular Cloning, Heterologous Expression, Specificity, and Catalytic Mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**, 324–335 (2002).
201. Villar, S. F. *et al.* Kinetic and structural assessment of the reduction of human 2-Cys peroxiredoxins by thioredoxins. *FEBS J.* **291**, 778–794 (2024).
202. Studier, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* **41**, 207–234 (2005).
203. Vakser, I. A. Protein-Protein Docking: From Interaction to Interactome. *Biophys. J.* **107**, 1785–1793 (2014).
204. Porter, K. A., Desta, I., Kozakov, D. & Vajda, S. What method to use for protein–protein docking? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **55**, 1–7 (2019).
205. Van Zundert, G. C. P. *et al.* The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *J. Mol. Biol.* **428**, 720–725 (2016).
206. Honorato, R. V. *et al.* The HADDOCK2.4 web server for integrative modeling of biomolecular complexes. *Nat. Protoc.* 1–23 (2024) doi:10.1038/s41596-024-01011-0.
207. Maier, J. A. *et al.* ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 3696–3713 (2015).
208. Pedron, F. N., Messias, A., Zeida, A., Roitberg, A. E. & Estrin, D. A. Novel Lennard-Jones Parameters for Cysteine and Selenocysteine in the AMBER Force Field. *J. Chem. Inf. Model.* **63**, 595–604 (2023).
209. Case, D. A. *et al.* AMBER 2018. (2018).
210. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD – Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38 (1996).
211. Case, D. A. *et al.* AmberTools. *J. Chem. Inf. Model.* **63**, 6183–6191 (2023).
212. Rastelli, G., Rio, A. D., Degliesposti, G. & Sgobba, M. Fast and accurate predictions of binding free energies using MM-PBSA and MM-GBSA. *J. Comput. Chem.* **31**, 797–810 (2010).
213. Chen, F. *et al.* Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 6. Capability to predict protein–protein binding free energies and re-rank binding poses generated by protein–protein docking. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 22129–22139 (2016).

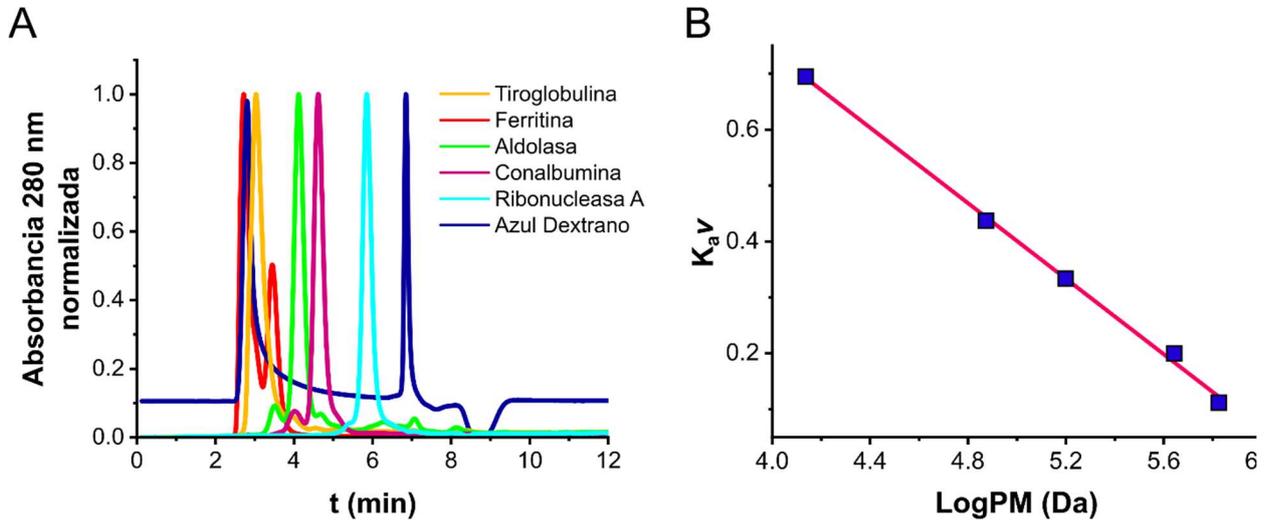
214. Noguera, M. E. *et al.* Structural variability of *E. coli* thioredoxin captured in the crystal structures of single-point mutants. *Sci. Rep.* **7**, 42343 (2017).
215. McDaniel, D. H. & Smoot, C. R. Approximations in the Kinetics of Consecutive Reactions. *J. Phys. Chem.* **60**, 966–969 (1956).
216. Forman-Kay, J. D., Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. Relationship between electrostatics and redox function in human thioredoxin: characterization of pH titration shifts using two-dimensional homo- and heteronuclear NMR. *ACS Publications* <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00128a019> (2002) doi:10.1021/bi00128a019.
217. Kallis, G. B. & Holmgren, A. Differential reactivity of the functional sulfhydryl groups of cysteine-32 and cysteine-35 present in the reduced form of thioredoxin from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **255**, 10261–10265 (1980).
218. Mössner, E., Huber-Wunderlich, M. & Glockshuber, R. Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases. *Protein Sci.* **7**, 1233–1244 (1998).
219. Nelson, K. J., Day, A. E., Zeng, B.-B., King, S. B. & Poole, L. B. Isotope-coded, iodoacetamide-based reagent to determine individual cysteine pKa values by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **375**, 187–195 (2008).
220. Li, H., Hanson, C., Fuchs, J. A., Woodward, C. & George J. Thomas, J. Determination of the pKa values of active-center cysteines, cysteines-32 and -35, in *Escherichia coli* thioredoxin by Raman spectroscopy. *ACS Publications* <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00073a012> (2002) doi:10.1021/bi00073a012.
221. Cho, K. J. *et al.* Crystal Structure of Dimeric Human Peroxiredoxin-1 C83S Mutant. *Bull. Korean Chem. Soc.* **36**, 1543–1545 (2015).
222. Singh, R. & Whitesides, G. M. Comparisons of rate constants for thiolate-disulfide interchange in water and in polar aprotic solvents using dynamic proton NMR line shape analysis. *ACS Publications* <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja00159a046> (2002) doi:10.1021/ja00159a046.
223. Ferrer-Sueta, G. Chapter 2 - Chemical basis of cysteine reactivity and specificity: Acidity and nucleophilicity. in *Redox Chemistry and Biology of Thiols* (eds. Alvarez, B., Comini, M. A., Salinas, G. & Trujillo, M.) 19–58 (Academic Press, 2022). doi:10.1016/B978-0-323-90219-9.00014-5.
224. Vicker, S. L. *et al.* Broader than expected tolerance for substitutions in the WCGPCK catalytic motif of yeast thioredoxin 2. *Free Radic. Biol. Med.* **178**, 308–313 (2022).
225. Langford, T. F., Deen, W. M. & Sikes, H. D. A mathematical analysis of Prx2-STAT3 disulfide exchange rate constants for a bimolecular reaction mechanism. *Free Radic. Biol. Med.* **120**, 239–245 (2018).
226. Grill, D. *et al.* Bridging of membrane surfaces by annexin A2. *Sci. Rep.* **8**, 14662 (2018).
227. Hakobyan, D., Gerke, V. & Heuer, A. Modeling of annexin A2—Membrane interactions by molecular dynamics simulations. *PLOS ONE* **12**, e0185440 (2017).
228. Mosharov, E., Cranford, M. R. & Banerjee, R. The Quantitatively Important Relationship between Homocysteine Metabolism and Glutathione Synthesis by the Transsulfuration Pathway and Its Regulation by Redox Changes. *Biochemistry* **39**, 13005–13011 (2000).

229. McCorvie, T. J. *et al.* Architecture and regulation of filamentous human cystathionine beta-synthase. *Nat. Commun.* **15**, 2931 (2024).
230. Niu, W. *et al.* Allosteric control of human cystathionine β -synthase activity by a redox active disulfide bond. *J. Biol. Chem.* **293**, 2523–2533 (2018).

Anexo

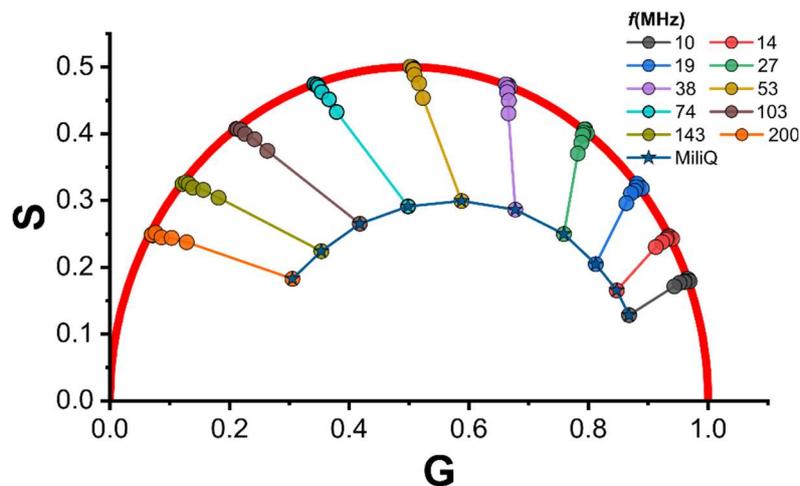
5.1. Figuras

5.1.1. Calibración de la columna Superdex 200 5/150 GL (Cytiva)



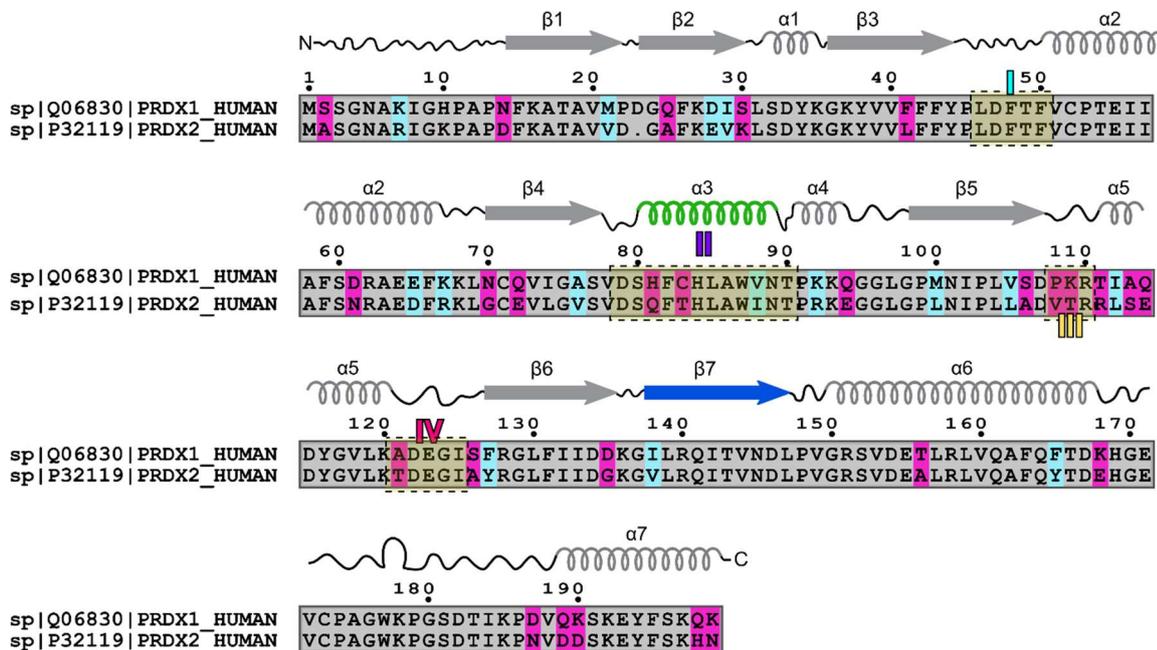
En la parte **A**, se muestran los cromatogramas superpuestos de las corridas de cada uno de los estándares de peso molecular y el azul dextrano (para definir el volumen “muerto” de la columna). Para el estándar de ferritina se tomó en cuenta el segundo pico, ya que el primero tiene el mismo tiempo de retención que el dextrano, por lo que podría representar agregados de ferritina de muy alto peso molecular. Si bien la señal registrada fue de absorbancia a 280 nm, los tiempos de retención correspondientes a los picos de cada estándar fueron corregidos por la diferencia de distancia que hay entre el detector de absorbancia y fluorescencia para poder estimar pesos moleculares en los cromatogramas registrados por fluorescencia. **B**. Coeficiente de retención (K_{av}) en función del logaritmo del peso molecular (PM) de los 5 estándares. Los volúmenes fueron calculados a partir del flujo y el tiempo de retención de los picos y corregidos por la diferencia de distancia entre los detectores de absorbancia y fluorescencia.

5.1.2. Efecto de la dilución de la señal en experimentos de fasores



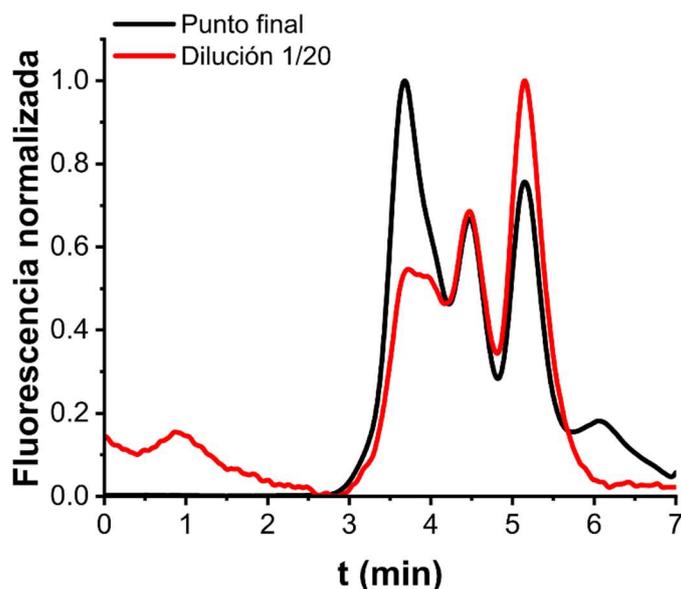
En la figura se muestra el gráfico de fasores (realizado en las mismas condiciones que los experimentos para las proteínas) de diluciones consecutivas de NATA en un rango de absorbancias de 1.6 a 0.0015. Cada punto (círculos de colores) representa una absorbancia (concentración) de NATA distinta. Las estrellas representan el fador del agua MilliQ que se usó para preparar la NATA. Este resultado muestra como la dilución del fluoróforo define una trayectoria en el gráfico, que va de forma recta desde el punto de mayor concentración hacia el punto que representa la señal de fondo (en este caso el agua MilliQ). A partir de este resultado sabemos que siempre tendremos una trayectoria adicional en los experimentos en los que se intente estudiar la oligomerización/interacción de proteínas por dilución.

5.1.3. Alineamiento de *HsPrx1* y *HsPrx2*



Alineamiento estructural de las secuencias aminoacídicas de *HsPrx1* y *HsPrx2*. Los residuos conservados tienen fondo gris, los que no están conservados tienen fondo magenta y los que no están conservados, pero sí fisicoquímicamente relacionados, tienen fondo celeste. Los recuadros amarillos transparentes señalan las regiones de la interfase de decamerización (regiones I a IV). La representación de los elementos de estructura secundaria es la misma que fue utilizada en la **Figura 1.19**.

5.1.4. Dilución de decámeros covalentes



En esta figura se comparan los cromatogramas del último punto medido de la reacción entre $HsPrx1(S)_2$ y H_2O_2 y el de una dilución 1/20 del mismo. La concentración final de $HsPrx1$ en el cromatograma de dilución es de 50 nM. Teniendo en cuenta los resultados presentados en la **Figura 2.8**, esperamos tener mayoritariamente dímeros a esa concentración de $HsPrx1(S)_2$. Si bien se observa que la proporción de dímeros aumenta y la de decámeros disminuye, el pico correspondiente a los tetrámeros no cambia.

5.1.5. Reacción de peroxidación de $HsPrx2$ en presencia de urea 2M

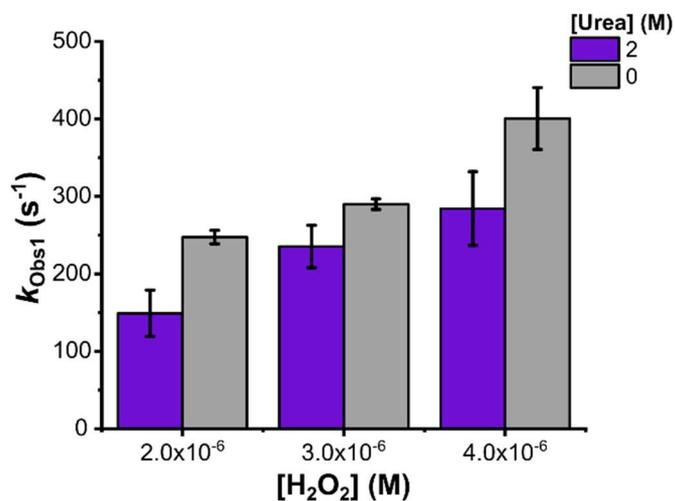
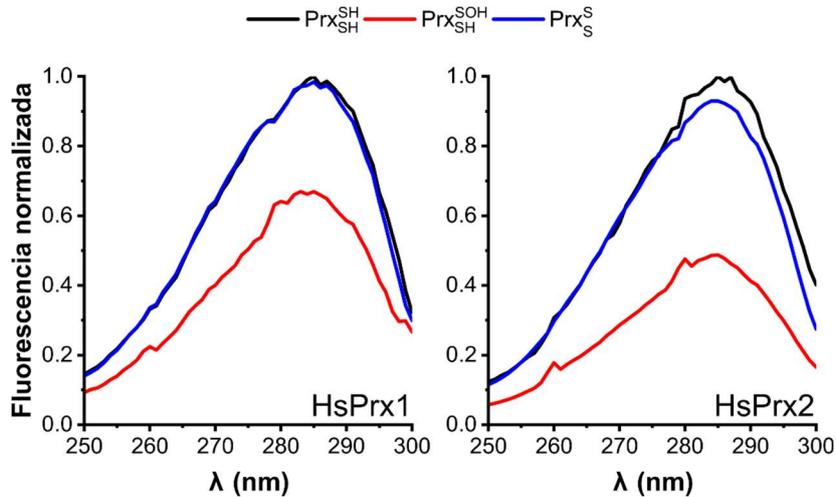


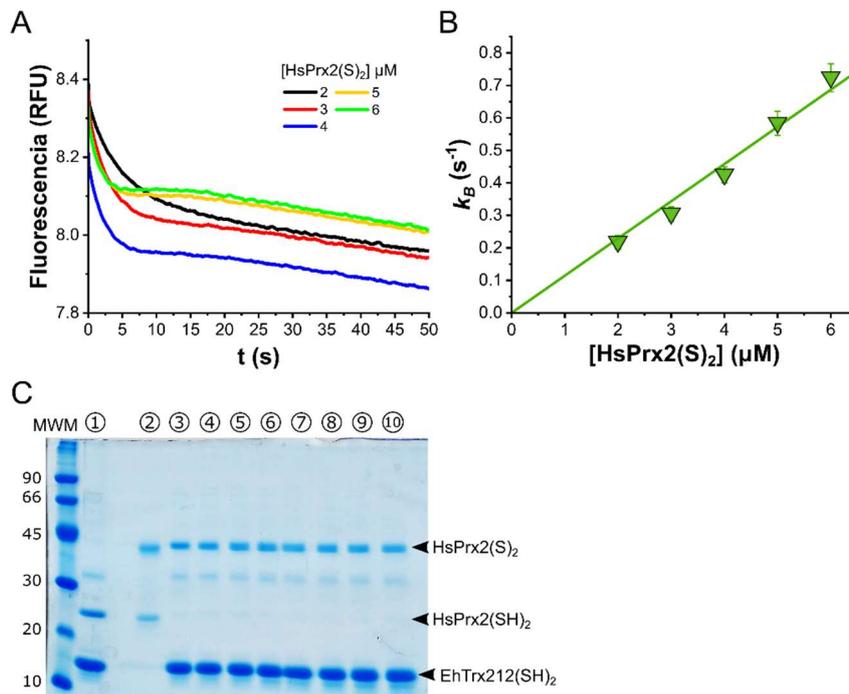
Gráfico de constante de velocidad de formación de C_pSOH de $HsPrx2$ en ausencia o presencia de 2 M Urea. Los resultados representan el promedio \pm desviación estándar de 10 repeticiones.

5.1.6. Espectros de excitación de *HsPrx1* y *HsPrx2* en distintos estados de oxidación



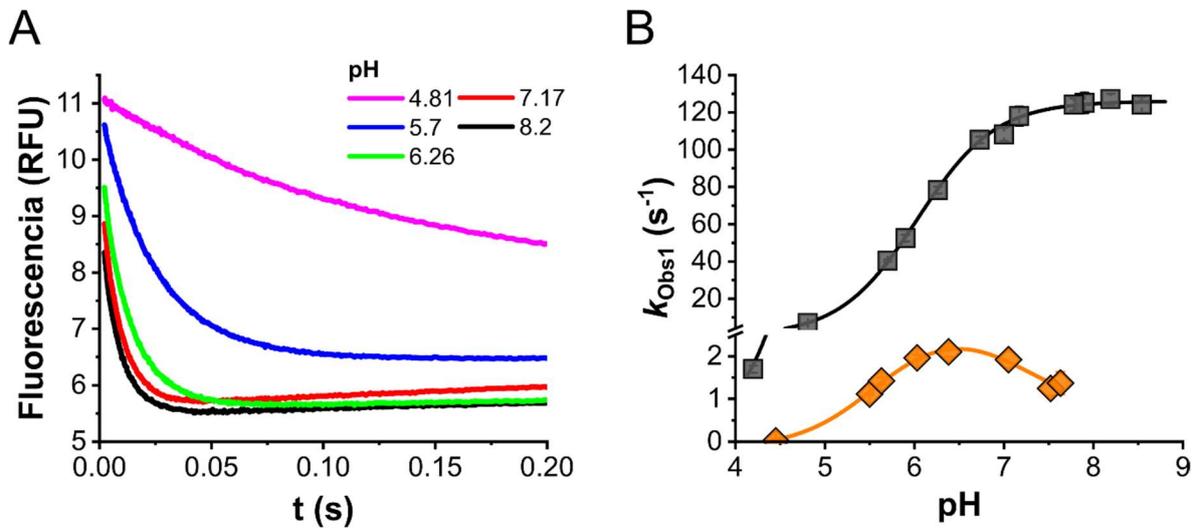
Espectros de excitación de *HsPrx1* y *HsPrx2* en las formas ditiol, C_P SOH y C_P - C_R , reconstruidos de los cursos temporales de oxidación de $0.5 \mu\text{M}$ *HsPrx*(SH) $_2$ con $1 \mu\text{M}$ H_2O_2 . El experimento fue repetido en intervalos de 1 nm.

5.1.7. Reducción de *HsPrx2*(S) $_2$ con *TbTxn* y *EhTrx212*

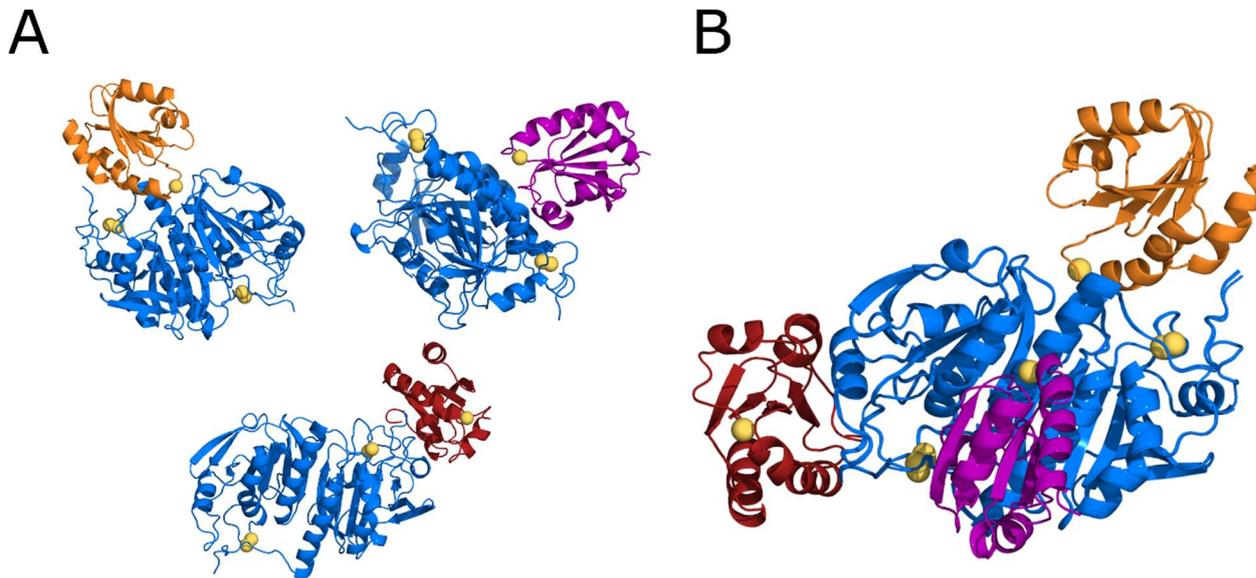


En los paneles **A** y **B**, se muestran los cursos temporales de emisión de fluorescencia para la reducción de *HsPrx2*(S) $_2$ con *TbTxn*(SH) $_2$ y el gráfico del descenso exponencial (k_B) de la señal en función de la concentración de *HsPrx2*(S) $_2$. El experimento fue realizado de forma idéntica a la reducción por las otras Trx. En este caso no se observó el ascenso en la señal debido a que k_B tuvo una velocidad similar a k_S en todas las concentraciones de *HsPrx2* ensayadas. Al no estar espaciadas en el tiempo, el descenso y aumento simultáneo de la fluorescencia hace que no se vea un cambio neto en la señal. Los resultados representan el promedio \pm desviación estándar de 10 repeticiones. En **C**, se muestra el resultado de un experimento de cinética de reducción de $1.8 \mu\text{M}$ *HsPrx2*(S) $_2$ con $18 \mu\text{M}$ *EhTrx212*(SH) $_2$. Las proteínas se incubaron en una mezcla de reacción, a partir de la cual se sacaron alícuotas de $30 \mu\text{L}$ a distintos tiempos. Las alícuotas se mezclaron con NEM y amortiguador de la muestra de electroforesis en una solución con una concentración final de NEM de 12.3 mM y volumen final de $40 \mu\text{L}$. Carriles: **1.** Mezcla de reacción + 100 mM DTT. **2.** *HsPrx2*(S) $_2$. **3.** 0 min. **4.** 30 min. **5.** 1 h. **6.** 2 h. **7.** 3 h. **8.** 4 h. **9.** 5 h. **10.** 6 h.

5.1.8. Oxidación de *HsPrx2* en función del pH

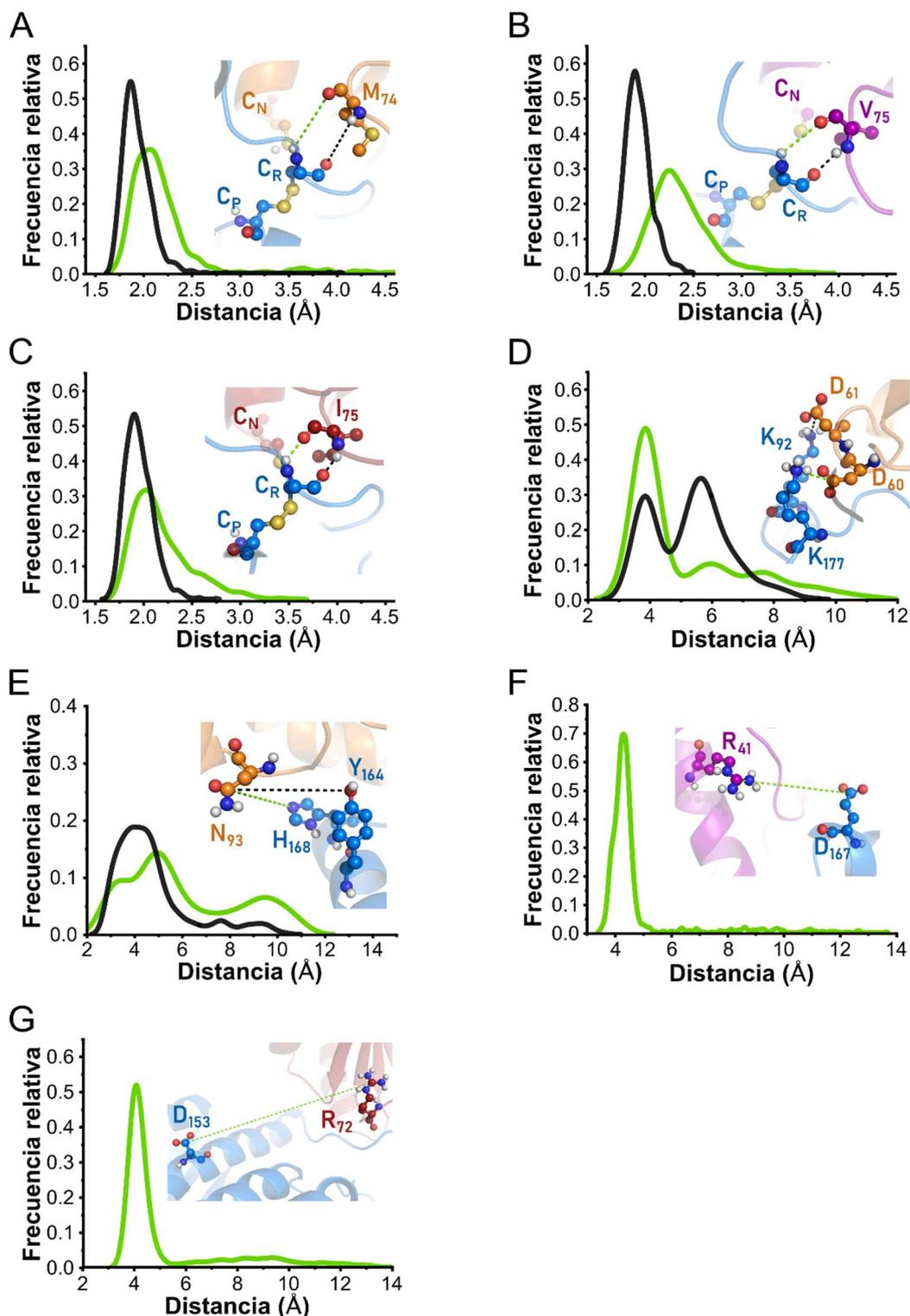


5.1.9. Docking a ciegas



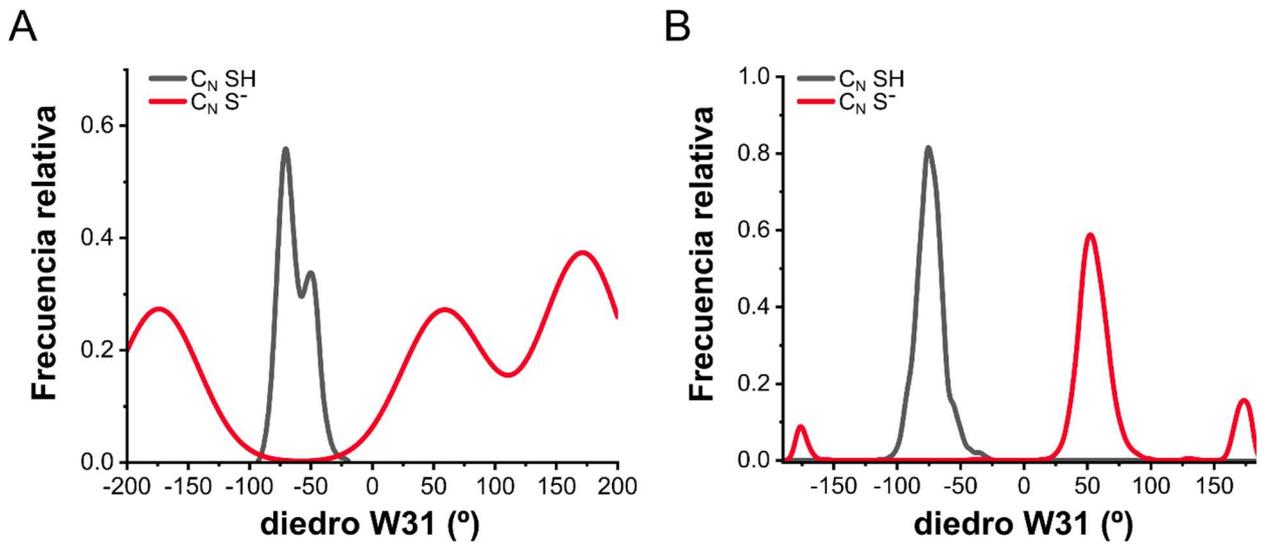
Complejos obtenidos a partir del docking a ciegas (sin introducir la información de la sección 3.1.3). El código de colores para *HsPrx2* y las Trx es el mismo de la Figura 3.14. En **A** se muestran los tres complejos, con las estructuras de las proteínas en formato “cartoon” y los átomos de azufre de C_P, C_R y C_N representados como esferas amarillas. **B**. Alineamiento de los tres complejos centrado en *HsPrx2*.

5.1.10. Distancias relevantes en las simulaciones de los complejos *HsPrx2*-Trx



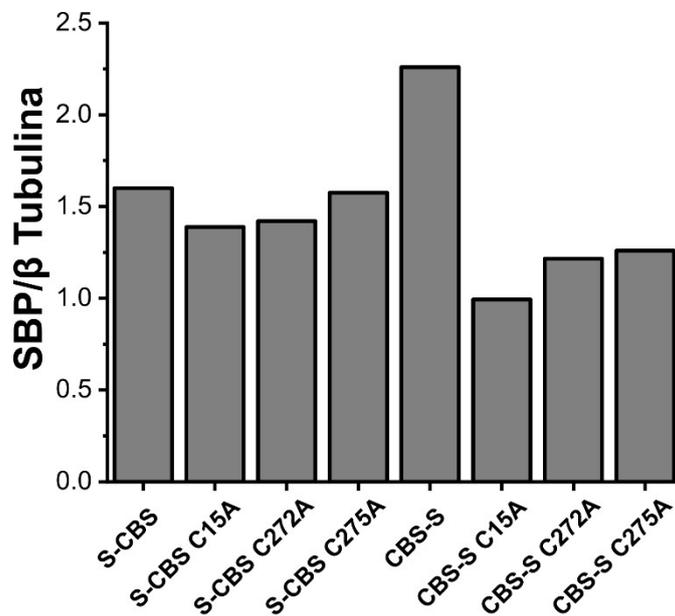
Gráficos de frecuencia relativa de distintas distancias durante las simulaciones de 500 ns. **A-C.** Distancias entre el protón del nitrógeno amida de C_R y el oxígeno carbonílico (línea verde) y el oxígeno carbonílico de C_R y el protón del nitrógeno amida (línea negra), de M74 (*HsTrx1*), V75 (*HsTrx2*) e I75 (*EcTrx*). **D.** La línea verde indica la distancia entre el nitrógeno ζ de K177 (*HsPrx2*) y el carbono γ de D60 (*HsTrx1*), la línea negra indica la distancia entre el nitrógeno ζ de K92 (*HsPrx2*) y el carbono γ de D61 (*HsTrx1*). **E.** La línea verde indica la distancia entre el carbono γ de N93 (*HsTrx1*) y el nitrógeno π de H168 (*HsPrx2*), la línea negra indica la distancia entre el mismo carbono de N93 y oxígeno del fenol de Y164 (*HsPrx2*). **F.** Distancia entre el carbono ζ de R41 (*HsTrx2*) y el carbono γ de D167 (*HsPrx2*). **G.** Distancia entre el carbono γ de D153 (*HsPrx2*) y el carbono ζ de R72 (*EcTrx*).

5.1.11. Cambios conformacionales de W31 en *HsTrx2* y *EcTrx*



Frecuencia relativa del diedro de W31 en las simulaciones de los complejos entre *HsPrx2(S)₂-HsTrx2* (A) y *HsPrx2(S)₂-EcTrx* (B), con C_N en su forma tiol (líneas grises) o tiolato (líneas rojas).

5.1.12. Expresión construcciones *HsCBS*



Expresión de las construcciones de *HsCBS* wt y mutantes de Cys con SBP en el N- o C-terminal normalizados por la banda de β-tubulina.

5.2. Otros documentos

5.2.1. Relevamiento de complejos entre Trx y sustratos en el PDB

La idea fue observar el posicionamiento y orientación de Trx en estos complejos para ver si tiene sustento experimental el posicionamiento elegido para el docking de los complejos Prx-Trx, principalmente para apoyar el procedimiento de anclar la cadena principal de C_R a la del residuo en la posición 74-75. La interacción es protón de N-amida con oxígeno de carbonilo.

PDB id	Participantes del complejo	Técnica experimental	¿Cumple con estrategia de docking?	Residuo que interacciona con la cadena principal de C _R
1CQH	<i>HsTrx1</i> disulfuro mixto con péptido de la subunidad P50 de NFKB.	RMN	SÍ	Una Thr que está en lugar de la Met en la secuencia original
1MDI	Misma idea que la anterior pero distinto péptido	RMN	NO	Está mirando hacia afuera de la cadena principal de C _R
1T7P	ADN polimerasa de T7 con <i>EcTrx</i>	Rayos X 2.2 Å	PARCIALMENTE	No hay una Cys interaccionando con la posición 74 o 75, pero si hay interacción con la cadena principal de una Thr
2IPA	Arsenato reductasa y Trx de <i>Bacillus subtilis</i>	RMN	SÍ	Ile 75
2O8V	PAPS reductasa y <i>EcTrx</i> en <i>E.coli</i>	Rayos X 3 Å	SÍ	Ile 75
3PIN	Msr1 y Trx2 de levadura	Rayos X 2.7 Å	SÍ	Es una Met, al igual que para <i>HsTrx1</i>
3QFB	<i>HsTrxR</i> con hTrx1	Rayos X 2.6 Å	SÍ	Met 74
4LL4	<i>HsTrx1</i> con TXNIP	Rayos X 2.7 Å	SÍ	Met 74
4PUF	<i>HsTrx1</i> con SlrP de <i>Salmonella</i>	Rayos X 3.3 Å	SÍ	Met 74, pero en lugar de haber una Cys hay una Ser en la SlrP
5HQP	HsERp44 (una PDI) con HsPrx4	Rayos X 2.6 Å	SÍ	En este caso la cadena principal de una Tyr interacciona con la C _R de <i>HsPrx4</i>
6GND	Ferredoxina-Flavina TrxR y Trx de <i>Clostridium acetobutylicum</i>	Rayos X 2.89 Å	NO	La responsable sería una Ala cuya cadena principal no llega a encajar bien con el de la Cys
6YEV	MsrA con <i>EcTrx</i> en <i>E.coli</i> . <i>EcTrx</i> sin Cys 35	Rayos X 2.94 Å	SÍ	Ile 75
4DSS	Ahp1 (Familia Prx5) con Trx2 sin Cys 35 en levadura	Rayos X 2.10 Å	SÍ	Met 73

5.2.2. Script selección residuos de interfase a partir de las simulaciones

```
#!/bin/bash

# Borrar archivos anteriores para que no se duplique informacion
#:rm IntRes_Prx.dat IntRes_Trx.dat rPrx.dat rTrx.dat

# Para Prx
# Crear lista de residuos con el criterio de que la fraccion total de contactos sea >= 2% (criterio)
awk '$3>=2 {print $1}' Contacts_respairs.dat | tail -n+2 | sort -u > IntRes_Prx.dat

# Calcular contactos totales de cada residuo en la lista, tomando contactos que aparecen en >=150 frames (criterio)
for i in $(cat IntRes_Prx.dat)
do
    grep $i Contacts.dat | awk '$3>=150 {print $3}' | awk '{s+=$1}END{print s}' >> rPrx.dat
done

# Combinar salidas para crear archivo que de la cantidad de contactos por residuo

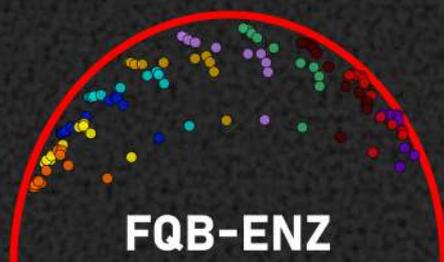
paste IntRes_Prx.dat rPrx.dat | column -s '\t' -tn > iContacts_prx.dat

# Para Trx

awk '$3>=2 {print $2}' Contacts_respairs.dat | tail -n+2 | sort -u > IntRes_Trx.dat
#
for i in $(cat IntRes_Trx.dat)
do
    grep $i Contacts.dat | awk '$3>=150 {print $3}' | awk '{s+=$1}END{print s}' >> rTrx.dat
done
#
paste IntRes_Trx.dat rTrx.dat | column -s '\t' -tn > iContacts_trx.dat
```

5.2.3. Lista de sistemas simulados

Nombre del sistema	Estructura inicial	Detalles	Tiempo simulado (ns)
<i>HsTrx1-HsPrx2</i>	Docking guiado	Restricción entre C_N y C_R (5 Å); C_NSH	500
<i>HsTrx1-HsPrx2</i>	Docking guiado	Restricción entre C_N y C_R (5 Å); C_NS^-	500
<i>HsTrx1-HsPrx2</i>	Docking guiado	Libre; C_NSH	500
<i>HsTrx1-HsPrx2</i>	Docking guiado	Libre; C_NS^-	500
<i>HsTrx1-HsPrx2</i>	Estructura obtenida de simulación anterior	Disulfuro C_N-C_R ; C_PSH	500
<i>HsTrx1</i>	1TRV	C_NSH	500
<i>HsTrx1</i>	1TRV	C_NS^-	500
<i>HsTrx2-HsPrx2</i>	Docking guiado	Restricción entre C_N y C_R (5 Å); C_NSH	500
<i>HsTrx2-HsPrx2</i>	Docking guiado	Restricción entre C_N y C_R (5 Å); C_NS^-	500
<i>HsTrx2-HsPrx2</i>	Docking guiado	Libre; C_NSH	500
<i>HsTrx2-HsPrx2</i>	Docking guiado	Libre; C_NS^-	500
<i>HsTrx2</i>	1UVZ	C_NSH	500
<i>HsTrx2</i>	1UVZ	C_NS^-	500
<i>EcTrx-HsPrx2</i>	Docking guiado	Restricción entre C_N y C_R (5 Å); C_NSH	500
<i>EcTrx-HsPrx2</i>	Docking guiado	Restricción entre C_N y C_R (5 Å); C_NS^-	500
<i>EcTrx</i>	1XOB	C_NSH	500
<i>EcTrx</i>	1XOB	C_NS^-	500



Febrero 2025